维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2001)04－0361－04

人参总皂甙诱导人内皮细胞表达造血生长因子的实验研究

吴 宏,姜 蓉,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:研究和论证人参促进血细胞发生及"补气生血"的现代生物学机理。方法:采用造血生长因子生物活性检测与免疫细胞化学等技术,研究经人参总皂甙(TSPG)诱导的人脐静脉内皮细胞株(Ecv304)上清液(HEcCM)中造血生长因子的活性及 GM－CSF、IL－3 和 IL－6 在内皮细胞的表达。结果:TSPG 体外诱导制备的 HEcCM 能显著促进 CFU－GM 和 CFU－Mix 的增殖;同时,TSPG 能不同程度地促进内皮细胞表达 GM－CSF、IL－3 和 IL－6 蛋白。结论:本研究提示 TSPG 能上调造血微环境中的内皮细胞分泌造血生长因子来调节血细胞的生长,这或许是人参"补气生血"的现代生物学机理之一。

【关键词】人参总皂甙;内皮细胞;造血祖细胞;造血生长因子

【中国图书分类法分类号】R331.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2001－03－09

Experimental study on expression of hematopoietic growth factors from human endothelial cell induced by TSPG

WU Hong, et al

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

【Abstract】 ***Objective***: To study modern biological mechanism for hematonic of Ginseng. ***Methods***: By using the techniques of biological assay of hematopoietic growth factor and immunocytochemistry, the activity of hematopoietic growth factors of the conditioned culture media of human umbilical vein endothelial cell (Ecv304) (HEcCM) and the expression of GM－CSF, IL－3, IL－6 in the endothelial cell induced by Total Saponins of Panax Ginseng (TSPG) were studied. ***Results***: HEcCM prepared with TSPG markedly promoted the proliferation and differentiation of CFU－GM and CFU－Mix. The expression of GM－CSF, IL－3 and IL－6 in the endothelial cell induced by TSPG was much stronger than that of the control. ***Conclusion***: We speculate that TSPG augmented endothelial cell capacity to support hematopoiesis, and this property might result from the up-regulation of hematopoietic growth factors expression.

【Key words】 Total saponins of panax ginseng; Endothelial cell; Hematopoietic progenitors; Hematopoietic growth factors

血管内皮细胞(EC)是造血诱导微环境的重要组成部分。国内外文献报道 EC 能分泌多种细胞因子来调控造血[1,2]。人参是中医临床"补气"要药,有"补气生血"之功效。既往的实验已证明[3,4]:人参总皂甙(TSPG)对正常和贫血小鼠的造血干/祖细胞增殖分化有显著刺激作用,但人参"补气生血"的现代生物学机理尚不清楚。本研究采用造血生长因子生物活性检测与免疫细胞化学等技术,探讨 TSPG 诱导人内皮细胞表达 GM－CSF、IL－3、IL－6 与促进人造血祖细胞增殖分化的相互关系。

作者介绍:吴 宏(1963－),女,浙江人,讲师,硕士。主要研究方向:血细胞发生及其调控。

1 材料与方法

1.1 人生总皂甙(Total Saponins of Panax Ginseng, TSPG) 四川省中药研究所惠赠,皂甙纯度达 95% 以上。

1.2 细胞

1.2.1 人脐静脉内皮细胞株(Ecv304):购自中国科学院上海细胞生物学研究所。

1.2.2 人骨髓细胞(hBMC):取自本校外科手术切除肋骨,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单个核细胞,用 PMI－1640 培养液

维普资讯 http://www.cqvip.com

洗涤，过 4 号针头制备单细胞悬液。

1.3 主要试剂 RPMI－1640 培养基、IMDM 培养基、甲基纤维素，美国 GIBCO 公司产品；马血清、rhIL－3 和 EPO，中国军事医学科院提供，小牛血清，购自杭州四季青公司；rhGM－CSF，北京北医联合生物工程公司产品；rhIL－1，北京北方同正生物技术公司分装；大鼠抗人 GM－CSF 单克隆抗体，美国 Pharmingen 公司产品；大鼠抗人 IL－3、IL－6 单克隆抗体，美国 Santa Cruz 公司产品；过氧化物酶标记的链霉卵白素染色试剂盒，北京中山生物技术有限公司产品。

