

制首乌总多糖对贫血小鼠造血祖细胞增殖的影响

冯雪梅¹, 吕艳², 祝彼得¹, 刘啸¹

(1. 成都中医药大学基础医学院, 四川 成都 610075; 2. 四川大学华西基础与法医学院, 四川 成都 610041)

摘要:目的 观察制首乌总多糖(PPS)对化疗所致骨髓抑制贫血小鼠造血祖细胞增殖的影响。方法 建立骨髓抑制贫血小鼠模型,采用造血祖细胞培养技术,观察 PPS 体内 ip 给药和细胞培养直接用药对造血祖细胞增殖和骨髓有核细胞(BMC)数目的影响。结果 体内用药能显著增加 BMC 数目,提高 BFU-E、CFU-E 和 CFU-Meg 集落数产率($P < 0.01$),能增加 CFU-GM 集落数产率($P < 0.05$);在一定浓度下,体外直接用药,能增加 CFU-Meg 集落数产率($P < 0.01$)。结论 PPS 能通过间接作用促进红系和粒系祖细胞的增殖,能通过间接和直接作用刺激巨核系祖细胞的增殖。

关键词:制首乌总多糖;骨髓抑制;贫血小鼠;造血祖细胞增殖

中图分类号:R286.1 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2006)11-1695-03

Effect of *Polignum multiflorum* polysaccharide on proliferation of hematopoietic progenitors in anemic mice

FENG Xue-mei¹, LÜ Yan², ZHU Bi-de¹, LIU Xiao¹

(1. School of Basic Medical Sciences, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China;

2. School of Basic and Forensic Medical Sciences, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Key words: *Polignum multiflorum* Thunb. polysaccharide; myelosuppression; anemic mice; proliferation of hematopoietic progenitors

何首乌为蓼科多年生草本植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的块根,经加工炮制为黑色,称制首乌。制首乌具有补肝肾、益精血的作用。既往对制首乌的研究多集中在抗衰老方面,对其补血作用的研究少有报道。本实验提取制首乌总多糖(*Polygonum multiflorum* Thunb. polysaccharide, PPS),采用造血祖细胞培养技术,通过体内 ip 给药和体外培养细胞直接用药,观察 PPS 对骨髓抑制贫血小鼠骨髓有核细胞(BMC)和造血祖细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂:2-巯基乙醇、L-谷氨酰胺(Sigma 公司),TRIZOL、马血清、IMDM 培养基(Gibco 公司)、mGM-CSF(Roche 公司),rhEPO(成都地奥公司),mTPO(R&D 公司),琼脂粉(Agar,日本进口分装),环磷酰胺、氟霉素(上海第十二制药厂)。

1.2 体内用药

1.2.1 PPS 注射液:制首乌经成都中医药大学中药鉴定教研室鉴定后,参照文献方法^[1]提取总多糖

成分,真空干燥,经成都中医药大学基础化学与中药化学教研室测定其含制首乌总多糖 64.4%。经除菌处理,用生理盐水配置成 2.5 mg/mL 注射液,用于体内 ip 给药。

1.2.2 实验设计与分组:将 BALB/C 纯系小鼠,雄性,体重(20±2)g,8~12 周龄(由华西医科大学实验动物中心提供)24 只,随机分成 3 组,分别为正常组、贫血组、PPS 组,每组 8 只。贫血组和 PPS 组小鼠经 ⁶⁰Co-γ 2.0 Gy 全身照射后,于照射的第 4 天开始 ip 环磷酰胺(40 mg/kg)及氟霉素(50 mg/kg),每日 1 次,连续注射 3 d 后造模完成,形成贫血小鼠模型。于造模完成后第 1 天,贫血组 ip 生理盐水 0.2 mL,PPS 组 ip PPS 25 mg/kg(用药剂量参照文献方法^[2]),并选择 12.5、25、50 mg/kg 剂量组进行预试验后确定,每日 1 次,连续 6 d,于造模完成第 7 天,颈椎脱臼处死所有小鼠,无菌条件下取出股骨,用生理盐水冲出骨髓细胞并反复吹打,过 4 号针头制成单细胞悬液,分别计数骨髓有核细胞(BMC)数目,做三系造血祖细胞培养,观察体内用

收稿日期:2006-03-07

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271661)

作者简介:冯雪梅(1964—),女,四川省成都市人,成都中医药大学基础医学院生物化学教研室副教授,在职博士,主要从事中西医结合基础研究。Tel:(028)88046486 E-mail:fxmcd@yahoo.com.cn

药对 BMC 数目和骨髓造血祖细胞增殖的影响。

1.3 体外用药

1.3.1 PPS 工作液: 将按上述方法提取的 PPS 用 IMDM 培养基配制成 1 mg/mL 工作液, 滤菌处理, 用于体外直接用药细胞培养。

1.3.2 实验设计与分组: 将 BALB/C 纯系小鼠 10 只, 按上述方法造模, 造模完成后颈椎脱臼处死所有贫血小鼠, 制备骨髓单细胞悬液, 混合所有单细胞悬液, 做三系造血祖细胞培养, 分别设贫血对照组及 4 个给药组, 给药组加入 PPS, 终质量浓度分别为 25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$, 观察体外直接用药对骨髓抑制贫血小鼠造血祖细胞增殖的影响。

