

越少,说明在没有外源性脂质提供的条件下,细胞内源性胆固醇合成受抑制。本实验结果显示,丹参提取物能明显抑制内源性胆固醇合成,这可能是其调血脂的作用机制之一。

降低血浆中的胆固醇,一方面可以通过减少胆固醇的合成,另一方面也可以促进胆固醇转化为胆汁酸。胆汁酸是胆固醇主要的代谢去路,胆固醇与胆汁酸形成的乳糜微团又是其排出的主要方式,正常人每天合成胆固醇的总量 40% 左右在肝内转化为胆汁酸。在这一酶促过程中,胆固醇 7 α -羟化酶(CYP7A)是其限速酶。

CYP7A 属于细胞色素 P450 酶系,存在于细胞内质网膜上,参与内源性化合物的氧化代谢。主要受氧化类固醇和胆汁酸的调控,从而诱导或抑制其表达,调控机制发生在 CYP7A 的转录水平,主要涉及到一些核受体,如肝 X 受体[liver X receptor, LXR(alpha)]和类法尼酯受体(farnesoid X receptor, FXR)等,CYP7A 在维持胆固醇代谢内环境中发挥着重要作用^[7~9]。本实验结果显示,丹参提取物对增加 CYP7A mRNA 的表达有明显作用,提示通过增加 CYP7A mRNA 的表达,促进胆固醇转化为胆汁酸,从而降低血浆中的胆固醇,这可能也是其调血脂机制之一。

消痰片具有良好的调血脂作用,尤其是丹参提取物,对调节胆固醇代谢十分重要,它可抑制内源性胆固醇的合成和增加胆固醇转化为胆汁酸。

References:

- [1] Xie M L, Gu Z L, Chen K J, et al. Therapeutic effects of Xiaoyu Tablets on the hyperlipidemic rabbits [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药理学), 1998, 15(6): 15-18.
- [2] Xie M L, Gu Z L, Chen K J, et al. Studies on the hypolipidemic effect of Xiaoyu Tablets in hyperlipidemic rabbits and rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1998, 29(3): 178-181.
- [3] Xie M L, Gu Z L, Chen K J, et al. Study of the effects of Xiaoyu Tablets on the regression of atherosclerotic plaque of the rabbit abdominal aorta [J]. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志), 2000, 20(6): 359-361.
- [4] Xue J, Xie M L, Gu Z L. Studies on the effective active ingredients of blood lipid-regulation from the extracts of *Radix Salvia Miltiorrhiza* (RSM) and *Fructus Crataegi* (FC) by orthogonal experimental design [J]. *Suzhou Univ J: Med Sci* (苏州大学学报:医学版), 2004, 23(3): 337-340.
- [5] Michihiro F, Masuo N, Yasuko M, et al. Hepatic LDL receptor mRNA in rats is increased by dietary mushroom (*Agaricus bisporus*) fiber and sugar beet fiber [J]. *J Nutr*, 2000, 130: 2151-2156.
- [6] Sun X M, Cai H J, Wang N, et al. Use amphoterin B cell model to determine the cholesterol biosynthesis inhibitor [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 1989, 9: 604-606.
- [7] Peet D J, Turley S D, Ma W, et al. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha [J]. *Cell*, 1998, 93: 693-704.
- [8] Niesor E J, Flach J, Lopes-Antoni I, et al. The nuclear receptor FXR and LXR alpha: potential targets for the development of drugs affecting lipid metabolism and neoplastic diseases [J]. *Curr Pharm Des*, 2001, 7: 231-259.
- [9] Lu T T, Makishima M, Repa J J, et al. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors [J]. *Mol Cell*, 2000, 6: 507-515.

人参总皂苷体外定向诱导 CD34⁺细胞分化为粒系血细胞的研究

王建伟,王亚平,王莎莉,姜蓉

(重庆医科大学基础医学院 重庆市生物化学与分子药理学重点实验室,重庆 400016)

