

人参皂苷 Rg₁对移植性白血病模型小鼠的作用

李 渊¹, 顾守美², 刘小虎³, 周 雯³, 周 玥^{3*}, 王亚平⁴

1. 大理护理职业学院, 云南 大理 671000

2. 大理大学第一附属医院 呼吸内科, 云南 大理 671000

3. 大理大学 组织胚胎学教研室, 云南省细胞生物学重点实验室, 云南 大理 671000

4. 重庆医科大学 组织胚胎学教研室, 干细胞与组织工程研究室, 重庆 400016

摘 要: 目的 研究人参皂苷 Rg₁对移植性白血病模型小鼠的作用。方法 采用免疫磁性分选法(MACS)从K562细胞中分离、纯化CD34⁺CD38⁻人白血病干细胞(CD34⁺CD38⁻ LSCs), 流式细胞术检测分选细胞纯度, 台盼蓝染色测定分选细胞活性。将6~8周雌性NOD/SCID小鼠27只随机分为对照组、模型组、人参皂苷 Rg₁ (200 mg/kg)组, 每组9只, 模型组和人参皂苷 Rg₁组通过尾iv移植CD34⁺CD38⁻ LSCs构建白血病小鼠模型, ip给药30 d。观察各组小鼠一般情况及腹部包块变化; 全自动血常规检测仪检测外周血白细胞、红细胞、血红蛋白、血小板水平; 免疫组化法检测肝、脾脏病理学变化; 流式细胞仪分析骨髓细胞周期; CCK-8法检测各组骨髓细胞的增殖能力; 细胞免疫荧光染色鉴定骨髓细胞CD34阳性表达情况。**结果** 分选前K562细胞中CD34⁺CD38⁻ LSCs细胞群百分比为(9.64±1.14)%, 分选后CD34⁺CD38⁻ LSCs纯度可达(96.45±1.63)%; 台盼蓝染色显示分选后细胞活性为(95.26±2.16)%。与对照组比较, 模型组小鼠腹部包块明显, 生存情况较差, 体质量显著下降(P<0.05); 白细胞数显著增高, 红细胞数、血红蛋白水平、血小板数均显著下降(P<0.05); 肝、脾脏结构被破坏, 有大量白细胞浸润; 骨髓细胞周期检测显示G₀/G₁期比例显著下降(P<0.05), S期比例显著升高(P<0.05); 骨髓细胞增殖活力显著升高(P<0.05)。与模型组比较, 人参皂苷 Rg₁组小鼠腹部包块明显减小, 生存情况好转, 体质量显著增加(P<0.05); 白细胞总数显著下降(P<0.05), 红细胞数、血红蛋白水平、血小板数均显著升高(P<0.05); 肝、脾脏结构明显恢复; 骨髓细胞G₀/G₁期比例显著升高(P<0.05), G₂/M期和S期比例显著下降(P<0.05)。细胞免疫荧光检测显示, 模型组和人参皂苷 Rg₁组中小鼠的骨髓细胞中存在大量的人源白血病细胞。**结论** NOD/SCID小鼠尾iv移植CD34⁺CD38⁻ LSCs可成功构建急性髓系白血病小鼠模型, 人参皂苷 Rg₁能有效缓解NOD/SCID小鼠的白血病症状。

关键词: 人参皂苷 Rg₁; NOD/SCID小鼠; 急性髓系白血病模型; 移植; 白血病干细胞

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)12-2571-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.12.007

Effect of ginsenoside Rg₁ on transplanted leukemia mouse model

LI Yuan¹, GU Shoumei², LIU Xiaohu³, ZHOU Wen³, ZHOU Yue³, WANG Yaping⁴

1. Dali Nursing Vocational College, Dali 671000, China

2. Respiratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Dali University, Dali 671000, China

3. Key Laboratory of Cell Biology, Department of Histology and Embryology, Dali University, Dali 671000, China

4. Laboratory of Stem Cells and Tissue Engineering, Department of Histology and Embryology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective To study the effect of ginsenoside Rg₁ on transplanted leukemia mice model. **Methods** CD34⁺CD38⁻ LSCs were isolated and purified from K562 cells by immunomagnetic separation (MACS). The purity of CD34⁺CD38⁻ LSCs was determined by flow cytometry, and the activity of CD34⁺CD38⁻ LSCs was determined by Trypan blue staining. Totally 36 female NOD/SCID mice, 6—8 weeks old, were randomly divided into control group, model group and ginsenoside Rg₁ (200 mg/kg) group, with nine mice in each group. The mouse model of leukemia in model group and ginsenoside Rg₁ group was established by tail IV transplantation of CD34⁺CD38⁻ LSCs, and ip administration of corresponding drugs for 30 days. The general condition and

