

复方扶芳藤合剂对小鼠外周血干细胞动员作用的研究

张雨, 常军英, 张宁, 运晨霞, 周倍伊*
(广西中医学院 方剂教研室, 南宁 530001)

[摘要] 目的:运用复方扶芳藤合剂对小鼠进行干预,观察复方扶芳藤合剂对小鼠外周血干细胞数量的影响,证明复方扶芳藤合剂对小鼠外周血干细胞具有从骨髓到外周血的动员作用。方法:取昆明种小鼠随机分为 4 组,分别为生理盐水组(空白组)皮下注射生理盐水 15 mL·kg⁻¹,同时生理盐水 25 mL·kg⁻¹ig;复方扶芳藤合剂组(药物干预组)复方扶芳藤合剂 15 mL·kg⁻¹ig,同时 sc 生理盐水 25 mL·kg⁻¹;重组粒细胞集落刺激因子(G-CSF)组(阳性对照组)sc G-CSF 10 μg·kg⁻¹,同时生理盐水 25 mL·kg⁻¹ig; G-CSF 加复方扶芳藤合剂组(联合用药组)复方扶芳藤合剂 15 mL·kg⁻¹·d⁻¹ig,同时 sc G-CSF 10 μg·kg⁻¹。给药 6 d 后,取静脉血检测外周血白细胞、单个核细胞数量,用甲基纤维素微量培养法培养进行混合细胞集落形成单位(CFU-Mix)集落计数,流式细胞术检测外周血干细胞抗原-1(Sca-1⁺)细胞数量和百分率。结果:药物干预组、阳性对照组和联合用药组的小鼠外周血白细胞数量明显高于空白组。药物干预组、阳性对照组和联合用药组经体外造血祖细胞培养 CFU-Mix 产率显著高于空白组,CFU-Mix 分别为 9,16,19 个($P<0.05$)。同时药物干预组、阳性对照组和联合用药组外周血中 Sca-1⁺细胞百分率比空白组明显提高,分别为 0.79% ,1.15% ,1.72% ($P<0.05$)。结论:复方扶芳藤合剂对小鼠外周血造血干细胞有明显的动员作用,具有作为有效的干细胞动员剂的潜力;复方扶芳藤合剂和 G-CSF 联合动员的效果好于单用复方扶芳藤合剂或单用 G-CSF 的动员效果,这提示在今后的应用中可考虑 G-CSF 联合复方中药进行外周血干细胞的动员。

[关键词] 复方扶芳藤合剂; 外周血干细胞; 干细胞动员剂
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)07-0212-04

The Study of Periphearal Blood Stem Cell Mobilization by Compound Fufangteng Mixture in Mice

ZHANG Yu, CHANG Jun-ying, ZHANG Ning, YUN Chen-xia, ZHOU Bei-yi*
(Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China)

[Abstract] Objective: To study the mobilization of peripheral blood stem cell in mice by compound fufangteng mixture. Method: Sixty mice were divided into four groups at random ($n=15$ each). Control group

[收稿日期] 20110510(008)
[通讯作者] * 周倍伊, 博士, Tel:0771-3088082, E-mail:zhoubeiyi2000@yahoo.com

[9] 陈蔚, 李益明, 俞茂华, 等. 黄芪多糖对糖尿病鼠 T 细胞亚群的免疫调节作用[J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17 (1): 28.

[10] 黄宏思, 黄卫彤, 韦鹏涯. 黄芪多糖协同抗癌药物对肿瘤细胞的杀伤作用[J]. 中国现代临床医学杂志, 2007, 6 (4): 1.

[11] 张竞之, 陈利国, 贾会欣, 等. 黄芪多糖对高血压病血瘀证患者血清损伤的人脐静脉内皮细胞形态学、活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16 (16):170.

[12] Stanley W C, Recchia F A, Lopaschuk G D. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart[J]. Physiol Rev, 2005, 85(3):1093.

[13] Fragasso G, Salerno A, Spoladore R, et al. Metabolic therapy of heart failure[J]. Curr Pharm Des, 2008, 14 (25):2582.

