维普资讯 http://www.cqvip.com



文章编号:0253－3626(2003)04－0405－04

# 人参总皂甙诱导人骨髓基质细胞表达 GM－CSF 的实验研究

陈 笛[1]，王莎莉[1]，王亚平[2]，王 璐[2]，姜 蓉[2]

(1.重庆医科大学基础医学院生理学教研室;2.组织胚胎学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究人参总皂甙(TSPG)对人骨髓基质细胞表达 GM－CSF 的影响及其与人粒单系血细胞发生的关系。方法:采用造血祖细胞与骨髓基质细胞体外培养、造血生长因子生物学活性检测、免疫细胞化学和核酸分子原位杂交等技术。结果:TSPG 能显著刺激粒单系造血祖细胞(CFU－GM)增殖;经 TSPG 诱导制备的骨髓基质细胞条件培养液富含 GM－CSF 样活性;TSPG 能显著促进骨髓基质细胞的 GM－CSF 蛋白和 mRNA 表达。结论:TSPG 可能通过直接和/或间接途径促进造血诱导微环境中的骨髓基质细胞合成和分泌 GM－CSF,进而促进 CFU－GM 的增殖分化。

【关键词】人参总皂甙;粒单系造血祖细胞;粒－巨噬细胞集落刺激因子

【中国图书分类法分类号】R331.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2002－10－14

# Experimental study on expressing GM－CSF in human bone marrow stromal cells by total saponins of Panax ginseng (TSPG)

*CHEN Di, et al*

(*Department of Physiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To study the relationship between effect of total saponins of Panax ginseng(TSPG) on expression of GM－CSF in human bone marrow stromal cells and modulation of human granulocytopoiesis and monocytopoiesis. *Methods*: The techniques of culture of hematopoietic progenitor cells and human bone marrow stromal cells in vitro, immunocytochemistry, nucleic acid in situ hybridization were used. *Results*: TSPG could markedly promote the colony formation of CFU－GM; human bone marrow stromal cells conditioned media prepared with TSPG could significantly enhance the proliferation and differentiation of CFU－GM, and expression of GM－CSF in protein and mRNA level in human bone marrow stromal cells induced by TSPG were much higher than those of the control group. *Conclusion*: TSPG may directly and/or indirectly promote stromal cells in hematopoietic inductive microenvironment to produce GM－CSF, which further prowote the proliferation and differentiation of human CFU－GM.

【Key words】 Total saponins of Panax ginseng; CFU－GM; GM－CSF

骨髓基质细胞是造血诱导微环境的核心成分，它不仅为血细胞发生提供支架，而且还可能通过细胞间直接接触和分泌多种造血生长因子来调节血细胞生成。人参是祖国传统医学的“补气”要药，人参皂甙是其主要药效成分。既往研究表明[1,2]，人参皂甙是人参“补气生血”或促进血细胞发生的有效成分，人参总皂甙(TSPG)在体内外均能促进小鼠造血干/祖细胞的增殖分化。本研究采用造血祖细胞体外培养、造血生长因子生物学活性检测、免疫细胞化学和核酸分子原位杂交等实验血液学技术，研究 TSPG 对人骨髓基质细胞表达 GM－CSF 的影响及其与粒单系造血调控的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 人骨髓细胞(hBMC)

取胸外科手术切除新鲜肋骨，供髓者无放、化疗史，骨髓细胞涂片检查无造血系统异常。淋巴细胞分离液分离骨髓有核细胞，RPMI－1640 培养液洗涤，用 4 号针头制备单细胞悬液。

### 1.2 人参总皂甙(total saponins of Panax ginseng, TSPG)

重庆中药研究所提供，纯度 98% 以上，RPMI－1640 培养液配制成所需浓度。

### 1.3 主要试剂

RPMI－1640 培养液，美国 GIBCO 公司产品；马血清

作者介绍:陈 笛(1974－ ),女,硕士,讲师。
主要研究方向:造血调控机理。

基金项目:国家自然科学基金项目(39670880)。

维普资讯 http://www.cqvip.com



(HS),中国军事医学科学院提供;重组人粒-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF),购自中国军事医学科学院基础医学研究所;鼠抗人 GM-CSF 单克隆抗体,美国 Pharmingen 公司产品。

1.4 人 GM-CSFcDNA 探针制备与标记

本实验室合成与标记[3]。

1.5 人骨髓基质细胞条件培养液(HBMSCM)制备

按 Dexter 等方法制备[4]。实验分组:对照组(HBMSCM),常规培养;TSPG 组(TSPG-HBMSCM),培养体系中加 TSPG(终浓度 50μg/ml);细菌脂多糖(LPS)组(LPS-HBMSCM),培养体系中加入 LPS(终浓度 10μg/ml)。分组加药后,置 37℃,含 5% $CO_2$ 的培养箱中培养 24h,离心收集培养上清液。

