

• 药理与临床 •

地榆总皂苷促进造血细胞增殖效应研究

邹文俊¹, 刘芳², 吴建明¹, 高小平^{1*}

1. 成都中医药大学, 四川 成都 610075

2. 四川大学, 四川 成都 610065

摘要: **目的** 观察地榆总皂苷对3种造血细胞 Baf3/Mpl、UT-7 和 NSF-60 的促增殖效应。**方法** 分别培养依赖血小板生成素(TPO)、红细胞生成素(EPO)和粒细胞集落生长因子(G-CSF)生长的 Baf3/Mpl、UT-7 和 NSF-60 细胞, 在加或不加细胞因子条件下, 用不同质量浓度地榆总皂苷处理细胞 72 h 后, 采用 MTT 法检测 3 种细胞的增殖; 采用 RT-PCR 法检测 3 种细胞因子受体表达水平的变化。**结果** 地榆总皂苷单独处理细胞 72 h, 明显促进 Baf3/Mpl 细胞和 NSF-60 细胞增殖, 但不影响 UT-7 细胞生长; 在 TPO 和 G-CSF 存在条件下, 地榆总皂苷能分别增强两种细胞因子的促细胞增殖作用。此外, 地榆总皂苷能明显增强 Baf3/Mpl 细胞 TPO 受体表达, 对 NSF-60 细胞 G-CSF 受体表达没有影响。**结论** 地榆总皂苷具有单独或协同细胞因子的促进造血细胞增殖作用, 其促增殖作用与上调 TPO 受体的表达有关。

关键词: 地榆总皂苷; 造血细胞; 细胞因子; 血小板生成素; 红细胞生成素

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)05-0929-05

Effects of total saponins from *Sanguisorba officinalis* on promoting hematopoietic cell proliferationZOU Wen-jun¹, LIU Fang², WU Jian-ming¹, GAO Xiao-ping¹

1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

2. Sichuan University, Chengdu 610065, China

Abstract: **Objective** To investigate the proliferative effects of total saponins from *Sanguisorba officinalis* (TSS) on three hematopoietic cell lines. **Methods** Three kinds of hematopoietic cells (Baf3/Mpl, UT-7, and NSF-60) expressing cytokines such as thrombopoietin (TPO), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), and erythropoietin (EPO), were cultured with or without cytokines. After 72 h the TSS at different concentration was added, cell proliferation capacity was estimated by MTT, and expression level of cytokine receptors was measured by RT-PCR. **Results** TSS promoted the proliferation of Baf3/Mpl and NSF-60 cells but had no effect on growth of UT-7 cells. With TPO and G-CSF, TSS could enhance the effect of promoting cell proliferation of the two cytokines, respectively. TSS could increase the expression of TPO receptor in Baf3/Mpl cells, but had no effect on the expression of G-CSF receptor in NSF-60 cells. **Conclusion** TSS could promote the proliferation of hematopoietic cells alone or in combination with cytokines. In Baf3/Mpl cells, the proliferative effect is correlated with the up-regulation of TPO receptor.

Key words: total saponins in *Sanguisorba officinalis* L. (TSS); hematopoietic cells; cytokines; thrombopoietin (TPO); erythropoietin (EPO)

地榆 *Sanguisorba officinalis* L. 为蔷薇科地榆属植物, 具有凉血止血、解毒敛疮之功效, 可用于便血、水火烫伤及痈肿疮毒的治疗。现代药理及临床研究表明, 以地榆为原料制备的地榆升白片能显著升高放、化疗引起的外周血白细胞减少^[1-2], 使癌症患者生活质量得到明显改善。地榆的主要化学成

分为鞣质、皂苷以及黄酮类等^[3-5], 通过用小鼠骨髓细胞体外筛选有效部位发现, 地榆总皂苷具有明显的促骨髓细胞增殖作用^[6]。体内动物实验也证实, 地榆总皂苷不仅能有效升高环磷酰胺诱导的骨髓抑制小鼠骨髓有核细胞数量, 同时对外周血白细胞、红细胞以及血小板数量也有明显的改善作用^[6-8], 这些研

收稿日期: 2011-10-14

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81073159)

作者简介: 邹文俊(1966—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为临床中药学。Tel: 13388165408 E-mail: zouwenjun@vip.163.com

