

人参总皂苷对骨髓造血细胞冷冻损伤的可恢复性研究

王建伟,王亚平,王莎莉,姜 蓉

(重庆医科大学基础医学院 重庆市生物化学与分子药理学重点实验室,重庆 400016)

摘要:目的 探讨骨髓造血细胞的冷冻保存效果及人参总皂苷(TSPG)降低冷冻损伤的作用。方法 以 3%二甲基亚砜(DMSO)为冷冻保护剂,采用逐步降温法将骨髓造血细胞在液氮中保存 3~5个月,复苏后应用台盼蓝拒染法、集落形成试验、CD34及细胞总数回收率等,测定骨髓造血细胞生物学活性的变化;将不同剂量的 TSPG与复苏的骨髓造血细胞共培养,应用集落形成试验、MTT比色分析法及流式细胞术等方法检测 TSPG对骨髓造血细胞冷冻损伤可恢复性的影响。结果 骨髓造血细胞在低温保存时一部分细胞会失去增殖能力,但这种损伤并不与保存时间成正比。细胞复苏后,加入合适剂量的 TSPG(25 μ g/mL),可明显提高冻存骨髓造血细胞的集落产率;TSPG在一定浓度范围内(25~50 μ g/mL)能促进冻存骨髓造血细胞的增殖;TSPG(25 μ g/mL)能促进冻存骨髓造血细胞进入细胞增殖周期。结论 TSPG能促进冷冻骨髓造血细胞的复苏、增殖,提高骨髓细胞冷冻损伤的可恢复性,对应用冻存骨髓造血细胞进行造血移植有一定意义。

关键词: 人参总皂苷;造血细胞;冷冻保存

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)04-0420-03

Effect of TSPG on recoverable ability from cryopreservation damage of human bone marrow hematopoietic stem cells

WANG Jian-wei, WANG Ya-ping, WANG Sha-li, JIANG Rong

(Basic Medical College, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract **Object** To study the effect of cryopreservation on the ability of hematopoietic stem cells from human bone marrow and the action of total saponins of *Panax ginseng* (TSPG) to reduce their freezing injury. **Methods** Gradual cooling methods were used to place mononuclear cells (MNC) in liquid nitrogen with 3% dimethylsulfoxide (DMSO) for 3~5 months. After thawed, the biological properties of MNC were monitored, which included the mean trypan blue exclusion rate and the mean recovery rate of MNC, CFU-Mix, CD34⁺ cell, and total cells; Thawed MNC were cultured with various concentrations of TSPG, the effect of TSPG on the recoverable ability from cryopreservation damage were detected by colony-forming assay, colorimetric MTT assay for cell proliferation and flow cytometry. **Results** A fraction of MNC lost their proliferatory ability after thawed, but the damage was not deteriorated with freezing time. TSPG (25 μ g/mL) could raise the colony production rate of thawed hematopoietic stem cells; TSPG (25~50 μ g/mL) could raise the colony production rate of thawed hematopoietic stem cells; TSPG (25~50 μ g/mL) could improve their proliferation; TSPG (25 μ g/mL) could also promote the entry of them into cell proliferatory cycle. **Conclusion** TSPG could induce the proliferation of thawed hematopoietic stem cells and raise the post-freezing recoverable ability of hematopoietic stem cells.

Key words total saponins of *Panax ginseng* (TSPG); hematopoietic stem cells; cryopreservation

造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)移植正广泛用于治疗肿瘤、某些遗传性疾病和免疫性疾病等。如何将 HSC进行有效的保存与复苏,降低其冷冻损伤,这是造血干细胞移植治疗的关键技术环节之一,也是实验血液学研究的热点内容。人参皂苷是人参中主要的有效成分。研究表明人参总皂苷(total saponins of *Panax ginseng*, TSPG)是人

参促进血细胞生成的有效成分^[1]。TSPG在体内外均能刺激造血干细胞和造血祖细胞(CFU-GEMM, CFU-E, BFU-E, CFU-GM和 CFU-MK)的增殖分化。但 TSPG对冻存复苏的造血细胞作用如何尚未见报道。本研究采用低温生物学技术,探讨骨髓造血细胞在液氮中的冷冻保存效果及 TSPG提高冷冻复苏造血细胞的增殖能力。

收稿日期: 2003-09-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(38670880); 重庆市科委重点攻关课题(渝科委计[2000]25)

