文章编号:1000-5404(2006)07-0677-04

论著

# 人参多糖对移植性人白血病模型小鼠作用观察

陈地龙,李 静,刘永刚,王亚平,王建伟,郑 敏,姜 蓉 (重庆医科大学基础医学院组织胚胎学教研室,重庆市生物化学与分子药理学实验室,重庆 400016)

**提 要:目的** 建立重度联合免疫缺陷(SCID)小鼠人白血病模型,观察人参多糖在体内对白血病细胞的药理学作用。**方法** 在SCID小鼠尾静脉分别接种K562细胞建立SCID小鼠人白血病模型,应用组织细胞化学、RT-PCR、流式细胞术、组织病理监测在给予人参多糖前后白血病模型SCID小鼠的外周血、骨髓、肝、脾中的白血病细胞。**结果** SCID小鼠人白血病模型外周血象在疾病早期无明显变化,第18天白细胞数略有升高,光镜下可检测到1%~4%人白血病细胞,病程后期,白细胞明显增高,血涂片检查人白血病细胞占10%;经GPS注射后,SCID小鼠一般状况明显好于对照组,其肺、肾等脏器的炎症及病理变化减轻。**结论** 人参多糖在体内能有效地治疗髓系白血病,且未发现有明显的毒副作用。

**关键词:** 人参多糖; K562; 白血病动物模型
**中图法分类号:** R-332; R282.71; R733.7 **文献标识码:** A

# Effect of Ginseng polysaccharide on human leukemia SCID mouse model

CHEN Di-long, LI Jing, LIU Yong-gang, WANG Ya-ping, WANG Jian-wei, ZHENG Min, JIANG Rong (Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, College of Basic Medicine, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

**Abstract: Objective** To establish the human leukemia model in the severe combined immunodeficiency (SCID) mice and to investigate the pharmacological action of Ginseng polysaccharide (GPS) on leukemic cells *in vivo*. **Methods** The human leukemia mouse model was established by implanting K562 cells into the caudal vein of SCID mouse. Histochemistry, RT-PCR, flow cytometry, histopathology were used to monitor the leukemic cells in peripheral blood, bone marrow, liver, spleen of leukemia SCID mouse models, before and after injection of GPS. The mice receiving the physiological saline instead of GPS served as controls. **Results** The peripheral blood cells did not change so much in SCID mice in the earlier period of leukemia, the total number of WBC slightly increased and promyelocytes of leukemia could be detected 1% -4% on day 18 after K562 cells implantation. In last phase of leukemia, WBC significantly rose and could be monitored 10%. After injection of GPS, the common condition of mouse models was more improved than that of controls, the inflammation and pathological changes of organs ameliorated. **Conclusion** GPS can effectively suppress leukemia *in vivo* and is found no obvious ill effect.

**Key words:** Ginseng polysaccharide; K562; severe combined immunodeficiency; animal model

人参多糖(Ginseng polysaccharide, GPS)是人参的主要成分之一。国内外的研究表明:GPS可诱导多种细胞因子(主要是TNF、INF-γ、IL-8等)生成而对肿瘤细胞具有杀伤作用[1,2]。我们的研究结果也表明:GPS对人急性早幼粒细胞性白血病细胞株(HL60)增殖有明显抑制作用,其抑制作用呈时间、剂量依赖性[3]。GPS在体外能抑制K562细胞增殖并诱导其向红系和粒系方向分化[4],但人参多糖对体内白血病细胞(K562)的影响如何尚不清楚。本研究采用静脉注入K562细胞建立人白血病异种移植模型,将人参多糖注射入人白血病重症联合免疫缺陷小鼠体内,采用外周血检测、细胞周期分析、细胞形态学观察、免疫细胞化学技术、流式细胞术(FCM)、RT-PCR等检测人参多糖对模型小鼠体内K562细胞增殖抑制、诱导分化的影响。结合本课题组既往工作,系统探讨人参多糖对体内和体外K562细胞的药理作用及其机制,本研究为从祖国医学宝库中寻找出抑制白血病细胞恶性增殖的中药成分提供了理论与实验依据。

