

- [7] Castellano C, Pavone F. Effects of ethanol on passive avoidance behavior in the mouse; involvement of GABAergic mechanism [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1988, 29(2): 321-324.
- [8] Wang G S, Chen Z Q, Fu W Z, *et al.* The nervous mechanism of the effect of ethanol on the ability of learning and memory in rats [J]. *Acta Acad Med Jiangxi* (江西医学院学报), 2001, 41(2): 75-78.
- [9] Xu D Y, Li J Y, Yin B Z, *et al.* Research for the formative condition of ferrihemoglobin induced by sodium nitrite *in vitro* [J]. *J Environ Health* (环境与健康杂志), 1999, 16(5): 269-271.

当归多糖对小鼠外周血造血干细胞动员作用的研究

胡 晶, 吴 宏

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

重庆医科大学基础医学研究所, 重庆 400016)

摘要:目的 探讨当归多糖 (APS) 对小鼠外周血造血干细胞的动员作用。方法 采用外周血白细胞 (WBC) 计数、淋巴细胞 (LC) 计数、免疫细胞化学、流式细胞术、造血祖细胞体外培养等实验技术观察 APS 的动员作用。结果 APS 动员后小鼠外周血的 WBC、LC 数明显高于生理盐水 (NS) 组 ($P < 0.05$); APS 动员后外周血中 CD34⁺ 细胞百分率明显高于 NS 组 ($P < 0.05$); APS 组 CFU-Mix 产率显著高于 NS 组 ($P < 0.01$); 并且 APS 和重组人粒细胞集落刺激因子 (rhG-CSF) 联合动员后的各项指标均高于单用 APS 或单用 rhG-CSF 组。结论 APS 对小鼠外周血造血干细胞有一定的动员作用, 并且 APS 和 rhG-CSF 联合动员的效果好于单用 APS 或单用 rhG-CSF 的动员效果。

关键词:当归多糖 (APS); 外周血造血干细胞; 动员

中图分类号:R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2006)12-1835-04

Mobilization of angelica polysaccharides on peripheral blood hematopoietic stem cell in mice

HU Jing, WU Hong

(Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Science, Key Laboratory of Chongqing

Biochemistry and Molecular Pharmacology, Institute of Basic Medical Sciences, Chongqing

Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study angelica polysaccharides (APS) for mobilizing peripheral blood hematopoietic stem cell in BALB/c mice. **Methods** Techniques of peripheral white blood cell (WBC) and lymphocyte (LC) count, immunocytochemistry, flow cytometry, and hematopoietic cell culture *in vitro* were used to observe the APS mobilization. **Results** The numbers of WBC and LC in APS group were markedly higher than that in NS group ($P < 0.05$); the percentage of CD34⁺ cells in peripheral blood in APS group was markedly higher than that in NS group ($P < 0.05$); the yields of CFU-Mix in APS group was significantly more than that in NS group ($P < 0.01$); the combined usage of APS and rhG-CSF enhanced more effects ($P < 0.05$) than that in either single use of APS or rhG-CSF group. **Conclusion** The results indicate that APS could mobilize haematopoietic stem cells into peripheral blood and the effect of APS in combination with rhG-CSF could be better than single use of APS or rhG-CSF.

Key words: angelica polysaccharides (APS); peripheral blood hematopoietic stem cell; mobilization

正常情况下外周血中的造血干细胞 (PBHSC) 数量很少, 因此需要进行动员才能获取足够数量的 PBHSC 以保证移植成功。当归为中医补血、活血的要药, 当归多糖 (angelica polysaccharides, APS) 是其主要有效成分之一。既往研究表明 APS 对正常

或贫血小鼠的髓系造血祖细胞 (BFU-E、CFU-E、CFU-GM 和 CFU-MK) 的增殖、分化有显著的促进作用^[1]。本研究以 BALB/c 小鼠为实验动物模型, 研究 APS 对小鼠 PBHSC 的动员作用, 旨在从祖国医学宝库中寻找简便、安全、高效的造血干细胞

