论著

文章编号:1000-5404(2007)23-2236-04

当归多糖动员的造血干/祖细胞移植重建小鼠造血功能的研究

胡 晶[1],冯 敏[2],杨 慧[1],吴 宏[1] (重庆医科大学:[1]基础医学院组织学与胚胎学教研室,重庆市生物化学与分子药理学重点实验室,基础医学研究所,[2]基础医学院生理学教研室,重庆 400016)

提 要:目的 探讨当归多糖(Angelica polysaccharides, APS)动员的造血干/祖细胞(hematopoietic stem/progenitor cell, HSPC)对造血衰竭小鼠造血功能重建的作用。**方法** 将APS动员的雄性BALB/c小鼠的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)静脉输注给受到8.5 Gy ^{60}Co γ射线照射的雌性同系受体小鼠;观察受体小鼠外周血白细胞(WBC)、血红蛋白(HGB)、血小板(PLT)的变化及30 d存活情况;采用PCR方法鉴定其造血重建的来源。**结果** APS组受体小鼠WBC、PLT、HGB、30 d存活数均明显高于对照组和NS组($P<0.05$);对APS组存活小鼠进行Y染色体PCR分析,证实雌性受体小鼠重建的造血细胞来自雄性供体。**结论** APS动员的小鼠外周血HSPC移植后能够重建造血衰竭小鼠长期造血。

关键词: 当归多糖;造血干/祖细胞;动员;移植;造血重建;小鼠

中图法分类号: R285.5; R331.2; R551.05 **文献标识码:** A

Hematopoiesis reconstruction in mice of hematopoietic aplasia by transplanting hematopoietic stem/progenitor cells mobilized by Angelica polysaccharides

HU Jing[1], FENG Min[2], YANG Hui[1], WU Hong[1] ([1]Department of Histology and Embryology, Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, [2]Department of Physiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study hematopoiesis reconstruction in mice of hematopoietic aplasia by transplanting hematopoietic stem/progenitor cells mobilized by Angelica polysaccharides (APS). **Methods** The female BALB/c mice irradiated with 8.5 Gy ^{60}Co γ ray were transplanted with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from male BALB/c mice mobilized by APS. After transplantation, the changes of WBC, HGB and platelet in peripheral blood were observed. Thirty-day survival rate was calculated. PCR was used to verify the cell source of hematopoiesis reconstruction. **Results** The number of WBC, platelet and HGB, and 30-day survival rate of APS group were markedly higher than that of negative control group and normal saline group ($P<0.05$). PCR results showed Y chromosome sequence existed in the survived mice of APS group, indicating that the repopulated hematopoietic cells came from the male donor. **Conclusion** The hematopoietic stem/progenitor cells mobilized by APS can reconstruct long-term hematopoiesis in mice of hematopoietic aplasia.

Key words: Angelica polysaccharides; hematopoietic stem/progenitor cell; mobilization; transplantation; hematopoietic reconstruction; mice

重组人粒细胞集落刺激因子(recombinant human granulocyte colony-stimulating factor, rhG-CSF)是目前临床常用的造血干细胞动员剂,动员效果明显,但其体内注射仍存在许多不足之处,如动员所需时间长、剂量大、费用高;需定时监测外周血干细胞的数量;异基因移植时,大剂量rhG-CSF注射可引起骨骼肌肉疼痛、发热等,健康供者不愿接受,这些都限制了外周血干细胞移植(peripheral blood stem cell transplantation, PBSCT)的广泛开展。我们已研究证明当归多糖(Angelica polysaccharides, APS)对小鼠造血干/祖细胞(hematopoietic stem/progenitor cell, HSPC)有明显的动员作用,经动员后采集的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中富集较多的HSPC[1-3],但APS动员的HSPC移植后能否有效地重建造血与免疫功能,尚需要进一步的研究。本研究观察了APS动员出的HSPC对小鼠造血功能的重建作用,为进一步探讨APS的动员作用及其机制提供理论

