维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)06-0581-03

人参多糖对小鼠造血干/祖细胞的动员作用

吴 宏,赵 俊,王亚平

(重庆医科大学基础医学院组胚教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨人参多糖(GPS)对小鼠造血干/祖细胞(HSPC)的动员作用,为从植物多糖中寻找造血干细胞动员剂提供实验依据。方法:采用 WBC、MNC 计数、免疫细胞化学、流式细胞术和造血祖细胞体外培养检测经 GPS 动员后外周血 WBC、MNC、CD_{34}^+ 细胞和 CFU-Mix 产率的变化。结果:给小鼠尾静脉注射 GPS 2mg/kg 后 4h 外周血 WBC、MNC 升高达到峰值,为 NS 组的 3 倍和 3.5 倍; 外周血中 CD_{34}^+ 细胞百分率和 CFU-Mix 产率分别为 0.0079±0.0010 和 (25.0±9.1)cfu/2×10^5MNC, 显著高于 NS 组;GPS 和 G-CSF 联合动员时外周血 WBC、MNC 数量,CD_{34}^+ 细胞百分率和 CFU-Mix 产率都明显优于单用 GPS 的效果。结论:人参多糖对小鼠 HSPC 有一定动员作用,与 G-CSF 联合应用有协同作用。

【关键词】造血干/祖细胞;动员;人参多糖

【中国图书分类法分类号】R285.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-12-27

The effect of mobilization of ginseng polysaccharide on murine hematopoietic stem/ progenitor cell

WU Hong, et al

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

【Abstract】*Objective*: To study the mobilizable effect of ginseng polysaccharide (GPS) on murine hematopoietic stem/ progenitor cells and provide experimental evidences for mobilizable preparation of hematopoietic stem cell from plant polysaccharide. *Methods*: The changes of the numbers of WBC and MNC, the percentage of CD_{34}^+ cell and the yields of CFU-Mix in peripheral blood were examined by means of WBC and MNC counts, immunocytochemistry, flow cytometry and hematopoietic cell culture in vitro. *Results*: 4 hours after injection of GPS into mice with a dosage of 2 mg/kg, the numbers of WBC and MNC reached the maximum, which were 3 times and 3.5 times that of the NS group respectively. The percentage of CD_{34}^+ cell and the yields of CFU-Mix in vitro in peripheral blood (0.0079±0.0011 and (25.0±9.1)cfu/2×10^5MNC respectively) after the mobilization by GPS were obviously higher than those of the NS group. The effect of mobilization by combination of GPS and G-CSF was much better than that mobilized by single administration of GPS. *Conclusion*: GPS alone or in combination with G-CSF could significantly mobilize murine hematopoietic stem/progenitor cells from bone marrow into peripheral blood.

【Key words】Hematopoietic stem/progenitor cell; Mobilize; Ginseng polysaccharide

造血干/祖细胞动员是外周血造血干细胞移植技术中的重要环节, 其技术关键之一是筛选高效、安全的造血干细胞动员剂。目前应用的造血干细胞动员剂如 G-CSF 和抗肿瘤药物都有这样或那样的副作用。人参多糖(Ginseng polysaccharide, GPS)为人参的主要药效成分之一,其升白细胞作用疗效确切[1],同时,GPS 对造血祖细胞的增殖与分化有明确的刺激作用[2]。若能从植物多糖中筛选出高效、安全的动员剂,将会极大地促进外周血干细胞移植的基础研究和临床应用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 6~12 周龄清洁级 BALB/c 小鼠, 雌雄各半, 体质量 18~24 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 药物与试剂 GPS 由四川省中药研究所提取、分离、纯化(纯度 95%以上)、鉴定;RPMI-1640 培养基、甲基纤维素:美国 Gibco 公司产品; 重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF):日本麒麟株式会社产品;马血清、重组人白细胞

