

## • 药理与临床 •

## 四物汤化学成分组合对人骨髓基质细胞系 HFCL 细胞增殖及造血相关基因表达的影响

李鹰飞, 佟丽, 梁乾德, 王升启\*

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

**摘要:**目的 观察四物汤及其化学成分组合对人骨髓基质细胞系 HFCL 细胞增殖及造血相关基因表达谱的影响, 探讨其促 HFCL 细胞增殖的可能机制。方法 MTT 法测定四物汤化学成分组合对体外 HFCL 细胞增殖的影响; 运用流式细胞术分析细胞周期的变化; 制备人造血相关细胞因子寡核苷酸芯片并检测四物汤及其化学成分组合所致的造血相关细胞因子基因差异表达情况。结果 四物汤化学成分组合增强 HFCL 细胞的能量代谢, 促进 HFCL 细胞增殖; 四物汤化学成分组合组处于  $G_0/G_1$  期的细胞显著少于空白组; 增殖指数 (PI) 则显著大于空白组;  $IL_2$ - $R\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、TPO 基因表达上调。结论 四物汤化学成分组合可通过上调  $IL_2$ - $R\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、TPO 基因表达而促进 HFCL 细胞增殖。

**关键词:** 四物汤化学成分组合; 细胞增殖; 造血相关基因表达谱; 寡核苷酸芯片

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)03-0386-04

## Effects of component combination in Siwu Decoction on proliferation of human bone marrow stromal cell lines HFCL and hematopoiesis-related gene expression

LI Ying-fei, TONG Li, LIANG Qian-de, WANG Sheng-qi

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of component combination in Siwu Decoction (CCSWD) on the proliferation of human bone marrow stromal cell lines HFCL and hematopoiesis-related gene expression and to probe into the mechanism of the stimulative effects of SWD and CCSWD on the proliferation of HFCL cells. **Methods** MTT and FCM were used for assaying the proliferation potency and cell cycle of HFCL cells, respectively. A human hematopoiesis-related cytokine oligonucleotide microarray was prepared to investigate the diversity of gene expression of HFCL cells in SWD and CCSWD groups. **Results** The energy metabolism and proliferation potency of HFCL cells treated with CCSWD were more prompted than that of the control group. Meanwhile, the percentage of HFCL cells in  $G_0/G_1$  phase treated with CCSWD was significantly lower, while the proliferation index (PI) was higher than that of the control group. Compared to the control group, expressions of  $IL_2$ - $R\alpha$ , NF- $\kappa$ B, and TPO were up-regulated in CCSWD group. **Conclusion** The proliferation of HFCL cells could be facilitated by CCSWD with up-regulating the expressions of  $IL_2$ - $R\alpha$ , NF- $\kappa$ B, and TPO.

**Key words:** component combination in Siwu Decoction (CCSWD); cell proliferation; hematopoiesis-related gene expression profile; oligonucleotide microarray

四物汤首见于宋代《太平惠民和剂局方》, 由熟地、当归、白芍、川芎组成。具有增强免疫、补血调血等功效, 在临床广泛应用, 为补血、调经之良方。近年来主要对其全方、单味药及配伍的机制研究较为系统和深入, 但这些研究对象多限于药材或个别的单

体成分, 研究结果也只是涉及一个或几个基因, 难以体现中药尤其是中药复方多成分配伍、多靶点、多途径协同起作用的特点, 也难以从基因网络水平研究中药的机制, 而基因芯片有高通量、多靶点的特点, 有利于克服此局限。本实验室前期研究表明四物汤

收稿日期: 2004-06-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30271617, 30070913); “十五”军队重点项目 (01Z019); 北京市“二四八”重大创新工程项目 (H010210220113)

作者简介: 李鹰飞 (1977—), 男, 山东青岛人, 军事医学科学院放射医学研究所生物技术室 2001 级硕士研究生, 从事中药基因组学方面的研究。E-mail: lyf334@yahoo.com.cn

\* 通讯作者 Tel/Fax: (010) 66932211 E-mail: sqwang@nic.bmic.ac.cn

含有芍药苷、果糖、蔗糖、葡萄糖、阿魏酸等成分,芍药苷等具有促进辐射致血虚小鼠造血功能的作用<sup>[1,2]</sup>;用寡核苷酸芯片研究了血虚小鼠造血相关细胞因子基因表达谱,各组织中共发现21个差异表达的基因。这些基因的功能大致分为3类:促细胞生长或增殖;免疫调节;诱导血细胞形成或造血祖细胞形成集落<sup>[3]</sup>。本研究基于化学基因组学的思路,结合基因芯片技术探讨四物汤化学成分组合对人骨髓基质细胞系 HFCL 细胞增殖的作用及对其基因表达谱的影响。

