

肿节风总黄酮对巨核系细胞体外扩增的作用研究

汤喜兰¹, 黄立新², 曾治君¹, 张启云¹, 单义民¹, 徐国良^{1*}

(1. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004;

2. 江西艺术职业学院基础部, 江西 南昌 330013)

[摘要] **目的:**探讨肿节风总黄酮(ZJF-HT)对小鼠骨髓巨核系细胞扩增的影响。**方法:**采用液体培养和半固体集落培养,观察ZJF-HT及其含药血清对成熟巨核细胞及巨核系祖细胞集落扩增的作用。**结果:**与模型组相比,ZJF-HT $\geq 125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 能使成熟巨核细胞数和巨核系祖细胞集落数增多($P < 0.05$);ZJF-HT含药血清在0.39%~6.25%体积浓度范围能增加成熟巨核细胞数,在0.20%~6.25%范围内能显著增加巨核系祖细胞集落数($P < 0.01$)。**结论:**ZJF-HT及其含药血清均能促进巨核系细胞的体外扩增。

[关键词] 肿节风总黄酮;巨核细胞;扩增

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)01-0079-04

[收稿日期] 2009-05-04

[基金项目] 江西省自然科学基金资助项目(0640161)

[通讯作者] * 徐国良, Tel: (0791)7118657; E-mail: xuguoliang6606@126.com

Effects of Flavonoids of *Sarcand glabrain* on the Expansion of Mature Megakaryocytes and Colony Forming Unit-megakaryocyte *in vitro*

TANG Xi-lan¹, HUANG Li-xin², ZENG Zhi-jun¹, ZHANG Qi-yun¹, SHAN Yi-min¹, XU Guo-liang^{1*}

(1. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM (Ministry of Education), Jiangxi

University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. Basis Department, Jiangxi Vocational College of Art, Nanchang 330013, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of the flavonoids of *Sarcand glabrain* (ZJF-HT) on the expansion of mature megakaryocytes and CFU-Meg *in vitro*. **Methods:** Megakaryocytes and megakaryocyte progenitor cells were cultured in liquid and semi-solid colony culture systems respectively. The effects of ZJF-HT and ZJF-HT serum on the expansion of mature megakaryocytes and CFU-Meg were observed. **Results:** ZJF-HT, up to 125 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, could increase the number of mature megakaryocytes and CFU-Meg compared with model group ($P < 0.05$). ZJF-HT serum could significantly increase the number of mature megakaryocytes over the range of 0.39% ~ 6.25% and also significantly promote the formation of CFU-Meg over the range of 0.20% ~ 6.25% (compared with model group, $P < 0.01$). **Conclusions:** Both ZJF-HT and ZJF-HT serum can promote the expansion of mature megakaryocytes and CFU-Meg.

[Key words] flavonoids of *Sarcand glabrain*; megakaryocytes; expansion

血小板减少症以凝血功能障碍、出血为临床特点,主要见于免疫性血小板减少性紫癜(ITP)、骨髓增生异常综合症(MDS)、系统性红斑狼疮(SLE)等疾病^[1]。另外,化疗和放疗的广泛应用可导致患者体内较长时间血小板数减少^[2]。巨核细胞作为血小板的前体细胞,其增殖分化成熟与否直接影响外周血中血小板的数量^[3]。巨核系细胞的增殖分化对于血小板减少症的治疗具有重要意义。

目前,国内外主要采用协同组合促血小板生成素(TPO)、干细胞因子(SCF)、白介素-3,6(IL-3、IL-6)各种细胞因子或骨髓条件培养液、优选最佳来源的造血干/祖细胞以及利用基质细胞的支持作用进行巨核细胞体外扩增研究^[4],而药物作用于巨核系细胞,促进血小板生成方面的报道较少。本室既往研究表明:肿节风分离部位 I(总黄酮)具有提升血小板数的作用,能使 ITP 模型动物的血小板数恢复到正常水平^[5]。本研究采用巨核系细胞液体培养体系和半固体培养体系,探讨肿节风总黄酮(ZJF-HT)及其含药血清对巨核系细胞体外增殖的作用。

