维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)06-0804-04

人参多糖动员的造血干/祖细胞移植重建造血衰竭小鼠造血功能的研究

吴 宏,赵 俊,李芳菲,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:探讨经人参多糖动员的外周血造血干/祖细胞移植对造血衰竭小鼠造血重建的作用。方法:建立小鼠造血衰竭模型,移植经人参多糖动员的外周血单个核细胞,检测受体小鼠生存时间,外周血 WBC,脾湿重及脾集落数,进行染色体嵌合实验。结果:经人参多糖动员的雄性小鼠外周血 MNC 1×10^5 个输注给致死剂量照射的雌性小鼠,可明显延长小鼠存活时间;提高受体小鼠外周血 WBC 数;亦能增加脾湿重,提高脾集落(CFU-S)数;经 Y 染色体检测(PCR 法)受体小鼠外周血单个核细胞可检出 581bp Y 染色体序列。结论:经人参多糖动员小鼠的外周血中存在数量较多的造血干/祖细胞,回输给造血衰竭小鼠能重建小鼠造血功能。

【关键词】人参多糖;动员;造血干/祖细胞;移植;造血重建

【中国图书分类法分类号】R285.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-09-08

Study on hematopoietic reconstruction for bone marrow depression mice with the transplantation of mobilized peripheral blood stem/proginiter cells by ginseng polysaccharide

WU Hong, et al

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

【Abstract】*Objective*: To study the hematopoietic reconstruction for bone marrow depression mice with mobilized peripheral blood stem/proginiter cells by ginseng polysaccharide. *Methods:* Establish hematopoiesis failure model of mouse and transplant murine peripheral blood mononuclear cells mobilized by GPS . To observe the survival time, WBC, the weight of spleen, the number of CFU-S of recipient mice and chromosome chimerism. *Results:* After PBMNCs (1×10^5)mobilized by GPS from mice (male) were injected to the lethality irradiated mice, it can reduce the time of WBC recovery obviously; prolong the time of murine survival, increase the number of WBC of the recipient mice; it can also increase the number of CFU-S, the weight of spleen; Evaluating the Y chromosome by PCR, the result showed that 581bp Y chromosome sequence was examined in peripheral blood of the recipient mice. *Conclusion:* There are a lot of hematopoietic stem/ proginiter cells in peripheral blood of the mice mobilized by GPS, so it can obviously reconstruct the hematopoiesis of the bone marrow depression mice by transplantation.

【Key words】Ginseng polysaccharide; Mobilization; Hematopoietic stem/ progenitor cell; Transplantation; Hematopoietic reconstruction

人参多糖(Ginseng polysaccharide,GPS)为人参的主要药物成分之一,既往研究发现:在有外源性 GM-CSF 存在的情况下,GPS 能显著促进粒单系祖细胞 CFU-GM 的增殖与分化,同时 GPS 能促进骨髓基质细胞合成和分泌造血生长因子[1,2]。我们的实验已初步发现:GPS 能提高小鼠外周血 WBC、MNC 数以及 CD_{34}^+ 细胞百分率,且外周血 CFU-Mix 产率显著高于对照组,提示 GPS 对小鼠造血干/祖细胞有一定动员作用,且与 G-CSF 联合应用动员效果更佳。经 GPS 动员的外周血造血干/祖细胞(HSPC)能否重建造血功能呢?本文采用建立造血衰竭小鼠模型,移植经 GPS 动员的外周血 HSPC,观察受体小鼠生存时间,检测外周血 WBC 数,脾湿重及脾集落数,染色体嵌合等实验血液学技术研究 GPS 动员的外周血 HSPC 对骨髓抑制小鼠的造血重建作用,为从植物中药有效成分中寻找造血干细胞动员剂或辅助制剂提供理论与实验依据。

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

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 8~12 周龄清洁级 BALB/c 小鼠,雌、雄各半,体重 18~24g,重庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 药物与试剂 人参多糖(GPS)由四川省中药研究所提供,纯度 >95%。Sry 引物与 IL-3 引物由上海生物工程有限公司合成。DNA 抽提试剂盒是北京鼎国生物技术有限责任公司产品。Taq DNA 聚合酶,200U/30μl,Promega 生物制品有限公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 造血干细胞的动员和外周血单个核细胞(PBMNC)采集 雄性 BALB/c 小鼠(供体小鼠)随机分为两组,分别一次性经尾静脉注射 GPS 2mg/kg 或等量生理盐水(NS)。给药后 4h 无菌条件下开胸取外周血,采用 Ficoll-Hypague 密度梯度离心分离 PBMNC。

