

川芎嗪对小鼠外周血造血干细胞动员作用的研究

★ 刘顺根¹ 李邦华^{2*} 张琦³ (1. 南昌大学第二附属医院二部 南昌 330006; 2. 江西省肿瘤医院内五科 南昌 330029; 3. 南昌大学研究生院医学部 2005 级硕士研究生 南昌 330006)

摘要:目的:探讨川芎嗪对小鼠外周血造血干细胞的动员作用及其对小鼠外周血细胞和骨髓基质细胞粘附分子的影响。方法:30 只 BALB/c 小鼠,随机分为 3 组,川芎嗪组($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、rhG-CSF 组($250 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、生理盐水组,腹腔注射 d1~7,每日 1 次,第 8 天,采用外周血 WBC、MNC 计数、流式细胞术、造血祖细胞体外培养、免疫细胞化学等检测各组给药后对外周血 WBC、MNC、CD34⁺ 细胞、CD49d 阳性细胞、CFU-GM、CFU-MK、CFU-E 的产率及小鼠骨髓基质细胞 VCAM-1 阳性细胞百分率的影响。结果:川芎嗪组给药第 7 天外周血 WBC、MNC 数量达到高峰,分别为给药前的 3.2 倍和 3.9 倍;川芎嗪组外周血 CD34⁺、CD49d 阳性细胞及骨髓基质细胞 VCAM-1 阳性细胞百分率分别为 $(0.86 \pm 0.42)\%$ 、 $(12.91 \pm 2.84)\%$ 和 $(48.47 \pm 7.87)\%$,均明显高于生理盐水组($P < 0.05$);川芎嗪组 CFU-GM、CFU-MK 和 CFU-E 产率分别为 $(11.70 \pm 3.23)\%$ 、 $(11.20 \pm 2.88)\%$ 和 $(24.50 \pm 8.10)\%$,均明显高于生理盐水组($P < 0.01$)。结论:川芎嗪对小鼠外周血造血干细胞有一定的动员作用,且这一作用可能与其上调小鼠外周血细胞和骨髓基质细胞粘附分子的表达有关。

关键词:川芎嗪;外周血造血干细胞动员作用;小鼠

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

Mobilization of ligustrazine on peripheral blood hematopoietic stem cells in mice

LIU Shun-gen¹, LI Bang-hua², ZHANG Qi³

1. The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006;
2. The Fifth Department of Medical Oncology, Jiangxi province tumor hospital, Nanchang 330029;
3. Graduate School of Medical Department, Nanchang University, Nanchang 330006

Abstract: Objective: To study ligustrazine for mobilizing peripheral blood hematopoietic stem cells and the effect of its on the expression of adherent molecule of peripheral blood hematopoietic stem cells and bone marrow cells in BALB/c mice. Methods: thirty BALB/c mice were divided into three groups at random ($n = 10$ each); From day 1 to 7, mice were intraperitoneally injected with ligustrazine $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (Group ligustrazine), and rhG-CSF $250 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (Group rhG-CSF) respectively, normal control with equivalence saline. On the eighth day, the effects of the numbers of WBC and MNC, the percentage of CD34⁺ cell and CD49d positive cell and the yields of CFU-GM, CFU-MK, CFU-E in peripheral and the percentage of VCAM-1 positive cells in bone marrow stromal cells of the mice were observed by means of WBC and MNC counts, flow cytometry, hematopoietic cell culture in vitro and immunocytochemistry. Results 7 days after be treated of group ligustrazine, the numbers of WBC and MNC reached the maximum, which were 3.2 times and 3.9 times that of the NS group respectively; the percentage of CD34⁺ cells and CD49d positive cells in peripheral blood and VCAM-1 positive cells in bone marrow stromal cells in group ligustrazine was $(0.86 \pm 0.42)\%$, $(12.91 \pm 2.84)\%$ and $(48.47 \pm 7.87)\%$ respectively, were markedly higher than in NS group ($P < 0.05$); the yields of CFU-GM, CFU-MK and CFU-E in group of tanshinol was $(11.70 \pm 3.23)\%$, $(11.20 \pm 2.88)\%$ and $(24.50 \pm 8.10)\%$ respectively, were markedly higher than in NS group ($P < 0.01$). Conclusion The results indicate that ligustrazine could mobilize hematopoietic stem cells into peripheral blood. And this role may be related to the increase adhesion molecule expression in peripheral blood cells and mouse bone marrow stromal cell.