1 材料

1.1 实验动物 BALB/C 小鼠,(6~8)周龄,体重(20±2)g,雌、雄不限,由南昌大学医学院实验动物中心提供,合格证号:021-9602。

1.2 药品与试剂 ZJF-HT(纯度为78.53%)、血小板相关抗体(PAIGG,豚鼠抗BALB/C小鼠)和骨髓成纤维细胞无血清条件培养液(F-CM)均为本室制备;IMDM培养基(GIBCO公司产品);牛血清白蛋白(国药集团化学试剂有限公司,批号:F20060119);新生牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所,批号:070331);马血清(HS, Solarbio 产品,批号:90090627);谷氨酰胺(HS, Solarbio 产品,批号:G8203);重组小鼠白介素3(rhIL-3)、重组小鼠干细胞因子(rmSCF)和促血小板生成素(rmTPO)均为英国Peprotech公司产品;碘化乙酰胆碱、 β -巯基乙醇和甲基纤维素(4000 cps)均为美国Sigma公司产品。

2 方法

2.1 F-CM 和 PAIGG 的制备 参考文献^[2,5]制备 F-CM 与 PAIGG,并进行 ELISA 试验检测 PAIGG 效价。

2.2 ZJF-HT 的制备及其含药血清的采集 ZJF-HT 的制备^[5]:取一定量的肿节风(*Herba Sarcandrae*)总浸膏,用水稀释后,再用恒流泵泵入 12-1 大孔吸附树脂柱进行吸附。用水洗柱,洗柱液与吸附时流出液合并为溶液 A。水洗后用乙醇洗脱,收集洗脱液,回收乙醇,干燥得固形物即为香豆素部位。将分离香豆素部位的溶液 A 泵入 HPD400 吸附柱进行吸

附。吸附完毕,用水洗柱,洗柱液与吸附时的流出液合并,干燥得固形物即为多糖部位。HPD400 吸附柱用乙醇洗脱,收集洗脱液,回收乙醇,干燥得固形物即为总黄酮部位。

ZJF-HT 含药血清的采集:根据上述所得的 ZJF-HT,参考文献^[6],加以改进,进行制备和收集 ZJF-HT 含药血清。具体如下: BALB/C 小鼠 20 只,体重(18~22)g,预先饲养 3~5 d,按体重随机分成正常组和给药组。给药组按 390 mg·kg⁻¹(相当于人临床用量的 60 倍)ig ZJF-HT,正常组给予等体积生理盐水,2 次/d,连续 2 d,于第 3 天上午给药后 2 h 股动脉取血,4℃ 静置 3 h,2 000 r·min⁻¹离心 10 min,分别得到 ZJF-HT 含药血清及正常动物血清,用 0.22 μm 微孔滤膜无菌过滤,-20℃ 保存备用。

2.3 小鼠骨髓细胞悬液制备 颈椎脱臼处死小鼠,无菌条件下取股骨和胫骨,用 IMDM 培养液冲出骨髓细胞,经细胞筛过滤,制成单细胞悬液。常规计数单个核细胞数。

2.4 巨核细胞体外液体培养及给药 小鼠骨髓单个核细胞以 1×10⁶ 个·mL⁻¹ 接种于含 5% HS、0.045% 谷氨酰胺、10⁻⁵ mol·L⁻¹ β-巯基乙醇、0.5% 牛血清白蛋白的 IMDM 培养液中。

2.4.1 ZJF-HT 加药 分为 4 组:对照组、二甲基亚砜组、PAIgG 模型组和 ZJF-HT 组。各组均加入 F-CM (30%, V/V)。除对照组外,其余各组均加入 100 倍稀释的 PAIgG。ZJF-HT 组设 4 个剂量浓度(62.5, 125, 250, 500 μg·mL⁻¹)。

2.4.2 ZJF-HT 含药血清加药 分为 4 组:对照组、PAIgG 模型组、正常动物血清组和 ZJF-HT 含药血清组。各组均加入 F-CM (30%, V/V)。除对照组外,其余各组均加入 100 倍稀释的 PAIgG。正常动物血清组和 ZJF-HT 含药血清组均设 6 个体积浓度(0.20, 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25)。

各培养体系加入 24 孔培养板中,每孔加入 1 mL,每组设 3 个复孔,37℃,5% CO₂ 饱和湿度下培养,第 5 天半量换液。半量换液后 2 d 进行乙酰胆碱酯酶染色,显微镜下计数成熟巨核细胞数。

2.5 巨核系祖细胞集落半固体培养及给药 小鼠骨髓单个核细胞以 1×10⁶ 个·mL⁻¹ 接种于含 25% HS、0.9% 甲基纤维素、0.045% 谷氨酰胺、10⁻⁵ mol·L⁻¹ β-巯基乙醇、0.5% 牛血清白蛋白、rmSCF 50 ng·mL⁻¹、rhIL-3 10 ng·mL⁻¹、rmTPO 10 ng·mL⁻¹