1.6 TSPG 体外作用对粒单系造血祖细胞(CFU-GM)增殖分化的影响

CFU-GM 体外琼脂半固体培养、集落染色鉴定与计数按本室常规方法进行[5,6]。对照组,常规培养;TSPG 组,常规培养基础上分别加不同浓度的 TSPG(终浓度 10~90μg/ml);药物对照组,常规培养体系中不加外源性 GM-CSF,而加入 TSPG(终浓度 10~90μg/ml)。根据每皿种植 $1\times10^5$BMC 所形成的集落数,评价 TSPG 体外作用对 CFU-GM 增殖分化的影响。

1.7 TSPG 诱导制备的 HBMSCM 中所含 GM-CSF 生物学活性检测

在 CFU-GM 培养体系中设置:常规对照组,常规培养;实验对照组(HBMSCM),常规培养基础上加入 10%(v/v)未经刺激制备的 HBMSCM;TSPG 诱导组(TSPG-HBMSCM),常规培养基础上加 10%(v/v)经 TSPG 诱导制备的 HBMSCM;LPS 诱导组(LPS-HBMSCM),常规培养基础上加入 10%(v/v)经 LPS 诱导制备的 HBMSCM。根据 $1\times10^5$BMC 所生成的 CFU-GM 集落数,评价各组 HBMSCM 中所含 GM-CSF 的生物活性。

1.8 TSPG 对骨髓基质细胞 GM-CSF 蛋白表达的检测

采用 SP 免疫细胞化学技术检测未诱导组(常规培养)、TSPG 组和 LPS 组(作用浓度和时间同 1.5)的骨髓基质细胞胞质内 GM-CSF 蛋白表达,并设置不加一抗的阴性对照组。每张载片计数 300 个细胞,计算 GM-CSF 蛋白表达阳性率和积分指数。反应强度依据胞浆中棕黄色颗粒多少及颜色深浅分为强阳性(+++)、阳性(++)、弱阳性(+)和阴性(-)4 级,分别记为 3、2、1 和 0 分,积分指数=阳性百分率×强度积分。

1.9 TSPG 对骨髓基质细胞 GM-CSFmRNA 表达的检测

采用核酸原位杂交技术检测骨髓基质细胞表达 GM-CSFmRNA 的水平(实验分组同 1.8,诱导时间为 12h),并设置不加探针和 RNA 酶处理载片的阴性对照组。光镜下每张载片计数 200 个细胞,计算阳性细胞的百分比和积分指数。反应强度依据胞浆中棕黄色颗粒多少及颜色深浅分为强阳性(+++)、阳性(++)、弱阳性(+)和阴性(-)4 级,分别记为 3、2、1 和 0 分,积分指数=阳性百分率×强度积分。

1.10 统计学方法

所获数据经计算机 SAS 统计软件处理,进行方差分析、Dunnet $t$ 检验和 SNK 检验。

## 2 结 果

2.1 TSPG 体外作用对 CFU-GM 集落形成的影响

在有外源性 GM-CSF 存在的条件下,TSPG 体外作用能明显促进人 CFU-GM 的增殖。当加入 TSPG10μg/ml 时,即表现出对 CFU-GM 增殖的刺激作用,在一定浓度范围内,随着加入药物浓度提高,其集落产率也显著提高,约在 50μg/ml 时达高峰(表 1)。若不加外源性 GM-CSF,而仅加入 TSPG,则几乎无 CFU-GM 形成。

2.2 TSPG 诱导制备的 HBMSCM 中所含 GM-CSF 生物活性的检测

常规制备的 HBMSCM 对 CFU-GM 的增殖分化有一定的刺激作用,而经 TSPG 或 LPS 体外诱导 24h 制备的 HBMSCM 能明显促进 CFU-GM 的增殖分化(图 1),提示经 TSPG 诱导后 HBMSCM 中所含 GM-CSF 含量或活性增加。

2.3 TSPG 对骨髓基质细胞表达 GM-CSF 蛋白的影响

免疫细胞化学检测显示:未经诱导的骨髓基质细胞表达 GM-CSF 蛋白的阳性率较低;经 TSPG 或 LPS 体外诱导 24h 后,其表达 GM-CSF 蛋白的阳性率显著提高(表 2),提示 TSPG 可诱导和促进骨髓基质细胞表达 GM-CSF 蛋白。

