

刺梨汁对骨髓抑制小鼠造血功能的调控作用

覃志坚, 何印蕾*, 何涛, 唐任光, 龙显科

右江民族医学院, 广西 百色 533000

摘要: 目的 探讨刺梨汁对环磷酰胺合并 ^{60}Co 致骨髓抑制小鼠造血功能的影响, 研究其促进血细胞上调的作用机制。方法 双抗体夹心法检测外周血常规、骨髓基质中红细胞生成素 (EPO)、血小板生成素 (TPO)、粒细胞生长因子 (GCSF) 的量。结果 刺梨汁能明显改善骨髓抑制小鼠外周血常规, 能有效平衡微环境中 TPO 的量, 改善 EPO 的表达, 对骨髓抑制小鼠骨髓细胞上清中 GCSF 有明显的正调控作用。结论 刺梨汁能提高骨髓抑制小鼠外周血血细胞和骨髓有核细胞计数, 可促进骨髓抑制小鼠骨髓细胞从 G_0/G_1 期进入增殖周期, 并能有效调节骨髓微环境中 TPO、EPO、GCSF 的表达, 从而促进骨髓抑制小鼠的造血功能, 可作为一种治疗贫血的辅助保健药物。

关键词: 刺梨汁; 骨髓抑制; 造血功能; 细胞因子

中图分类号: R973.3

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2012)06-0435-04

Regulation of *Rosa roxburghii* juice on hematopoietic function in myelosuppressive mice

QIN Zhi-jian, HE Yin-lei, HE Tao, TANG Ren-guang, LONG Xian-ke

Youjiang Medical University for Nationality, Baise 533000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of *Rosa roxburghii* juice (RRJ) on the hematopoiesis in myelosuppressive mice induced by cyclophosphamide merged ^{60}Co and to study the mechanism for making blood cells upregulating. **Methods** The peripheral blood, bone marrow stromal erythropoietin (EPO), thrombopoietin (TPO), and granulocyte growth factor (GCSF) contents were detected by double antibody sandwich method. **Results** RRJ could significantly improve the peripheral blood of myelosuppressive mice, effectively balance the amount of TPO in the microenvironment, improve the expression of EPO, and significantly up-regulate GCSF in the supernatant of mouse bone marrow cells. **Conclusion** RRJ could increase the peripheral blood cells and bone marrow nucleated cells in myelosuppressive mice, promote the bone marrow cells in myelosuppressive mice from the G_0/G_1 into the proliferation cycle, effectively regulate the expressions of TPO, EPO, and GCSF in the bone marrow microenvironment, thereby promote the hematopoietic function of myelosuppressive mice, as a health drug for anemia.

Key words: *Rosa roxburghii* juice (RRJ); bone marrow suppression; hematopoietic function; cytokines

刺梨 *Rosa roxburghii* Tratt. f. 又名文先果、送春归、缫丝花, 是蔷薇科蔷薇属落叶灌木, 原产云贵高原, 广西乐业县等地也有丰富的野生刺梨。刺梨富含多种营养物质, 具有较高的药用价值。刺梨含有丰富的维生素 C (Vc)、超氧化物歧化酶 (SOD)、刺梨黄酮、刺梨多糖及多种人体必需氨基酸^[1]。传统医学主要以根和果实入药, 用于消食、止泻、解暑及积食腹胀、痢疾、肠炎、高血压、血管破裂出血、维生素 C 缺乏症等疾病的治疗。此外, 刺梨还具有调节机体免疫功能^[2]、解毒、镇静、延缓衰老、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤、清除体内自由基等功能^[3-4]。

本实验拟从造血干细胞的增殖状况、造血微环境的变化来探讨刺梨汁的作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 KM 雄性小鼠, 右江民族医学院实验动物中心提供, 体质量 (20±2) g, 8~12 周龄, 生产许可证号 SCXK 桂 2012-0003。

1.2 仪器

Sysmex XE5000 五分类全自动血细胞分析仪 (日本 Sysmex 公司), RT6000 型酶标仪 (上海新波公司), Facscanto II 双 8 色流式细胞仪 (美国 BD

