

当归多糖对骨髓巨噬细胞的影响及其与造血调控的关系

李 静, 王亚平*

(重庆医科大学 组织胚胎学教研室, 重庆 400016)

摘要:目的 研究当归多糖 (APS) 对骨髓巨噬细胞 (BMM Φ) 生物活性的影响及其与造血调控的关系, 从而阐明当归的活血机制。方法 采用骨髓造血祖细胞和巨噬细胞体外培养, 造血生长因子生物活性检测, 免疫细胞化学, 核酸探针原位杂交等技术。结果 经 APS 诱导的 BMM Φ 的培养上清液可提高髓系造血祖细胞的集落产率; 经 APS 诱导后, BMM Φ 表达促红细胞生成素 (EPO)、粒-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、白细胞介素-3 (IL-3)、白细胞介素-6 (IL-6) 的蛋白水平有不同程度的提高; EPO mRNA 和 GM-CSF mRNA 的表达水平和强度明显提高。结论 APS 可以直接和(或)间接地刺激造血诱导微环境中的 BMM Φ 从基因水平和蛋白水平上促进造血调控因子的合成和分泌, 进而促进髓系多向性造血祖细胞 (CFU-Mix)、晚期红系祖细胞 (CFU-E)、粒单系造血祖细胞 (CFU-GM) 的增殖分化。

关键词: 当归多糖; 骨髓巨噬细胞; 造血祖细胞; 造血生长因子

中图分类号: R 286.3 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2005)01-0069-04

Effect of angelica polysaccharide on bone marrow macrophage and its relationship to hematopoietic regulation

LI Jing, WANG Ya-ping

(1. Department of Histology and Embryology, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of angelica polysaccharide (APS) on bioactivity of bone marrow macrophage (BMM Φ) and its relationship to hematopoietic regulation, for clarifying the hematonc mechanism of *Angelica sinensis*. **Methods** The techniques of hematopoietic progenitor cell culture and BMM Φ culture *in vitro*, biological assay of hematopoietic growth factor (HGF) in culture media of BMM Φ immunocytochemistry, and nucleic acid *in situ* hybridization were used. **Results** The culture supernatant of BMM Φ induced by APS can enhance the CFU-Mix, CFU-E, CFU-GM; the expression of erythropoietin (EPO), GM-CSF, IL-3, IL-6 protein in BMM Φ induced by APS was much stronger than that in the control group at different levels; the expression of EPO mRNA and GM-CSF mRNA in BMM Φ induced by APS were intensified. **Conclusion** APS may directly and/or indirectly stimulate the BMM Φ in hematopoietic inductive microenvironment to accelerate the synthesis and secretion of hematopoietic regulation factors on the basis of gene and protein level, such as EPO, GM-CSF, IL-3, IL-6, which in turn to promote the proliferation and differentiation of CFU-Mix, CFU-E, and CFU-GM.

Key words: angelica polysaccharide (APS); bone marrow macrophage (BMM Φ); hematopoietic progenitor cells; hematopoietic growth factors (HGF)

当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 作为祖国传统医学“补血活血”要药, 已有数千年的临床应用历史。现代临床医学观察表明: 当归用于治疗多种原因所致的贫血和白细胞减少确有独到功效。既往的研究表明, 当归多糖 (angelica polysaccharide, APS) 是当归中“补血”或促进血细胞生成的有效成分, APS 对小鼠造血干细胞 (CFU-S)、小鼠与人髓系造血祖细胞 (BFU-E、CFU-E、CFU-GM、CFU-MK、CFU-

Mix) 的增殖分化有显著促进作用^[1,2], 并从细胞生物学水平对其机制进行探讨。但是有关 APS 对造血诱导微环境中重要细胞成分之一的骨髓巨噬细胞有何影响及其与造血调控关系的研究还未见报道。本研究采用多种实验血液学术, 研究 APS 对骨髓巨噬细胞的影响及其与造血调控的关系。

1 材料

1.1 APS: 兰州医学院血液病研究所惠赠(从甘肃岷

* 收稿日期: 2004-05-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870912)