2.4 TSPG 对骨髓基质细胞表达 GM-CSFmRNA 的影响

表 1 不同浓度的 TSPG 体外作用对人 CFU-GM 增殖的影响(CFU-GM 集落数/$1\times10^5$ BMC, $n=31$)

| TSPG 浓度(μg/ml) | 0 | 10 | 30 | 50 | 70 | 90 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CFU-GM 集落数($\bar{x}\pm s$) | 45.69±6.12 | 50.61±5.77* | 60.68±5.07* | 74.42±7.05* | 65.77±8.01* | 53.03±5.11* |

* 与对照组相比 $P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com



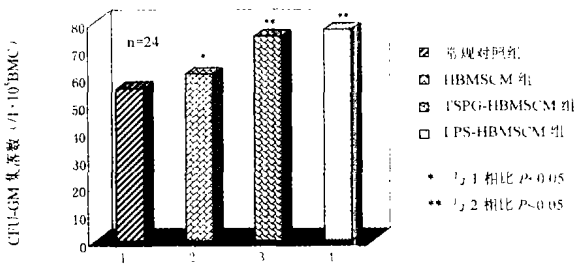



**图 1　TSPG 诱导制备的人骨髓基质细胞条件培养液对 CFU－GM 生长的影响**

**表 2　TSPG 对人骨髓基质细胞表达 GM－CSF 蛋白的影响($n=5$)**

| 分组 | 未诱导组 (Ⅰ) $\bar{x}\pm s$ | TSPG 诱导组 (Ⅱ) $\bar{x}\pm s$ | LPS 诱导组 (Ⅲ) $\bar{x}\pm s$ |
|---|---|---|---|
| 阳性率(%) | 22.50±5.23 | 39.68±8.97* | 42.62±8.16* |
| 积分指数 | 0.29±0.06 | 0.79±0.09* | 0.86±0.05* |

* 与Ⅰ相比 $P<0.05$

**表 3　TSPG 对人骨髓基质细胞表达 GM－CSFmRNA 的影响($n=5$)**

| 分组 | 未诱导组 (Ⅰ) $\bar{x}\pm s$ | TSPG 诱导组 (Ⅱ) $\bar{x}\pm s$ | LPS 诱导组 (Ⅲ) $\bar{x}\pm s$ |
|---|---|---|---|
| 阳性率(%) | 20.82±3.50 | 44.38±3.67* | 46.08±5.76* |
| 积分指数 | 0.31±0.03 | 0.81±0.06* | 0.83±0.06* |

* 与Ⅰ相比 $P<0.05$

核酸原位杂交结果显示：正常静止状态下骨髓基质细胞的 GM－CSFmRNA 表达水平较低；经 TSPG 或 LPS 诱导 12h 后，其 GM－CSFmRNA 表达阳性率和表达阳性强度积分值均显著提高(表 3)，提示 TSPG 能诱导和促进骨髓基质细胞的 GM－CSFmRNA 表达。

## 3　讨　论

人参皂甙是人参"补气生血"或促进血细胞发生的有效成分之一[1,2]。人参总皂甙(TSPG)能促进小鼠造血干/祖细胞的增殖分化。粒细胞与单核－巨噬细胞起源于粒单系造血祖细胞(CFU－GM)，CFU－GM 膜表面有与粒单系集落刺激因子(GM－CSF)相结合的受体，机体的粒单系造血调控主要在此阶段进行。我们的实验结果显示：在有外源性 GM－CSF 存在时，当加入 TSPG10μg/ml 即表现出对 CFU－GM 增殖的刺激作用，且在一定范围内，随着加入 TSPG 浓度提高，集落的产率也逐步增加。若不加入外源性 GM－CSF 而用 TSPG 替代，则无 CFU－GM 形成，提示 TSPG 单独作用不能替代 GM－CSF，而是协同外源性 GM－CSF 促进 CFU－GM 的增殖分化。这说明 TSPG 并不具有生长因子样作用，它可能通过其它途径调控粒单系血细胞发生。