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(39670880)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39670880)
**作者简介:** 陈地龙(1971-),男,重庆市人,博士,讲师,主要从事造血调控机制方面的研究。电话:(023)68485614
**通讯作者:** 王亚平,电话:(023)68485968
**收稿日期:** 2005-10-27; **修回日期:** 2005-12-16

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人参多糖(GPS)由重庆中药研究所提供(纯度98%),以RPMI1640培养液配制成所需浓度(5 mg/ml)。RPMI1640培养基、IMDM培养基,美国GIBGO公司产品;小牛血清(BS),杭州四季清公司(批号:990402);小鼠抗人$CD_{13}$单克隆抗体,DAB试剂盒,北京中山生物技术有限公司产品;DEPC,Trizol,Sigma公司;AMV逆转录酶,*Ex taq*酶为Takara公司产品;DQa、BCR-ABL引物合成由华美生物公司提供。

### 1.2 方法

1.2.1 白血病小鼠模型的建立[5-7] SCID小鼠,雌性和雄性兼有,8~10周龄,体质量23~27 g,北京联合维通利华公司提供。腹腔连续2 d注射环磷酰胺(CTX)2 mg/只,每天注射1次,第3天取对数生长期K562细胞用于移植,以尾静脉一次性注射$5\times10^6$个/鼠,每次尾静脉注射的SCID小鼠数目相同。

1.2.2 动物分组 分为两组,每组5只,对照组,白血病模型小鼠(SCID)尾静脉或腹腔注射生理盐水。GPS组,白血病模型小鼠(SCID)腹腔给予GPS,剂量为GPS 4 mg/只,连续7 d。

1.2.3 外周血白细胞计数及分类 对照组和GPS组给药后1周及病程后期,分别取尾静脉血涂片后,经瑞氏染色,显微镜下分类计数。

1.2.4 流式细胞术(FCM)检测$CD_{13}$阳性率 取对照组小鼠、GPS组小鼠的外周血、骨髓、肝和脾细胞PBS洗涤2次,加入抗人$CD_{13}$第一抗体,4℃孵育40 min后PBS洗2次,沉淀加FITC标记二抗20 μl混匀,4℃暗盒孵育60 min,PBS洗1次,沉淀加PBS 200 ml混匀后上样。FCM检测接种荧光标记的细胞。

1.2.5 细胞周期检测 取对照组小鼠、GPS组小鼠肝、脾细胞,制成单细胞悬液,经PBS洗2次,加碘化丙烷(DAPI)和SRI01工作液,4 ℃避光染色30 min,流式细胞仪检测,Midfilt软件分析细胞周期分布。正常人淋巴细胞为对照。

1.2.6 病理学检查 处死动物进行病理检查,取肾、肺以10%甲醛固定48 h,石蜡包埋切片,HE染色后进行光镜观察。

1.2.7 免疫组织化学检测 取对照组和GPS组小鼠的肺、肝、脾,以10%甲醛固定24 h以上,石蜡切片,或者新鲜组织冰冻切片。采用共同的$CD_{13}$抗体免疫组织化学反应,观察白血病细胞浸润分布情况。

1.2.8 RT-PCR检测白血病细胞 取SCID小鼠的外周血1 ml及肝、脾、肾等组织各100 mg,Trizol法提取RNA,28S、18S两条带清晰,$D(260)/D(280)=1.840$,RNA置于-70 ℃待用。按反转录试剂盒说明书进行cDNA合成,用*Taq*聚合酶进行PCR扩增,引物序列:ABL:上游:5′-GGTCCTGGACAGCACCGA-3′,下游:5′-TGATTTCCTTCACCGAACTGA-3′;BCR上游:5′-GGTGTCGGACCGCATCAG-3′,下游:5′-TGGCGTCGATCAGGTTGT C-3′;DQa上游:5′-GCATCTTTGGTTTGGGTTATG-3′,下游:5′-ACGCAGATCATCGAAACGTC-3′。