作者简介: 李 静(1973—), 女, 重庆市人, 1996 年获儿科医学学士学位, 2001 年获组织学与胚胎学硕士学位, 现于重庆医科大学基础医学

院组胚教研室任讲师, 主要研究方向为造血调控及其机制的研究。 Tel: (023) 68485087 (O) E-mail: lijingj@21cn.com

县当归中分离提取,质量分数 85% 以上),以 RPMI-1640 培养液配制成所需质量浓度。

1.2 主要试剂:重组人粒-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF),北京北医联合生物工程公司产品;重组人白细胞介素-3(rhIL-3)、促红细胞生成素(EPO),军事医学科学院提供;鼠抗人 EPO,粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),白细胞介素-3(IL-3)、白细胞介素-6(IL-6)单克隆抗体为美国 Pharmingen 公司产品;鼠抗人 CD14、CD15、CD41 单克隆抗体,北京中山生物技术有限公司产品;EPO mRNA 原位杂交试剂盒,武汉博士德有限工程公司产品。

1.3 大鼠骨髓细胞(rat bone marrow cell, rBMC)制备:8~12 周龄 Wistar 大鼠,雌雄各半,体重 200~250 g(重庆医科大学实验动物中心提供)。断头处死,取股骨,用 RPMI-1640 培养液冲出全部骨髓细胞,过 4 号针头制成单细胞悬液,计数并调整细胞悬液浓度。

1.4 骨髓巨噬细胞条件培养液(rBMMΦ-CM)制备:按文献方法^[3]培养出骨髓巨噬细胞,待骨髓巨噬细胞生长铺满塑料培养皿底部后分组。对照组:用无血清培养基进行培养;APS 组:培养体系中加入 APS(终质量浓度为 50~200 μg/mL);LPS 组:培养体系中加入 LPS(终质量浓度为 10 μg/mL)。分组加药后置 37、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h,收集上清液。

1.5 GM-CSF 寡核苷酸探针合成与标记^[4]:上海博亚生物技术有限公司按核酸序列 5'-ATGTGGCTGCAGAGCCTGCTGC-3 在 DNA 合成仪上合成,合成后经过聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化,纯度达 99%,并在 5 端用 Digoxigenin-11-dUTP 进行末端标记。

2 方法

2.1 大鼠髓系多向性造血祖细胞(CFU-Mix)、粒单系造血祖细胞(CFU-GM)、晚期红系祖细胞(CFU-E)的体外半固体培养、集落染色鉴定与计数:按文献方法进行^[5~7]。

2.2 APS 诱导制备的 BMMΦ-CM 中所含造血生长因子(HGF)生物活性检测:在 CFU-Mix、CFU-E、CFU-GM 培养中设置:对照组,常规条件培养;未经诱导组:常见培养体系中去除外源性造血生长因子(IL-3、EPO、GM-CSF),加入体积分数为 10% 常规方法制备的 rBMMΦ-CM(CFU-GM 常规培养体系中不去除外源性造血生长因子);APS 组:常规培养的基础上分别加入体积分数为 10% 经 APS

(50~200 μg/mL)诱导制备的 rBMMΦ-CM;LPS 诱导组:加入体积分数为 10% 经 LPS(10 μg/mL)诱导制备的 rBMMΦ-CM。根据每孔种植 5×10⁴ rBMC 所生成的 CFU-Mix、CFU-E 集落数,每个皿种植 1×10⁵ rBMC 所生成的 CFU-GM 的集落数,评价 APS 体外诱导制备的 rBMMΦ-CM 中所含造血生长因子生物学活性和种类。

2.3 免疫细胞化学检测 EPO、GM-CSF、IL-3、IL-6 蛋白表达:采用 SP 免疫细胞化学法检测未经诱导组、APS(150 μg/mL, 48 h)诱导组和 LPS(10 μg/mL, 48 h)诱导组 rBMMΦ 表达 EPO、GM-CSF、IL-3、IL-6 蛋白的情况。镜下每张载片计数 300 个细胞,计算各种蛋白表达阳性率。

2.4 核酸分子原位杂交检测 EPO mRNA、GM-CSF mRNA 的表达:分组同 2.3 项用 EPO 和 GM-CSF cDNA 探针检测各组 rBMMΦ EPO mRNA、GM-CSF mRNA 的表达,同时设立不加探针和 RNA 酶处理载片的阴性对照组。每张载片计数 200 个细胞,计算阳性细胞百分率及表达强度。

2.5 统计学处理:数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经 SAS 统计软件进行直线相关回归分析、方差分析和 *t* 检验。