Key words: ligustrazine; 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得足够数量的 PBHSC 以保证移植成功。川芎为活血化瘀类中药,

川芎嗪为其主要有效成分之一。研究表明川芎嗪对正常或再生障碍性贫血及放、化疗急性损伤的小鼠髓系造血祖细胞的增殖和分化有明显促进作

* 通讯作者:李邦华, E-mail: Llibang@nc.jx.cn

用^[1-5]。本研究以 BALB/c 小鼠为实验动物模型,研究川芎嗪对小鼠 PBHSC 的动员作用,旨在从祖国医学宝库中寻找简便、安全、高效的造血干细胞动员剂,为川芎嗪的临床用药和开发提供理论指导和实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物 清洁级近交系 8~12 周龄 BALB/c 小鼠 30 只,雌、雄各半,体重 18~20 g,由湖北省疾病预防控制中心动物中心提供。

1.2 药物 磷酸川芎嗪注射液(广东利民制药厂产品,批号:060410);重组人粒细胞刺激因子(rhG-CSF)针剂(深圳新鹏投资发展有限公司产品,批号:060820)。

1.3 试剂和仪器 IMDM 培养基、胎牛血清(Hyclone 公司产品);SCF、IL-3、TPO(PeproTechEC 公司产品);EPO(北京四环生物制药有限公司); α -培养液、L-谷氨酰胺、2-巯基乙醇、甲基纤维素,(美国 Sigma 公司产品);FITC 标记的大鼠抗小鼠 CD34 抗体、FITC 标记的大鼠抗小鼠 CD49d(VLA4)抗体、FITC 标记的大鼠 IgG2a(阴性对照)抗体和 CD106(VCAM-1)单克隆抗体(eBioscience 公司产品);SABC 免疫组化染色试剂盒(VECTOR 公司产品);DAB 显色试剂盒(福州迈新生物技术开发公司产品)。流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司产品)。

1.4 分组与处理 将 30 只雌、雄各半 BALB/c 小鼠随机分为 3 组(每组 10 只):生理盐水组、川芎嗪组(50 mg/kg)、rhG-CSF 组(250 μ g/kg);各组均腹腔注射给药,每次 0.2 ml,每天 1 次,连续给药 7 d。

1.5 外周血白细胞(WBC)及有核细胞(MNC)计数 各组于给药后第 2、3、4、5、6、7、8 d 断尾取外周血 20 μ l,用常规方法进行外周血白细胞(WBC)及有核细胞(MNC)计数。观察川芎嗪给药后对外周血 WBC、MNC 影响的时效关系。

1.6 外周血 CD34⁺细胞、CD49d 阳性细胞的检测 第 8 天将小鼠用 1% 戊巴比妥钠 0.3 ml 腹腔注射麻醉,用 5 ml 抗凝注射器,在无菌状态下剖胸直视心脏取血,约 0.8 ml/只。采用 Ficoll-Hypaque 液按常规离心制备外周血单个核细胞(PBMNC),用 PBS 洗涤 2 次后计数,调节 PBMNC 浓度为 1×10^6 /ml,按

常规方法用流式细胞仪分别检测 CD34⁺细胞、CD49d 阳性细胞百分率。

1.7 外周血造血干/祖细胞集落培养和计数 按文献略有改进^[6],CFU-GM 和 CFU-E 培养采用半固体培养体系:27 g/L 甲基纤维素、胎牛血清、0.1 g/ml 去离子牛血清白蛋白(BSA)、3% 谷氨酰胺、IMDM 培养液、每孔 PBMNC 数为 1×10^5 。培养 CFU-GM 时加入 G-CSF,培养 CFU-E 时加入 EPO;CFU-MK 采用血浆凝固块培养体系:27 g/L 甲基纤维素、牛血浆、0.1 g/ml 去离子牛血清白蛋白(BSA)、3% 谷氨酰胺、IMDM 培养液、 α -培养液、IL-3 和 SCF 及 TPO,终浓度均为 20 μ g/L,每孔 PBMNC 数为 2×10^5 ,每孔总体积为 1 ml。所有干/祖细胞培养板均置于 5% CO₂,37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 14 d,在倒置显微镜下计数集落数。CFU-GM 和 CFU-E 判断标准:以细胞计数 >40 个细胞为一个集落,CFU-MK 的判断标准:巨核细胞经乙酰胆碱酯酶染色及苏木精染色后呈黄棕色,以 >3 个乙酰胆碱酯阳性细胞为一个集落。