[14] Von Haehling S, Doehner W, Anker S. Nutrition, metabolism, and the complex pathophysiology of cachexia in chronic heart failure[J]. Cardiovasc Res, 2007, 73(2):298.

[15] 苏敬泽, 农一兵, 温志浩, 等. 黄芪组分配伍对乳鼠肥大心肌细胞肌酸激酶同工酶 mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(5):40.

[责任编辑 古云侠]

was treated with normal saline; fufangteng mixture group was treated with fufangteng mixture, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) group was treated with G-CSF, and Fufangteng mixture combined G-CSF group group was treated with G-CSF and Fufangteng mixture. The number of peripheral white blood cell (WBC) and mononuclear cell (MNC) was counted after 6 days, the number of colony-unit-mix (CFU-Mix) colony was cultured by methylcellulose micro-culture, and number and percentage of stem cell antigen 1 (Sca-1) cells were counted by flow cytometry. **Result:** The number of peripheral WBC and MNC was higher than pre-treatment, except for control group. The number of WBC was (7.5 ± 0.9) , (9.0 ± 0.6) , (16.1 ± 1.4) , $(19.8 \pm 0.4) \times 10^6/L$ ($P < 0.05$) respectively, while the number of MNC was (4.0 ± 0.7) , (6.6 ± 0.3) , (10.5 ± 0.9) , $(12.6 \pm 1.4) \times 10^6/L$ ($P < 0.05$) respectively. The yields of CFU-Mix were higher than control group. Meanwhile, the percentage of Sca-1⁺ in peripheral blood stem cells was higher than control group, and the percentage was 0.79%, 1.15%, 1.72%, respectively. **Conclusion:** Compound Fufangteng mixture has an obvious mobilizing effect on murine peripheral blood stem cells. The effect of Fufangteng mixture combined with G-CSF is better than single usage of compound Fufangteng mixture or G-CSF.

[**Key words**] compound Fufangteng mixture; peripheral blood stem cell; stem cell mobilization

外周造血干细胞移植(peripheral blood mononuclear cell, PBSCT)是目前研究的热点。利用干细胞动员剂将骨髓中造血干/祖细胞动员到外周血中,可用于治疗多发性骨髓瘤等恶性血液病和非霍奇金淋巴瘤等实体肿瘤^[1]。但目前临床常用的干细胞动员剂,如重组粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF),其所需的动员时间长、剂量大、费用高,一般患者难以承受^[2]。目前研究发现,多种补益类中药如当归、人参、黄芪等单味中药具有动员干细胞的作用^[3-4],但对复方中药的研究较少。复方扶芳藤合剂主要由扶芳藤、红参、黄芪3味药组成,具有益气健脾,补血养心的作用。已有临床和实验证实复方扶芳藤合剂可影响小鼠淋巴系统,增加小鼠脾重,促进淋巴细胞的增殖和分化,使外周血白细胞数量偏低的患者的白细胞数量增高^[5-7]。本研究通过复方扶芳藤合剂对小鼠外周血造血干细胞的影响,探讨复方扶芳藤合剂具有作为干细胞动员剂的可能性。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠,雌雄各半,8~12周龄,体重18~24 g,广西医科大学实验动物中心提供,许可证号桂医动字第2008324号。查随机数字表随机分为4组,每组15只。

1.2 药物、试剂 复方扶芳藤合剂(成分:扶芳藤、黄芪、红参,广西中医学院制药厂提供,国药准字Z45021781);PRMI-1640培养液(广州裕丰生物制品公司);G-CSF(日本麒麟株式会社,批号090724XR);淋巴细胞分离液(广州裕丰生物制品公司,批号010225);甲基纤维素(日本成田株式会社

产品,批号95101);小鼠干细胞抗原-1(Sca-1)试剂盒(包括PE标记抗小鼠Sca-1抗体及其同型对照抗体,美国EBioscience公司,批号UM241109s)。

1.3 仪器 CO₂细胞培养恒温箱(美国Forma Scientific公司);超净工作台(江苏南京医疗设备公司);CKC-TR-2W型倒置相差显微镜(日本奥林巴斯公司产品);血细胞计数板(上海安信光学仪器公司);FACS Calibur流式细胞仪(美国Becton-Dickinson公司)。