摘要:目的 研究人参总皂苷(TSPG)协同造血生长因子对 CD34⁺细胞体外定向诱导分化为粒系血细胞的影响。方法 应用阴性磁性分选策略,以 StemsepTM系统从正常人骨髓细胞中分离 CD34⁺造血干/祖细胞(HSC/HPC),通过甲基纤维素半固体培养法检测 TSPG 诱导 CD34⁺ HSC/HPC 向粒系祖细胞集落(CFU-GM)增殖与分化的能力;在 SCF+IL-3+GM-CSF+G-CSF(SIGG)液体培养体系中加入不同剂量的 TSPG,检测对 CD34⁺ HSC/HPC 增殖形成 CFU-GM 的影响以及 CD33⁺细胞比例的变化。结果 TSPG(10~50 μ g/mL)均能提高 CD34⁺细胞形成 CFU-GM 的集落产率,以 TSPG 20 μ g/mL 效果最为明显;不同质量浓度的 TSPG 协同造血生长因子在液体培养体系中诱导 CD34⁺细胞 2 周,观察粒系血细胞的分化,TSPG 10~70 μ g/mL 均可不同程度地提高细胞总数、CFU-GM 扩增倍数及 CD33⁺细胞比例,TSPG 20 μ g/mL 是液体培养诱导 CD34⁺细胞向粒系分化的最佳质量浓度。结论 TSPG 协同造血生长因子能促进 CD34⁺细胞定向诱导分化为粒系血细胞。

收稿日期:2006-05-22

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号 38670880, 30472253)

作者简介:王建伟(1968—),女,副教授,博士,硕士生导师,重庆市科技项目与科技成果评审专家,主要研究方向为天然中药对造血的调控。Tel: (023) 68485087 E-mail: wangjianwei88@sohu.com

关键词:人参总皂苷; CD34⁺细胞; 分化

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)01-0077-04

Total saponins of *Panax ginseng* inducing CD34⁺ cells to differentiate into granulocytopoietic lineage *in vitro*

WANG Jian-wei, WANG Ya-ping, WANG Sha-li, JIANG Rong

(Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, School of Basic Medicine, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of recombinant between hematopoietic growth factors and total saponins of *Panax ginseng* (TSPG) on granulocytopoietic differentiation of purified human CD34⁺ cells derived from human bone marrow cells. **Methods** A sterilized separation system for purification of CD34⁺ hematopoietic stem/progenitor cells (HSC/HPC) was established by means of Stemsep™ according to the strategy of negative selection on immunomagnetic separation. The capacity of various concentrations of TSPG inducing CD34⁺ cells to differentiate into CFU-GM cells was detected by methyl cellulose assay systems; CD34⁺ cells were committedly differentiated with various combination of cytokines in liquid culture systems and the expanded cell number, CD33⁺ cell ratio and granulocytopoietic progenitor cell number were detected; various concentrations of TSPG were then added into liquid culture systems containing SCF+IL-3+GM-CSF+G-CSF (SIGG), the elevation rate on proliferation of CD34⁺ cells and the formation of CFU-GM were observed and the ratio of CD33⁺ cells were estimated. **Results** TSPG (10—50 μg/mL) could increase the colony yield of CFU-GM, TSPG (20 μg/mL) did best. At the various concentrations of TSPG synergized with hematopoietic growth factors on granulocytopoietic differentiation of CD34⁺ cells for two weeks in liquid culture systems, TSPG (10—70 μg/mL) could increase the expanded cell number, the amplification multiple of total CFU-GM, and CD33⁺ cell ratio; TSPG 20 μg/mL was identified as the most potential concentration for the granulocytopoietic differentiation of CD34⁺ cells in liquid culture system. **Conclusion** TSPG may promote CD34⁺ cells to proliferate and differentiate to granulocytopoietic lineage by synergism with hematopoietic growth factors.

Key words: the total saponins of *Panax ginseng* C. A. Meyer (TSPG); CD34⁺ cells; differentiation

人参是祖国传统医学的补气要药,人参皂苷是人参中主要有效成分。既往研究表明^[1~3]人参总皂苷(total saponins of *Panax ginseng*, TSPG)是人参促进血细胞生成的有效成分。TSPG在体内外均能刺激造血祖细胞的增殖分化^[2,4]。本研究采用造血细胞工程技术,以分离纯化的CD34⁺造血干/祖细胞(CD34⁺ HSC/HPC)为模型,探讨了TSPG协同造血生长因子定向诱导对CD34⁺细胞分化为粒系血细胞的作用,旨在进一步阐述人参补气生血的现代生物学机制。

1 材料与方法

1.1 骨髓细胞:取胸外科无血液疾病患者切除的肋骨骨髓,淋巴细胞分离液(Ficoll,相对密度1.077)分离骨髓单个核细胞(MNC),RPMI-1640培养液洗涤,用4号针头制备单细胞悬液,并计数MNC。

1.2 药物:TSPG,重庆中药研究所惠赠,质量分数95%以上,IMDM培养液配成1 mg/mL的工作液,正压滤过除菌。

1.3 主要试剂及材料:RPMI-1640、IMDM培养基

(Gibco公司),胎牛血清(FBS, Sigma公司),马血清(HS,军事医学科学院提供),CD33⁺抗体(Santa Cruz公司),干细胞因子(SCF)、白细胞介素-3(IL-3)、粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)(军事医学科学院提供,使用终质量浓度分别为100、2、50、20 ng/mL)。