收稿日期: 2006-03-08

基金项目: 重庆市科委资助课题 [渝科计发字 (2001) 54 号]

作者简介: 胡 晶 (1979—), 女, 重庆市人, 助教, 硕士, 主要研究方向为造血干细胞生物学。

Tel: (023) 66313858 E-mail: hujing_805@hotmail.com

动员剂,为当归的临床用药和开发提供理论指导和实验依据。

1 材料

1.1 实验动物:8~12 周龄 BALB/c 小鼠,雌、雄各半,体重 18~22 g,重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 药品与试剂:APS,重庆医科大学化学教研室分离、提取、纯化(质量分数>85%)。重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF):日本麒麟株式会社产品。RPMI-1640 培养基、马血清,HyClone 公司产品。GM-CSF, Cytolab 公司产品。白细胞介素-3(IL-3)军事医学科学院基础研究所提供。EPO,美国 Amgen 公司产品。*L*-谷氨酰胺、甲基纤维素,美国 Sigma 公司产品。大鼠抗小鼠 CD34 抗体、FITC 标记的大鼠抗小鼠 CD34 抗体,英国 Serotec 公司产品。SABC 免疫组化染色试剂盒,武汉博士德生物工程技术有限公司产品。DAB 显色试剂盒,北京中山生物技术有限公司产品。FITC 标记的大鼠 IgG2a (阴性对照),eBioscience 公司产品。

2 方法

2.1 APS 给药剂量及采血时间的筛选:应用统计学正交试验设计,选用正交表 $L_{25}(5^6)$,将 25 只雄性 BALB/c 小鼠随机分为 5 组,每组 5 只,分别 ip 生理盐水(NS,每次 0.2 mL)和不同剂量 APS (2、4、8、16 mg/kg),每天 1 次,连给 6 d;分别于第 7、8、9、10、11 天采集各组小鼠外周血,计数白细胞(WBC)、淋巴细胞(LC)数。对正交试验结果进行统计学分析,找出 APS 最佳给药剂量和采血时间。

2.2 实验动物分组与给药方法:BALB/c 小鼠随机分为 4 组(每组 16 只):NS 组、APS (4 mg/kg) 组、rhG-CSF (10 μ g/kg) 组、rhG-CSF (10 μ g/kg)+ APS (4 mg/kg) 组;NS、APS ip 给药,每次 0.2 mL,每天 1 次,连给 6 d, rhG-CSF sc 给药,每次 0.2 mL,每天 1 次,连给 5 d,第 8 天采外周血。

2.3 外周血 WBC、LC 计数:给药后第 8 天取小鼠尾静脉血,用常规方法进行 WBC 和 LC 计数。

2.4 外周血单个核细胞(MNC)的分离:给药后第 8 天摘小鼠眼球取外周血,肝素抗凝,采用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心获取 MNC,用 PBS 洗涤 2 次,制成 MNC 悬液。

2.5 CD34⁺细胞免疫细胞化学染色:将 MNC 悬液滴在 APES 包被的玻片上,免疫细胞化学法染色后油镜下观察,细胞膜表面有棕黄色标记物的细胞为 CD34⁺细胞。

2.6 流式细胞术检测外周血 CD34⁺细胞百分率:

将每一例 MNC 悬液分两管,一管加 FITC 标记的大鼠 IgG2a (设为对照),另一管加 FITC 标记的 CD34 抗体,用流式细胞仪定量检测 CD34⁺细胞百分率。

2.7 外周血 CFU-Mix 集落培养、染色鉴定与计数:参照文献方法^[2~4]略有改进。依次加入 2-巯基乙醇 (1×10^{-4} mol/L)、3% *L*-谷氨酰胺、马血清、EPO、IL-3、GM-CSF、 2×10^6 个 MNC、2.7% 甲基纤维素,总体积 2 mL,充分混匀后,接种于 96 孔板,每孔 0.2 mL,置 5% CO₂、37 °C 的培养箱中培养 6 d 后,于倒置显微镜下计数集落数,并染色鉴定。