2 方法

2.1 给药 实验根据按照2因素1水平的析因分析法进行实验设计。根据随机数字表将60只小鼠随机分为4组,每组15只。空白组:sc生理盐水15 mL,同时生理盐水25 mL·kg⁻¹ig。药物干预组:复方扶芳藤合剂8.25 g·kg⁻¹·d⁻¹ig,同时sc生理盐水25 mL。阳性对照组:sc G-CSF 10 μg·kg⁻¹,同时生理盐水25 mL·kg⁻¹ig。联合用药组:复方扶芳藤合剂8.25 g·kg⁻¹·d⁻¹ig,同时sc G-CSF 10 μg·kg⁻¹,连续用药6 d。

2.2 外周血白细胞(WBC)和单个核细胞(MNC)计数

2.2.1 WBC计数 末次给药后10 h,小鼠摘眼球后取静脉血约1 mL备用,计数小鼠外周血白细胞数。用微量吸管准确吸取眼球后静脉末梢血20 μL,擦去管尖外部余血,将吸管插入小试管中稀释液的底部,轻轻将血放出,并吸取上层清液,洗吸管2次,最后用手摇动试管混合。吸取少许稀释后的血液注入计数池,静置2~3 min,待白细胞下沉,在显微镜下计数白细胞总数。

2.2.2 MNC 计数 小鼠摘眼球后取静脉血,取一块边缘光滑的载片做推片,涂片推好后,迅速在空气中摇晃,使之自然干燥。用特种玻璃铅笔在血膜两侧画两条线,将瑞氏染液滴在血膜上,至染液淹没全部血膜,染 0.5 min 后加等量蒸馏水与染液混合再染 5 min。最后用缓冲液把染液冲掉,吸水纸吸干,自然干燥,观察计数。计数:选择血涂片体尾交界处染色良好的部位在油镜下观察并计数单个核细胞数。连续计数 3 次,每次计数 200 个 WBC,得出 MNC 占 WBC 中的百分比。再根据 WBC 计数结果,求得每升血液中 MNC 的数量。

2.3 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞 小鼠摘眼球后取静脉血约 1 mL,注入含有 0.1 mL 肝素溶液的无菌试管中摇匀,再加入等量 Hank's 液混匀。在室温下取 1 mL 聚蔗糖(Ficoll)-泛影葡胺(Hypaque)分层液置于离心管中,加入时尽量不沾染试管壁。将稀释血液沿管壁小心地缓缓叠加于分层液上,形成清晰界面。稀释血液与分层液的容积比例约 2:1~3:1,2 000 r·min⁻¹离心 20 min。离心后用滴管直接吸出单个核细胞层,置于另一离心管中。加入 4 倍量以上的 Hank's 液,充分混匀,1 000 r·min⁻¹离心 10 min。离心后倾弃上清液,再用 Hank's 液洗 2 次。末次离心后,弃上清,加入含有 10% 小牛血清的 RPMI1640,重悬细胞,制成 MNC 悬浊液。取少量 MNC 悬浊液于血球计数板上,计数 4 个大方格内的细胞总数。

2.4 甲基纤维素微量培养法培养 将上述分离到的 MNC 悬液,调整 MNC 悬液密度至 1×10⁶ 个/mL,采用甲基纤维素微量培养法,严格按顺序加入 2-巯基乙醇 0.1 mL (PRMI-1640 培养液配成 1×10⁻⁴ mol·L⁻¹)、L-谷氨酰胺 0.1 mL (PRMI 1640 培养液配置成 3%)、马血清 0.38 mL、重组人白细胞介素-3 0.1 mL(400 μg·L⁻¹)、重组人红细胞生成素注射液 0.1 mL (经 RPMI-1640 培养液稀释成 10 U·mL⁻¹)、单个核细胞 0.1 mL(1×10⁶ 个/mL)和甲

基纤维素 0.75 mL(培养液配置成 2.7%),RPMI-1640 培养液 0.17 mL,振荡混匀后,将配制的培养体系在 37 ℃ 水浴,保温 10 min。培养体系加入培养板内,每孔 0.2 mL,在 37 ℃,无 CO₂,饱和湿度的条件下培养 7 d,倒置显微镜下计数 CFU-Mix 集落数。