基金项目: 重庆市科委资助课题[(2001)54号]
Supported by the Project of Chongqing Scientific Committee(2001-54)

作者简介: 胡 晶(1979-),女,重庆市人,硕士,助教,主要从事造血干细胞生物学方面的研究。电话:(023)66313858,E-mail:jessie805@gmail.com

通讯作者: 吴 宏,电话:(023)68485087,E-mail:wuhong6368@126.com

收稿日期: 2006-09-20;**修回日期:** 2007-06-29

与实验依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物　　健康成年未交配清洁级 BALB/c 小鼠 40 只,雌、雄各半,8 ~ 12 周龄,体质量 18 ~ 20 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2　当归多糖　　由重庆医科大学基础医学院化学教研室分离、提取、纯化(纯度 >85%)。

1.1.3　主要试剂　　基因组 DNA 提取试剂盒、*Taq* PCR 试剂盒、100 bp DNA 标准均购自北京天为时代科技有限公司,Sry 引物、IL-3 引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成,GoldView 核酸染料购自北京赛百盛基因技术有限公司。

1.1.4　主要仪器　　PCR 扩增仪为美国 Thermo Hybaid 公司产品,电泳仪为北京六一仪器厂产品,FCC-8000 型同中心回转式 ^{60}Co 治疗机为山东新华医疗器械股份有限公司产品,捷达 801 系列凝胶电泳图像分析系统为江苏省捷达科技发展有限公司产品,血细胞分析仪为深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司产品。

1.2　方法

1.2.1　PBMC 的动员和采集　　雄性 BALB/c 小鼠(供体小鼠)随机数字表法分为 2 组,每组 6 只,分别经腹腔注射生物盐水 0.2 ml/只、APS 4 mg/kg,1 次/d,连续注射 6 d。给药后第 8 天,摘眼球法取两组小鼠外周血,采用 Ficoll-Hypague 密度梯度离心分离 PBMC[5]。

1.2.2　造血衰竭小鼠模型的建立和 HSPC 移植　　雌性 BALB/c 小鼠(受体小鼠)34 只,装入面积为 15 cm × 15 cm 的特制的有机玻璃鼠盒内,经 ^{60}Co γ 射线全身一次性致死剂量(8.5 Gy)照射,照射距离为 80 cm,剂量率为 62.25 cGy/min。照射后 4 ~ 6 h,经尾静脉输注雄性供体小鼠 PBMC 或等量无菌 PBS,移植后小鼠在无菌层流架内饲养,水、饲料、垫料均经高温高压消毒。实验分组:①阴性对照组(对照组,n = 10),经尾静脉输注等量无菌 PBS;②实验对照组(NS 组,n = 12),经尾静脉移植经生理盐水动员后的 PBMC,5×10^5/只($CD34^+$ 细胞数约为 1.35×10^3);③ 实验组(APS 组,n = 12),经尾静脉移植经 APS 动员后的 PBMC,5×10^5/只($CD34^+$ 细胞数约为 6.95×10^3)。

1.2.3　血常规的检测及生存时间的观察　　移植后受体小鼠定期尾静脉取血,用血细胞分析仪检测血常规(WBC、HGB、PLT);观察移植后受体小鼠的生存时间和 30 d 存活情况。

