维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)03-0274-03

当归多糖对小鼠造血细胞表面粘附分子表达的影响

杜小丽,王改琴,吴 宏

(重庆医科大学基础医学院组胚教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨当归多糖(Angelica polysaccharides,APS)对小鼠造血细胞表面粘附分子表达的影响,旨在为阐述 APS 在造血调控和动员方面的机制提供实验依据。方法:采用外周血 WBC、骨髓单个核细胞(Marraw mononuclear cell,MNC)计数,流式细胞术检测外周血和骨髓 Sca-1⁺细胞率以及骨髓 MNC 和 Sca-1⁺细胞表面 CD49d(VLA-4 的 α 链)、CD44 表达情况。结果:1 采用 4mg/kg APS 动员后小鼠外周血的 WBC、Sca-1⁺细胞数明显高于 NS 组($P<0.01$),而骨髓 MNC 和 Sca-1⁺细胞数却明显低于 NS 组($P<0.01$);2APS 组骨髓 MNC 及 Sca-1⁺细胞表面 CD49d 表达明显下降($P<0.05$);骨髓 MNC 表面 CD44 表达阳性率下降($P<0.05$),但荧光强度无明显变化;骨髓 Sca-1⁺细胞表面 CD44 的表达与 NS 组无显著性差异。结论:APS 可能通过降低造血细胞表面的某些粘附分子的表达而产生动员效果。

【关键词】当归多糖;造血干/祖细胞;粘附分子;VLA-4;CD44

【中国图书分类法分类号】R285.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-25

Effect of angelica polysaccharides on adhesion molecules expressions in murine hematopoietic cells

DU Xiao-li, et al

(*Department of Histology and Embryology, College of Basic Medicine, Chongqing Medicine University*)

【Ahstract】*Objective*: To explore the effect of angelica polysaccharide(APS) on adhesion molecules expressions in murine hematopoietic cells, in order to provide experimental evidence of APS on hematopoietic regulation and the mechanism of mobilizing. *Methods*: Techniques of peripheral blood white blood cell(WBC)and bone marrow mononuclear cells(MNC)count were made. Flow cytometry detected the rate of Sca-1⁺ cells in peripheral blood and bone marrow and the expression of CD49d (VLA-4 of a chain), CD44 on bone marrow MNC and Sca-1⁺ cells. *Results*: 1.In APS group(4mg/kg): the number of peripheral blood WBC and Sca-1⁺ cells were markedly higher than that of NS group($P<0.01$), and bone marrow MNC and Sca-1⁺ cells was significantly lower than that of NS group($P<0.01$); 2. In APS group: the expression of CD49d on bone marrow MNC and Sca-1⁺ cells significantly declined($P<0.05$); the percent of CD44' expression on bone marrow MNC also decreased($P<0.05$), but we did not observe any change of the mean fluorescence intensity at the same time, or that of CD44' expression on bone marrow Sca-1⁺ cells. *Conclusion*: APS may reduce adhesion molecules expressions on some hematopoietic cells, resulting in mobilizing hematopoietic stem and progenitor cells cells(HSPC) from the bone marrow into the peripheral blood.

【Key words】Angelica polysaccharides; Hematopoietic stem and progenitor cells; Adhesion molecule; VLA-4; CD44

正常情况下外周血中的造血干/祖细胞(Hematopoietic stem and progenitor cells, HSPC)数量很少,因此需要进行动员才能获取足够数量的HSPC以保证移植成功。当归为中医"补血、活血"的要药,APS 是其主要有效成分之一。有实验证实:APS 能够动员 HSPC 从骨髓向外周血迁移[1]。目前国内外较为通用的干细胞动员剂为重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF),已有大量的实验证实其动员机制跟细胞表面的粘附分子如 CD49d、CD49e、CD49b、CD62L、CD44、CD58 等[2~6]表达下调有关,APS 动员作用是否也是通过改变粘附分子的表达来实现,有待深入探讨。我们用 APS 动员小鼠 HSPC,进而检测造血细胞表面粘附分子 CD49d(VLA-4 的 α 链)和 CD44[4,5]表达,旨在为传统中医药的进一步开发和应