作者简介: 王建伟(1968-),女,河北省博野县人,河北北方学院副教授,现在重庆医科大学攻读博士,主要从事中药药理与干细胞生物学研究。Tel (023) 68485050 E-mail wangjianwei88@sohu.com

1 材料与方法

1.1 药品与试剂: TSPG重庆中药研究所惠赠,纯度 > 95%, IMDM 培养液配成 1 mg/mL 工作液, 正压滤过除菌。RPMI-1640 与 IMDM 培养基 (Gibco, 美国), 聚丙烯低温冷冻管 (Creiner, 德国), 二甲基亚砷 (DMSO, 美国), 淋巴细胞分离液 (上海试剂二厂), 马血清 (HS, 军事医学科学院提供), 胎牛血清 (FBS, Sigma), CD34⁺ 抗体 (Santa Cruz, 美国), CD71⁺ 抗体 (中山生物试剂公司), SCF IL-3 GM-CSF (军事医学科学院提供, 终浓度分别为 100, 2, 50 ng/mL), Epo (Amgen 公司, 终浓度 2 U/mL)。

1.2 骨髓造血细胞制备: 取胸外科无血液疾病患者切除的肋骨骨髓, 涂片检查无造血系统疾病, 淋巴细胞分离液 (Ficoll, 相对密度 1.077) 分离单个核细胞 (MNC), 过 4 号针头, 制成所需浓度 MNC 悬液。

1.3 MNC 的冷冻保存: 冻存时临时配制冷冻保护液 (其中 DMSO 及 FBS 终浓度分别为 5% 及 20%) 将 MNC ($\times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ /mL) 加入到冷冻管, 再加等体积冷冻保护液。体系配制后在 4℃ 冰箱中平衡 30 min, 依次转入 -20℃ 冰箱。液氮冻存罐中的气相空间 30 min, 最后投入液氮 (-196℃) 中保存。

1.4 MNC 的融冻与复苏: 分别将冻存 3, 4, 5 个月的 MNC 从液氮中取出, 迅速置于 40℃ 水浴中复温至全部融化 (约 2.5 min), 用含 10% FBS 的 IMDM 培养液缓慢稀释 10 倍, 进行 MNC 和 CD34⁺ 细胞计数及台盼蓝染色, 1500 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 用 IMDM 洗 2 次, 加入含 10% FBS 的 IMDM 培养液, 制成所需浓度的 MNC 悬液, 待测其他指标。

1.5 MNC 的冷冻保存效果观察

1.5.1 MNC 计数: 在低倍镜下计数 MNC, 计算 MNC 的回收率

MNC 回收率 = 每管冻存后 MNC 总数 / 每管冻存前 MNC 总数 $\times 100\%$

1.5.2 台盼蓝拒染试验计数: 0.4% 台盼蓝生理盐水溶液 9 滴加细胞悬液 1 滴, 混匀, 2 min 后在显微镜下计数 MNC 拒染台盼蓝的存活细胞率。

1.5.3 早期髓系造血细胞集落 (CFU-Mix) 培养: 甲基纤维素体系中含 30% HS, 10% 牛血清白蛋白, SCF, IL-3, GM-CSF, Epo 及 $\times 10^6$ /mL 冻存前、后骨髓 MNC, IMDM 和 0.9% 甲基纤维素, 每孔 0.2 mL (含 MNC $\times 10^5$), 复种 3~5 孔。培养 14 d 计数每孔 CFU-Mix 数, 每例取 3 个孔集落的均数, 计算 CFU-Mix 的回收率

CFU-Mix 回收率 = 冻后 CFU-Mix 数 / 冻前 CFU-Mix 数 $\times 100\%$

1.5.4 CD34⁺ 细胞计数: 将冷冻复苏前、后的 MNC 悬液离心涂片, 经 4% 多聚甲醛固定及 PBS 冲洗后按 CD34⁺ 抗体试剂盒说明进行操作, 苏木精复染, 高倍镜计数 $\times 10^3$ 个 MNC 中所含 CD34⁺ 细胞数, 计算其回收率。

