维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)04-0373-03

当归多糖诱导胎儿胸腺细胞、脾细胞表达GM-CSF、IL-3的实验研究

郑 敏，王亚平，姜 蓉，吴 宏
（重庆医科大学基础医学研究所，重庆 400016）

【摘 要】目的：研究“补血活血”要药当归的主要有效成分-当归多糖（APS）对胎儿胸腺细胞、脾细胞表达造血生长因子GM-CSF、IL-3的影响。方法：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、核酸探针原位杂交等实验技术。结果：APS诱导的胸腺细胞、脾细胞培养上清液可促进早期造血祖细胞CFU-Mix增殖分化；APS诱导可促进胸腺细胞、脾细胞表达GM-CSF、IL-3蛋白及mRNA。结论：APS可促进淋巴细胞表达造血生长因子GM-CSF、IL-3，进而促进人早期造血细胞发生。

【关键词】当归多糖；淋巴细胞；多向性造血祖细胞；造血生长因子；造血调控
【中国图书分类法分类号】R331.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-12-10

Experimental study on expression of GM-CSF, IL-3 from fetal thymocytes and splenocytes

ZHENG Min, et al
(Institute of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To explore the effect of Angelica polysaccharide (APS) on the expression of GM-CSF and IL-3 from fetal thymocytes (FTC) and splenocytes (FSC). *Methods*: Techniques of hematopoietic progenitor cell culture in vitro, biological assay of hematopoietic growth factor (HGF), immunocytochemistry and in situ hybridization were used. *Results*: The conditioned media of FTC and FSC induced by APS can markedly promote the proliferation and differentiation of early multipotential progenitor cell (CFU-Mix); the expression of GM-CSF,IL-3 protein in FTC and FSC induced by APS were much stronger than that of the control; expression level of GM-CSF and IL-3mRNA showed similar tendency. *Conclusion*: APS promotes the expression of GM-CSF\IL-3 of FTC andFSC , then proceeds to promote early human hematopoiesis.

【Key words】Angelica polysaccharide; Lymphocyte; Multipotential progenitor cell; Hematopoietic growth factor; Hematopoietic regulation

当归多糖（Angelica polysaccharides, APS）是传统中药当归补血养血的主要有效成分，对多种造血祖细胞的增殖分化有促进作用[1]。淋巴细胞是造血调控的重要细胞，既往研究证明无论是T淋巴细胞、B淋巴细胞都能对血细胞发生起调节作用[2]。APS能否对淋巴细胞调控造血有影响尚未见报道。我们以胎儿胸腺细胞和脾细胞为模型，研究APS作用于淋巴细胞的造血调控及其机理，目的在于多角度探讨APS调控造血的机理，为APS的开发与临床应用提供实验依据和理论基础。

1 材料与方法

作者介绍：郑 敏（1972- ），女，讲师，博士研究生，主要研究方向：造血早期调控。

1.1 人骨髓有核细胞（human bone marrow cell, hBMC）

取自胸外科手术切除之肋骨，涂片检查无造血系统异常。

1.2 胎儿胸腺细胞、脾细胞

取自正常妊娠中晚期（24～30周）水囊引产的胎儿胸腺和脾脏。

1.3 主要药品试剂

当归多糖（Angelica polysaccharides, APS）甘肃岷县当归中分离提取，纯度大于85%，RPMI1640配制。鼠抗人GM-CSF及IL-3单克隆抗体：美国Santa Cruz公司产品。人GM-CSF、IL-3 cDNA探针制备、标记与鉴定：由本实验室完成，见文献[3,4]。

1.4 细胞条件培养液制备

按本室常规方法制备胸腺细胞培养上清液（HTCM）、脾细胞培养上清液（HSCM）[5]。实验分组：对照组：常规培养；APS作用组：培养体系中加入APS终浓度为200 μg/ml；刀豆蛋白A（ConA）作用组：加入ConA终浓度为10 μg/ml。加药后置37℃，5%CO_2培养箱中培养24h，离心，

