维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2003)03-0257-04

当归多糖对人粒单系祖细胞和粒系白血病细胞株增殖分化的实验研究

王莎莉[1], 王亚平[2], 戴 勤[3], 姜 蓉[2]

(重庆医科大学 1. 生理学教研室,2. 组织胚胎学教研室,3. 临床学院血液内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究当归多糖(APS)对人粒单系造血祖细胞(CFU-GM)和急性早幼粒白血病细胞株(HL-60)增殖分化的影响。方法:采用造血细胞体外培养,形态学观察,流式细胞术和免疫细胞化学等实验血液学技术。结果:APS 对正常 CFU-GM 的体外增殖有显著刺激作用;而对 HL-60 细胞的增殖却有明显的抑制作用;APS 可能通过阻止 HL-60 细胞从静止期进入增殖周期,抑制 DNA 的合成等途径来抑制细胞增殖;APS 可能诱导 HL-60 细胞发生凋亡。结论:APS 有可能成为既能促进正常造血,又能抑制白血病等肿瘤细胞增殖,并诱导其凋亡或分化的天然诱导剂。

【关键词】当归多糖;粒单系祖细胞;粒系白血病细胞株;人

【中国图书分类法分类号】R331.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2002-09-12

Experimental study of the effect of Angelica polysaccharide on proliferation and differentiation of human CFU-GM and HL-60 cells

WANG Shali, et al

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

【Abstract】 *Objective*: To study modern biological mechanism for hematonic and antitumor of Angelica Sinensis (oliv) Diels. *Methods*: By using the techniques of hematopoietic cells culture in vitro, morphological observation, flow cytometry and immunocytochemistry, the effect of Angelica polysaccharide (APS) on proliferation and differentiation of human CFU-GM and promyelocytic leukemia cell line (HL-60) was studied. *Results*: APS could markedly promote the colony formation of CFU-GM and could significantly inhibit the proliferation of HL-60 in vitro. The inhibitory effect is concerned with the concentration of APS. APS may prevent HL-60 from the Go phase entering the S/G2+M phase, thus prohibit the synthesis of DNA. APS may also promote HL-60 entering the process of apoptosis. *Conclusion*: APS may not only promote normal hematopoiesis, but also inhibit the proliferation of leukemia cell and it can be a natural inducer for therapy of malignant tumor.

【Key words】 Angelica polysaccharide; CFU-GM; HL-60; Human

多糖在分子生物学中起着控制细胞分化,调节细胞生长、衰老和死亡的决定性作用。当归是中医临床"补血、活血"要药,当归多糖(APS)为其主要药物成分[1]。既往工作证明:APS 是当归中促进造血的有效成分,它能刺激小鼠造血干、祖细胞的增殖分化[2]。有资料表明:APS 对移植性肿瘤,如 EC, Hep, S180, Lewis, B16 等瘤株有较强的抑制作用,但其作用机理尚不清楚[3]。本文采用造血细胞体外培养,形态学观察,流式细胞术和免疫细胞化学等技术,研究 APS 对人粒单系造血祖细胞和粒系白血病细胞株增殖分化的影响。为从祖国传统医学宝库中寻找既能刺激正常造血,又能抑制白血病等恶性肿瘤细胞增殖,并诱导其分化/凋亡的,毒副反应小或无的天然中药诱导剂提供理论与实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及材料

1.1.1 人骨髓细胞(hBMC) 取自胸外科手术切除肋骨,供髓者无放、化疗史,骨髓细胞涂片检测无造血系统异常。用咬骨钳挤出骨髓,淋巴细胞分离液分离骨髓有核细胞,离心洗涤后过 4 号针头制成单细胞悬液,计数并调整细胞悬液浓

作者介绍:王莎莉(1956-),女,副教授,
主要研究方向:血细胞发生及其调控机理。

基金项目:国家自然科学基金资助课题(39870912)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

度。

1.1.2 HL－60 细胞株 上海细胞生理研究所提供。在含 10%马血清，青、链霉素(100U/ml)的 RPMI－1640 培养液中常规培养，每 2～3d 换液传代。

1.1.3 当归多糖(Angelica Polysaccharide，APS) 甘肃岷县当归中分离提取，纯度 85%以上，RPMI－1640 培养液配制成所需浓度。