1.2.4　受体小鼠 Y 染色体 PCR 分析　　取移植后 APS 组第 40、60 天仍存活小鼠(各 1 只)的外周血,以 IL-3 基因片段作为内参照,对小鼠 Y 染色体上的性别决定基因(Sry 基因)进行 PCR 分析,步骤如下:① DNA 抽提:摘眼球取小鼠全血 600 μl,参照血液基因组 DNA 提取试剂盒产品说明书提取基因组 DNA。②PCR 扩增:以 IL-3 为内参照,Sry 引物序列:上游:5′-TGTGGTCCCGTGGTGAGAG-3′,下游:5′-CTCCAGTCTTGCCTGTATGTG-3′;IL-3 引物序列:上游:5′-GCTCCTGCTCCTGATGCTCTTC-3′,下游:5′-CTTTAGGTGCTCTGCCTGCTGT-3′。50 μl PCR 反应体系:ddH_2O 27 μl,10 × Buffer 5 μl,Mg^{2+}(25 mmol/L)4 μl,dNTP(250 μmol/L)4 μl,上下游引物(10 μmol/L)各 2 μl,DNA 5 μl,*Taq* 酶 2.5 U。预变性 94 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃ 10 min。③扩增物的检测:取 PCR 扩增产物 10 μl,经 2% 琼脂糖凝胶电泳后,溴化乙锭染色 30 ~ 40 min,在凝胶电泳图像分析系统中进行分析,并拍照。Sry 基因片段为 312 bp,IL-3 基因片段为 483 bp。

1.3　统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS8.1 统计软件进行方差分析和 t 检验。

2　结果

2.1　移植后受体小鼠的生存时间和 30 d 存活情况

对照组小鼠移植后 8 ~ 15 d 全部死亡;NS 组小鼠移植后 2 只存活 30 d,40 d 内全部死亡;APS 组小鼠存活时间均大于 18 d,30 d 时 8 只存活,有 5 只存活时间超过了 60 d,4 只存活时间超过了 120 d。

2.2　移植后受体小鼠血常规的检测

2.2.1　外周血 WBC 的变化　　移植后第 3 天小鼠外周血 WBC 数降至最低点,APS 组小鼠 WBC 最低值明显高于对照组和 NS 组的最低值(P < 0.05);对照组小鼠死亡前 WBC 数均小于 0.4×10^9/L;NS 组小鼠移植后 7 d WBC 有一定程度的上升,但存活小鼠外周血 WBC 在 30 d 时仅升至 $(2.0 \sim 2.2) \times 10^9$/L;APS 组小鼠 WBC 于移植后 7 d 左右开始恢复,较 NS 组提前 1 周升至 0.5×10^9/L,存活小鼠外周血 WBC 在移植后第 30 天恢复至正常范围,在第 40 及 60 天检测时 WBC 仍持续升高(表 1)。

2.2.2　外周血 HGB 的变化　　移植后第 14 天小鼠 HGB 水平下降到最低点,APS 组小鼠 HGB 的最低值明显高于对照组和 NS 组的最低值;移植后 21 d 左右 NS 组小鼠 HGB 水平有一定程度的上升,但存活小鼠外周血 HGB 在第 30 天时也只升至(99.0 ± 4.2) g/L;APS 组 HGB 水平于移植后 21 d 左右开始恢复,并且明显高于 NS 组(P < 0.05),30 d 左右已恢复至正常范围,在第 40 及 60 天检测时 HGB 仍持续升高(表 2)。

2.2.3　外周血 PLT 的变化　　对照组小鼠 PLT 移植后 7 d 左右迅速下降,第 14 天下降至最低点;NS 组和 APS 组小鼠 PLT 在移植后第 10 天下降到最低点,第 14 天时 NS 组小鼠 PLT 有一定程度的上升,但存活小鼠 PLT 在第 30 天时也只升至(118.0 ± 11.3) g/L;APS 组小鼠 PLT 在移植后第 14 天时已恢复至正常值范围,以后仍持续升高,并且明显高于 NS 组(P < 0.05)(表 3)。

表 1　移植后不同时间小鼠外周血 WBC 的变化($\times 10^9$/L, n = 4, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 3 天	第 7 天	第 10 天	第 14 天	第 21 天	第 30 天	第 40 天	第 60 天
阴性对照组	0.13 ± 0.05[a]	0.15 ± 0.06	0.18 ± 0.05[a]	0.30 ± 0.14 *[a]	–	–	–	–
实验对照组	0.18 ± 0.05[a]	0.25 ± 0.10	0.35 ± 0.10[a]	0.60 ± 0.16[a]	1.30 ± 0.26[b]	2.1 ± 0.14[b]	–	–
APS 组	0.40 ± 0.16	0.45 ± 0.19	0.70 ± 0.11	1.15 ± 0.34	2.80 ± 0.59	4.25 ± 0.55	8.45 ± 1.59	9.40 ± 0.91