收稿日期: 2012-09-05

作者简介: 覃志坚 (1956—), 男, 壮族, 广西百色人, 教授, 研究方向为免疫分子与血液性疾病研究。E-mail: qzj008008@163.com

*通讯作者 何印蕾, (1971—) 女, 壮族, 广西河池人, 副教授, 研究方向为临床免疫学。E-mail: heyinlei@163.com

公司)。CX—10 型倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.3 药品与试剂

碘化丙啶 (PI) 染色试剂盒 (凯基生物科技有限公司); 小鼠红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) ELISA Kit (研域化学试剂有限公司); 小鼠血小板生成素 (thrombopoietin, TPO) ELISA Kit (上海源叶生物科技有限公司); 小鼠粒细胞集落刺激因子 (granulocyte-colony stimulating factor, GCSF) ELISA Kit (上海西唐生物科技有限公司); 细胞增殖周期 DNA 分析试剂盒 (美国 BD 公司); 刺梨汁 (*Rosa roxburghii* juice, RRJ), 广西乐业县高野刺梨有限公司出品, 桂卫食证字第 451028-000137 号, 生产许可证 QS450006010128。

2 方法

2.1 骨髓抑制小鼠动物模型的制备

小鼠经 2.0 Gy ^{60}Co 全身照射后的第 4 天开始 ip 给予环磷酰胺 (CTX) 50 mg/kg (于临用前配制), 每天注射 1 次, 连续给药 3 d 完成模型制备。

2.2 动物分组及给药

将实验动物随机分为 4 组, 每组 20 只, 刺梨汁组、模型组、对照组、阳性药组 (GM-CSF)。除对照组外, 其他 3 组均进行造模。小鼠造模完成后 24 h 开始给药, 刺梨汁组每只小鼠按 10 mL/kg 剂量每天 ig 给药。对照组和模型组给等量生理盐水, 阳性药组 ip 给予 GM-CSF (125 g/kg), 连续 7 d。

2.3 外周血细胞计数

末次给药后 24 h, 经小鼠眼球后静脉丛采血 20 mL, 抗凝稀释后用全自动血细胞分析仪进行血常规及其分类检测。

2.4 骨髓有核细胞悬液的制备

末次给药后 24 h, 颈椎脱臼处死各组小鼠, 取出股骨, 用 6 号针头以 1 mL 生理盐水液冲出骨髓细胞, 4 号针头滤过制成单个骨髓细胞悬液。取部分骨髓细胞悬液在显微镜下按白细胞计数法进行骨髓有核细胞 (BMC) 计数。

2.5 细胞周期样品制备及分析

末次给药后 24 h 分别取各组动物的股骨, 参照“2.4”项下方法制备骨髓有核细胞悬液。将单个骨髓细胞悬液 1 000 r/min 离心 5 min, 去上清, 用 PBS 洗涤 2 次, 弃上清液, 加入 70% 冷乙醇固定打散细胞, 再用 PBS 洗 2 次, 加 100 μL PBS 混匀, 加 PI 染液 (4 $^{\circ}\text{C}$, 避光 30 min), 流式细胞仪检测细胞

周期的变化。

2.6 双抗体夹心法检测骨髓有核细胞上清中的 EPO、TPO、GCSF 水平

末次给药后 24 h 分别取各组动物的股骨, 制备骨髓有核细胞悬液。将单个骨髓细胞悬液 1 000 r/min 离心 5 min, 保留上清, 按照试剂盒说明操作, 酶标仪在 492 nm 处测吸光度值。

2.7 统计学方法

实验所得数据用 SPSS 11.5 软件统计, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组数据进行方差齐性检验, 同时进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 刺梨汁对骨髓抑制小鼠外周血及骨髓有核细胞计数的影响

实验结果显示, 模型组与对照组相比, 血中白细胞 (WBC)、红细胞 (RBC)、血红蛋白 (Hb)、血小板计数 (PLT)、BMC 的数量明显减少, 证明造模成功。刺梨汁组、阳性药组均能明显改善骨髓抑制小鼠外周血中 WBC、RBC、Hb、PLT、BMC 的量 ($P < 0.05$), 见表 1。

3.2 刺梨汁对骨髓抑制小鼠骨髓细胞细胞周期的影响

实验结果显示造模后骨髓细胞细胞周期出现了停滞的状态, G_0/G_1 期细胞堆积, G_2/M 期和 S 期细胞明显减少。刺梨汁组和阳性药组均能解除 G_0/G_1 期细胞阻滞, 促进 G_0/G_1 期细胞进入增殖周期, 不断生成各类血细胞, 且两组之间无显著差异 ($P > 0.05$)。见表 2。