1.4 造血祖细胞培养: 培养体系参照文献方法^[3]进行改良。粒单系祖细胞培养体系: 1×10^{-4} mol/mL 2-巯基乙醇 0.2 mL, 3% L-谷氨酰胺 0.03 mL, 马血清 0.5 mL, 50 ng/mL mGM-CSF 0.3 mL, BMC $1 \times 10^5/\text{mL}$, IMDM 培养基补足体积至 1.8 mL, 3% Agar 0.2 mL, 混匀。红系祖细胞培养体系: 1×10^{-4} mol/mL 2-巯基乙醇 0.2 mL, 3% L-谷氨酰胺 0.03 mL, 马血清 0.5 mL, 20 U/mL rhEPO 0.1 mL, 20 ng/mL IL-3 0.1 mL, BMC $1 \times 10^5/\text{mL}$, IMDM 培养基补足体积至 1.8 mL, 3% Agar 0.2 mL, 混匀。巨核系祖细胞培养体系: 1×10^{-4} mol/mL 2-巯基乙醇 0.2 mL, 3% L-谷氨酰胺 0.03 mL, 马血清 0.8 mL, 20 U/mL rhEPO 0.1 mL, 20 ng/mL IL-3 0.1

mL, 2.5 ng/mL mTPO 0.2 mL, BMC $1 \times 10^5/\text{mL}$, IMDM 培养基补足体积至 1.8 mL, 3% Agar 0.2 mL, 混匀。各培养体系总体积为 2 mL, 于 24 孔板中培养, 每孔 1 mL, 平行做两孔。参照文献方法^[3]于培养第 3 天于倒置显微镜下计数 CFU-E 细胞集落数, 培养第 7 天分别计数 BFU-E、CFU-GM、CFU-Meg (含 3 个以上的细胞团为一个 CFU-Meg 集落) 细胞集落数, 取两孔的平均值。

1.5 统计学分析: 实验数据用 SPSS 11.5 软件包进行统计学分析, 组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 体内用药: 表 1 显示, 贫血组与正常组比较, BMC 和 CFU-E、BFU-E、CFU-GM、CFU-Meg 集落数均明显降低 ($P < 0.01$); PPS 组与贫血组比较均显著增加, 其中 BMC、CFU-E、BFU-E 和 CFU-Meg 集落数, 差异非常显著 ($P < 0.01$), CFU-GM 集落数差异显著 ($P < 0.05$)。表明造模后, 小鼠骨髓 BMC 数和造血祖细胞的增殖能力均明显降低。用药后可使 BMC 数明显增加, 造血祖细胞的增殖能力有所恢复。

2.2 体外用药: 表 2 显示, 各给药组与贫血对照组比较, CFU-E、BFU-E、CFU-GM 集落产率均无明显变化 ($P > 0.05$), 说明 PPS 无直接刺激作用, CFU-Meg 集落产率在 PPS 25 $\mu\text{g/mL}$ 时未表现出明显的刺激作用, 但是随着 PPS 质量浓度的增加,

表 1 PPS 体内给药对贫血小鼠 BMC 数目和造血祖细胞集落数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effect of PPS on numbers of BMC and colony forming unit of hematopoietic progenitors in anemic mice *in vivo* ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	造血祖细胞集落数				BMC/ ($\times 10^6$)
		CFU-GM	CFU-E	BFU-E	CFU-Meg	
正常	—	78.33 ± 17.74	103.50 ± 22.55	48.83 ± 10.57	34.00 ± 8.74	10.21 ± 1.19
贫血	—	18.33 ± 6.80**	46.33 ± 9.97**	19.33 ± 3.01**	15.83 ± 2.56**	6.18 ± 0.91**
PPS	25	31.50 ± 8.38 Δ	74.67 ± 15.47 $\Delta\Delta$	29.17 ± 7.00 $\Delta\Delta$	30.67 ± 7.34 $\Delta\Delta$	8.63 ± 0.98 $\Delta\Delta$

与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与贫血组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs normal group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs anemic group

表 2 PPS 体外直接用药对贫血小鼠造血祖细胞集落数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of PPS on numbers of colony forming unit of hematopoietic progenitors of anemic mice *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	造血祖细胞集落数			
		CFU-GM	BFU-E	CFU-E	CFU-Meg
贫血	—	14.33 ± 5.20	18.17 ± 4.40	43.67 ± 9.37	16.00 ± 6.02
PPS	25	14.33 ± 3.14	19.67 ± 6.95	47.67 ± 8.48	16.67 ± 5.57
	50	18.33 ± 7.74	20.33 ± 8.99	39.67 ± 9.31	36.17 ± 10.46**
	100	16.67 ± 6.89	15.83 ± 6.01	40.50 ± 8.12	39.00 ± 10.71**
	200	20.50 ± 5.54	13.00 ± 4.38	36.50 ± 11.38	42.50 ± 11.86**