作者介绍:杜小丽(1982-),女,硕士
研究方向:造血干细胞生物学。
通讯作者:吴 宏,女,副教授,E-mail:wuhong6368@126.com。

基金项目:重庆市自然科学基金计划项目(编号:CSTC,2007BB5284)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

用以及丰富动员机制提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

8～12 周龄 BALB/c 小鼠，雌雄不限，体重 18～22g，重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 药品与试剂

APS：重庆医科大学化学教研室分离、提取、纯化（纯度 950mg/g 以上）。PE 标记抗小鼠 Sca-1 抗体及其同型对照抗体（eBioscience 公司产品，4℃保存）、FITC 标记抗小鼠 CD49d 抗体及其同型对照抗体（eBioscience 公司产品，4℃保存）、FITC 标记抗小鼠 CD44 抗体及其同型对照抗体（eBioscience 公司产品，4℃保存）。淋巴细胞分离液（比重 1.077±0.002），上海华精生物高科技有限公司产品。

1.3 主要仪器和设备

超净工作台、倒置显微镜、流式细胞仪等。

1.4 实验动物分组与给药方法

BALB/c 小鼠随机分为 2 组：NS 组、APS 组，每组 24 只（其中 12 只用于采集外周血，12 只用于采集骨髓），分别腹腔注射 NS 和 4mg/kg APS 0.2ml[1]，1 次 /d，连续注射 6d，第 8d 采集外周血及骨髓。

1.5 外周血 WBC、单个核细胞（MNC）分类计数

给药后第 8d 取小鼠尾静脉血，用常规方法进行 WBC、MNC 分类计数。

1.6 外周血 MNC 的分离

给药后第 8d 摘小鼠眼球取外周血，肝素抗凝，采用 Ficoll-Hypague 密度梯度离心法，2 500r/min[5]离心 20min 后获取 MNC，用 PBS 洗涤 2 次，制成 MNC 悬液备用。

1.7 骨髓 MNC 的分离及计数

给药后第 8d 以颈椎脱臼法处死小鼠，用 PBS 冲出股骨（2 根）骨髓。采用 Ficoll-Hypague 密度梯度离心法，2 500r/min 离心 20min 后获取 MNC，用 PBS 洗涤 2 次，制成 MNC 悬液，用常规方法进行骨髓 MNC 计数。

1.8 流式细胞术检测外周血和骨髓 Sca-1⁺细胞数以及骨髓 MNC 和 Sca-1⁺细胞表面粘附分子表达

1.8.1 流式细胞术检测外周血和骨髓 Sca-1⁺细胞数 分别取外周血和骨髓 MNC 细胞悬液各 100μl，加入新鲜稀释的 PE 标记的 Sca-1 单抗 100μl，4℃避光孵育 30min。PBS 洗涤后重悬细胞，置流式细胞仪，检测外周血和骨髓中 Sca-1⁺细胞率。骨髓和外周血中 Sca-1⁺细胞数计算公式如下：

骨髓 Sca-1⁺细胞数 = 骨髓 MNC × Sca-1⁺细胞率。

外周血 Sca-1⁺细胞数 = 外周血 WBC × MNC% × Sca-1⁺细胞率

1.8.2 流式细胞术检测骨髓 MNC 和 Sca-1⁺细胞表面粘附分子 CD49d、CD44 表达 取骨髓 MNC 细胞悬液 100μl，加入新鲜稀释的 PE 标记的 Sca-1 单抗 100μl，4℃避光孵育 30min PBS 洗涤 2 次后再加入 PBA 稀释的 FITC 标记的 CD49d 或 CD44 单抗，4℃ 避光孵育 30min。洗涤后重悬细胞，置流式细胞仪，检测骨髓 MNC 表面黏附分子 CD49d、CD44 的表达情况。另设 Sca-1 细胞窗，检测骨髓 Sca-1⁺细胞表面 CD49d、CD44 的表达。