收稿日期: 2021-05-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81860038); 云南省教育厅科学研究基金资助项目(2020J1055)

第一作者: 李 渊, 助教, 研究方向为中药调控干细胞衰老的相关信号通路。Tel: 17787897026 E-mail: 835700201@qq.com

*通信作者: 周 玥, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药调控干细胞衰老的相关信号通路。E-mail: zhouyue120@sina.com

abdominal mass changes of mice in each group were observed. Automatic blood routine detector was used to detect peripheral blood white blood cell, red blood cell, hemoglobin, platelet levels. The pathological changes of liver and spleen were detected by immunohistochemistry. Bone marrow cell cycle was analyzed by flow cytometry. CCK-8 method was used to detect the proliferation of bone marrow cells in each group. CD34 positive expression of bone marrow cells was determined by immunofluorescence staining. **Results** The percentage of CD34⁺CD38⁻ LSCs in K562 cells was (9.64 ± 1.14)% before separation, and the purity of CD34⁺CD38⁻ LSCs reached (96.45 ± 1.63)% after separation. Trypan blue staining showed that the cell activity after separation was (95.26 ± 2.16)%. Compared with control group, abdominal mass was obvious in model group, the survival was poor, and body weight was significantly decreased ($P < 0.05$). WBC count was significantly increased, RBC count, hemoglobin level and platelet count were significantly decreased ($P < 0.05$). The structure of liver and spleen was destroyed, and there were a lot of leukocytes. Bone marrow cell cycle detection showed that the proportion of G₀/G₁ phase was significantly decreased ($P < 0.05$), and that of S phase was significantly increased ($P < 0.05$). The proliferation activity of bone marrow cells was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with model group, abdominal mass in ginsenoside Rg₁ group was significantly reduced, survival was improved, and body weight was significantly increased ($P < 0.05$). The total number of WBC was significantly decreased ($P < 0.05$), while the RBC number, hemoglobin level and platelet count were significantly increased ($P < 0.05$). The structure of liver and spleen recovered significantly. The proportion of G₀/G₁ phase was significantly increased ($P < 0.05$), while the proportion of G₂/M and S phase was significantly decreased ($P < 0.05$). Immunofluorescence assay showed that there were a large number of human leukemia cells in bone marrow cells of mice in model group and ginsenoside Rg₁ group. **Conclusion** Tail iv transplantation of CD34⁺CD38⁻ LSCs construct acute myeloid leukemia mouse model, ginsenoside Rg₁ can effectively alleviate the symptoms of leukemia in NOD/SCID mice. **Key words:** ginsenoside Rg₁; NOD/SCID mice; acute myeloid leukemia model; transplant; leukemia stem cells

急性髓系白血病(acute myeloblastic leukemia, AML)是一种起源于AML干细胞的以髓细胞失控性增殖为特征的危及生命的恶性克隆性肿瘤。迄今为止,治疗白血病的主要思路仍是采用非靶向细胞毒性药物治疗,虽然已经取得了很显著的效果,但复发及大剂量化疗的毒副作用仍是影响疗效进一步提高的主要障碍^[1-3]。人参是我国名贵中药材,人参皂苷Rg₁是人参中的主要活性成分之一,具有延缓衰老、抵抗辐射、补气生血、抗肿瘤等功效^[4]。本课题组前期研究发现,人参皂苷Rg₁可抑制白血病K562细胞的体外增殖^[5-7],但其在体内调控白血病的作用及机制尚不明确。本研究以NOD/SCID小鼠为研究对象,探讨人参皂苷Rg₁对移植性白血病小鼠模型的作用及机制。

1 材料

1.1 实验动物

NOD/SCID小鼠,6~8周龄,体质量25~30 g,雌性,36只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物生产许可证号SCXK(京)2016-0011。小鼠自购回后保持其自由饮水、进食,温度23~25℃,动物房12 h/12 h昼夜交替,适应性喂养1周后进行实验。

1.2 细胞株

人髓系白血病K562细胞株为重庆医科大学干细胞与组织工程研究室馈赠。采用免疫磁性分选法(MACS)从K562细胞中分离、纯化CD34⁺CD38⁻

人白血病干细胞(CD34⁺CD38⁻ LSCs),流式细胞术检测分选细胞纯度,台盼蓝染色测定分选细胞活性。

1.3 药品与主要试剂

人参皂苷Rg₁(购于大连美仑生物技术有限公司,质量分数>98%,批号J0823AS);环磷酰胺水合物(Sigma公司,CAS编号6055-19-2,货号C0768-1G);瑞氏染液试剂(南京建成公司);苏木素染液(南京建成公司);伊红染液(碧云天公司);Anti CD34抗体、Anti Alexa Fluor 647抗体(abcam公司);免疫荧光一、二抗稀释液(碧云天公司);山羊血清(上海生工公司);Dapi染色液、抗荧光淬灭剂(碧云天公司);RPMI 1640培养基、胎牛血清(Gibco公司);Cell Cycle and Apoptosis Analysis Kit(美国BD公司);CCK-8试剂盒(Sigma公司);Human anti-CD38 MicroBead Kit(Miltenyi公司);Human anti-CD34 MicroBead Kit(Miltenyi公司)。