## 1 材料

1.1 药材及制备:四物汤由熟地黄、当归、白芍、川芎组成,全部药材均购自北京同仁堂药店,经本室马百平研究员鉴定。按《太平惠民和剂局方》规定的剂量称取熟地黄15g、当归10g、白芍10g、川芎6g。经水煎、滤过、浓缩、制成100%药液(即含生药1g/mL),置4℃保存。细胞培养时,滤过除菌。

1.2 四物汤化学成分组成及其含量测定:阿魏酸、芍药苷、川芎嗪对照品均购自中国药品生物制品检定所,果糖为国产分析纯。用HPLC法测得30mL四物汤药液含果糖1002mg、阿魏酸6mg、芍药苷79.5mg,基于文献分析换算得30mL四物汤药液含川芎嗪30mg<sup>[4]</sup>。用不含血清的培养液按果糖:阿魏酸:川芎嗪:芍药苷为2004:12:60:159配成总质量浓度为5mg/mL溶液,置4℃保存备用。细胞培养时,须滤过除菌。

1.3 主要试剂及仪器:MTT (Sigma 公司);IMDM、胎牛血清、Trizol、Rnasin 40 U/μL,均为Gibco BRL 公司产品;Super-script II 逆转录酶(200 U/μL, Invitrogen 公司);Cy3/Cy5-dUTP (1 mmol/L, Amer-sham Pharmacia);阳性对照 LUC mRNA 及芯片由本实验室制备。Mill-Q Biocel 超纯水器 (Millipore 公司), Napco-5410CO<sub>2</sub>培养箱 (Heraeus 公司), Wallac 1420 酶标仪 (芬兰产品), DU640 核酸蛋白紫外分析仪 (Backman 公司), GenePix 4000B 扫描仪 (Axon Instruments, Inc), GenePix Pro4.0 分析软件 (Axon Instruments, Inc)。其他试剂均为国产分析纯。

1.4 细胞系:人骨髓基质细胞系 HFCL (简称 HFCL) 来源于正常人胎儿骨髓基质细胞,由中国医学科学院血液学研究所姜学英教授建系<sup>[5]</sup>,本室保存。培养于含10%胎牛血清IMDM培养液,实验均用于对数生长期的细胞。

## 2 方法

2.1 MTT 法测定四物汤化学成分组合对 HFCL 细胞增殖活力的影响:将制备的 HFCL 悬液接种在96孔培养板中,每孔接种培养液200μL,含 $4 \times 10^3$ 个细胞。经CO<sub>2</sub>培养箱孵育24h,观察细胞生长状态良好,换无血清培养液,继续孵育48h,将细胞阻滞在G<sub>1</sub>期。换含3%血清培养液,每孔溶液总体积为200μL。四物汤化学成分组合设10个给药组,终质量浓度分别为0.25、0.5、1、2、4、8、16、32、64、128 μg/mL,每组8个复孔,另设不含药的细胞悬液对照组和空白对照组。37℃、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度条件下培养48h后,每孔加入MTT液(5mg/mL)20μL,继续避光培养4h,离心,弃上清液,每孔加入200μL二甲基亚砷,振荡10min,在酶联免疫检测仪上于波长490nm测定各孔吸光度(A)值<sup>[6]</sup>,计算细胞生长增殖率。

细胞生长增殖率 =  $[(A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) - 1] \times 100\%$

2.2 流式细胞术测定化学成分组合对 HFCL 细胞周期的影响:将制备的 HFCL 悬液接种在10cm<sup>2</sup>培养瓶中,每瓶接种培养液5mL,含 $2 \times 10^5$ 个细胞。经CO<sub>2</sub>培养箱孵育24h,观察细胞生长状态良好,换无血清培养液,继续孵育48h,将细胞阻滞在G<sub>1</sub>期。换含3%血清培养液,分为空白、四物汤及四物汤化学成分组合3组,四物汤终质量浓度为32μg/mL、四物汤化学成分组合终质量浓度为8μg/mL,每组6瓶,继续避光培养12h。0.25%胰酶消化,1体积细胞悬液(约 $1 \times 10^6$ 个细胞)加9体积70%乙醇,于-20℃固定细胞12h(可保存2~3周)。离心,用PBS液洗涤除尽乙醇,离心后的细胞重悬于1mLPI染液,室温染色30min<sup>[7]</sup>。流式细胞仪荧光检测各细胞周期DNA水平,计算增殖指数(PI)。