CD34⁺ 细胞回收率 = 冻后 CD34⁺ 细胞数 / 冻前 CD34⁺ 细胞数 $\times 100\%$

1.6 TSPG 对 MNC 冷冻可恢复性研究: 将保存 5 个月的 MNC 作为研究对象, 进行以下实验。

1.6.1 CFU-Mix 培养: 方法同 1.5.3 项, 实验组加入不同剂量 TSPG (5~50 μ g/mL), 对照组加等量 IMDM 培养液, 观察不同剂量 TSPG 对冻存复苏 MNC 的祖细胞集落形成的影响。

1.6.2 TSPG 对冻存 MNC 增殖的影响: 将复苏的 MNC (5×10^5 /mL) 单细胞悬液 100 μ L 和等量的不同稀释度的 TSPG (5~50 μ g/mL) 加入 96 孔细胞培养板, 每个稀释度设 4 个复孔, 对照组加细胞悬液及等量培养基。培养 24 h, 加入 MTT (20 μ L/孔), 继续培养 8 h, 500 g 离心 15 min, 弃上清液, 加 DMSO 200 μ L 孔, 待甲臜颗粒充分溶解后, 以自动酶标读数仪 (Bio-Rad E2550 型, $\lambda = 570$ nm) 测定各孔吸光度 (A) 值, 借以反映 TSPG 对冻存复苏 MNC 增殖的影响。同样实验重复 3 次。

1.6.3 细胞周期测定: 复苏的 MNC (5×10^5 /mL) 接种于含 10% FBS 的 IMDM 培养液中, 加药组加 TSPG (终浓度 25 μ g/mL), 对照组加等量 IMDM 培养液, 培养 24 h, 0.01 mol/L PBS 洗 2 次, 70% 冷乙醇固定。碘化丙啶染色, 流式细胞仪 FACS Vantage (Becton Dickinson Immunocytometry System, 美国) 分析, 每个样本测定 $\times 10^4$ 个细胞。数据经计算机分析得出细胞周期各时相细胞数比例。

1.7 数据处理: 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 冻存时间对 MNC 活力的影响: MNC 分别保存 3, 4, 5 个月后复苏, MNC 回收率、台盼蓝拒染率、CFU-Mix 回收率及 CD34⁺ 细胞回收率随保存时间的延长有所下降, 但差别不显著, 见表 1。

2.2 TSPG 对 MNC 冷冻可恢复性研究

2.2.1 TSPG 对冻存 MNC CFU-Mix 形成的影响: 实验表明 5~50 μ g/mL TSPG 均可增加冻存 MNC CFU-Mix 产率, 以 TSPG 25 μ g/mL 组效果最显著, 见表 2 (以 $\times 10^5$ MNC 形成 CFU-Mix 个数表示)。

表 1 冻存不同时间骨髓 MNC活性的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 1 Change of MNC viability after cryopreserved for 3, 4, or 5 months ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

冻存时间	MNC回收率 %	台盼蓝拒染率 %	CFU-Mix回收率 %	CD34 ⁺ 细胞回收率 %
3个月	97.19±3.07	86.23±2.55	66.33±5.04	90.08±4.58
4个月	96.32±4.11	85.17±3.21	64.01±4.96	90.02±5.52
5个月	94.21±4.28	83.58±3.62	63.39±3.57	89.23±4.49

2.2.2 TSPG对冻存 MNC增殖的影响: TSPG在一定浓度范围内 (25~ 50 μ g/mL) 能促进冻存 MNC的增殖,见表 2

表 2 TSPG对冻存 5个月的 MNC形成 CFU-Mix能力及其增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 2 Effect of TSPG on formation of CFU-Mix and its proliferation of MNC cryopreserved for 5 months ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	浓度 /(μ g·mL ⁻¹)	CFU-Mix /个	A 值
对照	0	73.80±6.723	0.355±0.021
TSPG	5	85.40±7.910 [*]	0.374±0.009
	10	96.40±10.46	0.373±0.020
	25	121.4±11.22 [*]	0.395±0.024 [*]
	35	104.6±8.452 [*]	0.390±0.027
	50	88.80±6.790 [*]	0.387±0.005 [*]

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

2.2.3 TSPG对冻存复苏 MNC增殖周期的影响: 经 TSPG刺激后,冻存复苏的 MNC处于相对静止时相 (G_0/G_1 期)的比例减少,处于 S期的细胞比例增多,与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$),见表 3,提示 TSPG能促进冻存复苏 MNC进入增殖周期