1.4 主要仪器

SW-CJ-2FD超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);MC-6500血常规仪(库贝尔生物科技有限公司);CKX53倒置显微镜(日本OLYMPUS公司);MCO-20AIC二氧化碳培养箱(日本三洋公司);FPMIC-razor切片机、烤片机(德国Leica公司);321XJ电子分析天平(瑞士Precisa12A公司);TCS SP5激光共聚焦荧光显微镜(德国Leica公司);FACSCalibur流式细胞仪(美国BD公司);FC多功

能酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司)。

2 方法

2.1 CD34⁺CD38⁻ LSCs 的分离纯化及鉴定

2.1.1 CD34⁺CD38⁻ LSCs 的分离纯化 收集无菌培养的 K562 细胞,每 1×10^7 个细胞中加入 800 μL buffer、200 μL biotin 标记的 human anti-CD38-PE 抗体的免疫磁珠,充分混合均匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 10 min,洗涤后去上清,加入 800 μL buffer、200 μL anti-biotin 微珠,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。将 LD 分选柱置于分离器磁场中,取 1 mL buffer 冲洗分选柱,重复 3 次。用刻度滴管将 K562 细胞加入分选柱中使其自然通过,待细胞悬液流完后加入 1 mL buffer 冲洗 2 次,CD34⁺细胞群即被吸附于柱上,流出细胞为 CD38⁻细胞群,离心洗涤计数后进行 CD34⁺细胞分选。取下柱子,每 1×10^7 个 CD38⁻细胞加入 300 μL buffer、100 μL fer blocking reagent、100 μL CD34 microbeads 充分混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。1 200 r/min 离心 10 min 后加入 500 μL buffer 重悬制成单细胞悬液,取 500 μL buffer 预冲洗柱子 3 次,将细胞悬液加入 LD 分选柱中进行 CD34⁺细胞分选,待悬液流尽后加 1 mL buffer 于柱中,分选柱配备活塞迅速推出加压洗脱磁性标记细胞,洗下的细胞即为 CD34⁺CD38⁻细胞群。

2.1.2 CD34⁺CD38⁻ LSCs 的活性检测 分选后,在细胞悬液中加入适当剂量的台盼蓝染液,均匀的混合后滴加至细胞计数板上,显微镜选取多个视野进行观察和计数。

2.1.3 CD34⁺CD38⁻ LSCs 的纯度检测 分别取分选前的 K562 细胞和分选后的 CD34⁺CD38⁻ LSCs 1×10^7 个,加入单克隆抗体 human anti-CD34-FITC 和 human anti-CD38-APC,通过流式细胞仪检测 APC 和 FITC 的荧光信号,计算细胞纯度。

细胞纯度 = $\text{CD34}^+\text{CD38}^- \text{细胞数} / \text{细胞总数}$

2.2 动物分组及给药

将 NOD/SCID 小鼠随机分为对照组、模型组、人参皂苷 R_{g1} 组,每组 9 只。人参皂苷 R_{g1} 组:在无菌条件下通过尾 iv 移植 CD34⁺CD38⁻ LSCs 2×10^7 只,移植后 ip 人参皂苷 R_{g1} 200 mg/kg(剂量参考文献报道^[8]及预试验确定),每天 1 次,连续 30 d;模型组:小鼠移植处理同人参皂苷 R_{g1} 组,移植后等时 ip 等量的无菌 PBS;对照组:小鼠等时尾 iv、ip 等量的无菌 PBS。

2.3 NOD/SCID 小鼠的一般情况观察

实验期间按照 3 次/周的频率观察小鼠精神、食

欲、活动能力、毛发状况、腹部包块、体质量等情况,并做好记录。

2.4 小鼠外周血血常规检测

给药结束后第 2 天,小鼠处死前摘眼球取血,采血量 0.5 mL/只,EDTA-K2 抗凝,全自动血常规检测仪检测白细胞、红细胞、血红蛋白、血小板水平。

2.5 肝、脾脏病理切片分析

处死小鼠后取新鲜肝、脾脏,在 4% 多聚甲醛固定 24~72 h,按照设置好的乙醇浓度梯度依次脱水,在二甲苯中透明,进行组织块石蜡包埋,冷冻切片后苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,95% 乙醇依次脱水后二甲苯透明,晾干后即可镜检和封片。