1.8 骨髓基质细胞 VCAM-1 表达水平的测定 无菌下冲洗小鼠股骨干髓腔取骨髓基质细胞制成基质细胞悬液,调节细胞浓度为 1×10^6 /ml,取 1 ml 接种于放有盖玻片的 24 孔培养板中进行细胞爬片,待基质形成后,取出盖玻片,用 PBS 液轻洗 3 次,加入 4 $^{\circ}$ C 丙酮固定 10 分钟,晾干,采用免疫细胞化学 SABC 法染色后行 DAB 显色。结果判断:细胞膜显棕色为阳性,随机计数 5 个高倍镜($\times 40$)视野中阳性细胞百分率。

1.9 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件包,对数据采用随机分组方差分析多样本均数比较的 LSD-t 检验法进行检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 川芎嗪对小鼠外周血 WBC、MNC 影响的时效关系 川芎嗪组小鼠外周血 WBC、MNC 数量给药 2 d 后开始升高,于第 7 d 达高峰,分别为给药前的 3.2 倍和 4.1 倍,与用药前比较差异有统计学意义($P < 0.01$);川芎嗪组给药第 7 d 与生理盐水组小鼠外周血 WBC、MNC 数量比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果见表 1~2。

表 1 给药后不同时间小鼠外周血 WBC 数量比较($n=10, \bar{x} \pm s, \times 10^9/L$)

组别	第 0 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天	第 8 天
生理盐水组	6.01 \pm 1.21	6.22 \pm 1.03	6.13 \pm 0.96	5.99 \pm 0.72	6.01 \pm 1.21	5.98 \pm 0.97	6.39 \pm 1.08	6.01 \pm 1.24
川芎嗪组	5.72 \pm 1.05	5.94 \pm 0.81	10.19 \pm 1.44	12.22 \pm 1.53	15.45 \pm 1.37	16.48 \pm 1.08	19.19 \pm 1.21	15.76 \pm 1.16
G-CSF 组	6.20 \pm 1.09	10.05 \pm 1.19	15.19 \pm 1.80	18.87 \pm 1.31	20.67 \pm 1.73	21.78 \pm 2.49	24.63 \pm 3.93	23.59 \pm 4.13

表2 给药后不同时间小鼠外周血MNC数量比较($n=10, \bar{x} \pm s, \times 10^9/L$)

组别	第0天	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天	第7天	第8天
生理盐水组	4.10 ± 1.00	4.49 ± 0.82	4.35 ± 0.99	4.49 ± 0.71	3.71 ± 1.01	3.86 ± 0.75	4.37 ± 0.53	4.33 ± 0.93
川芎嗪组	3.4 ± 0.87	3.96 ± 0.58	7.52 ± 1.44	8.92 ± 1.55	11.86 ± 1.01	12.63 ± 1.37	14.41 ± 1.15	12.15 ± 1.28
G-CSF组	4.03 ± 1.17	6.96 ± 1.01	11.56 ± 1.54	14.50 ± 1.54	15.87 ± 1.38	17.41 ± 1.77	20.13 ± 2.82	18.7 ± 3.26

2.2 川芎嗪对小鼠外周血 CD34⁺细胞和 CD49d 阳性细胞的影响 流式细胞术检测表明川芎嗪组小鼠外周血 CD34⁺细胞和 CD49d 阳性细胞百分率明显高于 NS 组(P 值分别为 0.046 和 0.007, 均小于 0.05); 川芎嗪组与 rhG-CSF 组小鼠外周血 CD34⁺细胞和 CD49d 阳性细胞百分率比较差异有非常显著性($P < 0.01$)。结果见表 3。图 1~3 分别为 NS 组、川芎嗪组和 rhG-CSF 组 CD34⁺细胞流式图, 图 4~6 分别为 NS 组、川芎嗪组和 rhG-CSF 组 CD49d 阳性细胞流式图。

表3 给药后对小鼠外周血 CD34⁺、CD49d 及骨髓基质细胞 VCAM-1 表达的影响($n=10, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	CD34 ⁺ (%)	CD49d ⁺ (%)	VCAM-1(%)
NS组	0.21 ± 0.10	4.94 ± 1.92	31.23 ± 9.36
川芎嗪组	0.86 ± 0.42 [△]	18.02 ± 1.84 [△]	48.47 ± 7.87 [*]
rhG-CSF组	3.16 ± 1.32 [□]	22.81 ± 8.92 [□]	71.60 ± 9.44 [□]