*通讯作者 高小平 Tel: 13708066104 E-mail: gxplw2003@yahoo.com.cn

究结果均表明地榆具有明显的促造血作用。

造血生成主要受骨髓基质细胞以及多种细胞因子的调节,其中粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、红细胞生成素(EPO)以及血小板生成素(TPO)等发挥了重要功能,如TPO通过与其受体相互作用,刺激巨核细胞增殖与分化,最终成熟并生成血小板;G-CSF则主要作用于造血中性粒细胞,促进其增殖和分化;EPO则作用于红系祖细胞。地榆总皂苷的促造血作用是否与细胞因子或其受体有关,以及是否能促进细胞因子受体表达等均不清楚。因此,本实验采用3种依赖细胞因子生长的造血细胞系,在加入或缺乏细胞因子的体外培养条件下,观察地榆总皂苷对造血细胞生长以及对细胞因子受体表达的影响,为探索地榆总皂苷促造血作用的细胞和分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 地榆总皂苷制备

取干燥地榆(购自成都市五块石药材市场,并由成都中医药大学贾敏如教授鉴定为地榆 *Sanguisorba officinalis* L.)粉碎成粗粉,70%乙醇回流提取,浓缩得醇浸膏,加水混悬,用正丁醇萃取,浓缩干燥,加入丙酮充分溶解,收集沉淀,采用硅胶柱色谱分离制备地榆总皂苷^[4]。采用比色法测定总皂苷质量分数为94.7%,HPLC法测定地榆皂苷I质量分数为76.3%。使用前用DMSO溶解,无菌PBS稀释至1 mg/mL,待用。

1.2 试剂与仪器

RPMI 1640 培养基(Gibco);新生胎牛血清(HyClone);重组人血小板生成素(rhTPO, Sigma);重组人红细胞生成素(rhEPO, Sigma);重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF, Cell Signaling);一步法RT-PCR试剂盒(Takara);CO₂培养箱(日本Sanyo公司);倒置相差显微镜(日本Olympus公

司);多功能酶标仪(Perkin Elmer公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 依赖TPO、EPO和G-CSF生长的Baf3/Mpl、UT-7和NSF-60细胞系均由Dr. Ji Li (University of Wyoming)赠送。3种细胞均采用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基培养,并参照文献方法^[9-11]分别补充加入不同的细胞因子维持细胞生长,其中TPO维持Baf3/Mpl细胞生长浓度为20 pmol/L;G-CSF维持NSF-60细胞生长质量浓度为10 ng/mL;EPO维持UT-7细胞生长浓度为1 U/mL。

1.3.2 细胞增殖测定 3种细胞维持培养在对数生长期,用无血清培养基洗涤3次,悬浮于含0.5%胎牛血清的无细胞因子培养基中,次日以适量细胞数分别接种于96孔培养板内,分别设置空白对照组、地榆总皂苷单独处理组、地榆总皂苷+细胞因子处理组,细胞因子单独处理组。用无因子、无血清培养基稀释地榆总皂苷溶液,按照设置浓度加入细胞,使其终质量浓度分别为5、10、20、30、40 μg/mL;细胞因子浓度参照细胞维持生长所需浓度加入。细胞在37℃条件下连续培养72 h,均采用常规MTT法进行增殖检测。

1.3.3 RT-PCR检测 3种细胞分别接种在6孔培养板,分别加入地榆总皂苷溶液(10 μg/mL),37℃条件下继续培养,分别于24、48、72、96 h收获细胞,用Trizol试剂提取总RNA。参照RT-PCR试剂盒扩增细胞内目的基因,各基因引物均由作者设计,上海基康生物技术有限公司合成,引物序列及产物片段大小见表1。扩增条件为逆转录(RT):50℃,30 min;94℃,2 min;rhTPOR、rhG-CSFR PCR扩增条件:94℃、15 s,50℃、15 s,72℃、45 s,26个循环;最后延伸:72℃、10 min,4℃、1 h。rhEPOR PCR扩增条件:94℃、15 s,55℃、15 s,72℃、45 s,28个循环;最后延伸:72℃、10 min,