2.3 四物汤及其化学成分组合对 HFCL 基因表达谱的影响<sup>[3]</sup>

2.3.1 寡核苷酸芯片的制备:从Genebank中检索并选取142个造血相关的人源细胞因子基因的mRNA序列,用Mprobe软件设计备选探针,长40mer。经Blast分析从其中筛选出基因特异性寡核苷酸探针。合成5'-氨基修饰的寡核苷酸探针。3×SSC点样液溶解探针至0.5μg/μL。点样仪将探针点于本实验室自制的醛基化基片上,放置过夜备用。

2.3.2 荧光标记探针的制备:将制备的 HFCL 悬液接种在25cm<sup>2</sup>培养瓶中,每瓶接种培养液12mL,含 $1 \times 10^6$ 个细胞。经CO<sub>2</sub>培养箱孵育24h,观察细胞生长状态良好,换无血清培养液,继续孵育

48 h,将细胞阻滞在 G<sub>1</sub>期。换含 3% 血清培养液,分为空白、四物汤及四物汤化学成分组合 3 组,四物汤终质量浓度 32 μg/mL、四物汤化学成分组合终质量浓度 8 μg/mL,每组 2 瓶,继续避光培养 12 h。按 Trizol 试剂说明书提取各组细胞的总 RNA<sup>[8]</sup>,紫外分析仪测定纯度及浓度,1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析总 RNA 的完整性<sup>[9]</sup>。取各组总 RNA 约 80 μg 置于 EP 管中,分别加入阳性对照 LUC mR-NA 0.3 μg 进行反转录,用 Cy3-d UTP 标记空白组 cDNA, Cy5-d UTP 标记不同给药组 cDNA,如此实验重复 2 次。cDNA 产物溶于 2 μL 水中备用。

2.3.3 杂交:将已溶解的 cDNA 探针与 6 μL 杂交液充分混匀,96 ℃ 水浴变性 2 min 后立即冰浴。将等量的空白组 cDNA 探针杂交液分别与不同给药组 cDNA 探针杂交液混合,均匀铺到芯片上,用盖玻片封片,置于密封湿润的杂交仓中,42 ℃ 杂交 3 h。杂交完毕,分别用洗液 A (1×SSC, 0.2% SDS),洗液 B (0.2×SSC),洗液 C (0.1×SSC) 梯度洗片,室温干燥。

2.3.4 激光共聚焦扫描及结果分析:GenePix 4000B 扫描仪扫描芯片, GenePix Pro4.0 分析软件对扫描数据进行定量分析。

2.4 数据处理:MTT 实验和流式细胞术实验的数据统计分析进行组间 *t* 检验,结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示。差异表达基因的筛选应用 GenePix Pro4.0 分析软件筛选差异基因,标准是:(1)两种相互比较的信号荧光强度值至少有一个大于 600,或者其中一个约为 0,另一个信号值大于 1 000;(2)信号荧光强度的比值大于 1.5 或小于 0.66。进行信号归一化校正的点为 LUC 及看家基因。

3 结果

3.1 四物汤化学成分组合对 HFCL 细胞增殖活力的促进作用:1、2、4、8、16、32、64、128 μg/mL 四物汤化学成分组合显著地增强 HFCL 细胞的增殖活力,见表 1。

3.2 四物汤化学成分组合对 HFCL 细胞周期的影响:与空白组相比,四物汤组处于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的细胞明显减少,PI 则明显大于空白组;四物汤化学成分组合处于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的细胞显著少于空白组,PI 则显著大于空白组,表明四物汤及其化学成分组合都有助于细胞通过阻滞点,促进增殖。同时,四物汤与其化学成分组合相比差异不显著,见表 2。