3 结果

3.1 APS 诱导制备的 rBMMΦ-CM 中所含 HGF 生物学活性的检测:常规方法制备的 rBMMΦ-CM 对 CFU-Mix、CFU-E、CFU-GM 的增殖分化有一定的刺激作用,经 APS 体外诱导制备的 rBMMΦ-CM 能不同程度地促进 CFU-Mix、CFU-E、CFU-GM 的增殖分化。提示 APS 能诱导 rBMMΦ-CM 生成造血生长因子样活性物质(如 IL-3、EPO、GM-CSF 等),见表 1。

表 1 APS 诱导制备的 rBMMΦ-CM 对 CFU-Mix、CFU-E、CFU-GM 增殖分化的影响($\bar{x} \pm s$, *n* = 21)

Table 1 Effect of rBMMΦ-CM induced by APS on proliferation and differentiation of CFU-Mix, CFU-E, and CFU-GM ($\bar{x} \pm s$, *n* = 21)

组别	质量浓度 <i>I</i> (μg · mL ⁻¹)	CFU-Mix 集落数 (5 × 10 ⁴ rBMC)	CFU-E 集落数 (5 × 10 ⁴ rBMC)	CFU-GM 集落数 (1 × 10 ⁵ rBMC)
对照	-	64.7 ± 5.3	135.2 ± 7.1	69.4 ± 7.8
未经诱导	-	74.1 ± 4.6	103.0 ± 8.4	72.9 ± 7.7
APS 诱导	50	86.2 ± 6.3	116.7 ± 4.2	-
	100	93.5 ± 5.6	123.7 ± 6.1	-
	150	115.7 ± 4.1**	151.4 ± 3.2**	77.2 ± 8.1**
	200	92.1 ± 2.8	121.4 ± 0.3	-
LPS 诱导	10	72.8 ± 5.7	81.2 ± 2.9	75.6 ± 5.9

与未经诱导组比较: ** *P* < 0.01

** *P* < 0.01 vs non-induced group

3.2 APS 对 rBMMΦ 表达 EPO、GM-CSF、IL-3、IL-6 蛋白的影响: APS 体外诱导 2 d 后 rBMMΦ 表达 EPO、GM-CSF、IL-3、IL-6 蛋白的阳性率明显提高, 提示 APS 能不同程度促进 rBMMΦ 表达 EPO、GM-CSF、IL-3、IL-6 蛋白, 见图 1。

3.3 APS 对 rBMMΦ 表达 EPO、GM-CSF mRNA 的影响: 原位杂交结果显示未经 APS 诱导的 rBMMΦ 的 EPO mRNA、GM-CSF mRNA 的表达水平均较低, 经过 APS 诱导后 rBMMΦ 的 EPO mRNA、GM-CSF mRNA 的阳性率及表达强度均明显提高, 见表 2。

4 讨论

巨噬细胞是骨髓造血诱导微环境 (hematopoietic inductive microenvironment, HIM) 中的重要组

表 2 APS 对 rBMMΦ 表达 EPO mRNA 和 GM-CSF mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 2 Effect of APS on expression of EPO mRNA and GM-CSF mRNA in rBMMΦ ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

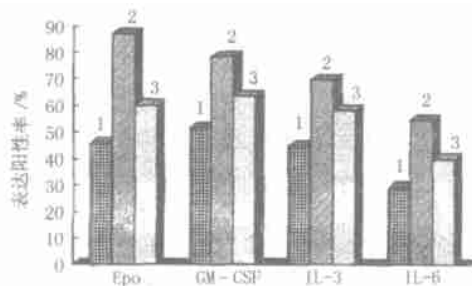
组 别	质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	EPO mRNA		GM-CSF mRNA	
		阳性率/%	阳性强度	阳性率/%	阳性强度
未经诱导	—	56.0 ± 3.5	0.34 ± 0.08	74.3 ± 5.2	0.37 ± 0.08
APS 诱导	150	75.6 ± 7.9**	0.77 ± 0.45**	84.3 ± 7.1**	0.83 ± 0.34**
LPS 诱导	10	62.5 ± 9.2	0.63 ± 0.15	79.6 ± 7.3	0.46 ± 0.06

与未经诱导组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs non-induced group

成成分, 研究发现骨髓巨噬细胞 (BMMΦ) 与造血干细胞之间存在镶嵌连接和其他连接形式^[8,9], 体内原位观察与体外培养均发现 BMMΦ 与幼红细胞或幼粒细胞共同形成幼红或幼粒细胞造血岛, 认为巨噬细胞可通过细胞间直接作用来调节血细胞发生。巨噬细胞还通过分泌多种生物活性物质等间接途径作用于造血干细胞和所有四系造血细胞^[9]。既往实验表明, 小鼠腹腔巨噬细胞培养上清液中具有 BPA、EPO 和 GM-CSF 样活性, 对红系、粒系血发生有明显调控作用^[10]。APS 是当归中“补血”或促进血细胞生成的有效成分, 其在体内外均能刺激小鼠和人的造血干/祖细胞增殖分化^[1,2]。APS 促进血细胞发生与造血微环境中的巨噬细胞有何关系尚不清楚。