2.5 流式细胞术检测 将分离的 MNC 用 RPMI-1640 洗涤 2 遍,每 100 μL 的 MNC 加入 2 mL 氯化氨溶血素,室温下放置 10 min 溶解样本中的红细胞。用磷酸缓冲溶液(PBS)洗涤细胞后,分成 2 管,1 管为阴性对照,另 1 管加新鲜稀释的 PE 标记的 Sca-1 单抗,混匀,在 4 ℃ 避光条件下孵育 30 min,加 PBS 0.5 mL,上机。用 Winlist 2.0 (verity software House, Topschem, ME) 软件进行分析。用 FSC (Forward Seatter)和 SSC(Side Seatter)建立一个包含所有有核细胞但除外血小板和红细胞的区域,再用 SSC 建立一个只包含 Sca-1 阴性细胞的区域,Sca-1⁺ 细胞的百分比和数目即可被确定。

2.6 统计分析 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件对数据进行统计学处理。数据经单因素方差分析得出,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

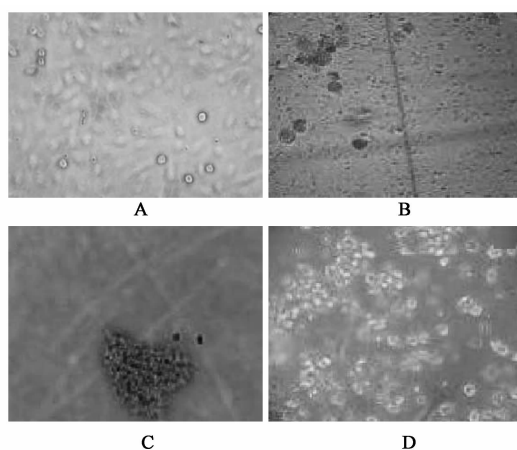
3 结果

3.1 药物干预后各组白细胞、单个核细胞和 CFU-Mix 集落数的比较 实验观察各组药物干预后小鼠外周血 WBC 和 MNC 的变化,以及比较 CFU-Mix 培养后各组的集落数。从表 1 中可以看出,与给予生理盐水的空白组 WBC,MNC 数量比较,其他各组 WBC,MNC 数量均增高,其中,联合用药组增高最多,其次为复方扶方藤合剂组,而复方扶方藤合剂组增高有限($P < 0.05$)。联合用药组与复方扶方藤合剂组,G-CSF 组比有显著差异($P < 0.05$)。CFU-Mix 培养后,联合用药组形成的 CFU-Mix 集落数最多,与 G-CSF 组比,复方扶方藤合剂干预组比 CFU-Mix 数较少,有显著差异($P < 0.05$),而空白组形成的 CFU-Mix 集落数最少($P < 0.01$)。见图 1。

表 1 药物干预后各组白细胞、单个核细胞和 CFU-Mix 集落数量的比较

组别	剂量/g·kg ⁻¹	WBC/10 ⁹ /L	MNC/10 ⁹ /L	CFU-Mix 集落/个
空白	-	7.5 ± 0.9	4.0 ± 0.7	4
G-CSF	1 × 10 ⁻⁸	16.1 ± 1.4 ²⁾	10.5 ± 0.9 ²⁾	16 ²⁾
复方扶方藤合剂	8.25	9.0 ± 0.6 ^{1,3)}	6.6 ± 0.3 ^{1,3)}	9 ^{1,3)}
复方扶方藤合剂 + G-CSF	8.25 + 1 × 10 ⁻⁸	19.8 ± 0.4 ^{1,3,4)}	12.6 ± 1.4 ^{1,3,4)}	19 ^{1,3,4)}

注:与空白组对比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与 G-CSF 对照组对比³⁾ $P < 0.05$;与复方扶方藤合剂干预组对比⁴⁾ $P < 0.05$ 。



A. 空白组;B. 复方扶芳藤合剂 $8.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$;C. sc G-CSF $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$;D. 联合用药组(复方扶芳藤合剂 $8.26 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$,同时 sc G-CSF $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)