维普资讯 http://www.cqvip.com

收集上清液，保存。

1.5 人髓系多向造血祖细胞（CFU-Mix）体外培养、鉴定与集落计数

参照文献[6]进行。

1.6 APS诱导制备的细胞条件培养液中所含造血生长因子活性检测

在CFU-Mix集落培养体系中加入15%（V/V）的各组细胞条件培养液，根据1×10^5BMC所生成的集落数评价细胞条件培养液中所含造血生长因子活性。

1.7 APS诱导后细胞GM-CSF、IL-3蛋白表达的检测

SP免疫细胞化学法检测胸腺细胞、脾细胞GM-CSF、IL-3蛋白表达水平，实验分组：对照组，APS作用组，ConA作用组（同1.4）。

1.8 APS诱导后细胞GM-CSF、IL-3mRNA表达的检测

以制备的GM-CSF、IL-3cDNA探针作原位杂交检测APS诱导后胸腺细胞、脾细胞GM-CSF、IL-3mRNA表达，实验分组：对照组，APS作用组，ConA作用组（同1.4）。设立不加探针和RNA酶处理切片的阴性对照组。

1.9 统计学处理

所获数据经SAS统计软件进行方差分析和t检验。

2 结 果

2.1 APS诱导制备的胸腺细胞、脾细胞条件培养液（HTCM、HSCM）对CFU-Mix增殖分化的影响

经APS诱导制备的HTCM，HSCM中富含造血生长因子活性，可促进CFU-Mix的增殖分化（图1）。

2.2 APS对胸腺细胞、脾细胞表达GM-CSF、IL-3蛋白的影响

SP免疫细胞化学染色结果显示，经APS诱导后胸腺细胞、脾细胞表达GM-CSF、IL-3蛋白的阳性率显著提高。结果提示APS能不同程度地促进胸腺细胞、脾细胞表达GM-CSF、IL-3（表1）。

2.3 核酸原位杂交技术检测表明，APS可促进胸腺细胞、脾细胞表达GM-CSF、IL-3mRNA，说明APS对造血生长因子GM-CSF、IL-3表达的调控发生在基因表达水平（表2）。

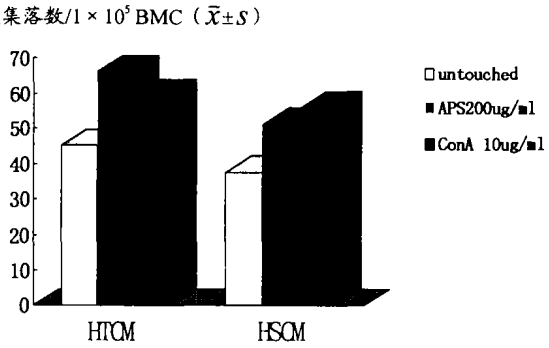


图1 APS诱导制备的HTCM、HSCM对CFU-Mix增殖分化的影响

3 讨 论

淋巴细胞对造血调控具有十分重要的作用。T、B淋巴细胞可产生多种生物活性物质对血细胞发生进行调控。胸腺是T淋巴细胞增殖分化的场所，在胎儿和婴幼儿时期胸腺发育最好，其T细胞对刺激物和诱导因素有良好反应；脾脏富含B淋巴

表1 APS对胸腺细胞、脾细胞表达GM-CSF、IL-3蛋白的影响

Conditions	IL-3 Positive Ratio (%)		GM-CSF Positive Ratio (%)	
	Thymocytes	Splenocytes	Thymocytes	Splenocytes
Untouched	54.2 ± 8.5	36.0 ± 6.8	20.4 ± 7.5	13.4 ± 5.3
APS induced	80.4 ± 11.3 *	54.3 ± 8.2 *	48.3 ± 6.3 *	28.6 ± 7.2 *
Con A induced	87.0 ± 14.5 *	68.2 ± 9.2 *	39.1 ± 8.3 *	34.8 ± 6.8 *

*与对照相比$P<0.05$ （APS 200 μg/ml，Con A 10 μg/ml）

表2 APS对胸腺细胞、脾细胞表达IL-3、GM-CSF mRNA的影响

Conditions	IL-3 Positive Ratio (%)		GM-CSF Positive Ratio (%)	
	Thymocytes	Splenocytes	Thymocytes	Splenocytes
Untouched	13.7 ± 2.23	30.0 ± 3.43	11.5 ± 3.25	8.8 ± 2.16
APS induced	36.5 ± 3.68*	41.2 ± 3.28*	29.2 ± 4.72*	22.6 ± 4.13*
Con A induced	27.5 ± 3.50*	44.8 ± 4.04*	26.7 ± 4.18*	28.1 ± 5.58*