骨髓造血祖细胞体外培养是研究血细胞生长、分化、增殖和成熟的重要方法^[11]。在造血祖细胞阶段膜上出现了与相应造血生长因子 (HGF) 作用的造血生长因子受体。现代造血理论认为: 造血调控因子与造血细胞膜上相应的受体结合, 启动调控信号的核内转导, 引起核内某些基因转录增强和/或其他基因转录抑制, 最终表现出蛋白质合成改变, 而细胞行为改变^[12,13]。因此, 根据造血祖细胞体外培养所形成的集落数或类型可推测待检样品中所含 HGF 的种类、生



1-未经诱导组 2-APS (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 3-LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

1-non-induced group 2-APS (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

3-LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

图 1 APS 对 rBMMΦ 表达 EPO、GM-CSF、IL-3、IL-6 蛋白的影响 ($n = 25$)

Fig. 1 Effect of APS on expression of EPO, GM-CSF, IL-3, IL-6 protein in rBMMΦ ($n = 25$)

物学活性以及量的多少。本研究结果表明, 经 APS 诱导制备的 rBMMΦ-CM 中含较高 HGF 活性, 能明显刺激 CFU-Mix、CFU-E、CFU-GM 的增殖与分化, 集落产率明显高于常规方法制备的 rBMMΦ-CM。提示, 经 APS 诱导制备的 rBMMΦ-CM 中含有 EPO、GM-CSF、IL-3、IL-6 等造血生长因子样物质, 可替代常规培养加入培养体系中的造血生长因子, 用于研究 CFU-Mix、CFU-E、CFU-GM 的增殖与分化。本研究结果提示 APS 有可能促进造血诱导微环境中的巨噬细胞分泌多种造血生长因子来调控血细胞的发生。

造血生长因子的基因表达及调控是研究血细胞发生分子生物学机制的核心内容之一。通过造血祖细胞集落形成来检测细胞培养上清液中 HGF 的活性和种类尚不能确定具体的造血生长因子, 为避免方法特异性不强的缺点, 本研究还采用抗 EPO、GM-CSF、IL-3、IL-6 的单克隆抗体对未经诱导的和 APS 诱导的 rBMMΦ 进行 SP 免疫细胞化学原位载片染色。结果表明: 未经诱导的 rBMMΦ 内 EPO、GM-CSF、IL-3、IL-6 蛋白有一定程度的表达, 但相对较弱, 经 APS 诱导后 rBMMΦ 其胞浆内的 EPO、GM-CSF、IL-3、IL-6 蛋白的表达与对照组相比有不同程度的提高, 这与检测 rBMMΦ-CM 中的 HGF

生物学活性的结果相吻合。但免疫细胞化学染色的阳性结果也难排除有可能检测的是无活性的变性分子或细胞因子裂解片段。核酸分子原位杂交不仅能检测基因表达还能直接地观察目标分子在组织和细胞内的定位、分布与半定量。本研究采用 Digoxingenin 标记的 EPO 和 GM-CSF 的寡核苷酸探针针对未经诱导和 APS 诱导的 rBMM Φ 进行了核酸分子原位杂交。结果发现, 经过 APS 诱导后, rBMM Φ 中 EPO mRNA 与 GM-CSF mRNA 表达与对照组相比明显提高。这提示 APS 调控造血的可能机制在于增强造血微环境中的巨噬细胞的 GM-CSF 和 EPO 的 mRNA 转录, 这与免疫细胞化学检测的几种造血生长因子的结果是一致的。

BMM Φ 起源于造血干/祖细胞, 又反过来调节造血干/祖细胞的增殖分化, 巨噬细胞能通过细胞间的直接接触等近距离调节方式, 也可通过分泌多种造血调节因子的远程调节方式调节血细胞发生。本研究表明 APS 可能通过直接和/或间接途径刺激 BMM Φ , 促进其合成和分泌 EPO、GM-CSF、IL-3, 进而促进各系造血祖细胞的增殖与分化, 这可能是当归“补血活血”和调节免疫功能的细胞与分子生物学机制之一。

References:

[1] Wang Y P, Zhu B D. The effect of angelica polysaccharide on proliferation and differentiation of hematopoietic progenitor [J]. *Natl Med J China* (中华医学杂志), 1996, 76(5): 363-366.