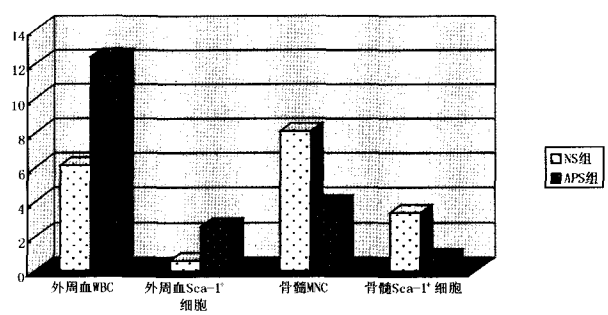
1.9 统计学方法

先对各变量进行正态性检验，正态分布数据以 $\bar{x} \pm s$ 来表示，两均数间比较采用 t 检验。数据均经 SAS 10.1 统计软件进行分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 APS 对小鼠外周血 WBC、骨髓 MNC、外周血和骨髓 Sca-1⁺细胞数的影响

APS 组的小鼠外周血 WBC、Sca-1⁺细胞数均明显增高（$P<0.01$）；而骨髓中的 MNC、Sca-1⁺细胞数却显著低于 NS 组（$P<0.01$）（图 1）。



注：外周血 WBC 和 Sca-1⁺细胞数（$\times 10^9$ 个 /L）；骨髓 MNC 和 Sca-1⁺细胞数（$\times 10^6$ 个 / 根股骨）。

图 1 APS 对小鼠外周血 WBC、骨髓 MNC、外周血和骨髓 Sca-1⁺细胞数的影响

2.2 APS 对小鼠骨髓 MNC 表面粘附分子 CD49d、CD44 表达的影响

给小鼠注射 APS 后，骨髓 MNC 表面 CD49d 表达的阳性率（$P<0.01$）和平均荧光强度（MFI）（$P<0.05$）都明显下降；骨髓 MNC 表面 CD44 表达的阳性率有所下降（$P<0.05$），但 MFI 无明显变化（$P>0.05$）（表 1）。

2.3 APS 对小鼠骨髓 Sca-1⁺细胞表面粘附分子 CD49d、CD44 表达的影响

APS 动员后，小鼠骨髓 Sca-1⁺细胞表面 CD49d 表达的阳性率显著降低（$P<0.05$），而 CD44 表达的变化无统计学差异（$P>0.05$）（表 2）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 APS 对小鼠骨髓 MNC 表面黏附分子表达的影响(n=12,$\bar{x} \pm s$)

组别	CD49d		CD44	
	阳性率(%)	MFI	阳性率(%)	MFI
NS 组	37.48 ± 12.21	41.39 ± 1.88	80.52 ± 14.77	80.08 ± 5.23
APS 组	23.08 ± 10.78	34.89 ± 8.34	68.07 ± 13.27	84.72 ± 4.99
P	<0.01	<0.05	<0.05	>0.05

表 2 APS 对小鼠骨髓 Sca-1$^+$细胞表面黏附分子表达的影响(n=12,$\bar{x} \pm s$)

组别	CD49d(%)	CD44(%)
NS 组	17.78 ± 10.32	18.47 ± 11.1
APS 组	10.27 ± 5.43	25.44 ± 16.89
P	<0.05	>0.05

3 讨 论

如何更有效地促进骨髓 HSPC 的增殖及动员是目前研究的热点之一。既往研究发现:APS 可能是通过促进造血微环境(Hematopoietic microenvironment,HME)中的基质细胞表达和分泌 G-CSF、IL-3 等造血生长因子,从而促进人早期造血细胞的发生[7],同时可上调 HME 中的内皮细胞分泌造血生长因子来调节血细胞的生成[8]。胡晶等[1]发现 APS 能够动员小鼠 HSPC 从骨髓向外周血迁移,并且与 rhG-CSF 联合使用时,动员 HSPC 的作用更加明显。APS 具体的动员机制目前尚未明确,是否与 G-CSF 一样因改变 HSPC 表面粘附分子的表达而利于 HSPC 迁移入血[3~6],其机制尚不清楚,有待进一步研究。