2.6 流式细胞仪检测各组小鼠骨髓细胞周期

处死小鼠后,无菌分离小鼠双侧股骨和胫骨,无菌 PBS 反复轻吹骨髓腔直至颜色发白,取各组小鼠骨髓细胞,2 000 r/min 离心 5 min,收集细胞沉淀,弃上清;用预冷 PBS 洗涤细胞 2 次,收集 5×10^5 个细胞。将细胞加入 1 mL 冰浴预冷 70% 乙醇中,4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 12 h。离心沉淀细胞,加入 3 mL 冰浴预冷的 PBS 洗涤 1 次,小心吸除上清;配制碘化丙啶染色液,每管细胞样品中加入 0.5 mL,重悬细胞沉淀,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光温育 30 min;用流式细胞仪在激发波长 488 nm 波长处检测红色荧光,同时检测光散射情况;结果用细胞周期软件进行分析。

2.7 CCK-8 法检测各组骨髓细胞的增殖能力

计数提取的各组骨髓细胞,调整细胞浓度至 $1 \times 10^5/\text{mL}$,分别接种于 96 孔板中,每孔 100 μL 。将 96 孔板移入培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2)中分别培养 24、48、96 h。每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,于培养箱内孵育 4 h。用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度(A)值。同时设置空白孔(只加培养基和 CCK 溶液),计算骨髓细胞的活力。

细胞活力 = $(A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$

2.8 免疫荧光染色鉴定骨髓中肿瘤细胞来源

取各组小鼠的骨髓细胞,用胰酶消化后重悬,吹打 3 次,分别制成浓度为 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 的单细胞悬液,取已消毒的培养板,做好标记,在预计放玻片的位置滴加少量培养基,用镊子小心将玻片放置培养板中,将已经制备好的各组小鼠骨髓单细胞悬液滴加至玻片上,培养板置于培养箱中培养 24 h。在培养板中将已制备完成的细胞爬片用 PBS 浸洗 3 次,4% 的多聚甲醛常温固定 15 min, PBS 浸洗后用 0.5% 的 Triton x-100 通透细胞 15 min,滴加 6% 正常

山羊血清室温封闭30 min,滴加一抗Anti CD34(稀释比例为1:500),湿盒中4℃孵育过夜,复温后滴加荧光二抗Anti Alexa Fluor 647(稀释比例1:800),湿盒中37℃孵育30 min;PBS浸洗后滴加DAPI避光孵育5 min对标本进行染核,PBS浸洗后用含抗荧光淬灭剂封片,激光扫描聚焦显微镜下观察采集图像。

2.9 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用SPSS 17.0软件对数据进行统计学分析,采用析因设计、单因素方差分析方法。

3 结果

3.1 CD34⁺CD38⁻ LSCs的分离、纯化与鉴定

流式细胞术检测结果显示,分选前K562细胞中CD34⁺CD38⁻ LSCs细胞群百分比为(9.64±1.14)%,MACS法分离纯化后CD34⁺CD38⁻ LSCs纯度可达(96.45±1.63)%。台盼蓝染色显示分选后细胞活性为(95.26±2.16)%。提示分选的CD34⁺CD38⁻ LSCs有较高的纯度和活性。见图1。

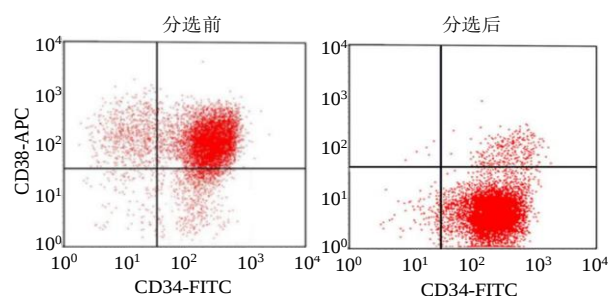


图1 分选前后CD34⁺CD38⁻ LSCs细胞比例

Fig. 1 Percentage of CD34⁺CD38⁻ LSCs before and after sorting

3.2 小鼠的一般情况观察

与对照组比较,模型组小鼠在处死前均出现全身白血病表现,小鼠精神萎靡、步态不稳、皮毛粗糙杂乱,腹部包块明显,体质量显著下降($P<0.05$);与模型组比较,人参皂苷Rg₁组小鼠精神状况明显较好,腹部包块明显缩小,平均体质量显著升高($P<0.05$)。见表1。

表1 各组小鼠体质量($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 1 Body weight of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	平均体质量/g
对照	—	29.56±0.46
模型	—	20.14±2.56*
人参皂苷Rg ₁	200	25.78±0.52 [#]