作者介绍: 吴 宏(1963-),女,副教授,硕士,
主要研究方向:造血干细胞生物学。

基金项目:重庆市科委资助课题 [渝科计发字(2001)54 号]。

维普资讯 http://www.cqvip.com

介素 -3(rhIL-3):中国军事医学科学院基础研究所提供;红细胞生成素 (EPO): 美国 Amgen 公司产品;GM-CSF: 美国 Cytolab 公司产品;兔抗小鼠 CD34mAb:博士德生物工程有限公司产品;SABC 免疫组化染色试剂盒:北京中山生物技术有限公司产品;DAB 显色试剂盒: 北京中山生物技术有限公司产品;FITC 标记的大鼠抗小鼠 CD_{34} mAb:Serotec 公司产品;FITC 标记的大鼠 IgG2a(阴性对照):eBioscience 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 GPS 对外周血白细胞、单个核细胞影响的量 - 效和时 - 效关系 小鼠随机分为 5 组,分别一次性给小鼠尾静脉注射不同剂量 GPS(1,2,4 和 8 mg/kg)或等量生理盐水(NS),于给药后 2,4,6,8,10 和 12h 分别剪小鼠尾采集各组小鼠外周血进行白细胞(WBC)和单个核细胞(MNC)计数,观察 GPS 对小鼠外周血 WBC、MNC 数量影响的量效、时效关系,应用统计学正交设计分析找出 GPS 最佳给药剂量和采血时间。

1.2.2 实验动物分组与给药途径 小鼠随机分为四组:NS 组、GPS 组、G-CSF 组、G-CSF+GPS 组, 每组 8 只小鼠。GPS 组和 NS 组分别一次性从小鼠尾静脉注射 GPS 2mg/kg 或等量生理盐水 4h 后采集外周血;G-CSF 组: 给小鼠皮下注射 rhG-CSF 10μg/kg,连用 5 天后采集外周血;G-CSF+GPS 组: 给小鼠皮下注射 rhG-CSF 10μg/kg,连用 5 天,第 5 天一次性注射 GPS 2mg/kg 4h 后采集外周血。用常规方法进行 WBC、MNC 计数。

1.2.3 外周血单个核细胞(MNC)的分离 于各个采血时间点摘小鼠眼球取外周血,肝素抗凝,用淋巴细胞分离液分离 MNC,PBS 洗涤后制成外周血 MNC 悬液。

1.2.4 CD_{34}^+ 细胞的免疫细胞化学染色鉴定 NS 组和 GPS 组的 MNC 悬液滴在 APES 包被的玻片上,凉干,用 40g/L 多聚甲醛固定 15min,采用 SABC 免疫细胞化学法染色 CD_{34}^+ 细胞。阳性对照:采用磁性分选的人造血干 / 祖细胞涂片;阴性对照:PBS 代替一抗。

1.2.5 流式细胞术检测 CD_{34}^+ 细胞的数量 取上述 4 组小鼠外周血,将每 1 例 MNC 悬液分两管,一管加 FITC 标记的大鼠 IgG2a (设为对照), 另一管加 FITC 标记的 CD_{34} 抗体,混匀,4℃避光孵育 30min,加红细胞裂解液,避光孵育 10min,离心后弃上清,PBS 洗涤,适当稀释,上流式细胞仪检测 CD_{34}^+ 细胞百分率。

1.2.6 外周血 CFU-Mix 培养和集落计数 上述 4 组小鼠取外周血,方法同上,分离 MNC 并调整 MNC 浓度至 1×10^6 个 /ml,采用甲基纤维素微量培养法[3],按顺序加入 2- 巯基乙醇、L- 谷氨酰胺、马血清、IL-3、GM-CSF、EPO、MNC 和甲基纤维素,RPMI-1640 培养液加至 2ml,振荡混匀后,培养体系加入培养板内,每孔 0.2ml,在 37℃、50ml/LCO_2、饱和湿度的条件下培养 6 天,计数 CFU-Mix 集落数。