1.2 主要试剂

RPMI－1640 培养基，美国 GIBCO 公司产品。重组人粒单系集落刺激因子(rhGM－CSF)，北京北医联合生物工程公司提供。小鼠抗人 CD_{14}、CD_{15}单克隆抗体，北京中山生物技术有限公司产品。马血清，中国军事医学科学院购买。全反式维甲酸(ATRA)，Sigma 公司产品。

1.3 研究方法

1.3.1 人粒单系造血祖细胞(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[4]。

1.3.2 APS 体外作用对 CFU－GM 增殖分化的影响 常规对照组，常规培养(加外源性 rhGM－CSF)；APS 组，常规培养基础上分别加入不同浓度的 APS(终浓度 2.5～2500μg/ml)；药物对照组，常规培养体系中除去外源性 GM－CSF，加入 APS，浓度同前。根据每皿种植 1×10^5 个 hBMC 所生成的集落数，评价 APS 体外作用对 CFU－GM 增殖分化的影响。

1.3.3 APS 对 HL－60 细胞增殖分化与调控影响的检测

1.3.3.1 活细胞计数 取对数生长期的 HL－60 细胞，调整细胞终浓度为 1×10^5 个/ml。对照组，常规培养；APS 组，培养体系中加 APS(终浓度 2.5～2500μg/ml)；ATRA 组，培养体系中加 ATRA(终浓度 10^{-6}mol/L)。培养至第三天换液，同时加入等量的相应药物，分别在培养第 2、4、6 天取样，进行台盼兰染色，计数活细胞数，观察不同浓度的 APS 作用不同时间对 HL－60 细胞的增殖抑制效应。

1.3.3.2 细胞周期测定 对照组常规培养；APS 组，加 APS(终浓度为 250μg/ml)；ATRA 组，加 ATRA(终浓度为 10^{-6} mol/L)。置 37℃，含 5%CO_2 的孵箱中培养 3d，PBS(pH7.2)洗涤细胞两次，70%冰乙醇固定。测定前去除固定液，加入 RNA 酶工作液和碘化丙啶(PI)4℃染色，过 300 目滤网后上机(Becton－Dickinson，FACS Calibur)。每例标本测定 3×10^4 个细胞，数据经计算机处理，分析得出细胞周期各时相比例。

1.3.3.3 细胞分化/凋亡检测 分别取培养第 2、4、6 天对照组、APS 组和 ATRA 组的 HL－60 细胞进行 Wright's 染色，光镜下观察细胞形态，计数凋亡细胞数。同时每例涂片用测微尺随机测量 100 个细胞的胞体、胞核直径，计算核浆比例。并进行 POX、PAS、NAE 细胞化学染色及 CD_{14}、CD_{15} 免疫细胞化学染色。

1.3.4 流式细胞术(FCM)检测 HL－60 细胞表面膜分化抗原 CD_{14}、CD_{15} 取对照组和经 250μg/ml APS、10^{-6}mol/L ATRA 诱导 3 天的 HL－60 细胞，PBA 洗涤 2 次，分别加入小鼠抗人 CD_{14}、CD_{15}单克隆抗体，异硫氰酸荧光素(FITC)标记的二抗，孵育后 PBS 洗涤，FCM 检测 10000 个细胞/例，并设立阴性对照组，数据经计算机处理，计算出阳性细胞百分率。

1.4 统计学处理

所获实验数据均输入计算机，经 SAS 统计软件进行直线相关回归分析，方差分析和 t 检验。

2 结 果

2.1 APS 体外作用对 CFU－GM 集落形成的影响

APS 体外作用能明显促进人 CFU－GM 的增殖。当加入 APS 2.5μg/ml 时，即表现对 CFU－GM 增殖的刺激作用，随着加入 APS 浓度提高，其集落产率也明显提高(图 1)，并呈量效关系。若不加外源性 GM－CSF 仅加入 APS 则无集落形成。Wright 染色可区分粒细胞集落，单核细胞集落，粒、单核细胞混合集落。粒系细胞的 POX 和 PAS 染色均成阳性反应。集落中的单核细胞 CD_{14}表达为阳性，粒系细胞 CD_{15}表达为强阳性。