的 IMDM 培养液中。ZJF-HT 和 ZJF-HT 含药血清加药分组情况同 2.4。将各培养体系加入 96 孔培养板中,每孔加入 150 μL,每组设 4 个复孔,37℃、5% CO₂、饱和湿度下培养 13 d,乙酰胆碱酯酶染色,显微镜计数,3 个以上大而亮且乙酰胆碱酯酶染色阳性的细胞聚合记为 1 个 CFU-MK 集落。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行方差分析(ANOVA),组间比较采用 LSD 检验。

3 结果

3.1 细胞形态观察 成熟巨核细胞大而亮,折光性好,胞浆和胞核较为明显。乙酰胆碱酯酶染色后的成熟巨核细胞呈棕褐色表达,3 个以上大而亮且乙酰胆碱酯酶染色阳性的细胞聚合为 1 个巨核系祖细胞集落。

3.2 PAIgG 造模 PAIgG 可使巨核细胞数和巨核系祖细胞集落数明显减少(与对照组相比, P < 0.01),成功造成巨核细胞和巨核系祖细胞集落减少模型(见表 1~2)。

3.3 ZJF-HT 对巨核细胞和巨核系祖细胞集落扩增的影响 ZJF-HT 的助溶剂 2.2% 体积浓度的二甲基亚砜对巨核细胞的增殖无明显影响(与模型组相比, P > 0.05)。与 PAIgG 模型组相比, ZJF-HT 浓度为 125~500 μg·mL⁻¹ 时能明显提高成熟巨核细胞的数目(P < 0.05)和促进巨核系祖细胞集落的形成(P < 0.05)(见表 1)。试验结果表明 ZJF-HT 有促进巨核细胞和巨核系祖细胞集落增殖的作用。

表 1 ZJF-HT 对巨核细胞和巨核系祖细胞增殖的影响(x±s, n=3)

组别	ZJF-HT 药物终浓度 (v/v 或 μg·mL ⁻¹)	巨核细胞数 (个)	巨核系祖细胞集 落数(个)
对照	-	31.0±6.6 ²⁾	6.0±0.0 ²⁾
PAIgG 模型	-	17.3±4.5	1.0±0.0
二甲基亚砜	2.2%	17.0±2.0	1.5±0.7
ZJF-HT	62.5	22.7±4.9	2.0±0.0
	125	25.3±2.5 ¹⁾	2.5±0.7 ¹⁾
	250	35.0±5.6 ¹⁾	2.5±0.7 ¹⁾
	500	30.3±0.6 ¹⁾	5.0±0.0 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01(下同)

3.4 ZJF-HT 含药血清对巨核细胞和巨核系祖细胞集落形成的影响 正常动物血清各浓度组整体上对巨核细胞和巨核系祖细胞集落的增殖均无明显影响(与模型组相比, P > 0.05)。ZJF-HT 含药血清体积浓度分别为 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25% 时均能显著促进巨核细胞的增殖(P < 0.01), ZJF-HT 含药血

清体积浓度分别为 0.20, 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25% 时均能显著促进巨核系祖细胞集落的形成 ($P < 0.01$), 增加巨核系祖细胞集落的数目 (见表 2), 试验结果表明 ZJF-HT 含药血清能改善 PAIgG 所致的巨核细胞和巨核系祖细胞减少, 能促进巨核细胞和巨核系祖细胞集落的成熟和分化。

表 2 ZJF-HT 含药血清对巨核细胞和巨核系祖细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	ZJF-HT 含药血清 体积浓度 (v/v)	巨核细胞数 (个)	巨核系祖细胞 集落数 (个)
对照	-	31.0 ± 6.6 ²⁾	6.0 ± 0.0 ²⁾
PAIgG 模型	-	17.3 ± 4.5	1.0 ± 0.0
正常动物血清	0.20	20.0 ± 6.0	1.0 ± 0.0
	0.39	16.0 ± 2.0	1.5 ± 0.7
	0.78	18.3 ± 1.5	2.0 ± 0.0
	1.56	18.3 ± 1.5	1.5 ± 0.7
	3.13	21.3 ± 3.5	1.0 ± 0.0
	6.25	22.0 ± 1.4	4.5 ± 0.7 ¹⁾
ZJF-HT 含药血清	0.20	19.3 ± 1.2	5.0 ± 1.4 ²⁾
	0.39	28.3 ± 4.0 ²⁾	9.5 ± 0.7 ²⁾
	0.78	26.7 ± 6.7 ²⁾	3.5 ± 0.7 ²⁾
	1.56	19.0 ± 2.6	5.5 ± 0.7 ²⁾
	3.13	28.5 ± 10.6 ²⁾	5.0 ± 0.0 ²⁾
	6.25	36.7 ± 2.1 ²⁾	4.5 ± 0.7 ²⁾