1.4 CD34⁺细胞的分离纯化^[5]:利用Stemsep™阴性分选系统进行分离,将 $4 \times 10^7 \sim 8 \times 10^7$ 骨髓MNC悬浮于含2% FBS的PBS缓冲液中,加入antibody cocktail 100 μL, 0℃、30 min,再加入磁性胶体60 μL, 0℃、30 min。将标记后的骨髓MNC加入磁场中的分离柱内,缓冲液冲洗,从流出道收集CD34⁺细胞群。经流式细胞仪FACS Vantage (Becton Dickinson Immunocytometry System, 美国)测定其纯度。

1.5 TSPG协同造血生长因子对CD34⁺细胞增殖分化的影响:IMDM培养基中含12.5% HS、12.5% FBS、 5×10^3 /mL CD34⁺细胞及重组细胞因子;对照组,含细胞因子组合SCF+IL-3+GM-

CSF+G-CSF;加药组,在以上细胞因子组合中加入不同剂量的 TSPG,终质量浓度分别为 10、20、50、70、100 $\mu\text{g/mL}$ 。细胞因子每 48 h 加入体系 1 次,均连续加入 5 次;TSPG 每周加入 1 次。上述体系接种于 24 孔板中,每孔 1 mL,复种 3 孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度下培养 2 周。每周半量换液,取出细胞用于细胞总数、CD33⁺ 细胞比例及 CFU-GM 祖细胞检测。

1.6 CD33⁺ 细胞的检测:将扩增的细胞经 PBS 洗涤后,用直接荧光法标记行流式细胞仪检测,每个样品分析细胞数 $\geq 1 \times 10^4$ 个,用 PC-Lysys II 软件在 VAX3300 微机 (Digital,美国) 上进行分析。

1.7 粒系造血祖细胞 (CFU-GM) 培养:体系中含 30% HS、10% BSA、SCF、IL-3、GM-CSF、G-CSF 及在此基础上分别加入 $1 \times 10^4/\text{mL}$ CD34⁺ 细胞、 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 扩增细胞,IMDM 及 0.9% 甲基纤维素。药物组为在 CD34⁺ 细胞培养体系中加入不同质量浓度的 TSPG (质量浓度同前),以不加 TSPG 为对照组。所有培养均在 96 孔板 (每孔 0.2 mL,复种 3~5 孔),37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度下培养 14 d,计数 CFU-GM。

1.8 统计学方法:显著性分析用 t 检验。

2 结果

2.1 骨髓 CD34⁺ 细胞的分选、纯化与鉴定:骨髓 MNC 中仅有少量细胞表达 CD34⁺ 抗原,CD34⁺ HSC/HPC 仅占 1~3%,用 StemsepTM 系统分离纯化可得到高纯度的 CD34⁺ 细胞,经免疫细胞化学和流式细胞术检测,其纯度为 92%~94%。

2.2 TSPG 诱导 CD34⁺ 细胞定向分化为粒系血细胞的作用:不同质量浓度的 TSPG 协同造血生长因子诱导 CD34⁺ 细胞 2 周,结果显示,TSPG 10~70 $\mu\text{g/mL}$ 均可不同程度地提高细胞总数、CFU-GM 扩增倍数及 CD33⁺ 细胞比例,TSPG 20 $\mu\text{g/mL}$ 是液体培养诱导 CD34⁺ 细胞向粒系分化的最佳质量浓度,但 TSPG 100 $\mu\text{g/mL}$ 对细胞总数的增加有所抑制,与对照组相比差异显著 (表 1)。

2.3 TSPG 对 CD34⁺ 细胞形成 CFU-GM 能力的影响:以甲基纤维素半固体培养法检测不同剂量 TSPG 诱导 CD34⁺ HSC/HPC 向 CFU-GM 增殖能力,结果 TSPG (10~50 $\mu\text{g/mL}$) 均能提高 CD34⁺ 细胞形成 CFU-GM 的集落产率,以 TSPG 20 $\mu\text{g/mL}$ 效果最为明显 ($P < 0.01$) (表 2)。

3 讨论

利用不同的细胞因子组合,使造血干/祖细胞按

表 1 TSPG 对人骨髓细胞中 CD34⁺ 细胞定向诱导分化为粒系血细胞的影响 ($n=9$)

Table 1 Effect of TSPG on granulocytopoietic differentiation of purified CD34⁺ cells derived from human bone marrow cells ($n=9$)