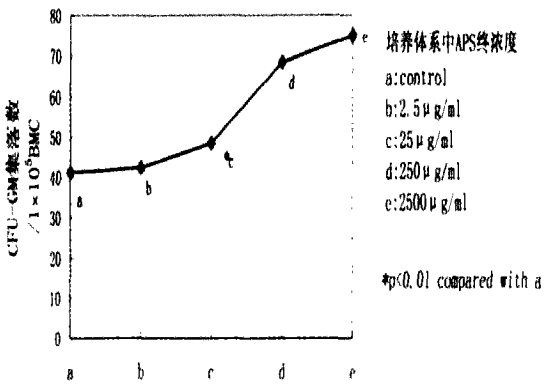


图 1 不同浓度 APS 体外作用对 CFU－GM 增殖的影响

2.2 APS 体外作用对 HL－60 细胞增殖的影响

APS 在体外对 HL－60 细胞有明确的增殖抑制作用，其抑制强度与剂量、时间有关，随加入 APS 浓度的增加和时间延长，对 HL－60 细胞的抑制作用增强(表 1)。

2.3 APS 体外作用对 HL－60 细胞增殖周期的影响

对照组 HL－60 细胞，S/G_2+M 期细胞占 60.23%，而 G_0/G_1 仅占 39.7%，经 APS(250μg/ml)和 ATRA(10^{-6}mol/ml)作用 3 天后，处于 S/G_2+M 期的 HL－60 细胞数明显减少(表 2)，提示

维普资讯 http://www.cqvip.com

APS 与 ATRA 均能阻止 HL－60 细胞由 G_0/G_1 期向 S/G_2+M 发展。

表 1 APS 对 HL－60 细胞增殖的抑制作用

处理因素	n	不同时间的细胞存活数($\times 10^5$/ml)		
		2d	4d	6d
对照组	8	2.14±0.57	4.84±0.86	6.89±1.0
APSμ(g/ml)				
2.5	8	1.70±0.16	4.66±0.70	5.50±0.52
25	8	1.66±0.45	3.74±0.78	5.07±0.59
250	8	1.20±0.39	1.54±0.39	2.09±0.32
2500	8	0.49±0.20	0.20±0.03	0.14±0.05
ATRA	6	2.03±0.69	3.70±0.64	5.69±0.58
(10^{-6}mol/L)				

$^{*}P<0.05$ 与对照相比 $^{**}P<0.01$ 与对照相比

表 2 APS、ATRA 对 HL－60 细胞增殖周期的影响

处理因素	细胞周期分布(%)			
	n	G_0/G_1	S	G_2+M
对照	4	39.7±7.48	43.84±6.56	16.39±3.06
APS(250μ	4	57.00±3.81	30.18±3.57	12.82±1.07
g/ml)				
ATRA(10^{-6}	3	49.40±4.59	42.05±6.48	8.55±2.30
mol/L)				

$^{*}P<0.05$ 与对照相比 $^{**}P<0.01$ 与对照相比

2.4 APS 诱导 HL－60 细胞的形态学改变

APS 2500μg/ml 作用 HL－60 细胞 2 天，大部分细胞可见胞核固缩，碎裂，胞浆中见大量空泡，胞膜不完整，甚至细胞崩解。APS 250μg/ml 诱导 HL－60 细胞 4 天，可见细胞体积缩小，核直径减小，核浆比例降低，部分细胞出现凋亡的特征性改变，胞体缩小，胞浆浓缩，核浓缩或碎裂成小块，可见凋亡小体。ATRA10^{-6}mol/L 作用 HL－60 细胞 4 天时，可见细胞胞体明显减小，核仁消失，核染色质浓缩，胞浆量丰富，胞浆中可见细小的嗜中性颗粒，部分呈杆状核和分叶核细胞(图 2，表 3)。