2.8 统计学方法:所获数据经 SAS8.1 统计软件进行正交设计分析、方差分析和 *t* 检验。

3 结果

3.1 APS 给药剂量及采血时间的筛选:对正交试验结果进行方差分析:总的 $P=0.0068$,有统计学意义;NS 组与不同剂量 APS 组之间比较, $P=0.037$;不同采血时间之间比较, $P=0.0073$,均有统计学意义。对各水平具体分析发现:不同剂量 APS 给药后,小鼠外周血 WBC、LC 数量均有不同程度的增高,APS (4 mg/kg) 组最高,与 NS 组比较差异有显著性 ($P<0.05$),其余 APS 组与 NS 组比较差异无显著性 ($P>0.05$),结果见表 1 (数据为每个剂量组在给药后不同时间点测得数据的均值)。APS 给药后第 8 天小鼠外周血 WBC、LC 数量升至最高,与第 9、10、11 天比较差异有显著性 ($P<0.05$),与第 7 天比较差异无显著性 ($P>0.05$),结果见表 2 (数据为每个时间点各剂量组测得数据的均值)。所以选择 APS 的给药剂量为 4 mg/kg,采血时间为给药后第 8 天。

3.2 APS 对小鼠外周血 WBC、LC 数量的影响:APS 作用后小鼠外周血 WBC、LC 数明显高于 NS 组 ($P<0.05$);rhG-CSF+APS 联合作用后小鼠外周血 WBC 和 LC 数量的影响

($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Effect of APS at different doses on numbers of WBC and LC in peripheral blood of mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	WBC/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	LC/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)
NS	—	6.22±1.23	3.32±0.77
APS	2	8.58±3.03	6.00±2.54
	4	12.40±6.64*	9.59±6.39*
	8	9.50±4.12	7.42±3.69
	16	7.90±3.81	6.01±3.33

与 NS 组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs NS group

表 2 给药后不同时间小鼠外周血 WBC 和 LC 的数量 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Numbers of WBC and LC in peripheral blood of mice in different days after ip administration ($\bar{x} \pm s, n=5$)

时 间	WBC/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	LC/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)
第 7 天	10.36 \pm 2.92	8.08 \pm 2.59
第 8 天	13.42 \pm 6.90*	10.71 \pm 6.66*
第 9 天	7.70 \pm 1.99	5.22 \pm 1.72
第 10 天	7.50 \pm 1.35	4.17 \pm 1.27
第 11 天	5.62 \pm 2.10	4.16 \pm 1.51

与第 9、10、11 天比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs day 9, day 10, and day 11

周血的 WBC、LC 数高于单用 APS 组 ($P < 0.05$) 或单用 rhG-CSF 组 ($P < 0.05$); APS 组与 rhG-CSF 组比较差异无显著性 ($P > 0.05$), 见表 3。

3.3 APS 对小鼠外周血中 CD34 阳性细胞的影响: 免疫细胞化学法对细胞表面 CD34⁺ 抗原检测发现: APS 组 CD34 阳性细胞的数量明显比 NS 组多; 计数 200 个细胞中阳性细胞的数量, 计算百分率, 进行比较, 见表 4。

表 3 APS 对小鼠外周血 WBC 和 LC 数量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of APS on numbers of WBC and LC in peripheral blood of mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组 别	剂量/($mg \cdot kg^{-1}$)	WBC/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	LC/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)
NS	—	6.07 \pm 0.88 Δ	3.56 \pm 0.69 Δ
APS	4	12.50 \pm 0.90* Δ	10.46 \pm 0.75* Δ
rhG-CSF	0.010	13.18 \pm 0.63* Δ	11.08 \pm 0.79* Δ
rhG-CSF+APS	0.010+4	15.10 \pm 0.88*	12.32 \pm 0.81*

与 NS 组比较: * $P < 0.05$

与 rhG-CSF+APS 组比较: $\Delta P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs NS group; $\Delta P < 0.05$ vs rhG-CSF+APS group