*:此时此组仅 2 只小鼠存活;a:P < 0.05,b:P < 0.01,与同时间 APS 组比较

表2 移植后不同时间小鼠外周血 HGB 的变化(g/L,$n=4$, $\bar{x}\pm s$)

组别	第3天	第7天	第10天	第14天	第21天	第30天	第40天	第60天
阴性对照组	146.5±19.3	147.5±5.7	72.5±14.6	67.0±7.1	-	-	-	-
实验对照组	154.5±11.1	145.5±7.7	125.0±15.2	80.5±30.6	96.0±11.4	99.0±4.2*	-	-
APS 组	156.5±8.4	150.5±7.6	129.0±14.3	109.5±11.5	119.5±11.9[a]	135.0±16.2[a]	154.5±9.0	163.5±5.0

*：此时此组仅2只小鼠存活；a：$P<0.05$，与同时间实验对照组比较

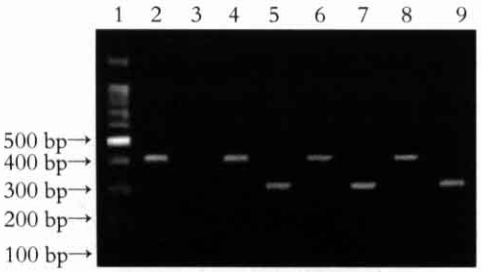
表3 移植后不同时间小鼠外周血 PLT 的变化($\times10^9$/L,$n=4$, $\bar{x}\pm s$)

组别	第3天	第7天	第10天	第14天	第21天	第30天	第40天	第60天
阴性对照组	407.0±100.2	82.0±7.3	56.5±13.9	44.0±11.3	-	-	-	-
实验对照组	400.5±122.8	86.5±17.5	57.0±14.7	68.0±14.8	113.0±14.4	118.0±11.3	-	-
APS 组	455.0±62.6	101.0±19.8	88.5±50.9	260.5±146.4[a]	370.0±159.0[a]	465.5±157.0[a]	623.5±136.4	766.0±219.9

a：$P<0.05$，与同时间实验对照组比较

2.3 受体小鼠 Y 染色体的检测

对移植后 APS 组第40、60天存活小鼠的外周血基因组 DNA 进行 PCR 分析，结果均检出了 312 bp Y 染色体序列(Sry 基因片段为 312 bp，IL-3 基因片段为 483 bp)，证实雌性受体小鼠重建的造血细胞来自雄性供体小鼠(图1)。



1：DNA 标准；2、3：成年雌性小鼠外周血 DNA PCR 产物；4、5：成年雄性小鼠外周血 DNA PCR 产物；6、7：APS 组移植后 40 d 小鼠外周血 DNA PCR 产物；8、9：APS 组移植后 60 d 小鼠外周血 DNA PCR 产物

图1 受体小鼠 Y 染色体 PCR 分析结果

3 讨论

近年来，造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation，HSCT)在国内外已得到广泛开展，成为治疗恶性血液病、多种实体瘤、部分遗传性疾病、免疫缺陷病和以造血干细胞为靶细胞的基因治疗的有效方法。与骨髓移植相比，PBSCT 因其具有采集安全方便、供者痛苦少、造血及免疫功能恢复快、受肿瘤细胞浸润或污染的机会较少、潜在的抗残留病优势等优点，正被临床广泛接受，有替代骨髓移植之趋势。但在正常状态下，外周血中 HSPC 的数量很少，人外周血中的 HSPC 相当于骨髓的 1%～10%，$CD34^+$ HSPC 只占循环血液中单个核细胞的 0.1%[4]；小鼠外周血干细胞数仅为骨髓的 1/100～1/50，$CD34^+$ 造血干细胞含量仅为 PBMC 的 0.01%～0.1%，远远不能满足 HSCT 时所需的数量[5]。因此，PBSCT 成功的前提技术之一是如何将骨髓中的 HSPC 动员到外周血中，以便采集到足够数量的 HSPC 以保证移植后重建造血。目前以粒细胞集落刺激因子(G-CSF)为代表的动员剂体内注射仍存在许多不足之处，所以寻找新的造血干细胞动员剂或优化动员方案已成为 PBSCT 领域的热点问题之一。