3.3 刺梨汁对骨髓抑制小鼠造血微环境中 EPO、TPO、GCSF 表达的影响

实验结果显示刺梨汁组、阳性药组均能明显影响骨髓基质中 TPO、EPO、GCSF 的量。正常情况下, 骨髓基质中只有很少量的这些细胞因子。造模后, 骨髓基质中 EPO、TPO 的量急剧增加, 和对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。随着药物的应用, 微环境中的细胞因子量会逐渐回落, 渐趋于正常。在对 TPO 的影响中可以看到, 刺梨汁组及阳性药组均能有效平衡微环境中 TPO 的量, 两组之间比较无显著差异; 对 EPO 的影响显示, 两组均能改善 EPO 的表达, 刺梨汁组疗效有更佳的趋势; 在对 GCSF 的影响中, 两组对骨髓抑制小鼠骨髓细胞上清中 GCSF 均有明显的正调控作用, 两组之间无显著差异 ($P > 0.05$), 见表 3。

表1 各组小鼠外周血常规及骨髓有核细胞比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison on peripheral blood and bone marrow nucleated cells in mice of each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	WBC/(×10 ⁹ ·L ⁻¹)	RBC/(×10 ¹² ·L ⁻¹)	Hb/(g·L ⁻¹)	PLT/(×10 ⁹ ·L ⁻¹)	BMC/(×10 ⁹ ·L ⁻¹)
对照	—	7.70±1.07	11.32±1.08	154.3±20.07	300.43±11.63	10.71±0.77
模型	—	1.095±1.30*	2.81±0.65*	92.80±10.03*	166.76±16.29*	2.65±0.81*
刺梨汁	10	5.31±0.74 [△]	8.70±0.95 ^{△△}	154.84±12.48 [△]	255.26±29.67 [△]	9.46±1.12 [△]
GM-CSF	1.25×10 ⁻⁴	7.43±0.87 [△]	5.71±0.43 [△]	155.85±19.37 [△]	279.39±34.84 [△]	7.74±1.16 [△]

与对照组比较: *P<0.05; 与模型组比较: [△]P<0.05, ^{△△}P<0.01, 下表同

*P<0.05 vs control group; [△]P<0.05, ^{△△}P<0.01 vs model group, same as below

表2 刺梨汁对骨髓抑制小鼠骨髓细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of RRJ on bone marrow cell cycle in myelosuppressive mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	细胞周期/%		
		G ₀ /G ₁ 期	G ₂ /M	S期
对照	—	55.35±1.28	11.86±0.47	32.60±0.63
模型	—	73.40±1.18*	6.36±0.83*	22.40±0.81*
刺梨汁	10	61.99±1.40 [△]	9.27±0.37 [△]	26.57±1.93 [△]
GM-CSF	1.25×10 ⁻⁴	65.05±1.63 [△]	8.80±0.54 [△]	23.84±1.39 [△]

表3 刺梨汁对骨髓抑制小鼠造血微环境中 EPO、TPO、GCSF 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of RRJ on expressions of EPO, TPO, and GCSF in myelosuppressive mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	EPO	TPO	GCSF
对照	—	0.105±0.013	0.125±0.014	0.365±0.032
模型	—	0.334±0.024*	0.526±0.058*	0.111±0.024*
刺梨汁	10	0.174±0.010 [△]	0.227±0.032 [△]	0.223±0.012 [△]
GM-CSF	1.25×10 ⁻⁴	0.181±0.010 [△]	0.280±0.039 [△]	0.244±0.011 [△]

4 讨论

刺梨有调节机体免疫功能、解毒、镇静、延缓衰老、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤、清除体内自由基等功能^[1], 作为保健食品受到消费者的欢迎。血细胞均起源于骨髓产生的造血干细胞。正常情况下, 大多数造血干细胞处于细胞周期的静止期(G₀期), 只有少数造血干细胞处于增殖状态, 造血祖细胞尤其是早期造血祖细胞虽然有高度增殖能力, 但也并非全部处于增殖周期中, 而静止期的造血干细胞或祖细胞进入细胞周期依赖于造血因子的增加和(或)造血抑制因子的减少^[6-7]。在细胞周期的 G₁ 期到 S 期、G₂ 期到 M 期这两个阶段正处于复杂活跃的水平变化时期, 易受外界条件的影响, 且 DNA

是辐射作用的靶分子。研究发现, 造模后小鼠的骨髓细胞中 G₀/G₁ 期细胞比例显著高于对照组。产生了 G₁ 期阻滞, 即抑制了细胞从 G₁ 期进入 S 期, 使 DNA 合成减少。进而使 DNA 合成的 G₂ 期和 M 期的细胞减少。而刺梨汁组及阳性药组小鼠 G₀/G₁ 期骨髓细胞比例较模型组均显著下降。S 期和 G₂/M 期骨髓细胞比例较模型组均显著上升。因此, 实验小鼠经复合造模后, 外周血象及骨髓有核细胞数与对照组比较均显著下降 (P<0.05), 证明造模成功。