表 4 小鼠外周血 MNC 中 CD34⁺ 细胞百分率 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 4 CD34⁺ Cell percentage in peripheral blood MNC of mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组 别	剂量/($mg \cdot kg^{-1}$)	CD34 ⁺ 阳性细胞率/%
NS	—	0.018 \pm 0.008
APS	4	0.144 \pm 0.012***

与 NS 组比较: *** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs NS group

3.4 APS 对小鼠外周血 CD34⁺ 细胞百分率的影响: 流式细胞术检测表明 APS 组小鼠外周血 CD34⁺ 细胞百分率明显高于 NS 组 ($P < 0.05$); rhG-CSF+APS 联合动员组 CD34⁺ 细胞百分率高于单用 APS 组或单用 rhG-CSF 组 ($P < 0.05$); APS 组与 rhG-CSF 组比较差异无显著性 ($P >$

0.05), 见表 5。

3.5 APS 对小鼠外周血 CFU-Mix 集落产率的影响: CFU-Mix 集落培养显示 APS 组 CFU-Mix 产率显著高于 NS 组 ($P < 0.01$); rhG-CSF+APS 联合动员后 CFU-Mix 产率高于单用 APS 组或单用 rhG-CSF 组 ($P < 0.01$), 见表 6。

表 5 APS 对小鼠外周血 MNC 中 CD34⁺ 细胞百分率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 5 Effect of APS on CD34⁺ cell percentage in peripheral blood MNC of mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组 别	剂量/($mg \cdot kg^{-1}$)	CD34 ⁺ 细胞/%
NS	—	0.27 \pm 0.06 Δ
APS	4	1.39 \pm 0.12* Δ
rhG-CSF	0.010	1.62 \pm 0.66* Δ
rhG-CSF+APS	0.010+4	3.21 \pm 0.12* Δ

与 NS 组比较: * $P < 0.05$

与 rhG-CSF+APS 组比较: $\Delta P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs NS group; $\Delta P < 0.05$ vs rhG-CSF+APS group

表 6 APS 对小鼠外周血 CFU-Mix 集落产率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 6 Effect of APS on yields of CFU-Mix in peripheral blood of mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组 别	剂量/($mg \cdot kg^{-1}$)	CFU-Mix (2×10^5 MNC)
NS	—	11.9 \pm 5.4 $\Delta\Delta$
APS	4	27.5 \pm 7.1** $\Delta\Delta$
rhG-CSF	0.010	37.2 \pm 13.2** $\Delta\Delta$
rhG-CSF+APS	0.010+4	56.4 \pm 18.4**

与 NS 组比较: ** $P < 0.01$

与 rhG-CSF+APS 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs NS group;

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs rhG-CSF+APS group

4 讨论

造血干细胞移植是目前治疗部分白血病和部分实体瘤的有效方法, 外周血干细胞移植 (PBST) 是因其具有采集安全方便、供者无痛苦、造血及免疫功能恢复快、受肿瘤细胞浸润或污染的机会较少、潜在的抗残留病优势等优点, 正被临床广泛接受, 已有替代骨髓移植的趋势^[5]。正常情况下 PBHSC 的数量很少, 如小鼠 PBHSC 数仅为骨髓的 1/50 ~ 1/100, CD34⁺ 造血干细胞仅为外周血 MNC 的 0.01% ~ 0.10%, 远远不能满足造血干细胞移植时所需的数量^[6], 因此需要进行动员才能获取足够数量的 PBHSC 以保证移植成功。rhG-CSF 作为动员剂已广泛用于临床, 动员效果明显, 但其体内注射存在许多不足之处: 如所需剂量大、费用高; 需定时监测 PBHSC 的数量; 转基因移植时, 大剂量 rhG-CSF 注射可引起剧烈骨骼疼痛, 健康供者不愿接受。所以