研究证明，许多中草药有效成分可以作用于不同周期的 HSPC，从蛋白质和基因水平参与 HSPC 增殖与分化的调控，从而达到促进骨髓造血的作用。当归为中医“补血、活血”的要药，APS 是其主要有效成分之一。既往研究表明：APS 对正常或贫血小鼠的髓系造血祖细胞(BFU-E、CFU-E、CFU-GM 和 CFU-MK)的增殖分化有显著的促进作用[1]；同时 APS 在体外可促进人红系、粒单系及混合系造血祖细胞的增殖与分化[2-4]，其可能的作用机制是 APS 通过促进造血微环境中的基质细胞或内皮细胞表达和分泌粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、IL-3 等造血生长因子，从而促进血细胞的发生[6]。我们前期研究发现：APS 对小鼠 HSPC 有明显的动员作用，经动员后采集的 PBMC 中富集较多的 HSPC[3]。而移植后的造血重建是评判动员的 HSPC 数量与质量最重要的标准。因此我们建立小鼠造血衰竭模型，通过多种实验血液学技术，进一步研究 APS 动员的 HSPC 移植后能否有效地重建小鼠造血功能。

本研究采用 HSCT 法，将受体小鼠经 ^{60}Co γ 射线致死剂量照射以致其造血功能衰竭，然后对其进行 HSPC 移植。结果显示，经 APS 动员的雄性供体小鼠 PBMC 输注给雌性受体小鼠后，可明显加快受体小鼠外周血 WBC、HGB、PLT 的恢复，延长其生存时间；并通过 PCR 方法证实受体小鼠重建的造血细胞来自于雄性供体小鼠。我们推测如果进一步提高移植的 PBMC 的数量，可进一步延长小鼠的生存时间。实验证

明APS动员的HSPC移植后能够有效地重建小鼠的造血功能,接下来我们将进一步研究APS动员的机制,希望能为临床PBSCT中动员剂的优化提供理论和实验依据。

参考文献:

[1] 王亚平,祝彼得. 当归多糖对造血祖细胞增殖调控机理的研究[J]. 中华医学杂志,1996,76(5):363-366.
[2] 郑 敏,王亚平. 当归多糖对人髓系多向造血祖细胞增殖分化的影响及其机理研究[J]. 解剖学杂志,2002,25(2):105-109.
[3] 胡 晶,吴 宏. 当归多糖对小鼠外周血造血干细胞动员作用的研究[J]. 中草药,2006,37(12):1835-1838.
[4] Bender J G, Unverzagt K L, Walker D E, *et al*. Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry[J]. Blood, 1991, 77(12): 2591-2596.
[5] Bellucci R, De-Propris M S, Buccisano F, *et al*. Modulation of VLA-4 and L-selectin expression on normal CD34$^+$ cells during mobilization with G-CSF[J]. Bone Marrow Transplant, 1999, 23(1): 1-8.
[6] 吴 宏,姜 蓉,郑 敏,等. 人参多糖和当归多糖诱导人内皮细胞表达造血生长因子的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志,2002,22(9):687-690.