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group

3.3 小鼠的外周血血常规测定

与对照组比较,模型组小鼠外周血中白细胞数显著增高($P<0.05$),红细胞数、血红蛋白水平、血小板数均显著下降($P<0.05$);与模型组比较,人参皂苷Rg₁组小鼠外周血中白细胞总数显著下降($P<0.05$),红细胞数、血红蛋白水平、血小板数均显著增高($P<0.05$)。见表2。

3.4 小鼠肝脏、脾脏病理学检查

与对照组比较,模型组小鼠肝小叶结构被破坏,边界不清,肝脏组织中大量白细胞浸润,肝细胞出现水样变性;脾脏中的淋巴滤泡扩大并融合成片,脾脏组织中有大量白细胞浸润。与模型组比较,人参皂苷Rg₁组小鼠肝小叶破坏程度减轻,白细胞浸润减少;脾脏的基本结构破坏程度和白细胞浸润程度均减轻。见图2、3。

3.5 骨髓细胞周期检测

与对照组比较,模型组小鼠骨髓细胞G₀/G₁期比例显著下降($P<0.05$),S期比例显著升高($P<0.05$),提示模型组小鼠骨髓细胞的增殖能力明显增强;与模型组比较,人参皂苷Rg₁组小鼠骨髓细胞G₀/G₁期比例显著升高($P<0.05$),G₂/M期和S期比例显著下降($P<0.05$),提示人参皂苷Rg₁能使异常骨髓细胞阻滞在G₀/G₁期,增殖能力下降。见表3。

3.6 骨髓细胞的增殖能力检测

与对照组比较,模型组小鼠骨髓细胞增殖活力显著升高($P<0.05$);与模型组比较,人参皂苷Rg₁组小鼠骨髓细胞增殖活力显著下降($P<0.05$)。见表4。

表2 各组小鼠外周血中白细胞、红细胞、血红蛋白、血小板水平($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 2 Peripheral blood leucocytes, erythrocytes, hemoglobin and platelet level of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	白细胞/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	红细胞/($\times 10^{12} \cdot L^{-1}$)	血红蛋白/(g·L ⁻¹)	血小板/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)
对照	—	3.78±0.76	9.17±0.25	140.00±6.00	714.72±226.28
模型	—	9.72±0.39*	4.38±0.77*	87.48±3.49*	279.89±56.04*
人参皂苷Rg ₁	200	6.73±0.49 [#]	6.62±0.19 [#]	110.00±3.00 [#]	435.53±24.20 [#]

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group

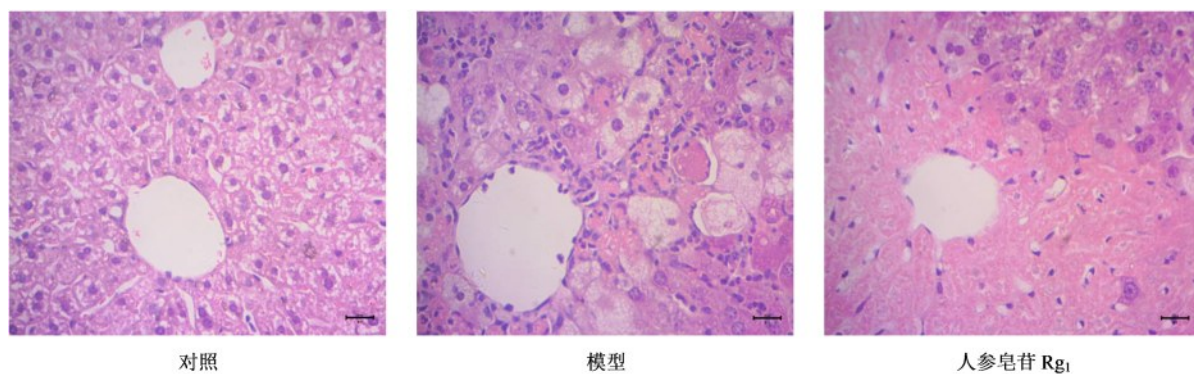


图2 各组小鼠肝脏病理学检测(HE染色,×400)

Fig. 2 Liver pathological examination of mice in each group (HE staining, ×400)