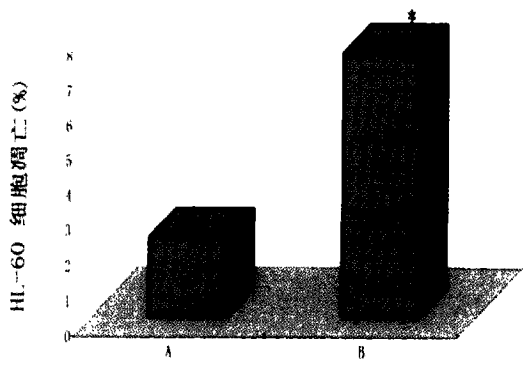


图 2 APS 对 HL－60 细胞调亡的影响

表 3 APS、ATRA 对 HL－60 细胞形态分化的影响(第 4d)

检测指标	处理因素		
	对照	APS	ATRA
细胞直径	19.95±3.15	16.94±2.36	14.42±3.02
核/浆比例	71.46±8.89	64.80±9.03	58.08±8.61

$^{*}P<0.01$ 与对照相比

注：APS：250μg/ml；ATRA：10^{-6}mol/L

2.5 APS 诱导 HL－60 的细胞化学改变

APS 诱导 HL－60 细胞 6 天 POX 与 PAS 与对照组相比无明显差异。

2.6 APS 诱导 HL－60 对细胞膜表面分化抗原(SmCD)表达的影响

APS 250μg/ml 诱导 HL－60 细胞 3 天后，通过流式细胞术检测 CD_{14}抗原表达，APS 组与对照组均无明显差异；而 CD_{15}抗原表达，APS 组与对照组有显著差异(图 3)。

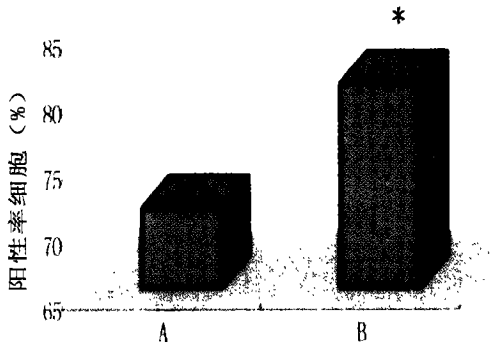


图 3 APS 对 HL－60 细胞膜表面 CD_{15}表达的影响

3 讨 论

迄今治疗白血病的主要手段仍是采用传统的大剂量联合化疗，此疗法副作用甚大、复发率高，尤其对机体的造血与免疫功能有极大的损害。在白血病等肿瘤的治疗中如何能达到既抗癌又扶正固本已成为迫切解决的问题。值得注意的是中药以其攻补兼施，毒副作用小或无，注意整体的优越性已得到广泛认可和重视[5]。本项研究采用现代生物学技术，探讨 APS 对人粒单系造血祖细胞和粒系白血病细胞增殖分化的影响及有关机理。为寻找和开发中药诱导剂提供实验依据。

粒细胞与单核细胞起源于粒单系造血祖细胞(CFU－GM)，其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

维普资讯 http://www.cqvip.com

主要在此阶段进行。GM－CSF 是 CFU－GM 增殖分化必不可少的、重要的调控因子，其主要作用在使 G_0 期的 CFU－GM 进入 S 期，缩短 CFU－GM 增殖时间进而提高集落产率[6]。本实验结果表明：在有外源性 GM－CSF 存在时，当加入 APS2.5μg/ml，即表现出对 CFU－GM 增殖的刺激作用，且随着加入 APS 浓度提高，其集落产率也逐步增加。若不加外源性 GM－CSF，而用 APS 替代则无 CFU－GM 的形成，说明 APS 并不能代替 GM－CSF 的作用。我们采用免疫细胞化学和核酸原位杂交技术证明[7]：经 APS 诱导后胸腺细胞、脾细胞和骨髓基质细胞的 GM－CSFmRNA 和 GM－CSF 蛋白表达水平明显提高，且几种细胞的培养上清液中 GM－CSF 样活性明显增加。这提示，APS 可能通过诱导造血微环境中的基质细胞和淋巴细胞等分泌高活性的 GM－CSF，来促进机体粒单系细胞发生。