由骨髓基质细胞和细胞外基质共同构成的 HME 在 HSPC、基质细胞和髓窦内皮细胞表面以及骨髓基质内有一系列粘附分子受体/配体,它们之间的相互作用介导了 HME 对造血的调节,也影响着 HSPC 的动员和归巢。在众多的干细胞表面粘附分子中,VLA-4(α4β1)是介导干细胞与骨髓粘附的最重要受体,它通过与 VCAM-1、FN 的结合介导干细胞与骨髓微环境的粘附,使干细胞定位于骨髓特定区域增强由跨膜生长因子介导的干细胞与基质细胞的相互作用,传递增殖和分化信号,在特定的生长因子浓度下还可维持干细胞的静息状态。此外,CD44 作为归巢相关粘附分子,与造血干细胞的归巢有直接关系[6]。Vermeulen 等用粘附分子抗体封闭小鼠干细胞后发现抗 VLA-4 和抗 CD44 对小鼠干细胞进入骨髓的抑制程度达到了 77% ~ 86%。而其它粘附分子抗体的抑制作用明显不如前两者,说明小鼠干细胞归巢至骨髓依靠 VLA-4 和 CD44 作用[2]。因此我们选择 CD49d(VLA-4 的 α 链)、CD44 作为我们的观察指标,同时比较这两种粘附分子在 APS 动员 HSPC 时何者的变化占主导地位。

小鼠 HSPC 具有特征性的表面标志 - 干细胞抗原 -1(Sca-1),因此,可以通过 Sca-1 抗体将 HSPC 从小鼠骨髓细胞中分离出来[5]。将 APS 按 4mg/kg 剂量连续 6d 作用于小鼠后,其外周血 WBC 在第 8d 达到高峰[1]。我们继续按该方法动员小鼠 HSPC,第 8d 时小鼠外周血 WBC 和 Sca-1$^+$细胞数均增高,其中 Sca-1$^+$细胞数增高了近 50%,而骨髓 MNC、Sca-1$^+$细胞数却显著的减少,说明出现了 HSPC 从骨髓至外周血的再分布[9]。此时骨髓 MNC 表面 CD49d 表达的阳性率、平均荧光强度和骨髓 Sca-1$^+$细胞中的 CD49d 的表达都明显低于对照组,骨髓 MNC 表面 CD44 的表达也有减弱。说明 APS 通过使造血细胞表面粘附分子表达发生变化,影响造血细胞对骨髓基质的粘着力而使其"外移"至外周血。APS 动员时骨髓 MNC、Sca-1$^+$细胞表面 CD49d 表达降低的同时,CD44 的变化远不如 CD49d 显著:骨髓 MNC 表面 CD44 阳性率的变化与 CD49d 类似,但平均荧光强度和骨髓 Sca-1$^+$细胞表面 CD44 表达阳性率无明显变化,说明 HSPC 和骨髓的粘附通过 VLA-4 介导,而 APS 主要通过削弱 VLA-4 粘附能力使未成熟的 HSPC 提前进入血循环而产生动员作用[4,5]。

本实验发现,一定浓度的 APS 可使小鼠骨髓造血细胞表面的某些粘附分子尤其是 CD49d 的表达降低,这一变化影响了 HSPC 出髓而达到动员的目的。APS 动员时外周血 MNC 表面粘附分子表达是否也有相应的变化,以及是不是还有其他的粘附分子参与等,皆需要进一步的实验证实,APS 使造血细胞表面粘附分子表达变化的机制也需要进一步研究和探索。

(下转第 300 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

占 Down's 综合征的 1%～2%）也有重要的诊断价值，但不适于三体比例较低的嵌合体诊断，也不能用于平衡易位携带者的诊断（易位型占 Down's 综合征的 3%～4%）。

将 Down's 综合征患儿 21 号染色体上的 STR 电泳条带与其父母的 STR 电泳条带进行对比，通过带型特征确定患儿 STR 的来源。20 例患儿的电泳条带均包含了母亲的全部电泳条带，而与父亲的电泳条带只有部分相同，就整个人群中 Down's 综合征而言，推测其多数情况是来源于母亲，与 Down's 综合征的发生与其母亲生殖细胞形成时 21 号染色体不分离有关。

由此可见，本研究所采用的实验方法能较好地对 D21S11 和 D21S1414 多态性进行分析，以确定 21 号染色体的数目，方法准确、快速（整个过程 24h 内完成）、简便和费用低廉。应当注意的是仅选用 1 个 STR 作为基因诊断标记，会有少数对象不能诊断，我们建议同时选择上述 2 个 STR 标记，以提高检测的灵敏度和准确性。它对部分嵌合型 Down's 综合征的诊断存在一定漏诊，也不能用于诊断平衡易位携带者，有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Clementi M,Bianca S,Tenconi R.Re: "parity and the risk of Down's syndrome"[J]. Am J Epidemiol,2004;160(6):610.