## 2 结果

### 2.1 发病情况

SCID小鼠在接种K562细胞30 d后均发生全身白血病,动物皮毛起皱、萎靡少动、步态不稳,侧偏或转圈,体质量平均为22 g,较正常组减轻7~8 g,存活时间为32~45 d。给GPS注射后,GPS组白血病小鼠精神状况明显好于对照组小鼠。体质量较对照组下降减少,平均为28 g,存活时间延长至56 d,有的小鼠甚至可以存活到70 d。

### 2.2 外周血象

接种K562细胞的SCID小鼠外周血象在疾病早期无明显变化,第18天白细胞数略有升高,光镜下可检测到1%~4%人白血病细胞,病程后期,白细胞明显增高,血涂片检查人早期白血病细胞占10%。给予GPS后1周取外周血可见有核细胞数有所减少,但与对照组无统计学意义,但2周后外周血有核细胞数与对照组相比明显减少(表1)。

**表1 对照组SCID小鼠与GPS组外周血象($n=5$, $\bar{x}\pm s$)**

| 时间 | 白细胞($10^9$/L) | 中性粒细胞(%) | 淋巴细胞(%) | K562细胞(%) |
|---|---|---|---|---|
| 接种K562细胞后(周) | | | | |
| 2 | 4.75±0.65 | 71±4 | 25±6 | 0 |
| 3 | 7.65±1.24[a] | 79±8[a] | 14±5[a] | 3.9±1[a] |
| 4 | 9.86±1.32[b] | 82±9[b] | 6±2[b] | 10±3[b] |
| 注射GPS后(周) | | | | |
| 1 | 10.33±1.76 | 80±9 | 6±2 | 13±4 |
| 2(病程后期) | 7.33±1.89 | 77±8[a] | 13±7[a] | 7±2[a] |

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与对照组比较. GPS终浓度: 4 mg/只×7 d

### 2.3 免疫细胞化学检测对照组与GPS组SCID小鼠肺、肝、脾等器官$CD_{13}$表达

与对照组比较,GPS组SCID小鼠肺、肝、脾等器官$CD_{13}$表达的阳性率明显降低(表2)。

**表2 对照组和GPS组SCID小鼠肝、脾、肺中$CD_{13}$细胞表达情况[($\bar{x}\pm s$)%]**

| 组别 | $n$ | 脾 | 肝 | 肺 |
|---|---|---|---|---|
| 对照组 | 5 | 41±7 | 29±4 | 38±8 |
| GPS组 | 5 | 21±5[b] | 16±3[a] | 20±6[a] |

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与对照组比较. GPS终浓度: 4 mg/只×7 d

### 2.4 细胞周期分布

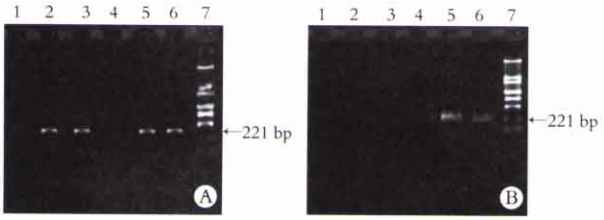
对照组SCID小鼠中可见肿瘤累及肝、脾,肝、脾脏组织增生期($S+G_2+M$)细胞达40.11%、41.66%,GPS组肝、脾脏组织增生期细胞则为31.85%、29.37%,与对照组相比有显著性差异($P<0.05$)。

### 2.5 对照组、GPS组SCID小鼠骨髓细胞$CD_{13}$阳性率

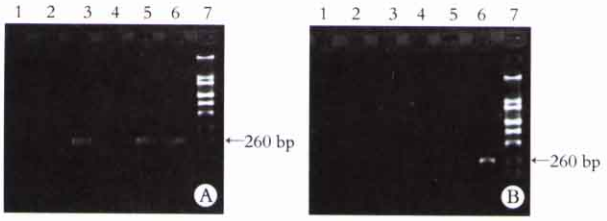
流式细胞术(FCM)检测对照组SCID小鼠骨髓$CD_{13}$阳性率8.42%、GPS组SCID小鼠骨髓$CD_{13}$阳性率2.19%。