表 1 基因引物序列及产物片段大小

Table 1 Primer sequences and product size

基因	引物序列	产物片段 / bp	退火温度 / °C
rhTPOR	正向: 5'-CTGAGGTACGAACCTCCGCTAT-3'	420	56.5
	反向: 5'-CTGCCATTGACAGGTAACATTC-3'		57.4
rhEPOR	正向: 5'-AGCCAGTGGGCACTGAGCAT-3'	386	62.7
	反向: 5'-GTAGGGGCCATCGGATAAGC-3'		61.1
rhG-CSFR	正向: 5'-CCTTACCCACTACACCATCTT-3'	443	53.6
	反向: 5'-GCTTCTTTTCATCCTCCTCC-3'		55.5
GAPDH	正向: 5'-ATCCCATCACCATCTTCCAG-3'	308	56.7
	反向: 5'-GAGTCCTTCCACGATACCAA-3'		54.7

4 ℃、1 h。同时设置内参基因 GAPDH 的扩增，循环数为 24 个，其余同目的基因扩增。扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察并拍照，同时采用半定量方法（目的基因/GAPDH）计算目的基因表达水平。

1.3.4 统计学方法 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，数据分析采用 SPSS 14.0 统计软件包处理，组间均数比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 对 Baf3/Mpl 细胞生长的影响

图 1-A 显示，在含 TPO 的培养条件下，Baf3/Mpl 细胞明显依赖 TPO 生长，而同时加入地榆总皂苷（10 $\mu\text{g/mL}$ ）后，Baf3/Mpl 细胞数量增加更为明显，具有明显的统计学意义。在缺乏 TPO 的培养条件下，地榆总皂苷单独处理也能刺激 Baf3/Mpl 细胞的

增殖，但其促增殖作用不呈浓度依赖性，且随地榆总皂苷质量浓度的增加细胞数减少（图 1-B）。

2.2 对 NSF-60 细胞生长的影响

图 2-A 显示，在含 G-CSF 的培养条件下，NSF-60 细胞生长呈现明显的细胞因子依赖性，同时加入地榆总皂苷（10 $\mu\text{g/mL}$ ）后，NSF-60 细胞数量无明显变化。在缺乏 G-CSF 的培养条件下，地榆总皂苷单独处理能显著刺激 NSF-60 细胞的增殖，其促增殖作用呈浓度依赖性（图 2-B）。

2.3 对 UT-7 细胞生长的影响

图 3-A 显示，在含 EPO 的培养条件下，UT-7 细胞生长呈现明显的细胞因子依赖性，同时加入地榆总皂苷（10 $\mu\text{g/mL}$ ）后，UT-7 细胞数量无明显变化。在缺乏 TPO 的培养条件下，地榆总皂苷单独处理对 UT-7 细胞的增殖促进作用不明显（图 3-B）。

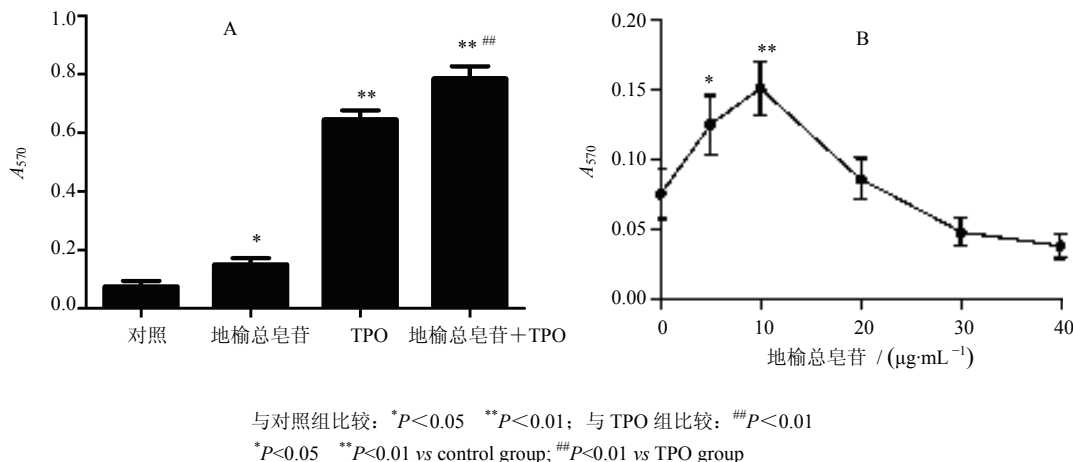


图 1 地榆总皂苷与 TPO 合用 (A) 与地榆总皂苷单用 (B) 对 Baf3/Mpl 细胞生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effects of TSS combined with TPO (A) and TSS alone (B) on growth of Baf3/Mpl cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