3.3 四物汤化学成分组合对 HFCL 细胞表达谱的影响:图 1 为基因表达谱差异分析的散点图,Y 轴代

表 1 四物汤化学成分组合对 HFCL 细胞增殖活力的促进作用 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )  
Table 1 Stimulative effect of CCSWD on proliferation potency of HFCL cells ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

| 组 别    | 终质量浓度<br>/(μg · mL <sup>-1</sup> ) | A 值            | 增殖率/%  |
|--------|------------------------------------|----------------|--------|
| 空白     | —                                  | 0.136±0.038    | —      |
| 对照     | —                                  | 0.558±0.096    | —      |
| 化学成分组合 | 0.25                               | 0.637±0.129    | 18.51  |
|        | 0.5                                | 0.653±0.077    | 22.33  |
|        | 1                                  | 0.756±0.110**  | 46.82  |
|        | 2                                  | 0.861±0.157*** | 71.45  |
|        | 4                                  | 0.989±0.205*** | 101.86 |
|        | 8                                  | 1.029±0.103*** | 111.18 |
|        | 16                                 | 1.018±0.221*** | 108.65 |
|        | 32                                 | 0.945±0.051*** | 91.39  |
|        | 64                                 | 0.940±0.135*** | 90.14  |
|        | 128                                | 0.855±0.175**  | 70.20  |

与对照组比较: \*\**P*<0.01 \*\*\**P*<0.001  
\*\**P*<0.01 \*\*\**P*<0.001 vs control group

表 2 四物汤化学成分组合对 HFCL 细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )  
Table 2 Effect of CCSWD on HFCL cell cycle ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

| 组 别    | 细胞周期/%                         |                   |            | PI/%         |
|--------|--------------------------------|-------------------|------------|--------------|
|        | G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> | G <sub>2</sub> /M | S          |              |
| 对照     | 51.25±2.89                     | 12.33±1.47        | 36.43±3.50 | 48.76±2.89   |
| 四物汤    | 45.40±5.51                     | 13.06±1.38        | 40.55±4.54 | 54.61±5.51*  |
| 化学成分组合 | 43.56±3.72                     | 16.49±4.96        | 39.55±4.32 | 56.04±3.72** |

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

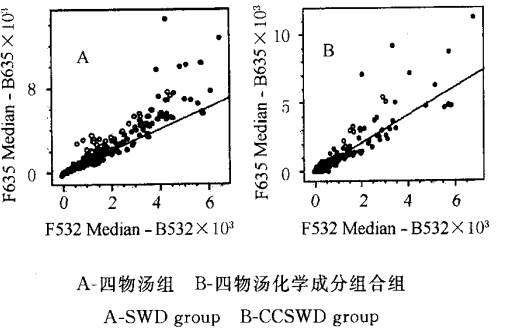


图 1 基因表达谱分析散点图(看家基因及阳性对照 LUC 校正)

Fig. 1 Scatter plots of gene expression profile (normalized by house-keeping genes and positive control LUC)

表药物处理组荧光强度,X 轴代表对照组荧光强度。图中对角线上及其附近的点代表无差异表达的基因,左上方远离对角线的点代表表达上调的基因,右下方远离对角线的点代表表达下调的基因。图中实心点代表无差异表达基因。

经分析比较发现,四物汤组差异表达的基因共有 10 个,四物汤化学成分组合差异表达的基因共有 3 个。具体分析结果见表 3 和表 4。

表 3 四物汤作用 12 h 后 HFCL 细胞差异表达基因

Table 3 Different expression of genes in HFCL cells treated by SWD for 12 h

| 基因名称                            | 注册号       | 比值(四物汤:空白) |
|---------------------------------|-----------|------------|
| IL <sub>8</sub> -Rb             | M73969    | 1.516:1    |
| IL <sub>13</sub>                | AF377331  | 1.549:1    |
| IL <sub>2</sub> -R $\alpha$     | NM-000417 | 1.577:1    |
| IL <sub>9</sub> -R              | BC051337  | 1.646:1    |
| Pre-IL <sub>1</sub> -R          | X02851    | 1.658:1    |
| DLL1                            | AF196571  | 1.863:1    |
| NF- $\kappa$ b                  | S76638    | 1.911:1    |
| TPO                             | NM-000460 | 1.913:1    |
| IL <sub>1</sub> -R <sub>2</sub> | U75649    | 1.975:1    |
| TFR                             | XM-052730 | 2.463:1    |

表 4 四物汤化学成分组合作用 12 h 后 HFCL 细胞差异表达基因

Table 4 Different expression of genes in HFCL cells treated by CCSWD for 12 h

| 基因名称                        | 注册号       | 比值(化学成分组合:空白) |
|-----------------------------|-----------|---------------|
| IL <sub>2</sub> -R $\alpha$ | NM-000417 | 1.622:1       |
| NF- $\kappa$ b              | S76638    | 1.656:1       |
| TPO                         | NM-000460 | 1.776:1       |