寻找新的 PBHSC 动员剂成为造血干细胞移植领域的热点问题之一。

既往研究发现:APS 可能是通过促进造血微环境中的基质细胞表达和分泌 G-CSF、IL-3 等造血生长因子,促进早期造血细胞的发生^[7];同时 APS 能上调造血微环境中的内皮细胞分泌造血生长因子来调节血细胞的生成^[8]。但目前尚未见 APS 对外周血造血干细胞动员的研究报道。

造血干细胞 (hematopoietic stem cell, HSC) 没有明确的形态学特征,与小淋巴细胞相似^[9],用常规形态学技术无法区分,但是如果外周血中的 HSC 数量增加,那么外周血中的 WBC、LC 也会相应地增加。本实验表明,给小鼠体内注射 APS 后外周血 WBC、LC 数与对照组相比明显增加,推测 APS 可能使外周血中的 HSC 数量增加。

CD34⁺ 抗原是造血干细胞分离纯化的主要标志,选择性地表达于早期造血干/祖细胞 (HS/PC) 表面^[10]。本研究采用免疫细胞化学法检测发现:APS 动员后小鼠外周血 CD34⁺ 细胞阳性率明显高于 NS 组,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。流式细胞术能更加精确地检测出外周血 MNC 中 CD34⁺ 细胞百分率,结果表明 APS 动员后小鼠外周血中 CD34⁺ 细胞百分率明显高于 NS 组;rhG-CSF + APS 联合动员后小鼠外周血中 CD34⁺ 细胞百分率高于单用 APS 组或单用 rhG-CSF 组,提示 APS 动员后分离的外周血 MNC 悬液中含有较多的 HS/PC。

CFU-Mix 集落的数量可直接或间接反映细胞群中早期 HS/PC 的数量及其活性,本研究采用外周血 CFU-Mix 集落培养计数,检测外周血中的 HS/PC,实验结果表明,APS 动员后 CFU-Mix 产率显著高于 NS 组;rhG-CSF + APS 联合动员后 CFU-Mix 产率高于单用 APS 组或单用 rhG-CSF 组,进一步证明了 APS 对小鼠外周血 HS/PC 的动员作用。

本实验结果证明:APS 能够动员 HS/PC 从骨

髓向外周血迁移,并且当与 rhG-CSF 联合使用时,动员 HS/PC 的作用更加明显。APS 具体的动员机制目前尚未明确,是否与 G-CSF 一样因改变造血干细胞表面黏附分子的表达而利于干细胞迁移入血^[1],尚有待进一步研究,同时动员的干细胞移植后能否有效地重建造血,亦需要实验室和临床进一步的实验证明。

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] 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.
- [3] Liu X Z. *The Experimental Manual of Hematopoietic Progenitor Cell Culture* (造血相细胞培养技术实验手册) [M]. Beijing: Beijing Publishing House, 1993.
- [4] 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.
- [5] Da W M, Pei X T. *Peripheral Blood Stem Cell Transplant* (外周血干细胞移植) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000.
- [6] Bellucci R, De Propriis M S, Buccisano F, et al. Modulation of VLA-4 and L-selectin expression on normal CD34⁺ cells during mobilization with G-CSF [J]. *Bone Marrow Transplant*, 1999, 23(1): 1-8.
- [7] 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.
- [8] Wu H, Jiang R, Zheng M, et al. Experimental study on effect of ginseng polysaccharide and angelica polysaccharide in inducing hematopoietic growth factors in human endothelial cells [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2002, 22(9): 687-690.
- [9] Bunting K D. ABC Transporters as phenotypic makers and functional regulators of stem cells [J]. *Stem Cells*, 2002, 20(1): 11-20.
- [10] Krause D S, Fackler M J. CD34: structure, biology, and clinical utility [J]. *Blood*, 1996, 87(1): 1-13.
- [11] Masauzi N. Expression of differentiation antigens and adhesion molecules on CD34⁺ cells in peripheral blood and bone marrow after chemotherapy followed by administration of granulocyte colony stimulating factor [J]. *Hokkaido Igaku Zasshi*, 1996, 71(6): 771-783.

欢 迎 投 稿 欢 迎 订 阅