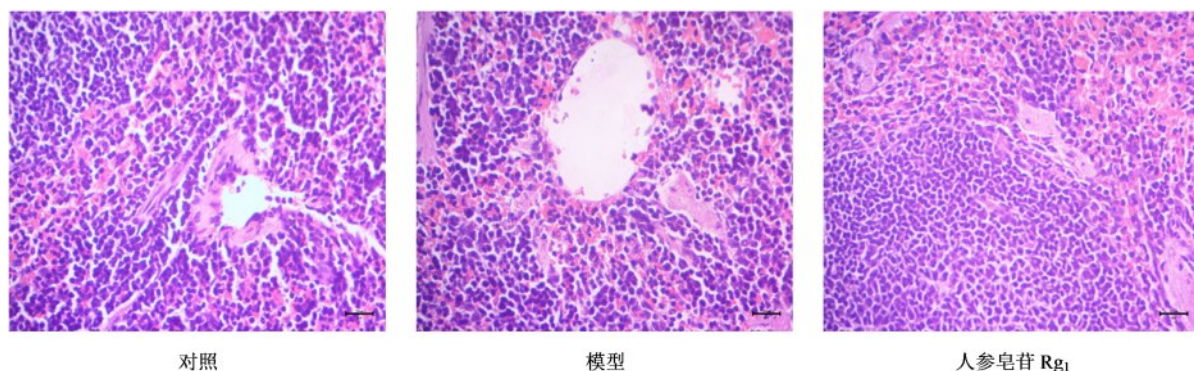


图3 各组小鼠脾脏病理学检测(HE染色,×400)

Fig. 3 Spleen pathological examination of mice in each group (HE staining, ×400)

表3 各组小鼠骨髓细胞周期时相检测($\bar{x} \pm s, n=9$)Table 3 Phase analysis of bone marrow cell cycle in each group ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	G ₀ /G ₁ 期/%	G ₂ /M期/%	S期/%
对照	—	80.22±3.21	12.80±1.54	6.98±0.73
模型	—	70.04±4.02 [*]	9.77±1.37	20.19±2.06 [*]
人参皂苷 Rg ₁	200	86.56±5.41 [#]	7.36±2.02 [#]	6.08±1.62 [#]

与对照组比较:^{*} $P < 0.05$;与模型组比较:[#] $P < 0.05$ ^{*} $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group表4 各组小鼠骨髓细胞增殖活力检测($\bar{x} \pm s, n=9$)Table 4 Detection of value added ability of bone marrow cells ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	细胞活力/%
对照	—	94.77±1.15
模型	—	126.03±1.53 [*]
人参皂苷 Rg ₁	200	114.49±1.39 [#]

与对照组比较:^{*} $P < 0.05$;与模型组比较:[#] $P < 0.05$ ^{*} $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

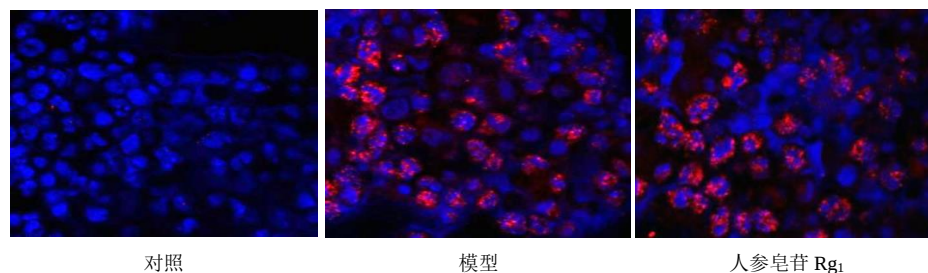
3.7 免疫荧光染色鉴定骨髓中肿瘤细胞来源

免疫荧光细胞化学检测结果显示,模型组和人参皂苷 Rg₁组骨髓细胞荧光明亮且清晰,提示模型组和人参皂苷 Rg₁组小鼠骨髓细胞中大量人源白血

病细胞;对照组中骨髓细胞未出现阳性表达。见图4。

4 讨论

AML是人类最常见的恶性侵袭性的白血病^[9]。临床上的标准药物治疗方法是化疗药物阿糖胞苷和蒽环类药物的结合,尽管大多数AML患者可以缓解,然而患者的其他脏器功能损害严重,生存率大大下降且容易复发^[10]。近年来,随着干细胞研究的拓展及细化,LSCs逐渐被人们所认知。这类肿瘤干细胞大部分时候处于细胞周期的静止期,因此能逃脱传统改变细胞周期的化疗药物,白血病化疗耐药性恰恰与这种肿瘤干细胞清除不足有关^[11-12]。LSCs具有自我更新、增殖和分化的能力^[13],移植入

图4 免疫荧光鉴定骨髓中白血病细胞来源($\times 1\ 600$)Fig. 4 Identification of source of leukemia cells in bone marrow by immunofluorescence ($\times 1\ 600$)

实验受体小鼠体内能够增殖分化形成大量白血病细胞,建立移植性白血病小鼠模型。目前白血病研究应用的免疫缺陷小鼠主要有SCID小鼠和NOD/SCID小鼠,其中NOD/SCID小鼠具有更高的移植效率。