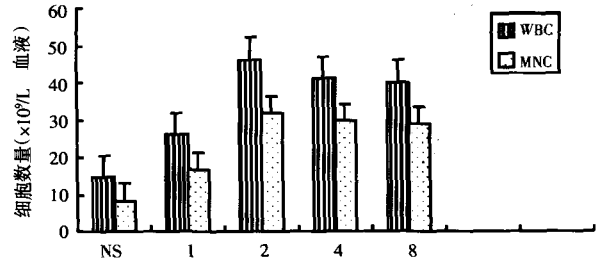
1.3 统计学处理

所获数据经 SAS8.1 统计软件进行正交设计分析、方差分析和 t 检验。

2 结 果

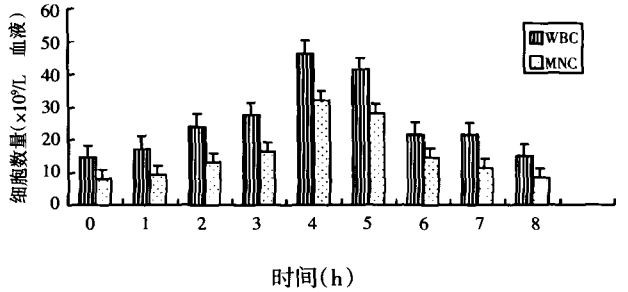
2.1 GPS 对外周血白细胞、单个核细胞影响的量-效和时-效关系

GPS 给药后,小鼠外周血 WBC、MNC 数量均增加,GPS(2mg/kg)组最高,分别相当于 NS 组的 3.1 倍和 3.8 倍($P<0.05$)(图 1)。GPS 给药后 2h 上述两项指标开始升高, 于 4h 达高峰, 分别为给药前的 3.1 倍和 4 倍,与给药前比较差异有统计学意义($P<$



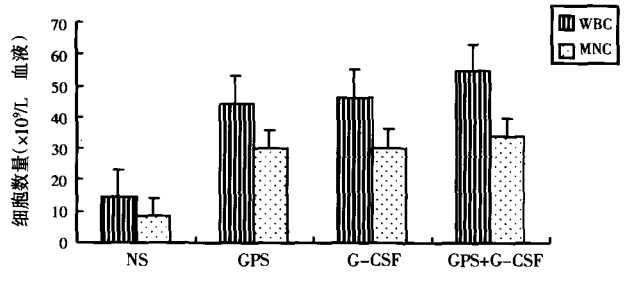
* 与 NS 组比较:$P<0.05$

图 1 不同剂量 GPS 对小鼠外周血 WBC、MNC 数量的影响(量效关系)($n=10,\bar{x}\pm s$)



* 与 1,2,3,6,7,8 h 组比较:$P<0.05$

图 2 GPS 给药后不同时间小鼠外周血 WBC、MNC 数量的变化(时效关系)($n=10,\bar{x}\pm s$)



* 与 GPS 组比较:$P<0.05$

图 3 GPS 和 G-CSF 的协同作用($n=8,\bar{x}\pm s$)

维普资讯 http://www.cqvip.com

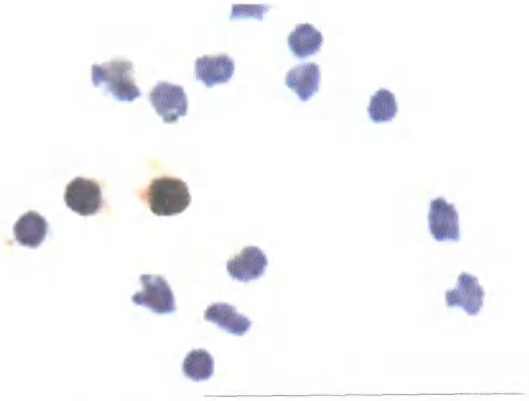


图 4 NS 组外周血中的 CD_{34}^+细胞(ICC)×1000

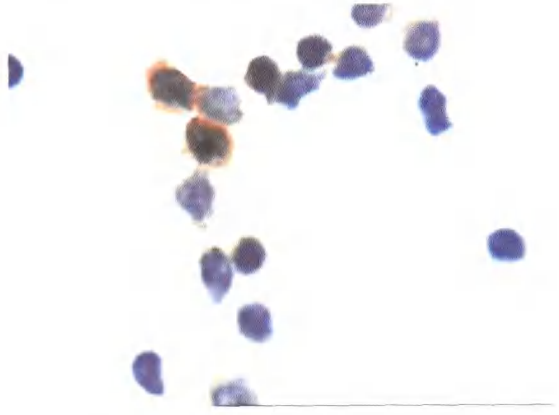


图 5 GPS 组外周血中的 CD_{34}^+细胞(ICC)×1000

0.05)(图 2);8h 后趋于正常。所以选择 GPS 的给药剂量为 2mg/kg,采血时间为给药后 4h。

2.2 GPS 和 G-CSF 的协同作用

给小鼠注射 GPS、G-CSF 或 GPS+G-CSF 之后,WBC 数量分别是 NS 组的 3、3.2 和 3.7 倍,MNC 数量分别是 NS 组的 3.5、3.6 和 4 倍。G-CSF+GPS 联合动员后小鼠外周血的 WBC、MNC 数显著高于单用 GPS($P<0.05$)或单用 G-CSF($P<0.05$);GPS 组与 G-CSF 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)(图 3)。