### 2.6 RT-PCR检测对照组和GPS组SCID小鼠中白血病累及脏器情况

RT-PCR检测SCID小鼠肝、脾、肾、骨髓、外周血未发现有白血病细胞(K562)人特有DQα基因,ABL-BCR癌基因。接种K562细胞后的对照组SCID小鼠,3~4周即可见白血病细胞累及肝、脾、肾、骨髓、外周血等主要脏器。GPS组SCID小鼠DQα仅在脾脏和外周血有表达,ABL-BCR仅在外周血有表达(图1、2)。



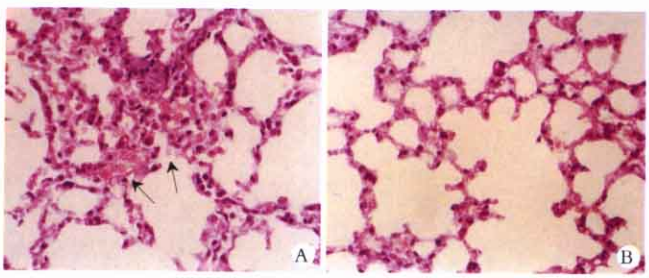

A：对照组；B：GPS 组白血病
1：空白对照；2：骨髓；3：肝；4：肾；5：脾；6：外周血；7：DNA 标准
**图 1　SCID 小鼠 DQα 的表达**



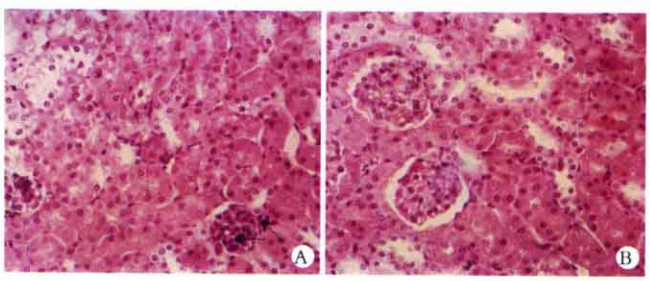

A：对照组；B：GPS 组白血病
1：空白对照；2：骨髓；3：肝；4：肾；5：脾；6：外周血；7：DNA 标准
**图 2　SCID 小鼠 ABL-BCR 的表达**

### 2.7　病理学检查

与对照组比较，GPS 组 SCID 小鼠的病理症状明显减轻。肺、肾等脏器的炎症及病理变化减轻，通过 HE 染色检测显示脏器中浸润的肿瘤细胞明显减少（图 3、4）。




A：对照组　　↑：炎症细胞、尘细胞；B：GPS 组
**图 3　SCID 小鼠肺的病变**　（HE×400）




A：对照组　　↑：肾小球可见炎症及病理变化
B：GPS 组，肾小球可见炎症及病理变化减轻
**图 4　SCID 小鼠肾的病变**　（HE×400）

## 3　讨论

传统的白血病治疗药物以细胞毒药物为主。细胞毒药物在杀伤恶性细胞的同时，对正常的细胞和器官也产生严重损伤。近年研究表明，白血病细胞在体外可被不同的化学物质诱导分化为正常或较正常的细胞；分化诱导剂的发现是白血病治疗药物发展的新阶段[8-10]。

人参作为传统医学的“补气”要药已有数千年的临床应用历史，人参多糖（GPS）是其主要的有效药物成分之一。近年的研究证明：人参多糖可明显增强免疫系统的功能并有免疫抗肿瘤和辅助抗肿瘤活性。另外，GPS 还有降血糖以及调控血细胞生成的作用。我们既往的研究表明：人参多糖在体外具有双向调控作用，一方面可促进正常造血，另一方面又可抑制白血病细胞的增殖，诱导其向成熟方向分化；其分子机制在于调控造血生长因子的分泌、调控信号转导途径等。但人参多糖在体内的作用如何，尚少见文献报道。