*与对照相比$P<0.05$ （APS 200 μg/ml，Con A 10 μg/ml）

维普资讯 http://www.cqvip.com

细胞。在实验血液学研究中，ConA刺激的脾细胞条件培养液和胸腺细胞条件培养液常作为造血生长因子替代品，用于造血祖细胞培养。

多糖是有效的免疫调节剂，对淋巴细胞功能有增强作用。近年来研究发现：APS可刺激淋巴细胞的增殖，促进其活化和分泌功能[7]。既往研究结果表明：体内注射APS可显著提高脾脏重量，且淋巴细胞分裂相增多。在体外培养中加入经APS诱导制备的胸腺细胞、脾细胞培养上清液对BFU-E、CFU-GM的增殖分化有明显促进作用。为探讨APS对人胸腺细胞、脾细胞分泌造血生长因子的影响，本实验取正常妊娠中、晚期引产胎儿的胸腺和脾脏，在体外用APS诱导制备HTCM、HSCM，并观察了APS对淋巴细胞的刺激作用及其与血细胞生成的调节的关系。结果表明：在CFU-Mix培养体系中加入胎儿的胸腺细胞和脾细胞培养上清液可促进CFU-Mix集落形成，经APS诱导制备的胸腺细胞、脾细胞培养上清液对集落的刺激作用显著提高，说明培养上清液中富含HGF样活性物质。

细胞因子与造血细胞表面的相应受体结合，调节造血细胞的增殖分化。白细胞介素3（IL-3）是主要的早期造血调控因子，在造血调控中作用极其重要[8]。在体内，IL-3主要由活化的T淋巴细胞产生，是多功能的集落刺激因子，其作用的发挥需与其他造血生长因子协同。粒-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）不仅能刺激粒-巨噬细胞集落的形成，对红系、巨核系造血祖细胞和造血干细胞的增殖和分化均起调控作用[9]。机体内多种细胞和组织可产生GM-CSF，尤其是活化的T淋巴细胞、IL-1诱导的巨噬细胞、成纤维细胞及内皮细胞等。本文采用免疫细胞化学SP法对胸腺细胞、脾细胞的GM-CSF、IL-3蛋白表达进行检测，结果表明：APS诱导后胸腺细胞、脾细胞的GM-CSF、IL-3蛋白表达与对照组相比有不同程度提高，胸腺细胞的提高程度较为明显。说明APS调控造血的可能机制之一在于刺激细胞分泌高水平HGF。组织细胞核酸分子原位杂交不仅能检测基因表达，还能直观地观察目标分子在组织与细胞内的定位、分布与半定量。为了进一步明确APS对GM-CSF、IL-3的作用是在翻译水平上还是在转录水平上，我们制备了GM-CSF、IL-3 cDNA探针，运用原位杂交技术对胸腺细胞、脾细胞GM-CSF、IL-3 mRNA表达进行检测，结果发现：APS诱导后胸腺细胞、脾细胞GM-CSF、IL-3 mRNA表达与对照组相比有不同程度提高。

研究提示：APS促进造血的机理之一是在基因水平上对淋巴细胞表达造血生长因子GM-CSF、IL-3进行调控，从而达到促进正常造血的作用。而APS促进胸腺细胞、脾细胞分泌HGF的具体途径和基因调控机制还不清楚，对此我们将进行更深入的研究。

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):363-365.

[2]Tang PH. The augmentive effect of supernatant of the cultured T and B lymphocyte on CFU-C growth[J]. Exp Hematol, 1981;9(9):199-203.

[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] 王亚平，王 璐，郑 敏，等．人IL-3cDNA探针制备及应用[J]．重庆医科大学学报，1999;24(4):337-339.

[5] 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;133-138.

[6] 李家增，王鸿利，韩忠朝．血液实验学[M]．上海：上海科学技术出版社，1997;126-132.

[7] Kiyohara H, Yamada H, Cyong JC, et al. Studies on polysaccharides from Angelica acutiloba[J]. J Pharmacobiodyn, 1986;9(4):339-346 .

[8] Mangi MH, Newland AC. Interleukin-3 in hematology and oncology: current state of knowledge and future directions[J]. Cytokines Cell Mol Ther, 1999;5(2):87-95.

[9] Johnson BS, Mueller L, Si J ET AL.The cytokines IL-3 and GM-CSF regulate the transcriptional activity of retinoic acid receptors in different in vitro models of myeloid differentiation [J]. Blood, 2002;99(3):746-753.