1.4 内皮细胞培养上清液(HEcCM)的制备 在含 10%小牛血清的 RPMI－1640 培养液中常规传代培养，待内皮细胞铺满瓶底后进行分组：对照组：常规培养，不加任何刺激物；IL－1 诱导组：培养时加入 IL－1(终浓度为 100U/ml)；TSPG 诱导组：培养时加入 TSPG(终浓度为 50μg/ml)。分别培养 24、72h，收集上清液。

1.5 造血生长因子活性检测 粒单系祖细胞(CFU－GM)培养为本室常规方法[3,4]，人多向性造血祖细胞(CFU－Mix)的体外甲基纤维素培养参照《血液实验学》[5]，在 CFU－GM 和 CFU－Mix 培养中设置：对照组：常规培养；实验对照组(HEcCM)：常规培养的基础上加入 10%(V/V)未经刺激的 HEcCM；TSPG 组(TSPG－HEcCM)：常规培养的基础上加入 10%(V/V)经 TSPG 诱导制备的 HEcCM；IL－1 组(IL－1－HEcCM)：常规培养的基础上加入 10%(V/V)经 IL－1 诱导制备的 HEcCM。以每种植 1×10^5 个骨髓有核细胞所生成的 CFU－GM、CFU－Mix 集落数评价各种 HEcCM 中造血生长因子生物学活性。

1.6 GM－CSF、IL－3 和 IL－6 蛋白表达 采用 SP 免疫细胞化学检测对照组、IL－1 诱导组、TSPG 诱导组(作用浓度和时间同 1.4)的内皮细胞胞质中 GM－CSF、IL－3 和 IL－6 蛋白表达情况，并设置不加一抗的阴性对照组。光镜下计数 300 个细胞/每张载片，计算三种造血生长因子蛋白表达阳性率及阳性强度(强阳性＋＋＋＋，阳性＋＋，弱阳性＋，阴性－，分别计为 3、2、1 和 0 分，求出表达的积分指数(积分指数＝阳性百分率×强度计分)。所获数据经计算机处理分析得出实验结果。

2 结 果

2.1 TSPG 诱导制备的 HEcCM 中所含造血生长因子生物学活性的检测

实验结果表明：常规制备的 HEcCM 对 CFU－GM 和 CFU－Mix 的增殖分化有一定刺激作用，而经 IL－1 或 TSPG 体外诱导 24h 制备的 HEcCM 就能显著促进 CFU－GM 和 CFU－Mix 的增殖(图 1、图 2)，诱导 72h 制备的 HEcCM 对 CFU－GM 和 CFU－Mix 的产率与前一作用时间比较无显著差异。提示 TSPG 可能诱导血管内皮细胞生成造血生长因子样活性物质。

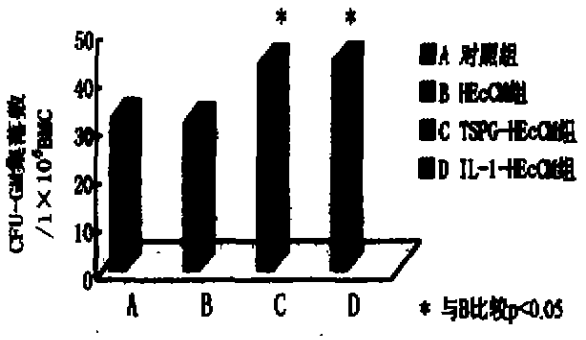


图 1 TSPG 诱导制备的 HEcCM 对 CFU－GM 增殖的影响($n=16, \bar{x}\pm s$)