(编辑 栾 嘉)

文章编号:1000-5404(2007)23-2239-01

个案与短篇

小儿食管平滑肌肉瘤1例

余祖滨,张国强,姚 珂,闵家新,彭胜祖 (第三军医大学新桥医院胸外科,重庆 400037)

1 临床资料

患儿,男性,7岁。因受凉后干咳3 d,院外摄胸片发现纵隔包块,入我院进一步诊治。入院查体示生命征平稳,心肺腹无异常。胸外科专科检查无异常。辅助检查:胸部CT示包块位于后中纵隔,直径约4 cm,边界不规则,但包块边缘光滑,部分与食管黏连。食管吞钡检查示纵隔内食管旁见一7.2 cm×5.0 cm大小肿块影,食管右后侧壁轮廓不规则,边缘呈虫蚀状,正常黏膜皱襞向内侧移位,扩张轻度受限,蠕动减弱。考虑纵隔肿瘤,性质待定。开胸探查见包块大小约5 cm×4 cm×4 cm,边界清楚,包膜完整,血供丰富,呈暗红色,质中较脆,基底与食管紧密相连;未见纵隔淋巴结肿大。因包块基底与食管黏膜紧密黏连,故无法完整剥离,沿包块周围作钝性剥离,部分肿瘤送检。术中冷冻报告为低度恶性肿瘤。因此行食管肿瘤切除,食管胃吻合术。术后病理报告为食管平滑肌肉瘤,CD34(-/+),CD117(-)。术后患者未接受放、化疗,随访半年无复发或转移。

2 讨论

食管平滑肌肉瘤来源于间叶组织,多发生于食管的中下段,是食管疾病中少见的恶性肿瘤,约占食管恶性肿瘤的0.5%[1]。多数起源于黏膜下层及肌层,沿食管侧壁长轴呈膨胀性外生性生长,一般无包膜或呈假包膜。切面呈鱼肉状,质脆,瘤体内血管丰富,易出血和形成溃疡。男性多于女性,年龄多在50~70岁[2]。本病早期无症状或症状轻微,检查不易发现。其主要表现为吞咽梗阻感,且时重时轻,其症状和肿瘤大小不成比例。食管吞钡及胃镜检查有助于明确诊断。免疫组化检查CD34、CD117均为阴性,有助于与食管间质瘤鉴别[3]。外科手术切除是本病治疗的有效手段,宜行食管肿瘤切除,食管胃吻合术[4]。食管平滑肌肉瘤的预后明显优于食管癌,5年生存率最高可达60%[5]。本病对放、化疗不敏感。

本例患儿发病时年仅7岁,消化道症状不明显,术前诊断考虑纵隔肿瘤,术后确诊为食管平滑肌肉瘤。通过本例患儿的诊治过程,结合文献,提示我们近年来消化道肿瘤的发生呈年轻化趋势,而且发病早期往往无症状或症状不明显,很容易被忽视,所以应重视儿童的消化道检查,以免贻误最佳治疗时机和误诊。

关键词:食管平滑肌肉瘤;恶性肿瘤
中图法分类号:R735.1 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] Rainer W G, Brus R. Leiomyosarcoma of the esophagus: review of the literature and report of 3 cases[J]. Surgery, 1965, 58: 343-350.
[2] 程 波,张国强. 尿毒症病人行食管癌和食管平滑肌瘤手术治疗1例报告[J]. 第三军医大学学报,2000,22(1):25.
[3] 张 旭,戎铁华,傅剑华,等. 食管平滑肌肉瘤的诊断与治疗[J]. 中国肿瘤临床与康复,2005,12(5):452-454.
[4] Caldwell C B, Bains M S, Burt M. Unusual malignant neoplasms of the esophagus. Oat cell carcinoma, melanoma, and sarcoma [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1991, 101(1): 100-107.
[5] Rocco G, Trastek V F, Deschamps C, *et al*. Leiomyosarcoma of the esophagus: results of surgical treatment[J]. Ann Thorac Surg, 1998, 66(3): 894-896.

(编辑 龙 亮)

作者简介:余祖滨(1974-),男,重庆市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事肺癌发生分子机制的实验和临床方面的研究。电话:(023)68774724

收稿日期:2007-07-02;修回日期:2007-07-09