注:与 NS 组比较: * $P < 0.01$; [△] $P < 0.05$; 与 NS 组、川芎嗪组比较: [□] $P < 0.01$

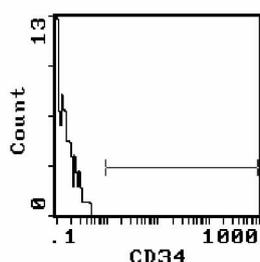


图1 NS组

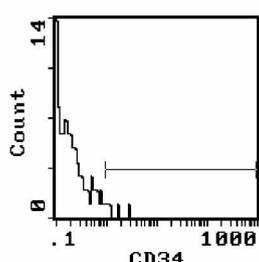


图2 川芎嗪组

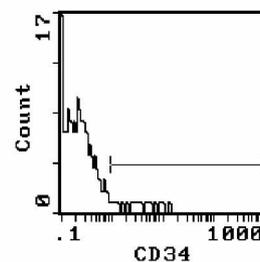


图3 rhG-CSF组

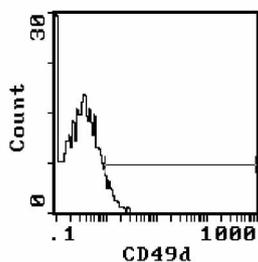


图4 NS组

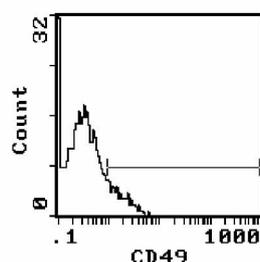


图5 川芎嗪组

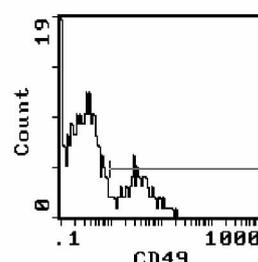


图6 rhG-CSF组

2.3 川芎嗪对小鼠骨髓基质细胞 VCAM-1 表达影响 免疫细胞化学法对基质细胞表面 VCAM-1 抗原检测发现:川芎嗪组小鼠骨髓基质细胞 VCAM-1 阳性细胞数量明显比 NS 组多;计数 200 个细胞中阳性细胞的数量,计数百分率,进行比较发现:川芎嗪组小鼠骨髓基质细胞 VCAM-1 阳性细胞百分率明显高于 NS 组($P < 0.05$)。结果见表 3。图 7~9 分别为阴性对照、川芎嗪组和阳性对照骨髓基质细胞 VCAM-1 阳性细胞免疫细胞化学染色图。



图7 NS组(阴性对照) × 100

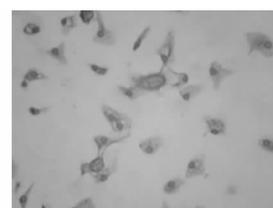


图8 川芎嗪组 × 100

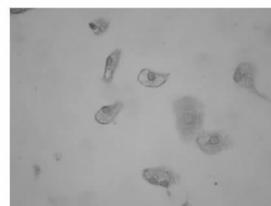


图9 阳性对照组 × 100

2.4 川芎嗪对小鼠外周血 CFU-GM、CFU-MK、CFU-E 集落产率的影响 CFU-GM、CFU-MK 和 CFU-E 集落培养显示川芎嗪组 CFU-GM、CFU-MK 和 CFU-E 集落产率明显高于 NS 组($P < 0.01$),但明显低于 rhG-CSF 组($P < 0.01$)。结果见表 4。

表4 川芎嗪对小鼠外周血 CFU-GM、CFU-MK、CFU-E 集落产率的影响($n=10, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	CFU-GM	CFU-MK	CFU-E
NS组	1.5 ± 1.27	0.80 ± 1.03	0.40 ± 0.52
川芎嗪组	11.70 ± 3.23 [*]	11.20 ± 2.88 [*]	24.50 ± 8.10
rhG-CSF组	53.10 ± 9.63 [△]	20.40 ± 5.36 [△]	128.5 ± 28.19 [△]

与 NS 组比较: * $P < 0.01$; 与 NS 组、川芎嗪组比较: [△] $P < 0.01$ 。

3 讨论

川芎为活血化瘀类中药,川芎嗪为其主要有效成分之一。既往研究表明含川芎嗪的复方活血汤及单药能对再生障碍性贫血及放、化疗急性损伤的小鼠骨髓有修复作用^[1~3],能增加再障小鼠及放疗急性损伤的小鼠骨髓造血细胞的 VLA4、VLA5 及基质