2.3 外周血 CD_{34}^+细胞免疫细胞化学染色鉴定和流式细胞术定量检测

如图 4~5 所示:免疫细胞化学染色、苏木精复染后,油镜下观察细胞表面有棕黄色标记物的细胞为 CD_{34}^+细胞。经 GPS 2mg/kg 动员 4h 后 CD_{34}^+细胞的数量较 NS 组有所增加。流式细胞术检测表明 GPS 组小鼠外周血 CD_{34}^+细胞百分率明显高于 NS 组($P<0.05$);G-CSF+GPS 联合动员组 CD_{34}^+细胞百分率高于单用 GPS 组($P<0.05$)(表 1)。

2.4 外周血 CFU-Mix 集落检测

CFU-Mix 集落培养显示 GPS 组 CFU-Mix 产率显著高于 NS 组($P<0.05$);G-CSF+GPS 联合动员后 CFU-Mix 产率高于单用 GPS 或 G-CSF 组($P<0.05$)(表 1)。

表 1 GPS 动员对小鼠外周血 CD_{34}^+细胞百分率和 CFU-Mix 集落产率的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	CD_{34}^+ 细胞百分率(%)	CFU-Mix 集落数 (/2×10^5MNC)
NS	$0.45\pm0.08^{\triangle}$	$11.9\pm5.4^{\triangle}$
GPS(2mg/kg)	$0.79\pm0.10^{*\triangle}$	$25.0\pm9.1^{*\triangle}$
G-CSF(10μg/kg)	$1.15\pm0.85^{*}$	$37.2\pm13.2^{*\triangle}$
G-CSF+GPS	$1.73\pm0.23^{*}$	$54.1\pm16.5^{*}$

注:CD_{34}^+ 细胞百分率的 $n=4$,CFU-Mix 集落数的 $n=20$,$^*P<0.05$ vsNS 组,$\triangle P<0.05$ vsG-CSF+GPS 组

3 讨 论

正常情况下外周血干细胞的数量很低,远不能满足造血干细胞移植时所需的数量。G-CSF 是临床上常用的干细胞动员剂,但体内注射 G-CSF 仍存在许多不足之处,如所需剂量大、费用高;大剂量 G-CSF 注射可引起剧烈骨骼疼痛,健康供者不愿接受,因而给外周血干细胞移植的广泛开展带来一定的困难。发掘新的对骨髓造血干细胞有增殖和动员作用的药物在临床上具有重要意义。人参是中医药学的"补气、补血"要药,GPS 为其主要药效成分之一。GPS 在肿瘤放射治疗中具有升白细胞作用[1],在体外对 CFU-GM 增殖有明显促进作用[2]。其是否能动员骨髓中的 HSPC 进入外周血目前尚未见报道。

造血干细胞没有明确的形态学特征,用常规形态学技术无法区分[3]。我们通过外周血 WBC、MNC 计数间接反映外周血中 HSPC 的变化,粗略了解外周血中 HSPC 在 GPS 作用下的量效和时效关系。在此基础上以 CD_{34} 抗原作为 HSPC 检测的主要标志,采用免疫细胞化学法和流式细胞术对经 GPS 动员的小鼠外周血 CD_{34}^+细胞进行定性检测和定量分析,发现给小鼠注射 2mg/kg GPS 后 4h 外周血中 CD_{34}^+细胞明显高于阴性对照组;与 G-CSF 阳性对照组比较无明显差异,但二者给药的途径和作用的时间明显不同,由于 GPS 作用的时间较短,我们推测 GPS 可能是将骨髓中已有的部分 CD_{34}^+细胞"驱赶"到外周血中;G-CSF+GPS 联合动员后小鼠外周血中

(下转第 622 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

示胆固醇与 AD 发病密切相关，通过建立高胆固醇血症可在动物模型中复制出部分 AD 的特征性病理改变。

本实验中，行为学实验和 HE 染色结果显示，铝中毒组和铝中毒联合高胆固醇饮食组小鼠均出现空间识别能力下降，海马 CA1~CA2 区神经元病理损伤。铝中毒联合高胆固醇饮食组小鼠在血清总胆固醇水平较单纯铝中毒组明显升高的同时，空间识别能力更低，海马区神经元损伤更明显，不仅存在严重损伤，而且在变性坏死神经元周围出现散在的粉红色斑块样色素沉着物。经改良的刚果红染色后，发现在 HE 染色中呈粉红色的斑块样色素沉淀物在刚果红染色中呈红色改变，提示为淀粉样蛋白，而其它各组未见到类似病变。以上说明，高胆固醇血症能促进淀粉样蛋白在铝中毒小鼠脑内沉积并加重神经元损伤。但遗憾的是，所有标本的银染色均未发现神经纤维缠结样改变。