1.2.2 造血衰竭小鼠模型的建立和外周血造血干/祖细胞移植 雌性 BALB/c 小鼠(受体小鼠)装入面积 15cm × 15cm 特制有机玻璃鼠盒内,经 ^{60}Co γ 射线全身一次性致死剂量(8.5Gy)照射,照射距离为 75cm,剂量率为 57.28cGy/min。照射后 4~6h 内,经尾静脉输注雄性供体小鼠 PBMNC,移植后小鼠在无菌层流架内饲养,饮水、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):受体小鼠照射后未输注 PBMNC;② 实验对照组(NS 组):通过尾静脉移植经 NS 动员后的 PBMNC,1×10^5 个 PBMNC/只;③ 实验组(GPS 组):通过尾静脉移植经 GPS 动员后的 PBMNC,1×10^5 个 PBMNC/只。

1.2.3 外周血白细胞检测及生存时间的观察 移植后定期尾静脉取血检测各组受体小鼠 WBC;观察移植后各组受体小鼠的生存时间和 30 天存活率。

1.2.4 脾湿重及脾集落的检测 移植后 12 天取受体小鼠脾脏,称脾湿重后放入 Bouin's 液中固定 24h。弃 Bouin's 液换同样容积 80%酒精,每 24h 换 1 次新的酒精,5 天后观察脾脏表面结节并记数(即 CFU-S)。

1.2.5 受体小鼠 Y 染色体 PCR 分析 取移植后 GPS 组第 90 天仍存活小鼠外周血,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 600μl,参照全血基因组 DNA 提取试剂盒产品说明书提取 DNA。

2) PCR 扩增:以 IL-3 为内参照

Sry 引物序列:上游 5'-GCGTGCAAGCATCTAACTGG-3'

下游 5'-AGCCCCCTGACTCCTCTGAC-3'

IL-3 引物序列:上游 5'-CATGCTGCTCCTGCTCCT-GAT-3'

下游 5'-ACATTCCACGGTTCCACGGTTAG-3'

50μl PCR 反应体系:ddH_2O 34.5μl,Buffer 5μl,Mg^{2+} 25mmol/L,dNTP 200μmol/L,引物 20μmol/L,DNA 1μg,Taq 酶 2unit。预变性 94℃ 1min;94℃ 30s,60℃ 30s,72℃ 1min,30 个循环。

3) 扩增物的检测:取 PCR 扩增产物 10μl 经 2%琼脂糖凝胶电泳后,溴化乙锭染色 30~40min,在凝胶电泳图像分析系统中进行分析,并拍照。

1.3 统计学处理

所获数据均经 SAS8.1 统计软件进行方差分析和 t 检验。

2 结 果

2.1 移植后受体小鼠生存时间和 30 天存活率的观察

对照组小鼠照射后 15 天内全部死亡;NS 组小鼠移植后 37 天内全部死亡;GPS 组小鼠存活时间均大于 21 天,有 5 只存活时间超过了 90 天(表1)。

表 1 移植后各组小鼠 30 天存活情况

分组(group)	鼠数(只)	存活数量(只)	存活率(%)
对照组	10	0	0
NS 组	12	1	8.3
GPS 组	10	7	70*

*: $P<0.05$ vs 对照组和 NS 组

2.2 移植后受体小鼠外周血 WBC 的变化

照射后 3~4 天小鼠外周血 WBC 数迅速下降,对照组小鼠死亡前 WBC 值均小于 0.3×10^9/L;NS 组小鼠移植后 2 周 WBC 开始有一定程度上升,存活小鼠外周血 WBC 在 4 周后(仅存活 1 只)恢复至 3.8×10^9/L;GPS 组小鼠 WBC 于移植 1 周后开始上升,存活小鼠外周血 WBC 在 3 周后逐渐恢复至正常范围,以后仍持续升高(图 1)。

2.3 移植后受体小鼠脾湿重及脾集落(CFU-S)计数

经尾静脉给受体小鼠输注 1×10^5 供体小鼠 PBMNC,12 天后将受体存活小鼠处死,取脾脏,肉眼观察形态,称脾湿重,计数脾集落数。结果表明:NS 组的脾脏萎缩,体积变小,GPS 组的脾脏在形态上明显比 NS 组大;NS 组和 GPS 组的脾湿重分别为 30.4 ± 13.4 和 73.7 ± 7.1 (mg/10g 体重);脾集落的计数分别为 0 和 3 ± 1 个(图 2),其差异有统计学意义。

2.4 受体小鼠 Y 染色体的检测

提取移植后 GPS 组第 90 天仍存活小鼠外周血基因组 DNA,经 Y 染色体 PCR 分析,鉴定其造血来源。结果均检出了 581 bp Y 染色体序列,证实雌性受体小鼠重建的造血细胞来自雄性供体小鼠(图3)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