TSPG/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞总数 扩增倍数	CD33 ⁺ 细胞 比例/%	CFU-GM 扩增倍数
0(对照)	118.2 $\pm$ 8.90	10.16 $\pm$ 1.719	10.48 $\pm$ 1.678
10	124.6 $\pm$ 11.21	14.48 $\pm$ 2.433*	13.31 $\pm$ 1.795*
20	133.2 $\pm$ 9.03**	26.78 $\pm$ 1.913**	16.98 $\pm$ 1.729**
50	131.4 $\pm$ 9.56*	20.89 $\pm$ 3.580**	14.52 $\pm$ 1.504**
70	127.0 $\pm$ 7.74*	17.23 $\pm$ 3.259**	13.35 $\pm$ 1.214*
100	105.8 $\pm$ 10.16*	11.52 $\pm$ 1.759	10.54 $\pm$ 1.636

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

表 2 TSPG 对 CD34⁺ 细胞形成 CFU-GM 的影响 ($n=12$)

Table 2 Effect of TSPG on CFU-GM colony formation of CD34⁺ cells ($n=12$)

TSPG/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	CFU-GM 数/ 1×10^4 个 CD34 ⁺ 细胞
0(对照)	40.83 $\pm$ 5.879
10	46.50 $\pm$ 4.722*
20	52.83 $\pm$ 7.322**
50	48.67 $\pm$ 4.227*
70	43.50 $\pm$ 3.082
100	41.33 $\pm$ 3.204

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

照要求向不同的方向分化,从而生产出所需的用于临床治疗的细胞产品。在造血干细胞移植和大剂量化疗、放疗后患者将出现一段较长时间的粒细胞减少和血小板减少,由此所造成的感染及出血往往成为治疗失败的直接原因。目前针对这一现象往往采用常规的抗感染及抗出血治疗,其结果是患者治疗费用增高而疗效常不尽人意。虽然目前尚不清楚造血干细胞产物中哪一部分群体与早期的造血恢复有关,利用富集的 CD34⁺ 细胞的研究提示可进行造血重建的细胞存在于这一非成熟的细胞群体中。这样,治疗这一细胞缺乏期的一个策略就是提供部分分化的粒细胞和/或巨核细胞的前体细胞,这些细胞可在输入后很快成熟,从而发挥其生理功能。利用这些扩增的造血细胞作为目前造血干细胞治疗的补充方法将会减轻或消除这些细胞减少症。

一项研究报道^[6],回输培养 3 周后的外周血成熟中性粒细胞可获得暂时的中性粒细胞恢复。这些数据与其他的利用 G-CSF 动员后的异基因供者粒细胞输注的研究结果相一致。利用 PIXY321 (IL-3/GM-CSF) 扩增 CD34⁺ 细胞产生的中性粒细胞前体细胞在 10^{10} 的剂量下没有不良反应,还发现给予患

者更大剂量的培养细胞可缩短中性粒细胞缺乏的时间^[7]。研究显示体外培养获得的中性粒细胞是有生理功能的^[8]。“生产”用于增加造血恢复细胞的争论焦点在于是否能“生产”出有益于临床适合数量的细胞。并且,维持这一数量的最佳方法是应该持续地产生成熟的细胞,而不是一次大量地输入成熟细胞。所以,目前人们仍在努力探索提高中性粒细胞“生产”量的方案。本室多年来一直关注中医药,尤其是TSPG对血发生的影响,研究表明:TSPG是人参促进造血的主要成分。对于TSPG能否促进CFU-GM的增殖,文献报道结论各异。黄干等^[1]认为TSPG对小鼠CFU-GM的集落产率无明显影响;但王勇等^[9]同样以小鼠为实验对象,却表明TSPG对CFU-GM的刺激作用与剂量有关,TSPG在3 $\mu\text{g/mL}$ 时对CFU-GM的增殖的影响不明显,而当质量浓度增高到20 $\mu\text{g/mL}$ 时,CFU-GM的集落产率明显提高;高瑞兰等^[10]研究表明,人参皂苷能刺激正常人和再障患者CFU-GM增殖;王莎莉等^[3]实验结果表明:在有外源性HGF(IL-3、Epo、GM-CSF)存在的条件下,TSPG(20~100 $\mu\text{g/mL}$)在体外对人骨髓CFU-GM的增殖有显著促进作用,经TSPG(50 $\mu\text{g/mL}$)诱导制备的人骨髓基质细胞、胸腺细胞、脾细胞、血管内皮细胞、单核细胞培养上清液同样可以促进CFU-GM的增殖,并且从调控机制上进行了探讨,推测TSPG可通过直接和/或间接途径刺激人骨髓细胞合成GM-CSFR α ,使细胞膜表面的GM-CSFR α 数量增加,结合更多的GM-CSF,还可以直接和/或间接地促进GM-CSFR α 和Shc可逆磷酸化,从而调控GM-CSFR介导的信号转导过程,最终促进CFU-GM的增殖分化。