本实验结果还显示，单纯高胆固醇血症尚不能导致小鼠学习记忆功能障碍及神经元病理损伤。但有学者通过类似的实验研究发现，高脂血症能通过促进大鼠海马神经元内一氧化氮合酶(nNOS)的过表达，生成过量的 NO，导致海马神经元损伤的发生[8]。得出不同结果的原因可能跟各自采用的动物种属、实验时间长短和实验条件等不同有关。

综上所述，我们得出以下结论：高胆固醇血症能加重铝中毒导致的小鼠海马神经元损伤，其原因可能与促进淀粉样蛋白在小鼠脑内沉积有关，胆固醇、铝在 AD 的发病中可能存在协同作用。铝中毒联合高胆固醇血症两因素建立的拟 AD 模型可能更贴近人类 AD。

(通讯作者：刘颖菊，女，副教授，硕士生导师。E-mail: liuyingjbh@yahoo.com.cn)

参 考 文 献

[1] Wellington CL. Cholesterol at the crossroads: Alzheimer's disease and lipid metabolism[J].Clinical Genetics, 2004;66(1):1-16.

[2] Howland DS, Trusko SP, Savage MJ, et al.Modulation of secreted beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in brain by cholesterol[J].J Biol Chem, 1998;273(26):16576-16582.

[3] Morris R.Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat[J].J Neurosci Methods, 1984;11(1):47-60.

[4] 刘介眉，严庆汉，路英杰，等，主编.病理组织染色的理论方法和应用[M].第 1 版，北京：人民卫生出版社，1983.149-231.

[5] Qian ZM, Shen X.Brain Iron transport and neurodegeneration [J].Trends Mol Med, 2001;7(3):103-108.

[6] Exley C.The aluminum -amyloid cascade hypothesis and Alzheimer's disease[J].Subcell Biochem, 2005;38:225-234.

[7] Sparks DL, Scheff SW, Hunsaker JC, et al.Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol[J].Exp Neurol, 1994;126(1):88-94.

[8] 柯红林，吴连仲，贾友苏.高脂血症大鼠海马nNOS 及 NT-3 免疫阳性神经元的变化[J].安徽医科大学学报，2004;39(3):177-181.

(上接第 583 页)

CD_{34}^+细胞明显高于单用 G-CSF 或 GPS 组。提示 GPS 动员后分离的外周血 MNC 悬液中含有较多的 HSPC，GPS 与 G-CSF 联合应用有协同作用，其机制是否为 G-CSF 先促进骨髓中 HSPC 的增殖，再与 GPS 协同驱使 HSPC 进入外周血尚不清楚。经 GPS 动员的小鼠外周血 CD_{34}^+细胞活性如何？我们通过体外培养外周血 CFU-Mix 集落来反映细胞群中早期 HSPC 的数量和活力，实验结果表明：GPS 动员后外周血 MNC 能形成较多的 CFU-Mix 集落，其 CFU-Mix 集落形成能力与 G-CSF 组无明显差异；G-CSF+GPS 联合动员后 CFU-Mix 产率高于单用 GPS 组，此结果进一步证明 GPS 能动员小鼠骨髓 HSPC 进入外周血，且与 G-CSF 有协同作用。由于造血重建能力是造血干细胞的唯一可靠标志[5]，我们将进一步研究 GPS 动员的造血干细胞对骨髓抑制小鼠的造血重建功能以及 GPS 动员的可能机制。

参 考 文 献

[1] 陈岩菊，杜伟彬，李树臣.人参多糖在肿瘤放射治疗中升白细胞观察[J].中医药学报，2004;32(2):55-56.

[2] 戴 勤，王亚平，周开昭，等.人参多糖对粒单系造血祖细胞增殖分化的影响[J]. 基础医学与临床，2004;24(1):52-55.

[3] 刘秀珍.造血祖细胞培养技术实验手册[M].北京：北京出版社，1993.118-127.

[4] Bunting KD.ABC transporters as phenotypic makers and functional regulators of stem cells[J].Stem Cells, 2002;20(1):11-20.

[5] Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, et al.A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity [J]. Nature Med, 1998;4(9):1038-1045.