[2] Yang YH,Nam MS,Yang ES. Rapid prenatal diagnosis of trisomy 21 by real-time quantitative polymerase chain reaction with amplification of small tandem repeats and S100B in chromosome 21 [J]. Yonsei Med J,2005;46(2):193-197.

[3] Quaife R,Wong LF,Tan SY,et al. QF-PCR-based prenatal detection of aneuploidy in a southeast Asian population[J]. Prenat Diagn,2004;24(6):407-413.

[4] Von Eggeling F,Freytag M,Fahsold R,et al. Rapid detection of trisomy 21 by quantitative PCR[J]. Hum Genet,1993;91(6):567-570.

[5] Pertl B,Kopp S,Kroisel PM,et al. Quantitative flourescence polymerase chain reaction for the rapid prenatal detection of common aneuploidies and fetal sex[J]. Am J Obstet Gynecol,1997;177(4):899-906.

[6] Pertl B,Yau SC,Sherlock J,et al. Rapid molecular method for prenatal detection of Down's syndrome[J]. Lancet,1994;343(8907):1197-1198.

[7] Samura O,Sohda S,Johnson KL,et al. Diagnosis of trisomy 21 in fetal nucleated erythrocytes from maternal blood by use of short tandem repeat sequences[J]. Clin Chem,2001;47(9):1622-1626.

[8] Verma L,Macdonald F,Leedham P,et al. Rapid and simple prenatal DNA diagnosis of Down's syndrome[J]. Lancet,1998;352(9121):9-12.

[9] Yan J,Wu J,Li Y,et al. A novel diagnostic strategy for trisomy 21 using short tandem repeats[J]. Electrophoresis,2006;27(2):416-422.

[10] 俞冬熠，温 严，任慧颖.PCR-AFLP 技术产前诊断唐氏综合征[J]. 中国妇幼保健，2004;19(7):82-83.

[11] Sharma V,Litt M. Tetranucleotide repeat polymorphism at the D21S11 locus[J]. Hum Mol Genet,1992;1(1):67.

（责任编辑：关蕴良）

（上接第 276 页）

参 考 文 献

[1] Hu J,Wu H. Study on mobilization of angelica polysaccharides on peripheral blood hematopoietic stem cell in mice [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,2006;37(12):1835-1838.

[2] Timeus F,Crescenzio N,Basso G,et al. Cell adhesion molecule expression in cord blood CD_{34}^{+} cells[J]. Stem Cells,1998;16(2):120-126.

[3] Stefan F,Marlon R,Alwin K,et al. Delineation of cell cycle state and correlation to adhesion molecule expression of human CD_{34}^{+} cells from steady-state bone marrow and peripheral blood mobilized following G-CSF-supported chemotherapy[J]. Stem Cells,1998;16(4):271-279.

[4] Vermeulen M,Le-Pesteur F,Gagnerault MC,et al. Role of adhesion molecules in the homing and mobilization of murine hematopoietic stem and progenitor cells[J]. Blood,1998;92(3):894-900.

[5] Chen T,Xue Y. Role of adhesion molecules in mobilization of hematopoietic cells[J]. Chinese Medical Journal,2003;116(2):273-277.

[6] Lee YH,Lee YA,Noh KT,et al. Homing-associated cell adhesion molecules and cell cycle status on the nucleated cells in the bone marrow,mobilized peripheral blood and cord blood[J]. J Korean Med Sci,2004;19(4):523-528.

[7] 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.

[8] 李 静，王亚平. 当归多糖对骨髓巨噬细胞的影响及其与造血调控的关系[J]. 中草药，2005;36(1):69-72.

[9] Link DC. Mechanisms on granulocyte colony-stimulating factor-induced hematopoietic progenitor-cell mobilization[J]. Semin Hematol,2000;37(1 Suppl 2):25-32.

（责任编辑：关蕴良）