本研究通过尾iv移植CD34⁺CD38⁻LSCs来构建NOD/SCID小鼠AML模型。与对照组相比,模型组小鼠的一般情况发生变化:腹部包块明显,生存情况较差,体质量明显下降,提示小鼠出现全身白血病的表现;血液系统发生变化:外周血中白细胞总数明显增高,骨髓细胞G₀/G₁期比例明显下降,骨髓细胞的细胞活力明显升高,提示小鼠骨髓中存在增殖能力很强的白血病细胞;肝、脾脏发生变化:肝小叶边界不清,肝细胞出现空泡变性,脾脏中的淋巴滤泡扩大并融合成片,肝脏、脾脏组织中都有大量白细胞浸润。这些结果证明,LSCs移植可以成功构建AML小鼠模型,该模型的建立为控制白血病复发率以及白血病药物的开发提供了实验基础^[14]。

人参皂苷Rg₁是人参中的主要活性成分,可促进白血病细胞衰老和凋亡,抑制其增殖。本课题组前期研究发现,人参皂苷Rg₁可抑制白血病K562细胞的体外增殖。人参皂苷Rg₁可通过调控P53-P21-Rb和P16-Rb信号通路来诱导K562细胞的衰老^[15];通过下调红细胞生成素受体的表达和信号转导,诱导人红白血病TF-1细胞的凋亡^[16];可改变K562细胞内STAT5的分布和数量,抑制K562细胞的增殖^[17]。同时还发现,人参皂苷Rg₁可促进正常造血干/祖细胞的增殖^[18]。

既往大部分研究集中在人参皂苷Rg₁与白血病细胞的体外实验,体内实验研究较少。本研究以白血病小鼠模型为基础,探究人参皂苷Rg₁的治疗作用,同时为进一步探究作用机制打下实验基础。本研究结果显示,与模型组比较,人参皂苷Rg₁组小鼠的一般情况发生变化:腹部包块缩小,生存情况良好,体质量明显升高,提示人参皂苷Rg₁可缓解小鼠

白血病症状;人参皂苷Rg₁组小鼠的外周血中白细胞总数明显降低,骨髓细胞G₀/G₁期比例明显升高,骨髓细胞的细胞活力明显降低,提示人参皂苷Rg₁可抵抗小鼠骨髓中白血病细胞的增殖,保护小鼠血液系统;人参皂苷Rg₁组小鼠肝、脾脏的基本结构破坏没有模型组明显,白血病细胞浸润没有模型组明显,提示人参皂苷Rg₁可抵抗白血病细胞在肝脏中的浸润,保护肝、脾脏系统。结果证明人参皂苷Rg₁可有效缓解白血病小鼠的症状,对白血病小鼠有一定的治疗作用。本课题组前期研究发现,人参皂苷Rg₁可通过SIRT1-TSC2信号通路来抑制体外LSCs的增殖^[19],但在体内是否仍通过SIRT1-TSC2信号通路或者其他信号轴来缓解白血病小鼠的症状仍未得到证实。下一步研究中,本课题组将从分子通路的角度继续探究人参皂苷Rg₁缓解白血病小鼠症状的作用机制,为治疗白血病及白血病药物的开发提供新的思路和方法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wong T N, Miller C A, Klco J M, et al. Rapid expansion of preexisting nonleukemic hematopoietic clones frequently follows induction therapy for de novo AML [J]. *Blood*, 2016, 127(7): 893-897.
- [2] Hemmati P G, Terwey T H, Na I K, et al. Allogeneic stem cell transplantation for refractory acute myeloid leukemia: A single center analysis of long-term outcome [J]. *Eur J Haematol*, 2015, 95(6): 498-506.
- [3] Bodet-Milin C, Kraeber-Bodéré F, Eugène T, et al. Radioimmunotherapy for treatment of acute leukemia [J]. *Semin Nucl Med*, 2016, 46(2): 135-146.
- [4] 罗林明, 石雅宁, 姜懿纳, 等. 人参抗肿瘤作用的有效成分及其机制研究进展 [J]. *中草药*, 2017, 48(3): 582-596.
Luo L M, Shi Y N, Jiang Y N, et al. Advance in components with antitumor effect of *Panax ginseng* and their mechanisms [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2017, 48(3): 582-596.