与贫血组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs anemic group

50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组均表现出明显的刺激作用 ($P < 0.01$), 且有剂量依赖性。

3 讨论

制首乌具有补肝肾、益精血的作用。据《本草纲目》记载, 该药有“养血益肝, 固精益肾, 健筋骨, 乌髭发, 为滋补良药。不寒不燥, 功在地黄、天门冬诸药之上”。周志文等发现, 何首乌提取物(水煎醇沉粗提物)能增加 CFU-S、BFU-E、CFU-E 和 CFU-GM 集落产率^[2]。表明何首乌有促进造血作用, 但是对于巨核系祖细胞的影响及对骨髓抑制贫血小鼠造血恢复的作用却未见报道。

本研究结果显示, PPS 体内用药后能明显增加骨髓抑制贫血小鼠 BMC 数, 促进骨髓抑制贫血小鼠红系、巨核系、粒系造血祖细胞的增殖; 体外用药后对红系和粒系祖细胞的增殖均无明显的直接刺激

作用, 但对巨核系祖细胞的增殖仍表现出刺激作用。提示 PPS 的对红系和粒系祖细胞的增殖似乎是一种间接作用, 而对巨核系则表现出直接/间接的刺激作用。目前还不能解释 PPS 对巨核系祖细胞增殖的直接刺激作用机制, 其间接作用可能与刺激造血生长因子分泌, 促进生长因子受体、转录因子、抗凋亡蛋白等的表达有关, 有待进一步的研究。

References:

- [1] Shang P, Yang T H, Jia M, et al. Purification and analysis of polysaccharides of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels [J]. *J Fourth Mil Med Univ* (第四军医大学学报), 2001, 22(14): 1311-1314.
- [2] Zhou Z W, Zhou J H, Xing S T. Effects of *Polygonum multiflorum* extract on murine hematopoietic functions [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 1991, 7(5): 19-21.
- [3] Liu X Z. *Experimental Handbook of Technologies on Cell Culture of Hematopoietic Progenitors* (造血祖细胞培养技术实验手册) [M]. Beijing: Beijing Publishing House, 1993.

脑舒宁胶囊对培养皮层神经细胞自由基损伤的保护作用及其机制研究

彭伟

(山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250011)

缺血性中风是临床常见的疑难病, 其发病率、病残率居高不下, 对人类健康危害极大, 因此, 对脑缺血神经元损伤机制进行研究并寻找有效的药物进行治疗具有重要意义。本实验采用血清药理学方法, 通过离体神经细胞培养, 制备自由基损伤模型, 以神经细胞存活率, 丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 水平测定和细胞凋亡率检测探讨脑舒宁胶囊对神经细胞损伤的保护作用及其机制。为临床防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂: MTT 购自美国 Sigma 公司, DMSO 购自北京化学试剂三厂, MDA、SOD 试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 原位凋亡检测试剂盒购自北京医科大学病理系。

1.2 神经细胞培养: 无菌条件下分离新生大鼠 (出生 0~1 d) 大脑皮层, 置于预冷的 D-Hank's 液中, 仔细剔除软脑膜及血管, 0.25% 胰酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 30 min, 终止消化, 1 000 r/min 离心 10 min, 沉淀用接种液悬浮, 机械吹打制成单细胞悬液, 调细胞计数约

为 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 接种到经 0.1% 多聚赖氨酸过夜处理的 12 孔培养板和培养瓶中。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中培养。24 h 后全量换液 1 次以去除死细胞, 以后每 3 天换液 1 次, 第 5 天加阿糖胞苷以抑制非神经细胞的增殖。接种液成分: 85% DMEM/ F_{12} 、15% 小牛血清、100 U/mL 青霉素, 100 U/mL 链霉素。维持液为含 10% 小牛血清的 DMEM/ F_{12} 培养液。

1.3 神经细胞自由基损伤模型的建立

1.3.1 O_2^- 损伤模型: 生物体内自由基生成途径之一是酶促催化产生自由基, 黄嘌呤氧化酶催化产生自由基通常称为 X (黄嘌呤)/XO (黄嘌呤氧化酶) 模式。参照文献方法^[1], 采用 X/XO 体系, 将培养细胞用 D-Hank's 液洗 2 次, 加入含有 0.08 U/mL 黄嘌呤氧化酶和 1 mmol/L 黄嘌呤的无血清培养液作用 1 h, 然后吸除培养液, 加入无血清的 DMEM 培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中继续培养。

1.3.2 H_2O_2 损伤模型: 取培养 8 d 的神经细胞, 吸除原培养液, D-Hank's 液洗 2 次, 加入终浓度为 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_2O_2 作用 1 h, 换以无血清的 DMEM

收稿日期: 2006-02-21

作者简介: 彭伟 (1970—), 女, 山东济南人, 副主任医师, 副教授, 硕士, 主要研究方向为中西医结合治疗神经内科系统疾病。

Tel: (0531) 82613190 E-mail: pengwei0625@163.com