造血诱导微环境(hematopoietic inductive microenvironment，HIM)是造血干/祖细胞定居、增殖和分化的场所，HIM 主要由造血基质细胞、细胞外基质和基质细胞分泌的各种可溶性生长因子组成。骨髓基质细胞是构成 HIM 的核心成分，它包括成纤维细胞、单核－巨噬细胞、内皮细胞和载脂细胞等。实验证明，骨髓基质细胞不仅为血细胞发生提供有活力的支架，还可通过细胞间直接接触来调节血细胞生成[7]。而骨髓基质细胞更为重要的造血调控方式是分泌多种造血生长因子和/或受体，促进或抑制血发生[8]。基质细胞同时又表达多种生长因子受体，结合和聚集外来因子于局部，造成不同因子的浓度分布区，通过粘附作用使相应造血细胞定位，受到高浓度造血生长因子的调节而发生分化。体外建立的骨髓基质细胞层正好模拟了体内 HIM，是公认的研究 HIM 对造血细胞增殖分化的理想模型。从造血干细胞到造血祖细胞的增殖分化直至成熟血细胞的形成过程中，存在着多种造血生长因子(HGF)的网络性调控作用，其中造血祖细胞是造血调控的重要阶段，造血祖细胞膜上有 HGF 受体，可受相应 HGF 调节，形成不同的集落，由此可以检测 HGF 的生物学活性。尽管粒单系造血祖细胞(CFU－GM)的增殖分化受到诸多造血调控因子的控制，但 GM－CSF 与 GM－CSF 受体相互作用却是粒单系血细胞发生调控的关键环节。本研究采用造血祖细胞体外培养技术，研究 TSPG 对骨髓基质细胞的作用及其与粒单系造血的相互关系。结果表明：经 TSPG 诱导制备的骨髓基质细胞条件培养液对 CFU－GM 的增殖分化有明显促进作用，提示其中 GM－CSF 样活性有所增加。可以推测 TSPG 对骨髓基质细胞表达 GM－CSF 具有明显的刺激作用。

造血生长因子与造血细胞膜上相应的受体结合，所启动的信号转导是当今造血调控分子生物学机理研究的核心内容。现代造血理论认为：造血调控因子与造血细胞膜上相应受体结合，启动调控信号向核内转导，引起核内某些基因转录增强和/或其

维普资讯 http://www.cqvip.com



它基因转录抑制,最终表现为蛋白质合成改变,导致细胞行为的变化。可见研究造血生长因子的蛋白和mRNA 表达调控能深入阐明造血调控的分子生物学机理。HGF 生物学活性检测仅反映了骨髓基质细胞条件培养液所含 GM－CSF 的生物学活性,但由于 HGF 有其多效性和丰余性的特点,为进一步验证 TSPG 能否影响骨髓基质细胞表达 GM－CSF,本研究采用免疫细胞化学 SP 法对骨髓基质细胞的 GM－CSF 的蛋白表达进行检测,结果表明:经 TSPG 诱导后骨髓基质细胞的 GM－CSF 的蛋白表达水平显著提高,这与生物学活性检测的结果相吻合。为了进一步明确 TSPG 能否在转录水平上促进 GM－CSF 表达,我们制备 GM－CSF cDNA 探针,运用原位杂交技术对骨髓基质细胞的 GM－CSFmRNA 表达水平进行检测,结果显示:经 TSPG 诱导后骨髓基质细胞的 GM－CSFmRNA 表达阳性率和强度积分指数均显著高于未诱导组,提示 TSPG 能促进骨髓基质细胞的 GM－CSFmRNA 表达。

综上所述,TSPG 调控粒单系造血的可能机制之一是上调造血诱导微环境中的骨髓基质细胞合成和分泌 GM－CSF,进而调节粒单系血细胞发生。

## 参 考 文 献

[1] 王 勇,王亚平,祝彼得.人参总皂甙对小鼠造血细胞增殖的影响[J].解剖学杂志,1995;18(2):153－156.

[2] 王 勇,祝彼得,王亚平.人参总皂甙体外刺激小鼠造血作用机理的研究[J].中华血液学杂志,1995;16(12):648－649.

[3] 王亚平,王 勇,郑 敏,等.地高辛标记的 cDNA 探针检测 GM－CSFmRNA 表达[J].免疫学杂志,1999;15(4):266－269.

[4] Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro[J]. J Cell Physiol, 1977;91(3):335－344.

[5] 黄 干,祝彼得,张淑慎.人参总皂甙对小鼠血细胞发生的影响[J].中华血液学杂志,1990;11(2):66－68.

[6] 姜 蓉,王亚平,戴 勤.粒单系造血祖细胞 CFU－GM 琼脂半固体培养的原位固定及鉴定染色[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2000;9(3):344－346.

[7] Weimar IS, Miranda N, Muller EJ, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor(HGF/SF) is produced by human bone marrow stromal cells and promotes proliferation, adhesion and survival of human hematopoietic progenitor cells($CD_{34}^{+}$)[J]. Exp Hematol, 1998;26(9):885－894.

[8] Kittler EL, McGrath H, Temeles D, et al. Biologic significance of constitutive and subliminal growth factor production by bone marrow stroma[J]. Blood, 1992;79(12):3168－3178.