造血细胞增殖失控是白血病的生物学特征之一，因此治疗白血病所采用的有效方法是尽可能的杀死肿瘤细胞和抑制它们的生长。本实验采用台盼蓝拒染法检测了 APS 体外作用对 HL－60 细胞增殖的影响。结果表明：APS 对 HL－60 细胞有明确的增殖抑制作用，其抑制强度与药物剂量和时间密切相关。APS 2.5μg/ml 作用 6 天，可见 HL－60 细胞增殖的抑制，并随着药物剂量提高，其抑制时间也相应缩短，这种作用高于 ATRA。李兴玉等报道[7]：APS 对小鼠淋巴细胞白血病 L1210、人粒细胞白血病株 KG－1 和人单核细胞白血病 U937 均有明显的增殖抑制作用。为什么在同等剂量下 APS 对正常粒单系造血祖细胞表现出促进增殖作用，而急性早幼粒白血病细胞株呈现抑制效应？目前还不能完全解释，这尚需进一步实验加以证实。推测这是否与某些中药有"双向调节作用"有关。若这种结论被证实，APS 就有可能成为治疗肿瘤的天然诱导剂。为探讨 APS 对 HL－60 细胞增殖抑制的机制，本文采用流式细胞术(FCM)观察到经 APS 作用后，多数 HL－60 细胞被阻滞在 G_0/G_1 期，S/G_{2+M}期细胞显著减少，由此可推测 APS 对 HL－60 细胞增殖抑制作用与抑制 DNA 合成有关。

白血病的另一重要生物学特征是分化成熟受阻，即异常分化的细胞大量增殖和正常凋亡机制的抑制。我们通过分析 APS 诱导 HL－60 细胞形态学、功能及生化的改变，探讨 APS 诱导分化/凋亡作用。结果显示：APS 250μg/ml 诱导 HL－60 细胞第 4 天可见细胞体积变小，核直径缩小，核固缩，核浆比例降低，仍可见 1－2 个核仁，但未见典型的杆状或分叶核。同时部分细胞出现调亡的特异性形态改变，细胞凋亡比例可达 7.5%。APS 诱导 HL－60 细胞后 POX、PAS 阳性率与对照组无明显差异，NAE 表达为阴性，FCM 检测表明 APS 诱导组的 HL－60 细胞 CD_{15}表达阳性率较对照组高，两者有显著差异；而 CD_{14}在对照组与 APS 诱导组均无明显差异。结合上述检测结果，在本实验条件下，尚未见 APS 有诱导 HL－60 向成熟粒系细胞分化的趋向，但并不能排除它们诱导 HL－60 分化的可能性，这还需在不同诱导条件包括药物浓度，时间以及其它因素进行摸索。

参 考 文 献

[1] 王亚平，祝彼得. 当归多糖的化学与药理学研究[M]. 中药药理与临床研究进展(第四册)，军事医学科学出版社，1996；365.

[2] 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)：363－366.

[3] 程国权，席时芳，李德杏，等. 岷县当归多糖对小鼠移植性肿瘤的作用[J]. 甘肃医药，1986；5(3)：5－8.

[4] 王亚平，祝彼得. 当旧多糖对小鼠粒单系血细胞发生的影响[J]. 中国实验血液学杂志，1993；1(1)：79－83.

[5] 李海燕. 中医药治疗急性白血病进展[J]. 中国中西医结合杂志，1997；17(1)：58－60.

[6] Kwon EM, Sakamoto KM. The molecular mechanism of action of granulocyte－macrophage colony－stimulating factor. J Invest Med 1996；44：442.

[7] 王莎莉，王亚平，戴 勤，等. 当归多糖对人粒单系造血祖细胞增殖分化的调控机理研究[J]解剖学报，2001；(3)：241－245.

[8] 李兴玉，丁慧蓉. 当归多糖对肿瘤细胞系的抑制效应[J]. 中国中西医结合杂志，1993；13(特集)：135～137.

[9] Touzhette N. Evolution：Apoptosis[J]J NIH Res, 1995；7(6)：91.