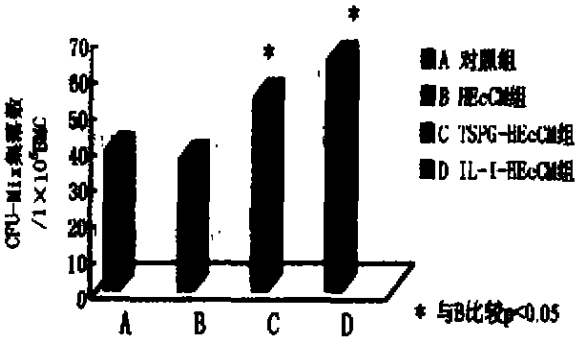


图 2 TSPG 诱导制备的 HEcCM 对 CFU－Mix 增殖的影响($n=16, \bar{x}\pm s$)

2.2 TSPG 对 GM－CSF、IL－3 和 IL－6 蛋白表达的影响

免疫细胞化学检测显示静止状态下 EC 胞浆内 GM－CSF 和 IL－6 蛋白表达阳性率及强度均很低(图 3、4)，EC 胞浆内几乎无 IL－3 蛋白表达(图 5)；经 IL－1 或 TSPG 诱导 24h 后内皮细胞表达 GM－CSF、IL－3 和 IL－6 蛋白的阳性率和阳性强度均明显提高(图 6～8)(表 1)。



图 3 静止状态下内皮细胞的 GM－CSF 蛋白表达水平较低(ICC×1000)

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 4 静止状态下内皮细胞的 IL-6 蛋白表达水平较低(ICC×1000)



图 5 静止状态下内皮细胞的 IL-3 蛋白表达水平很低(ICC×200)



图 6 TSPG 诱导 24h 后,内皮细胞 GM-CSF 蛋白表达显著提高(ICC×1000)



图 7 TSPG 诱导 24h 后,内皮细胞 IL-6 蛋白表达显著提高(ICC×1000)

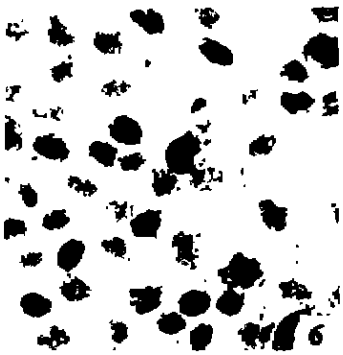


图 8 TSPG 诱导 24h 后,内皮细胞 IL-3 蛋白表达显著提高(ICC×400)

3 讨 论

既往研究证明[3,4]:人参皂甙是人参"补气生血"或促进血细胞生成的有效成分,对髓系造血干/祖细胞的增殖分化有明确的调控作用,但其机理尚不清楚。内皮细胞是造血微环境中的重要基质细胞成分,它可通过分泌造血生长因子(HGF)对血细胞发生进行调控[6]。Candal 等[7]研究发现在骨髓内皮细胞培养上清中含有干细胞因子(SCF)、IL-6、GM-CSF、IL-1α、IL-11 和 G-GSF,其上清可扩增由脐带血单个核细胞富集的 CD_{34}^{+} 细胞。Jazwiec 等[8]证明在脐静脉内皮细胞与 CD_{34}^{+} 细胞协同培养的上清中可检测到 IL-6、LIF、G-CSF、GM-CSF、M-CSF。IL-1α 和糖皮质激素并不直接作用于造血祖细胞,但它们可以分别上调和下调内皮细胞表达造血生长因子而间接调控造血。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,形成不同集落,由此可以检测 HGF 的生物学活性。本研究采用人脐静脉内皮细胞株 Ecv304,研究 TSPG 对内皮细胞的作用及其与血细胞发生的相互关系,结果表明:经 TSPG 或 IL-1 诱导制备的内皮细胞培养上清液对 CFU-GM 和 CFU-Mix 的增殖分化有明显促进作用,提示其中 HGF 含量或活性有所增加。因此推测 TSPG 对内皮细胞表达 HGF 具有明显的刺激作用。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1　TSPG 对内皮细胞表达 GM－CSF、IL－3 和 IL－6 的影响($n=4, \bar{x} \pm s$)