4 讨论

持续的血小板减少会增加患者严重出血死亡的可能性, 而反复的血小板输注易导致血小板无效输注及病毒感染等一系列问题。将部分造血干细胞移植进行巨核系细胞体外扩增, 再回输患者体内有望成为治疗血小板减少症的重要途径^[7]。

目前, 合理配伍使用各种细胞因子、优选最佳来源的造血干/祖细胞及利用基质细胞的支持作用来体外扩增巨核细胞已取得一定进展^[4], 但药物对于巨核系细胞的扩增作用研究报道较少。华小黎^[8]报道表明菝葜有效部位能使 ITP 小鼠骨髓巨核细胞数恢复正常, 尤其是产板巨核细胞数显著增多。周敏^[9]报道褪黑素不仅可以促进巨核细胞增殖和分化成熟, 而且可以通过抑制巨核细胞凋亡从而恢复血小板数目。本研究以 PAIgG 建立巨核细胞和巨核系祖细胞集落减少模型为基础, 探讨肿节风总黄酮对巨核系细胞体外扩增的作用。研究结果表明肿节风总黄酮能够促进巨核细胞的增殖和巨核系祖细胞集落的形成。本研究结果提示: ZJF-HT 对巨核系细胞的扩增作用是 ZJF-HT 升血小板的机制之一。

目前, 巨核系细胞的增殖分化调控机理研究尚不深入。近年来, 研究较多的是 TPO/c-MPL 信号转

导系统, 血小板生成素 (TPO) 及其受体 c-MPL 是体内、外调控巨核细胞增殖、分化, 产生血小板的重要因素^[10]。有研究表明 TPO 可能通过刺激巨核细胞中 MAPK, p42/p44, AKT 和 STAT 蛋白的磷酸化^[11], 从而激活和维持巨核细胞的增殖。又有研究表明 Bcl-xL 基因失活或过度表达能够破坏血小板产生^[12]。ZJF-HT 具体是通过何种途径促进巨核系细胞增殖, 值得进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 周巧云, 张晓敏, 鞠文东. 巨核细胞成熟障碍临床分析 [J]. 医学文选, 2003, 22(1): 18.
- [2] 黄艳红, 周小莹, 谭孟群, 等. 骨髓成纤维细胞条件培养液对巨核系细胞体外增殖和血小板体内生成的影响 [J]. 中南大学学报 (医学版), 2005, 30(6): 726-728.
- [3] 程源山, 刘元生, 吴映娥, 等. 血小板内容物 5-羟色胺和血小板反应素-1 对巨核细胞增殖及凋亡的生物学作用 [J]. 血栓与止血学, 2006, 12(2): 53.
- [4] 黄艳红, 王绮如. 巨核细胞体外扩增的研究进展 [J]. 国外医学·生理病理科学与临床分册, 2002, 22(4): 383-385.
- [5] 徐国良, 肖兵华, 陈奇, 等. 肿节风及其分离部位对免疫性血小板减少性紫癜小鼠血小板的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(4): 33-36.
- [6] 陈奇. 中药药效研究思路与方法 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 30-32.
- [7] 李昕, 陈方平, 王光平, 等. 脐血造血细胞体外扩增巨核细胞的研究 [J]. 血栓与止血学, 2004, 10(4): 158.
- [8] 华小黎, 陈东生. 菝葜有效部位对特发性血小板减少性紫癜动物模型的实验研究 [J]. 世界临床药物, 2006, 27(2): 123-125.
- [9] 周敏, 徐西华, 李晓辉, 等. 褪黑素对巨核细胞凋亡的影响及作用机制研究 [J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(18): 1702-1705.
- [10] 廖旭东, 陈兰英. 血小板生成素及其受体的研究进展 [J]. 国外医学输血与血液学分册, 2000, 23(6): 286-289.
- [11] 陈淑萍, 陈慧菁, 叶韵斌, 等. TPO、PDGF、IL-11 在脐血巨核细胞生长和分化中的作用 [J]. 福建医科大学学报, 2006, 40(4): 330-332.
- [12] 张磊, 杨仁池, 卢士红, 等. 抗凋亡蛋白 Bcl-xL 在巨核细胞分化和成熟过程中的作用 [J]. 中国医学科学院学报, 2007, 29(3): 374-378.