由于体外研究的影响因素简单，作用的成份清楚；而体内的情况比较复杂，受多种因素的影响，在体外作用被证实有效的药物并非在体内有同样的效果。药物在体内要代谢，并受多种酶的影响，有些甚至被酶破坏，有些在体外证实无抗瘤作用的成份，在体内反而有抗瘤效果，或受到多种因素的协同或抑制作用。因此，要证实 GPS 的药理作用，就不能缺少体内研究的资料，而目前从药物研究角度与开发的角度都必须先进行模型建立。本研究在成功建立白血病模型后通过体内注射 GPS 观察其在体内对白血病的作用。本研究从以下几个方面探讨了 GPS 在体内对白血病动物的作用。

### 3.1　发病情况

给予白血病动物模型 GPS（4 mg/只）后，白血病动物的精神、活动状况有所好转，体重增加，平均存活时间延长，从外部症状上可见 GPS 对白血病有一定的药理作用。

### 3.2　外周血象

白血病小鼠的外周血白细胞明显升高，在给予白血病小鼠 GPS（4 mg/只）后，给药后第 2 周即可见外周血白细胞降低，表明 GPS 在体内可以抑制白血病细胞的生长，这与体外 GPS 抑制 K562 的增殖是一致的。

### 3.3　SCID 小鼠 $CD_{13}$ 阳性率的表达

$CD_{13}$ 是检测髓性白血病细胞的重要表面标志之一，我们采用免疫细胞化学和流式细胞仪检测 $CD_{13}$ 的表达均表明 GPS 有一定的抑制白血病小鼠肝、脾、骨髓等组织细胞 $CD_{13}$ 的表达。

### 3.4　细胞周期分布

给药后的白血病模型小鼠脾脏组织细胞周期 $G_0-G_1$ 期细胞数与对照组相比明显增加，但脾脏组织

细胞周期无显著性变化，这表明GPS能阻止白血病小鼠白血病细胞于静止期，抑制其增殖。

### 3.5 RT-PCR检测对照组和GPS组白血病小鼠中白血病细胞累及脏器情况

RT-PCR检测人特有DQα基因，ABL-BCR癌基因结果表明给予GPS作用后白血病细胞浸润的器官有所减少，从白血病模型白血病细胞累及到肝、脾、肾、骨髓、外周血，到给药后期的仅在外周血中发现白血病细胞。

以上实验结果表明：人参多糖能有效地治疗小鼠髓系白血病，且未发现有明显的毒副作用。提示GPS是一种潜在的治疗白血病药物，有进一步研究的价值，其体内作用机制我们需进一步深入研究。

**参考文献：**


[1] ASSINEWE V A, AMASON J T, AUBRY A, *et al*. Extractable polysaccharides of Panax quinquefolius L. (North American ginseng) root stimulate TNFalpha production by alveolar macrophages[J]. Phytomedicine, 2002, 9(5): 398-404.

[2] SONODA Y, KASAHARA T, MUKAIDA N, *et al*. Stimulation of interleukin-8 production by acidic polysaccharides from the root of Panax ginseng[J]. Immunopharmacology, 1998, 38(3): 287-294.

[3] 戴 勤，王亚平，周开昭，等. 人参多糖对人早幼粒白血病细胞株(HL-60)增殖的影响[J]. 重庆医科大学学报，2001，26(2)：126-128，131.

[4] 陈地龙，刘永刚，王亚平，等. 人参多糖对K562细胞增殖抑制及诱导分化的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(6)：517-520.

[5] 聂小蒙，楼敬伟，王建民. SCID小鼠-人白血病模型在白血病研究中的应用[J]. 中国实验血液学杂志，2003，11(1)：99-104.

[6] 林祥华，陈志哲，林景娟，等. 人白血病细胞重度联合免疫缺陷小鼠模型的建立和监测[J]. 福建医科大学学报，2002，36(4)：352-355.

[7] 林祥华，陈志哲，林景娟，等. Bcl-2反义硫代磷酸寡脱氧核苷酸抑制HL-60细胞在重度联合免疫缺陷小鼠中生长的研究[J]. 中华病理学杂志，2003，32(3)：251-254.

[8] MATHAS S, LIETZ A, JANZ M, *et al*. Inhibition of NF-kappaB essentially contributes to arsenic-induced apoptosis[J]. Blood, 2003, 102(3): 1028-1034.