图1 甲基纤维素微量培养法所见
CFU-Mix 集落(倒置显微镜, $\times 10$)

3.2 流式细胞仪检测 Sca-1 表达 流式细胞术检测 Sca-1 表达显示:空白组阳性率为 0.45%,复方扶方藤合剂组阳性率为 0.79%,G-CSF 组阳性率为 1.15%,联合用药组阳性率为 1.72%。各组与空白组比 $P < 0.05$;联合用药组与复方扶方藤合剂组和 G-CSF 组比 $P < 0.05$ 。

4 讨论

PBSCT 使接受超大剂量化/放疗的患者输注外周血液中的造血干/祖细胞,重建造血和免疫功能的一种干细胞移植,是治疗多发性骨髓瘤等恶性血液病和非霍奇金淋巴瘤等实体肿瘤的方法^[8]。G-CSF 被称为干细胞动员的“金标准”药,不仅可以用于恶性肿瘤患者,也可用于健康人如干细胞捐献的志愿者。目前临床进行的干细胞动员,都是 G-CSF 为基础,单用或者联用细胞毒性动员剂进行^[9-11]。不过 G-CSF 也存在不足之处,如:所需时间长(一般需要 5~6 d)、剂量大(大于 $500 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$)、费用高,一般患者无法承受,且动员时需定时监测外周血中造血干/祖细胞的数量,外周血干细胞移植的广泛开展有一定的困难。因此部分学者开始转向研究中药,希望从中发现有效的干细胞动员剂。

本实验以既往研究为基础,通过检测外周血白细胞和单个核细胞数量,甲基纤维素微量培养法培

养后行 CFU-Mix 集落计数,流式细胞数检测外周血 Sca-1 细胞数量和百分率,分别从血液学、细胞培养、流式细胞术 3 个层面对复方扶芳藤合剂的干细胞动员作用进行研究,实验结果均已证实复方扶芳藤合剂对小鼠外周血白细胞造血干细胞有动员作用,并作为有效的干细胞动员剂的潜力。

[参考文献]

- [1] Choi H Y, Yong C S, Yoo B K. Plerixafor for stem cell mobilization in patients with non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma [J]. *Annals Pharmacotherapy*, 2010, 44(1): 117.
- [2] Bensinger W, DiPersio J F, McCarty J M. Improving stem cell mobilization strategies: future directions [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2009, 43(3): 181.
- [3] 吴宏,赵俊,王亚平. 人参多糖对小鼠造血干/祖细胞的动员作用 [J]. *重庆医科大学学报*, 2007, 32(6): 581.
- [4] 胡晶,冯敏,杨慧,等. 当归多糖动员的造血干/祖细胞移植重建小鼠造血功能的研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(23): 2236.
- [5] 陆桂祥,黄新风,齐幼龄. 百年乐对肺气虚病人免疫功能及血锌浓度的影响 [J]. *广西中医药*, 1993, 16(2): 47.
- [6] 陈黎. 复方扶芳藤合剂抗大肠癌术后化疗白细胞减少疗效观察 [J]. *广西中医药*, 2001, 24(5): 122.
- [7] 陆桂祥,黄新风. 百年乐对小鼠免疫功能的影响 [J]. *广西中医药*, 1988, 7(1): 17.
- [8] 王小燕,刘健康,森昭康,等. 百年乐对体外自由基清除作用的研究 [J]. *中国老年学杂志*, 1992, 12(4): 236.
- [9] Moldenhauer S, Burgauner M, Hellweg R, et al. Mobilization of $\text{CD133}^+ \text{CD34}^-$ cells in healthy individuals following whole-body acupuncture for spinal cord injuries [J]. *J Neurosci Res*, 2009, 12(22): 132.
- [10] 郑华金,苏毅,邹春华,等. 自体造血干细胞移植治疗恶性血液病 [J]. *西南国防医药*, 1998, 8(6): 321.
- [11] 张进. 造血干细胞动员剂的研究 [J]. *国外医学:输血及血液学分册*, 1985, 8(4): 216.

[责任编辑 聂淑琴]