表 3 TSPG对冻存复苏 MNC细胞周期分布的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 3 Effect of TSPG on distribution of cell cycle of MNC ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	细胞周期分布 %			
	G_0/G_1	G_2/M	S	G_2/G_1
对照	82.59±3.636	3.323±1.142	14.08±2.538	2.007±0.115
TSPG	80.87±4.186	3.830±1.425	15.30±2.932	1.997±0.006

与对照组比较: * $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group

3 讨论

DMSO是最常用的细胞冻存保护剂,具有快速透过细胞膜防止细胞内冰晶形成的特性经典的造血细胞冷冻方法以 10% DMSO作为细胞保护剂,但由于 DMSO有一定毒性,降低冷冻保存液中 DM-SO比例对冷冻后的复苏有重要意义。Zhao等^[2]对胎儿肝脏 CD34⁺细胞的冷冻复苏研究发现,用 Dulbecco's 代替 Iscove's 培养基, DMSO的需要量

可低于 10%; Abrahamsen 等^[3]研究表明 5% DM-SO比 10% DMSO更能有效保存 CD34⁺细胞本研究以 5% DMSO作为冷冻保护剂,将骨髓造血细胞在液氮中保存 3~ 5个月,其 MNC回收率台盼蓝拒染率、CD34⁺细胞回收率均大于 80%,造血祖细胞恢复率也大于 60%,结果与文献报道一致,故建议在临床应用中可采用 5% DM SO 冻存造血祖细胞

造血细胞冷冻损伤发生在冷冻和复温过程中,与保存时间不成正比 实验证实:低温冻存长达 10~ 15年之久的脐血,其 CFU-GM 损失不超过 10%^[4]。Kobylka比较了冻存 2~ 8周和 15年的脐血,发现冻存 15年的脐血 MNC回收率仍可达 80% (64%~ 92%),集落形成能力未见明显下降^[5]。本实验观察冻存 3,4,5个月的 MNC,有一部分细胞会受到冷冻损伤而失去增殖能力,但这种损伤并不与保存时间成正比。

在探索理想的造血干细胞冷冻保存与复苏方法的同时,如何提高复苏细胞的冷冻损伤可恢复性的研究也是不容忽视的,但相关文献报道甚少^[6]。既往研究发现,TSPG能明显促进造血干祖细胞的增殖与分化。因此推测,TSPG也能促进冻存复苏的 MNC增殖,进而提高其冷冻损伤可恢复性 本实验结果表明 TSPG可增加冻存造血细胞集落产率,提示其能使部分受损的冻存造血祖细胞的生物学活性得以快速恢复;一定浓度 (25~ 50 μ g/mL)的 TSPG能够促进冻存 MNC的增殖;经 TSPG刺激后,处于 S时相的 MNC比例高于对照组,提示 TSPG能促进冻存 MNC从相对静止时相 (G_0/G_1 期)进入细胞增殖活跃时相,从而促进其增殖 但 TSPG的具体作用机制尚待进一步探讨 此研究结果对造血干细胞移植的临床治疗提供了有价值的实验依据。

References

[1] Wang Y, Wang Y P, Zhu B D. Effect of total saponins of *Panax ginseng* on proliferation of hematopoietic cells in mouse [J]. *Acta Anat Sin* (解剖学报), 1995, 18(2): 153-156.
[2] Zhao J, Hao H N, Thomas R L, et al. An efficient method for the cryopreservation of fetal human liver hematopoietic progenitor cells [J]. *Stem Cells*, 2001, 19(3): 212-218.
[3] Abrahamsen J F, Bakken A M, Bruserud O. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells with 5-percent rather than 10-percent DMSO results in less apoptosis and necrosis in CD34⁺ cells [J]. *Transfusion*, 2002, 42(12): 1573-1580.
[4] Broxmeyer H E, Srouf E F, Hangoc G, et al. High efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, 100(2): 645-650.
[5] Kobylka P, Ivanyi P, Breur V, et al. Preservation of immunological and colony-forming capacities of long term (15 years) cryopreserved cord blood cells [J]. *Transplantation*, 1998, 65: 1275-1278.
[6] Ohta K, Yamane T, Koh K R, et al. An effective method for recovering CD34 positive progenitor cells from peripheral blood stem cell apheresis products cryopreserved with simplified method [J]. *Oxaka City Med J*, 1999, 45(2): 139-148.