[9] AOKI S, KONG D, MATSUI K, *et al*. Smenospongine, a spongean sesquiterpene aminoquinone, induces erythroid differentiation in K562 cells[J]. Anticancer Drugs, 2004, 15(4): 363-369.

[10] SACHS L. The molecular regulators of normal and leukaemic blood cells[J]. Proc R Sco Land B Biol Sci, 1987, 231(1264): 289-312.


（编辑 汪勤俭）

# 个案与短篇

文章编号：1000-5404(2006)07-0680-01

## 伴单克隆免疫球蛋白血症的纯红再障1例

赵咏梅，刘 林 （第三军医大学新桥医院血液内科，重庆 400037）

患者，男，65岁，因"进行性头晕、乏力4个月余"于2004年5月24日入我院。患者4个月前无明显诱因出现头晕、乏力、食欲不振，活动后心悸，气促等贫血症状，无发热、出血倾向，酱油色尿，骨痛，消瘦，紫外线过敏，脱发，口腔溃疡，关节肿痛等。查血常规发现血红蛋白低，以"贫血待查"收治。既往有戊型肝炎病史20年，近8年来多次复查肝功均在正常范围，近半年无特殊用药史，无毒物接触史。入院查体：重度贫血貌，全身皮肤苍白，浅表淋巴结不大，胸骨无压痛，心肺腹无明显异常，肝脾肋缘下未触及。入院后辅助检查：血常规WBC 4.41×10⁹/L，RBC 1.29×10¹²/L，HGB 46 g/L，PLT 233×10⁹/L，MCV 117.4fL，MCH 40.0 pg，MCHC 34%，网织红计数：0.1%，尿常规正常，肝肾功正常，抗人球蛋白试验(-)，抗核抗体(-)，血清蛋白电泳发现M蛋白，为排除多发性骨髓瘤，查尿本周氏蛋白(-)，免疫球蛋白IgG 22.6 g/L，IgM 0.29 g/L，IgA 0.1 g/L，IgE 78 g/L，免疫固定电泳发现M蛋白区带，提示在IgG和κ轻链部位有明显免疫附着，血沉30 mm/h，β₂微球蛋白正常，头颅X线片提示：头颅片见颗粒，颅骨多发性不规则小透光区，脊柱、肋骨，骨盆诸骨均未见异常骨质破坏，髂骨骨髓细胞学检查提示：骨髓增生减低，粒系占20%，红系0%，环片下周未见巨核细胞，外周血涂片见红细胞呈缗钱状排列，行第2次骨髓细胞学检查，结果与前类似，髂骨骨髓活检提示：骨髓增生减低。后行胸骨穿刺结果为：骨髓增生活跃，粒系占57%，红系12%，粒红比4.75:1，红系增生活跃，以中晚幼为主，形态无异常，粒系巨核系比值与形态无异常，未见原幼浆细胞。第2次复查免疫球蛋白IgG 24.6 g/L，IgM 0.52 g/L，IgA 0.45 g/L，IgE 80 g/L，免疫固定电泳结果同前，抗人球蛋白试验(-)。追溯病史，患者1984年7月在外院住院时检查发现，血清蛋白电泳出现M蛋白，免疫球蛋白IgG增高，头颅X线片示：颅骨多处有虫蚀样破坏，血红蛋白正常，髂骨骨髓细胞学检查：骨髓增生活跃，粒、红、巨核系细胞正常，浆细胞3.5%，未见原幼浆细胞。当时诊断为特发性单克隆良性高M蛋白血症。对照此次入院检查，M蛋白无明显增加，头颅骨骨质破坏无明显加重，但出现进行性贫血，网织红计数低，髂骨多次穿刺及活检均示骨髓增生减低，未见红系，胸

（下转684页）

作者简介：赵咏梅(1971-)，女，陕西省长安县人，硕士，主治医师，主要从事造血干细胞移植方面的研究。电话：13640543261，E-mail：zymip@21cn.com

收稿日期：2005-11-15；修回日期：2006-01-12