骨髓是重要的造血场所, 其中造血干细胞、基质细胞及细胞外基质是骨髓造血的 3 个关键部分, 后两者是目前研究最为关注的造血微环境。造血微环境中造血调控因子协同调节造血干细胞的增殖和分化。EPO 是生理情况下调节红系生成的主要细胞因子, 主要调控红系造血干细胞的增殖、分化和成熟。EPO 对多向祖细胞 (CFU-GEMM)、粒巨噬细胞集落生成单位 (CFU-GM)、巨核细胞集落生成单位 (CFU-Meg) 也有一定的调控作用, 并可直接作用于激活的 B 细胞, 促进 B 细胞增殖, 提高免疫球蛋白合成。据郭平等^[8]的研究报道, 正常小鼠骨髓细胞也有 EPO 的表达。EPO 通过结合到其相应受体 EPO 受体 (EPOR) 而起作用。对骨髓抑制小鼠骨髓基质中 EPO 的表达进行了检测, 表明刺梨汁可平衡骨髓微环境中 EPO 的水平, 从而促进周围血红细胞的均衡产生。TPO 主要促进巨核细胞增殖与分化成熟, 以及血小板的成熟和释放。TPO 是体内调节血小板生成的调节因子, 此外 TPO 还具有显著的早期造血调控作用, 促进红系和巨核系在内的各系干细胞增殖^[9-10]。本实验表明, 模型组小鼠外周血中的血小板下降, 微环境中的 TPO 上升。服用刺梨汁后, 游离 TPO 的量逐渐下降, 外周血中血小板的量也逐渐回升, 达到一个血小板 TPO 的自稳状态。GCSF 是由单核细胞、巨噬细胞和成纤维细胞

等多种细胞分泌产生的一种重要的造血生长因子,能选择性和特异地刺激造血干细胞向中性粒细胞的定向增殖和分化^[11]。综合结果显示,刺梨汁能上调 GCSF 的表达,平衡骨髓微环境中 EPO 和血小板 TPO 的水平,使 G₀/G₁ 期骨髓细胞比例下降, S 期和 G₂/M 期骨髓细胞比上升。为此,刺梨汁可作为一种治疗贫血的辅助保健药物。其主要成分如刺梨多糖、刺梨黄酮、超氧化物歧化酶等的补血作用有待进一步研究。

参考文献

- [1] 简崇东. 刺梨药理作用的研究进展 [J]. 中国医药指南, 2011, 9(29): 38-40.
- [2] 路筱涛, 鲍淑娟. 刺梨多糖对小鼠抗应激功能和免疫功能的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2002, 19(2): 141-142.
- [3] 戴支凯, 余丽梅, 杨小生, 等. 刺梨提取物 CL 对胃癌细胞的抑制作用 [J]. 贵州医药, 2005, 29(9): 786-788.
- [4] 杨江涛, 杨娟, 谢红, 等. 刺梨多糖粗品与纯品体外抗氧化作用 [J]. 食品工业科技, 2008, (2): 94-95.
- [5] 严苏纯, 祝彼得, 陈志伟. 几种骨髓抑制性贫血小鼠模型的比较研究 [J]. 成都中医药大学学报, 2007, 30(1): 31-34.
- [6] 祝晓玲, 祝彼得. 黄芪注射液对小鼠骨髓细胞增殖周期的影响 [J]. 中药材, 2000, 23(10): 625-627.
- [7] 刘屏, 王东晓, 陈若芸, 等. 儿茶素对骨髓细胞周期及造血生长因子基因表达的作用 [J]. 药学学报, 2004, 39(6): 424-428.
- [8] 郭平, 王继峰, 王升启, 芍药苷对放射线致血虚证小鼠骨髓 EPO 和 GCSF 基因表达的影响 [J]. 山东中医药大学学报, 2005, 29(3): 236-239.
- [9] Drachman J G. Role of thrombopoietin in hematopoietic stem cell and progenitor regulation [J]. *Curr Opin Hematol*, 2000, 7(3): 183-187.
- [10] Fujiwara T, Harigae H, Kameoka J, et al. A case of familial thrombocytosis: Possiblerole of altered thrombopoietin production [J]. *Am J Hematol*, 2004, 76(4): 395-398.
- [11] 冯彦斌, 苑晓玲, 善亚君, 等. GCSF 受体胞内区结合蛋白 COXII 的分子克隆及相互作用验证 [J]. 生命科学, 2004, 8(1): 15-17.