[2] Zheng M, Wang Y P. Study on biological mechanism of angelica polysaccharide regulation on human early multipotential progenitor cell [J]. *Chin J Anat* (解剖学杂志), 2002, 25(2): 105-108.

[3] Li J, Wang Y P. Methodology of separation, purification, cultivation and identification of rat bone marrow macrophage [J]. *Acta Univ Sci Med Chongqing* (重庆医科大学学报), 2003, 28(3): 304-308.

[4] Sun W M. *The Methodology of Research Cytokines* (细胞因子研究方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1999.

[5] Li J Z, Wang H L, Han Z C. *The Hematology Experiment* (血液实验学) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1997.

[6] Wang Y P, Zhu B D. The effect of angelica polysaccharide on proliferation and differentiation of CFU-CM [J]. *Chin J Anat* (解剖学杂志), 1993, 16(2): 125-129.

[7] Liu X Z. *The Experimental Manual of Hematopoietic Progenitor Cell Culture* (造血祖细胞培养技术实验手册) [M]. Beijing: Beijing Publishing House, 1993.

[8] Lamberts R M. Interdigitate coupling of presumptive hematopoietic stem cell to macrophage [J]. *Blood*, 1984, 63(5): 1225-1228.

[9] Wang Y P, Wang Y, Wang S P, et al. Study on the relationship between macrophage and hematopoiesis regulation [J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 1997, 13(1): 15-18.

[10] Guo R Q, Zhu B D. The effect of conditioned culture media of celiac macrophage on hematopoiesis of mouse [J]. *Acta Anat Sin* (解剖学报), 1992, 23(3): 300-305.

[11] Wang Y, Zhu B D. The experimental research and clinic significance of hematopoietic progenitor cell culture [J]. *Foreign Med Sci—Transfu and Hematol* (国外医学·输血与血液学分册), 1994, 17(2): 89-92.

[12] Tang P X. Some new ideas about hematopoietic stem/progenitor cells [J]. *J Exp Hematol* (实验血液学杂志), 1996, 4(3): 225-227.

[13] Gordon M Y. Hematopoietic growth factor and receptor [J]. *Cancer Cell*, 1991, 3(4): 127-132.

人参炔醇对大鼠原代培养的神经细胞过氧化氢损伤的影响

王泽剑¹, 陈红专¹, 薛庆生², 陆 阳^{1*}

(1. 上海第二医科大学药物研究所, 上海 200025; 2. 上海第二医科大学瑞金医院 麻醉科, 上海 200025)

摘 要: 目的 探讨人参炔醇对原代神经细胞氧化应激的保护作用。方法 通过 MTT 法、流式细胞术观察人参炔醇对神经细胞氧化应激的影响; 并观察人参炔醇体外对自由基的清除作用及对细胞内超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性与丙二醛(MDA)含量的影响。结果 2~16 $\mu\text{mol/L}$ 人参炔醇对 H_2O_2 损伤神经细胞有一定的保护作用, 可剂量依赖性地促进细胞存活, 8 $\mu\text{mol/L}$ 人参炔醇可显著减少细胞的坏死率及凋亡率 ($P < 0.01$)。30~100 $\mu\text{mol/L}$ 人参炔醇对自由基有一定的清除作用, 2~8 $\mu\text{mol/L}$ 人参炔醇还可显著提高 H_2O_2 损伤细胞内 SOD、GSH-Px 活性并抑制 MDA 的生成 ($P < 0.01$)。结论 人参炔醇具有保护神经细胞对抗氧化应激的活性, 该活性与细胞内 SOD 活性增高有关。

关键词: 人参炔醇; 皮层神经细胞; 过氧化氢; 抗氧化酶

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2005)01-0072-04

* 收稿日期: 2004-05-04
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371731); 上海第二医科大学-上海交通大学联合科研基金资助项目(2003HZJJ002); 上海市教委学科建设专项基金部分资助(JY2001)
作者简介: 王泽剑(1972—), 男, 河南郑州人, 博士, 从事中药药理研究, 现在上海交通大学药学院工作。
* 通讯作者 Tel: (021) 63846590-776466 E-mail: huaxue@shsmu.edu.cn