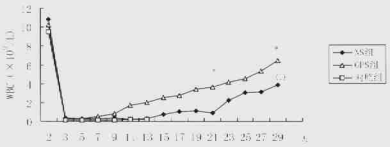


图 1 移植后不同时间小鼠外周血 WBC 的变化(×10⁹/L)
*: $P<0.05$ vs NS 组 (1)此时间仅 1 只小鼠存活



图 2 GPS 组小鼠脾集落(CFU-S)



图 3 受体小鼠 Y 染色体 PCR 分析
Line 1:DNA marker
Line 2、3:GPS 组内对照(IL-3 扩增产物)PCR 产物
Line4:正常雌性小鼠内对照 PCR 产物
Line 5、6:GPS 组 Sry 基因 PCR 产物
Line 7:正常雄性小鼠 Sry 基因 PCR 产物

3 讨 论

外周血干细胞移植 (peripheral blood stem cell transplantation,PBSCT)是应用来源于外周血液中的造血干 / 祖细胞使患者重建造血和免疫功能的一种干细胞移植。含有造血干细胞、大量祖细胞的 CD_{34}^+ 细胞是理想的移植物[3]。PBSCT 以其采集安全方便、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且具有潜在的抗残留病等优势[4],而受到广泛的关注。但在稳定的造血情况下,外周血中仅有少量造血干 / 祖细胞存在,相当于骨髓的 1 ~ 10%,不能满足外周血干细胞移植的需求。为了从循环的外周血中采集到足够的 HSPC 而采取的将 HSPC 从骨髓池"驱赶"到外周血的方法称为外周血干细胞动员。PBSCT 能否成功的关键在于干 / 祖细胞的输注剂量,所以选择高效、安全的造血干细胞动员剂就成为当前研究的热点。G-CSF 是目前临床广泛使用的造血干细胞动员剂,但仍然存在一些不足之处。许多抗癌药物,也具有造血干细胞动员作用,其中以大剂量环磷酰胺最常用,但只能用于恶性肿瘤患者做自体移植。这些因素限制了 PBSCT 的广泛开展。

人参是祖国传统医学的"补气、补血"要药,人参多糖(GPS)为其主要药物成分之一。我们前期的研究发现给小鼠注射 GPS 后外周血白细胞、单个核细胞、CD_{34}^+ 细胞数量明显提高;体外培养动员的单个核细胞,其 CFU-Mix 集落产率显著高于对照组。说明 GPS 对小鼠外周血 HSPC 有一定的动员作用,并且与 G-CSF 联合应用效果更好。造血干细胞移植实验法是一种体内造血干细胞测量方法,在评估造血细胞的长期造血重建能力方面具有较高的应用价值,是检测造血干细胞自我更新和多向分化能力的主要方法。所以目前认为移植后的造血重建是评判动员的 HSPC 数量与质量的最重要标准。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 GPS 动员的 HSPC 移植后能否有效地重建小鼠造血功能。

本研究采用造血干细胞移植实验法,将雌性受体小鼠用 $^{60}Co\ \gamma$ 射线致死剂量照射以致其造血功能衰竭,通过外周血象和生存时间证明小鼠造血衰竭模型建立是成功的。然后对其进行 HSPC 移植。实验发现:经 GPS 动员的雄性供体小鼠 PBMNC 输注给雌性受体小鼠后,可明显加快受体小鼠外周血 WBC 的恢复,并于移植 3 周后逐渐恢复至正常值范围,NS 组的 WBC 不能恢复至正常值范围;GPS 组小鼠 30 天存活率也明显高于 NS 组,移植后 NS 组小鼠 37 天内全部死亡,而 GPS 组小鼠有 5 只存活时间超过了 90 天。估计如果进一步提高移植的 PBMNC 的数量,可使小鼠的存活率进一步提高,存