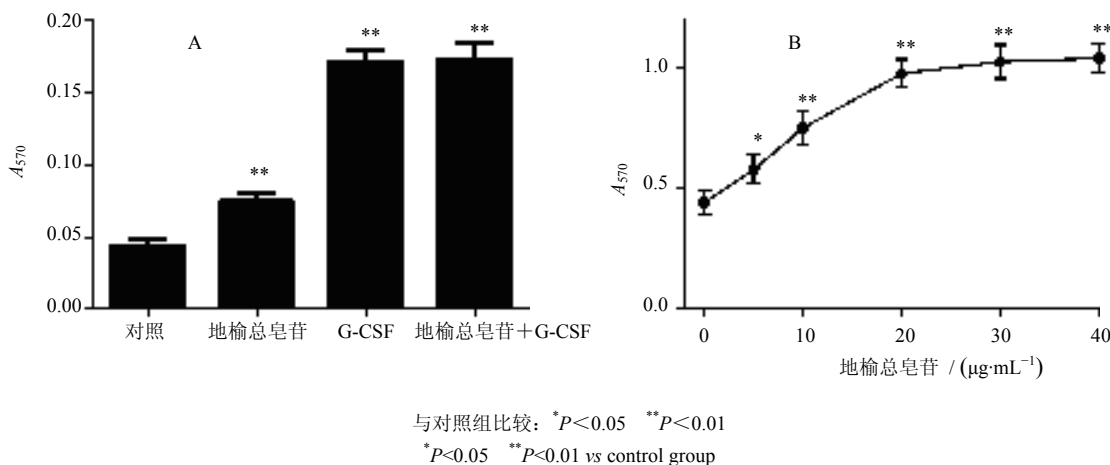


图 2 地榆总皂苷与 G-CSF 合用 (A) 与地榆总皂苷单用 (B) 对 NSF-60 细胞生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effects of TSS combined with G-CSF (A) and TSS alone (B) on growth of NSF-60 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

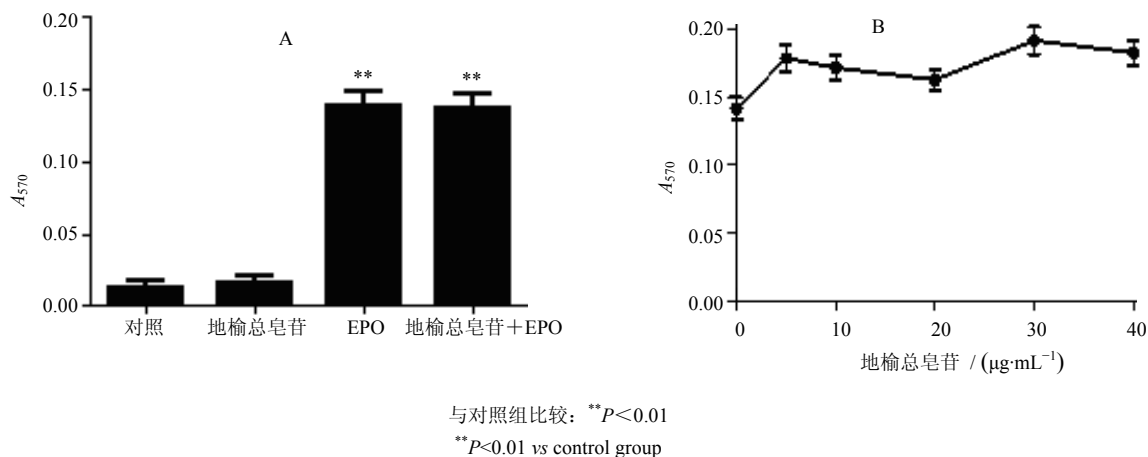


图 3 地榆总皂苷与 EPO 合用 (A) 与地榆总皂苷单用 (B) 对 UT-7 细胞生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effects of TSS combined with EPO (A) or TSS alone (B) on growth of UT-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.4 对细胞因子受体表达水平的影响