细胞 VCAM-1 的表达来调节血细胞的生成^[4-5]。但目前未见川芎嗪对小鼠外周血干细胞动员作用的研究。

外周血 WBC 计数、流式细胞仪检测 CD34⁺ 细胞百分率及干/祖细胞集落计数是观察 PBHSC 动员效果的有效手段。本实验表明, 给药后川芎嗪组小鼠外周血 WBC 计数及外周血 CD34⁺ 细胞百分率与 NS 组相比均明显增加; 川芎嗪组 CFU-GM、CFU-MK 集落产率均明显高于 NS 组, 但川芎嗪组与 rhG-CSF 组相比外周血 WBC 计数、CD34⁺ 细胞百分率及干/祖细胞集落计数比较均有非常显著差异。可证明川芎嗪对小鼠外周血干细胞有一定的动员作用, 但其动员效果仍不如 rhG-CSF。

基质细胞与造血细胞的直接连接有传递转换信息分子的作用, 此种连接是通过基质细胞与造血细胞表面的粘附分子实现的, 在众多的干细胞表面粘附分子中, VLA-4 (CD49d) 是介导干细胞与骨髓粘附的最重要受体, 它通过与 VCAM-1、Fn 的结合介导干细胞与骨髓微环境的粘附, 直接参与红系、B 淋巴系的分化, 并有利于骨髓造血细胞的增殖, 90% 以上的 CD34⁺ 细胞都表达 VLA-4^[7]。VCAM-1 表达于骨髓微环境网状纤维细胞和骨髓微血管内皮细胞上。VCAM-1 在调节造血中有重要作用, 参与造血细胞与基质细胞形成聚集体, 有利于造血细胞增殖、分化^[8]。本研究结果表明川芎嗪可显著增强小鼠造血干细胞 CD49d 的表达, 同时增加基质细胞 VCAM-1 的表达, 说明川芎嗪有可能通过作用于造

血细胞和基质细胞, 提高粘附分子受体受体和粘附分子配体表达, 从而加强基质细胞与造血细胞相互作用, 促进骨髓造血细胞的增生, 参与造血干细胞动员的过程。

参考文献

[1] 舒砚秋, 孙汉英, 刘文励, 等. 复方活血汤对免疫诱导再生障碍性贫血小鼠骨髓微环境的作用研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(6): 359-361.

[2] 刘文励, 孙汉英, 路武, 等. 活血化淤中药对受照小鼠骨髓微环境及其供氧的作用[J]. 中华放射医学与防护杂志, 1997, 17(5): 341-342.

[3] 孙汉英, 董凌莉, 刘文励, 等. 复方活血汤对再生障碍性贫血小鼠骨髓造血细胞黏附分子及细胞周期蛋白表达作用[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(2): 100-102.

[4] 舒砚秋, 孙汉英, 董凌莉, 等. 川芎嗪对免疫介导再生障碍性贫血小鼠骨髓细胞 CD34 抗原表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(2): 107-108.

[5] 董凌莉, 刘文励, 孙汉英, 等. 川芎嗪对再生障碍性贫血小鼠骨髓细胞粘附分子作用研究[J]. 中华血液学杂志, 1999, 20(4): 178-179.

[6] 刘秀珍. 造血细胞培养技术实验手册[M]. 北京: 北京出版社, 1993: 25-127.

[7] Clulombel L, Auffray I, Gaugler MH, et al. Expression and function of integrins on hematopoietic progenitor cells[J]. Acta haematol, 1997, 97(1-2): 13-21.

[8] Oostendorp RA, Reisbach G, Spitzer E, et al. VLA-4 and VCAM-1 are the principal adhesion molecules involved in the interaction between blast colony forming cells and bone marrow stromal cells[J]. Br J Haematol, 1995, 91(2): 275-284.

(收稿日期: 2008-10-15)

母校江西中医学院五十华诞感赋

何顺华* (江西省樟树市中医院 樟树 331200)

校庆春光朗, 江中景簇欣。
 黉门迎砚友, 相见感言真。
 梦剪西窗烛, 情连赤子心。
 崇知明旧说, 重教拓新程。
 桃李香中外, 绩勋耀古今。
 母校与时进, 吾侪安步停?
 路遥肩任重, 催马奋蹄奔!

己丑年仲春

* 作者系江西中医学院 67 届本科毕业生。