维普资讯 http://www.cqvip.com

活时间进一步延长。提示经 GPS 动员的 PBMNC 能够重建小鼠造血功能，也证明了移植的 PBMNC 中含有大量的 HSPC。脾集落形成实验是检测小鼠造血干细胞的经典实验方法，利用该实验可以检测造血干细胞的相对数量[5]。对小鼠血液和骨髓中CFU-S的观察结果证明血液和骨髓中的干细胞处于动态平衡，造血干细胞在外周血或非造血器官中都不能正常发育，通过血液循环迁移的干细胞最终将回归造血器官的一定位置才能行使其生理功能。如果把 HSPC 移植到造血衰竭小鼠中，那么骨髓和脾脏中的 HSPC 必然会增殖、分化，重建造血功能，在 HSPC 移植后比较短的时间内，脾脏将会发挥它短期造血重建作用，即从外周血分布到脾脏的 HSPC 开始增殖、分化，那么脾脏在外观和重量上也会发生相应地改变。所以我们通过观察移植后小鼠脾脏的湿重和脾集落的计数来检测移植到小鼠体内的 HSPC。实验结果表明移植后 12 天 GPS 组的脾脏在形态上明显比 NS 组大；GPS 组的脾湿重和 CFU-S 数显著高于 NS 组，更进一步说明移植到小鼠体内的 PBMNC 中含有较多的 HSPC，同时在脾脏表面也形成了造血细胞集落。前面的实验结果已经间接地证明了 HSPC 植入成功。但为排除受体造血功能自行恢复的可能性，遗传学的直接证明才最具有说服力。哺乳动物 Y 染色体上存在性别决定区，即 Sry 基因。Y 染色体的 Sry 基因作为细胞本身基因组的标志，在细胞分裂、分化和增殖过程中，不会发生减弱和丢失现象，因此作为追踪移植细胞存活或植入的标志，明显优于其它的转基因方法[6,7]。我们采用 PCR 法检测移植后受体小鼠外周血细胞 Sry 基因，鉴定其造血来源。结果发现：移植后 GPS 组第 90 天存活小鼠，经 Y 染色体 PCR 分析，均检出了 581 bp Y 染色体序列，证实雌性受体小鼠重建的造血细胞来自雄性供体小鼠。本研究初步观察到 GPS 动员出的 HSPC 对小鼠造血功能重建的作用，为进一步探讨 GPS 的动员作用及其机理提供了理论与实验依据。

参 考 文 献

[1] 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.

[2] 吴 宏、姜 蓉、王亚平. 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.

[3] 唐佩弦. 造血干祖细胞移植的生物学基础[J].中国病理生理杂志，2000；16(10)：932-934.

[4] 韩忠朝. 造血干细胞理论与移植技术[M].郑州：河南科学技术出版社，2000.11.

[5] 王绮如、谭孟群、程腊梅. 造血生理学[M].长沙：中南大学出版社，2005.24.

[6] Hawkins AL, Jones RJ, Zehabauer BA, et al. Fluorescence in situ hybridization to determine engraftment status after murine bone marrow transplant [J]. Cancer Genet Cytogenet, 1992；64(2)：145-148.

[7] Yan XQ, Briddell R, Hartley C, et al. Mobilization of long-term hematopoitic reconstituting cells in mice by the combination of stem cell factor plus granulocyte colony-stimulating factor [J]. Blood, 1994；84(8)：795-797.

(上接第 803 页)

ET-1mRNA 的水平。ET-1 生成增加可使细胞表面特性改变，血管收缩舒张异常，抗血小板凝集作用也减弱，促进动脉粥样硬化，在糖尿病微血管病变早期可能起主要作用。干预高血糖所介导的 ET-1 的分泌，有可能减轻高血糖对内皮细胞的损害，有助于防治糖尿病血管并发症的发生发展。

参 考 文 献

[1] Michiels G. Endothelial cell functions [J]. J Cell Physiol, 2003；196：430-443.

[2] Laight DW, Carrier MJ, Anggard EE. Endothelial cell dysfunction and the pathogenesis of diabetic macroangiopathy[J]. Diabetes Metab Res Rev, 1999；15：274-282.

[3] De Vriese AS, Verheuren TJ, Van de Voorde J, et al. Endothelial dysfunction in diabetes[J]. Br J Pharmacol, 2000；130：963-974.

[4] Lee IK, Kim HS, Bae JH. Endothelial dysfunction：its relationship with acute hyperglycaemia and hyperlipidemia [J]. Int J Clin Pract Suppl, 2002；129：59-64.

[5] Miginn S, Poronnik P, King M, et al. High glucose and endothelial cell growth：novel effects independent of autocrine TGF-β 1 and hyperosmolarity[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2003；284：C1374-1386.

[6] Chen Y, McCarron RM, Golech S, et al. ET-1- and NO-mediated signal transduction pathway in human brain capillary endothelial cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2003；284(2)：C243-249.

[7] Chang CZ, Winardi D, Lin CL, et al. Attenuation of hemolysate-induced cerebrovascular endothelial cell injury and of production of endothelin-1 and big endothelin-1 by an endothelin-converting enzyme inhibitor[J]. Surg Neurol, 2002；58(3-4)：181-187.

[8] Bousette N, Giaid A. Endothelin-1 in atherosclerosis and other vasculopathies[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2003；81(6)：578-587.

[9] Lam HC. Role of endothelin in diabetes vascular complication[J]. Endocrine, 2001；14(3)：277-284.