在研究地榆总皂苷对造血细胞增殖的基础上, 进一步收集地榆总皂苷处理细胞, 采用 RT-PCR 技术, 研究了地榆总皂苷对 3 种细胞因子受体 TPOR、G-CSFR 和 EPOR 表达水平的影响, 结果显示,

Baf3/Mpl 细胞表面的 TPOR 在 mRNA 水平上明显增加, 但地榆总皂苷不影响 NSF-60 细胞和 UT-7 细胞的 G-CSFR 和 EPOR 表达; 此外, 地榆总皂苷处理 Baf3/Mpl 细胞 48 h 后, TPOR 在 mRNA 水平上达到最高, 随后减弱, 96 h 下降至对照水平 (图 4)。

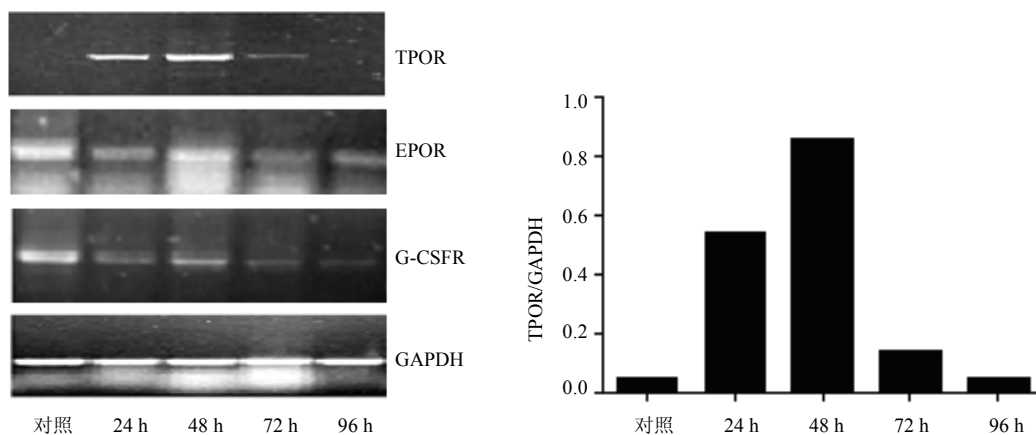


图 4 地榆总皂苷对 TPO、EPO 和 G-CSF 受体表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of TSS on expression levels of TPOR, EPOR, and G-CSFR ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论

本实验采用 3 种造血细胞评价了地榆总皂苷的促造血作用, 发现地榆总皂苷能明显促进 TPO 依赖的 Baf3/Mpl 细胞和 G-CSF 依赖的 NSF-60 细胞增殖, 但对 UT-7 细胞, 无论加或不加入 EPO, 地榆总皂苷均无明显的促细胞增殖作用。

在 Baf3/Mpl 细胞, 加入 TPO 的培养条件下, 细胞明显依赖因子生长, 而同时加入地榆总皂苷后, 细胞数量增加更为明显, 显示地榆总皂苷增强 TPO 刺激的 Baf3/Mpl 细胞增殖, 表明地榆总皂苷具有促

进 TPO 增强的作用; 在缺乏 TPO 的条件下, 观察了地榆总皂苷对 Baf3/Mpl 细胞的作用, 发现地榆总皂苷单独作用也能刺激 Baf3/Mpl 细胞的增殖。在 NSF-60 细胞中, 也证实了地榆总皂苷的直接促增殖作用。地榆总皂苷的直接促细胞增殖作用在两种细胞中呈现一定差异, 在 NSF-60 细胞中地榆总皂苷呈现浓度依赖性, 但在 Baf3/Mpl 细胞中, 地榆总皂苷的作用不呈浓度依赖性, 而是随地榆总皂苷质量浓度增加, Baf3/Mpl 细胞增殖明显减弱。进一步通过光学显微镜观察发现, 高质量浓度的地榆总皂苷