基于以上的研究基础,直接以分离纯化的人骨髓CD34⁺细胞为靶细胞,探讨TSPG对CD34⁺细胞向粒系细胞分化的影响。本研究观察到,TSPG

10~70 $\mu\text{g/mL}$ 均可不同程度地提高细胞总数、CFU-GM扩增倍数及CD34⁺细胞比例,TSPG 20 $\mu\text{g/mL}$ 是液体培养诱导CD34⁺细胞向粒系分化的最佳质量浓度。以甲基纤维素半固体培养法检测不同质量浓度TSPG诱导CD34⁺HSC/HPC向CFU-GM增殖与分化能力,结果显示TSPG(10~50 $\mu\text{g/mL}$)均能提高CD34⁺细胞形成CFU-GM的集落产率,以TSPG 20 $\mu\text{g/mL}$ 效果最为明显。既往研究及本研究结果表明TSPG能够协同其他细胞因子诱导CD34⁺HSC/HPC向粒系细胞分化。

References:

- [1] Huang G, Zhu B D, Zhang S S. The effect of TSPG on hematopoiesis in mice [J]. *Chin J Hematol* (中华血液学杂志), 1990, 11(2): 66-68.
- [2] Wang L, Wang Y P. Experimental study for the effect of TSPG on the expression of IL-3 in hematopoietic stromal cells [J]. *Acta Anat Sin* (解剖学报), 2004, 35(1): 49-54.
- [3] Wang S L, Chen D, Wang Y P, et al. Modulation of expression of human GM-CSF and GM-CSFR α by total saponins of *Panax ginseng* [J]. *Acta Physiol Sin* (生理学报), 2003, 55(4): 487-492.
- [4] Chen D, Wang S L, Wang Y P, et al. Experimental study on expressing GM-CSF from lymphocytes by total saponins of *Panax ginseng* [J]. *Immunol J* (免疫学杂志), 2003, 19(6): 411-414.
- [5] Wang J W, Wang S L, Wang Y P, et al. Separation, purification, and identification of CD34⁺ hematopoietic stem/progenitor cells from bone marrow cells [J]. *Chin J Anat* (解剖学杂志), 2004, 27(3): 328-330.
- [6] Gluck S, Chadderton T, Porter K, et al. Characterization and transfusion of *in vitro* cultivated hematopoietic progenitor cells [J]. *Transfus Sci*, 1995, 16(3): 273-281.
- [7] Williams S F, Lee W J, Bender J G, et al. Selection and expansion of peripheral blood CD34⁺ cells in autologous stem cell transplantation for breast cancer [J]. *Blood*, 1996, 87(5): 1687-1691.
- [8] Hino M, Suzuki K, Yamane T, et al. *Ex vivo* expansion of mature human neutrophils with normal functions from purified peripheral blood CD34⁺ haematopoietic progenitor cells [J]. *Br J Haematol*, 2000, 109(2): 314-321.
- [9] Wang Y, Wang Y P, Zhu B D. The effect of TSPG on proliferation of mouse hematopoietic cells [J]. *Chin J Anat* (解剖学杂志), 1995, 18(2): 153-156.
- [10] Gao R L, Xu C L, Jin J M, et al. The effect of GS on proliferation of hematopoietic progenitor cells from normal human and patients with aplastic anemia [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 1992, 12(5): 285-287.

白藜芦醇对多发性骨髓瘤细胞的体外抗癌作用

孙春艳, 胡 豫, 刘新月, 杨海燕

(华中科技大学同济医学院附属协和医院血液病研究所, 湖北 武汉 430022)

摘要:目的 研究白藜芦醇对多发性骨髓瘤细胞体外抗癌作用,探讨其抗癌作用的分子机制。方法 用MTT法检测白藜芦醇对骨髓瘤细胞系RPMI-8226和KM3增殖的影响;Annexin-V/PI双标流式细胞术检测白藜芦醇对

收稿日期:2006-04-30

作者简介:孙春艳(1976—),女,黑龙江省佳木斯市人,博士,主治医师,研究方向为恶性肿瘤的发病机制。

Tel: (027) 62766183 E-mail: ayan0618@163.com