- [5] 王红宁. 人参皂苷Rb₁、Rg₁、Re对K562细胞、KG1α细胞增殖影响及信号转导分子机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2010: 1-69.
- Wang H N. Effects of ginsenoside Rb₁, Rg₁, Re on proliferation inhibition of KG1α and K562 cells and signal transduction mechanism [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2010: 1-69.
- [6] 韩艳军, 周 玥. 人参皂苷Rg₁诱导白血病K562细胞老化的研究[J]. 医学研究生学报, 2020, 33(1): 32-37.
- Han Y J, Zhou Y. Study on the aging of leukemia K562 cells induced by ginsenoside Rg₁ [J]. J Med Postgrad, 2020, 33(1): 32-37.
- [7] 韩艳军, 王翠丽, 刘小虎, 等. 人参皂苷Rg₁对K562细胞增殖的影响[J]. 大理大学学报, 2020, 5(4): 16-20.
- Han Y J, Wang C L, Liu X H, et al. Effects of ginsenoside Rg₁ on the proliferation of K562 cells [J]. J Dali Univ, 2020, 5(4): 16-20.
- [8] 刘小虎, 赵志慧, 周 玥, 等. PI3K/Akt/mTOR自噬通路在人参皂苷Rg₁延缓D-gal诱导的卵巢早衰小鼠模型卵巢早衰中的作用[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(24): 6036-6042.
- Liu X H, Zhao Z H, Zhou Y, et al. Effect of ginsenoside Rg₁ in delaying premature ovarian failure induced by D-gal in mice through PI3K/Akt/mTOR autophagy pathway [J]. China J Chin Mater Med, 2020, 45(24): 6036-6042.
- [9] Quek L, Otto G W, Garnett C, et al. Genetically distinct leukemic stem cells in human CD34-acute myeloid leukemia are arrested at a hemopoietic precursor-like stage [J]. J Exp Med, 2016, 213(8): 1513-1535.
- [10] Martiáñez Canales T, de Leeuw D C, Vermue E, et al. Specific depletion of leukemic stem cells: Can microRNAs make the difference? [J]. Cancers (Basel), 2017, 9(7): E74.
- [11] Bruedigam C, Bagger F O, Heidel F H, et al. Telomerase inhibition effectively targets mouse and human AML stem cells and delays relapse following chemotherapy [J]. Cell Stem Cell, 2014, 15(6): 775-790.
- [12] Siveen K S, Uddin S, Mohammad R M. Targeting acute myeloid leukemia stem cell signaling by natural products [J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 13.
- [13] Stahl M, Kim T K, Zeidan A M. Update on acute myeloid leukemia stem cells: New discoveries and therapeutic opportunities [J]. World J Stem Cells, 2016, 8(10): 316-331.
- [14] Leyton J V, Gao C, Williams B, et al. A radiolabeled antibody targeting CD123(+) leukemia stem cells-initial radioimmunotherapy studies in NOD/SCID mice engrafted with primary human AML [J]. Leuk Res Rep, 2015, 4(2): 55-59.
- [15] 蔡世忠, 刘 俊, 刘典峰, 等. 人参皂苷Rg₁诱导白血病K562细胞衰老[J]. 基础医学与临床, 2012, 32(5): 481-486.
- Cai S Z, Liu J, Liu D F, et al. Human leukemia K562 cell aging induced by ginsenoside Rg₁ [J]. Basic Clin Med, 2012, 32(5): 481-486.
- [16] 柯大智, 王红宁, 陈地龙, 等. 人参皂苷Rg₁抑制白血病细胞K562增殖并诱导分化的分子机制[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(2): 125-129.
- Ke D Z, Wang H N, Chen D L, et al. Molecular mechanism of ginsenoside Rg₁ in inhibiting proliferation and inducing differentiation in chronic myelocytic leukemia K562 cells [J]. J Third Mil Med Univ, 2014, 36(2): 125-129.
- [17] Li J, Wei Q, Zuo G W, et al. Ginsenoside Rg₁ induces apoptosis through inhibition of the EpoR-mediated JAK2/STAT5 signalling pathway in the TF-1/Epo human leukemia cell line [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(6): 2453-2459.
- [18] 李 渊, 周 玥, 王亚平, 等. 人参皂苷Rg₁基于SIRT6/NF-κB信号通路对辐射致造血干/祖细胞衰老的保护作用[J]. 中草药, 2017, 48(21): 4497-4501.
- Li Y, Zhou Y, Wang Y P, et al. Effect of ginsenoside Rg₁ on delaying radiation-induced senescence of hematopoietic stem cell and progenitor cell based on SIRT6/NF-κB signal pathway [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2017, 48(21): 4497-4501.
- [19] 唐艳隆, 周 玥, 张成桂, 等. 人参皂苷Rg₁通过SIRT1-TSC₂信号通路诱导白血病干细胞衰老的作用[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(11): 2348-2352.
- Tang Y L, Zhou Y, Zhang C G, et al. Ginsenoside Rg₁ induces leukemia stem cell senescence via SIRT1/TSC₂ signal axis [J]. China J Chin Mater Med, 2019, 44(11): 2348-2352.

[责任编辑 兰新新]