EC	表达阳性率(%)			积分指数		
	GM－CSF	IL－3	IL－6	GM－CSF	IL－3	IL－6
对照组(Ⅰ)	9.85±1.03	3.21±1.18	8.55±1.12	0.15±0.07	0.06±0.01	0.14±0.05
TSPG 诱导组(Ⅱ)	37.41±2.96*	24.81±2.04*	34.83±1.97*	0.78±0.13*	0.55±0.12*	0.71±0.15*
IL－1 诱导组(Ⅲ)	39.67±2.45*	31.71±2.63*	35.43±3.24*	0.84±0.20*	0.63±0.17*	0.74±0.21*

*与 1 比较 $P<0.01$

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。它能刺激多种造血祖细胞增殖，是对早期造血祖细胞具有广泛增殖促进活性的集落刺激因子[9]。IL－3 在体内主要由活化的 T 淋巴细胞产生，是刺激造血干细胞、髓系和淋巴系细胞增殖分化的集落刺激因子[10]。IL－6 可诱导骨髓造血干细胞生长和巨核细胞成熟，在造血调控中与 GM－CSF 和 IL－3 有协同作用。现代研究认为：HGF 与造血细胞膜上相应的 HGF 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或其他基因转录抑制，最终表现出蛋白合成改变，而导致细胞行为等变化。可见研究 HGF 的蛋白表达及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内皮细胞条件培养液所含 HGF 的生物学活性，HGF 有其多效性和丰富性的特点，为进一步阐明 TSPG 能诱导和影响哪些 HGF 表达，本研究采用免疫细胞化学 SP 法对内皮细胞的 GM－CSF、IL－3 和 IL－6 蛋白表达进行检测，结果表明：IL－1 或 TSPG 诱导后内皮细胞的 GM－CSF、IL－3 和 IL－6 蛋白表达阳性率和强度积分值均显著高于对照组，这与生物学活性检测的结果相吻合。研究结果提示：TSPG 调控造血的机理之一是上调造血微环境中的内皮细胞分泌造血调控因子来调节血细胞的生成。

参 考 文 献

[1] Krshnaswamy G, Kelley J, Lakshminnarayanyerra, et al. Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: Molecular regulation and possible role in human disease [J]. J Interferon and Cytokine Res, 1999; 19: 91～97.

[2] Rafii S, Mohle R, Shapiro F, et al. Regulation of hematopoiesis by microvascular endothelium [J]. Leukemia and Lymphoma, 1997; 27: 375－382.

[3] 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(1): 66－68.

[4] 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.

[5] 李家增，王鸿利，韩忠朝. 血液实验学[M]. 第一版，上海：上海科学技术出版社，1997; 126.

[6] 陈文杰. 血液分子细胞生物学[M]. 第一版，北京：中国医药科技出版社，1994; 36.

[7] Candal FJ, Rafii S, Parker JT, et al. BMEC－1: a human bone marrow microvascular endothelial cell line with primary cell characteristics[J]. Microvasc Res, 1996; 52(3): 221－234.

[8] Jazwiec B, Solanilla A, Grosset C, et al. Endothelial cell support of hematopoiesis is differentially altered by IL－1 and glucocorticoids[J]. Leukemia, 1998; 12(8): 1210－1220.

[9] Sieff CA, Ekem SC, Nathan DG, et al. Combinations of recombinant colony－stimulating factors are required for optimal hematopoietic differentiation in serum－derived culture[J]. Blood, 1988; 73(3): 688－690.

[10] Ganser A, Lindemann, A Seipelt G, et al. Effect of recombinant human IL－3 in patients with nomal hematopoietics and in patients with bone marrow failure [J]. Blood, 1990; 76(4): 666－676.