促使细胞数量明显下降,但细胞胞体明显增大,Giemsa染色显示多核,提示地榆总皂苷可能还具有促进细胞分化的作用,即与巨核细胞分化有关,但相关研究尚待确认和鉴定。

Baf3/Mpl 细胞特异表达 TPO 受体,与其配体相互作用,调节巨核细胞分化和血小板生成。在配体 TPO 缺乏时,细胞增殖减缓并逐渐死亡,但加入 TPO 可使细胞生长迅速恢复,减少细胞死亡数量。TPO 作为促进血生长因子,尤其促 Baf3/Mpl 细胞生长和血小板生成的作用已被充分证实。因此,本研究结果显示地榆总皂苷促 Baf3/Mpl 细胞增殖,提示了其潜在的促血小板生成作用,也证实了早期的动物实验研究结果^[8]。地榆总皂苷的促 Baf3/Mpl 细胞增殖也提示其可能通过如下途径实现促血小板生成作用:直接作用 TPO 受体或促进 TPO 受体表达,增强 TPO 与受体的结合。进一步采用了 RT-PCR 技术检测了 Baf3/Mpl 细胞的 TPO 受体表达水平,结果发现,地榆总皂苷能显著增加 TPO 受体的 mRNA 表达水平,证实了地榆总皂苷的作用与提高 TPO 受体表达有关。但地榆总皂苷在无 TPO 的条件下,Baf3/Mpl 细胞仍能增殖,提示地榆总皂苷可能还存在其他作用机制,如同某些小分子直接激动受体的作用^[12]。

本研究也检测了 NSF-60 细胞的 G-CSF 受体表达水平,但未观察到 G-CSF 受体表达水平的变化。地榆总皂苷促 NSF-60 细胞的增殖可能与受体表达水平无关,可能存在直接激动受体而发挥促细胞增殖作用。本研究中,地榆总皂苷对 UT-7 细胞增殖以及 EPOR 表达水平均无影响,尚不能支持前期的研究结果^[8],但得此结论可能为时过早。地榆总皂苷可能不通过 EPO/EPOR 途径发挥作用,或通过其他如 SCF/c-kit 途径促进红系造血,SCF/c-kit 是 EPO/EPOR 之外影响红细胞分化及发育的重要途径。

本研究证实了地榆总皂苷的促造血作用,尽管相关机制还有待进一步阐明,但地榆总皂苷促两种

造血细胞增殖的实验结果提示地榆总皂苷具有多效性,即可能发挥多种细胞因子作用,值得深入研究。

参考文献

- [1] 万楚成,郭仁慈,夏云金,等.地榆升白片治疗白细胞减少症 146 例临床观察[J].中国中医药信息杂志,2004,11(3):241.
- [2] 许新华,李松,薛峰,等.地榆升白片预防放疗中白细胞减少症的疗效评价[J].临床荟萃,2005,20(8):458.
- [3] 程东亮,曹小,邹佩,等.中药地榆黄酮等成分的分离与鉴定[J].中草药,1995,26(11):570-571.
- [4] 秦国伟,陈梅玉,徐任生.地榆化学成分的研究[J].中草药,1991,22(11):483-485.
- [5] 楼小红.溪黄草根茎叶不同部位总黄酮的含量测定[J].中国医药学报,2004,19(5):316-317.
- [6] 高小平,吴建明,邹文俊,等.地榆促造血作用的有效部位筛选[J].中国天然药物,2006,4(2):49-52.
- [7] 李佑民,乐风华,邹银水,等.地榆升白片预防非小细胞肺癌患者化疗外周血细胞下降的临床研究[J].肿瘤防治杂志,2004,11(9):964-966.
- [8] 王土金.地榆升白片用于化疗后白细胞减少症疗效观察[J].西部医学,2004,16(4):341.
- [9] Rojnuckarin P, Drachman J G, Kaushansky K. Thrombopoietin-induced activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in normal megakaryocytes: Role in endomitosis [J]. *Blood*, 1999, 94(4): 1273-1282.
- [10] Komatsu N, Yamamoto M, Fujita H, *et al.* Establishment and characterization of an erythropoietin-dependent subline, UT-7/EPO, derived from human leukemia cell line, UT-7 [J]. *Blood*, 1993, 82(2): 456-464.
- [11] Westphal G, Niederberger E, Blum C, *et al.* Erythropoietin and G-CSF receptors in human tumor cells: Expression and aspects regarding functionality [J]. *Tumori*, 2002, 88(2): 150-159.
- [12] Erickson-Miller C L, Delorme E, Tian S S, *et al.* Preclinical activity of Eltrombopag (SB-497115), an oral, nonpeptide thrombopoietin receptor agonist [J]. *Stem Cells*, 2009, 27: 423-430.