#### 4 讨论

骨髓成纤维样基质细胞是造血微环境的主要成分,约占骨髓基质细胞的 60%~70%,通过分泌细胞因子及细胞间的相互接触参与调节造血干细胞的增殖与分化<sup>[10]</sup>,对正常造血具有调控作用。

本研究发现四物汤化学成分组合 0.25~128  $\mu$ g/mL 可增强骨髓成纤维样基质细胞 HFCL 增殖活力,且在 8  $\mu$ g/mL 以下组增强作用呈浓度依赖关系,大于 8  $\mu$ g/mL 组随药物浓度增加,增强作用反而减弱,这可能与化学成分组合浓度加大改变了 HFCL 培养环境有关。四物汤化学成分组合作用于 HFCL 12 h 后,相对于空白组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞显著减少,与四物汤相似,说明二者加强了 HFCL 细胞 DNA 合成,加快了细胞分裂、增殖速度,这一作用与四物汤可促进小鼠骨髓细胞由 G<sub>1</sub>期进入 S 期的作用相吻合<sup>[11]</sup>。四物汤化学成分组合对细胞增殖活力的影响远大于对流式细胞术实验中 PI 的影响,说明其促 HFCL 增殖外,主要是促进 HFCL 的能量代谢。

四物汤化学成分组合组有 3 个表达上调的基因。其中 IL-2 受体是异多聚体糖蛋白,由  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  3 条链组成, $\alpha$  链(又称 CD25)是 IL-2 特异的,IL-2

与 IL-2 受体结合后,传递信号,引起细胞的增殖反应。NF- $\kappa$ B 是一种重要的转录因子,对细胞因子诱导的基因表达起关键性调控作用,在 T 细胞激活作用过程中也起重要作用,还能够抑制肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )诱导的细胞凋亡。TPO 增强祖细胞 DNA 合成和增加细胞多倍体倍数,刺激巨核细胞合成蛋白质,增加巨核细胞总数,进而增加血小板生成。这 3 者的作用可能与四物汤促进骨髓造血干祖细胞的增殖,抑制骨髓造血干祖细胞的凋亡作用相关。

四物汤及其化学成分组合作用于 HFCL 细胞 12 h 后,化学成分组合表达上调的基因只有 3 个,少于四物汤的 10 个,说明四物汤由于含有更多的成分,作用的范围更广范。而且化学成分组合来源于四物汤,所以该组表达上调的 3 个基因在四物汤组也是表达上调的,表明四物汤作用机制与其特定的物质基础存在一定的对应关系,因此可以应用基因芯片技术研究复方中药作用机制与其化学成分的关系或用于初步筛选、确定复方中药的有效成分。

#### References:

- [1] Liang Q D, Ma B P, Wang S Q. Determination of monosaccharide and disaccharide in condensed Siwu Decoction by HPLC-ELSD [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(4): 395-397.
- [2] Liang Q D, Lu X Q, Ma Z C, et al. Preliminary study on hematopoietic constituents of SI-WU-TANG [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 29(7): 646-650.
- [3] Tong L, Chen S H, Ma Z, et al. Accessing gene expression profile of blood deficiency mice using hematopoietic-related cytokine oligonucleotide microarrays [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(7): 625-629.
- [4] Chen Y, Yang X, Han F M, et al. Determination of ligustrazin and ferulic acid in *Chuanxiong* rhizome by capillary electrophoresis [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1999, 34(9): 699-701.
- [5] Liang R, Huang G S, Chen X Q, et al. Effects of human fibroblastoid stromal cell line on proliferation of HL-60 cells and expression of VEGF [J]. *J Exp Hematol* (中国实验血液学杂志), 2003, 11(5): 476-479.
- [6] Ling C Q, Peng Y H, Zhang C, et al. Effect of melittin on growth and proliferation of H<sub>22</sub> hepatocarcinoma cells [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(10): 921-923.
- [7] Ji Y B, Gao S Y, Kong Q, et al. Effect of sea pyrimidine on apoptosis of human gastric cancer cell SGC-7901 [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(10): 901-904.
- [8] Schena M, Shalon D, Davis R W, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray [J]. *Science*, 1995, 270(5235): 467-470.
- [9] Joseph S, David W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [10] Yoder M, Williams D A. Matrix molecule interactions with hematopoietic stem cells [J]. *Exp Hematol*, 1995, 23: 961-967.
- [11] Ma Z C, Gao Y, Liu Y X, et al. Studies on effects on the hematopoietic cell of the blood deficiency mice made by <sup>60</sup>Co $\gamma$  irradiation [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2001, 7(3): 41-44.