

基于对造血细胞增殖影响的地榆鞣质和皂苷升白效应研究

熊永爱¹, 王芳², 杨明^{1*}

¹ 遵义医学院药学院, 遵义 563003; ² 江西中医学院中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004

摘要: 从体外造血细胞干预角度研究地榆鞣质和皂苷升高白细胞的靶细胞基础。分别分离纯化小鼠造血干/祖细胞(HSPCs)和粒细胞(Granulocytes), 用地榆鞣质和皂苷组分进行交叉干预, 通过观察对HSPCs和Granulocytes增殖的影响, 从体外角度考察两种有效组分对造血两个关键环节的影响。地榆鞣质的靶细胞主要集中在HSPCs, 其升白效应的产生可能是通过促进HSPCs的增殖分化增加下游骨髓样干细胞的数量; 地榆皂苷的靶细胞则集中在Granulocyte, 其升白效应的产生可能是通过促进骨髓样干细胞向Granulocyte的增殖分化, 从而增加白细胞的数量。地榆升高白细胞作用是鞣质和皂苷分别作用于HSPCs和Granulocyte而产生的综合效应。

关键词: 地榆鞣质; 地榆皂苷; 造血干/祖细胞; 粒细胞; 增殖

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.S.027

Sanguisorba Tannins and Saponins Rise White Blood Cells based on the Effect of Proliferation of Hematopoietic Cells

XIONG Yong-ai¹, WANG Fang², YANG Ming^{2*}

¹ Pharmaceutical College, Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China; ² Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Key Lab. of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Nanchang 330004, China

Abstract: To study the sanguisorba tannins and saponins rising white blood cells based on the effect of proliferation of hematopoietic cells. Mice HSPCs and granulocyte were isolated and purified, after be intervened by Sanguisorba Tannins and Saponins, the proliferation of HSPCs and Granulocyte were observed. HSPCs were main target cells of Sanguisorba Tannins, it might be to increase WBC via accelerating the proliferation and differentiation of HSPCs, further promoting myeloid stem cell numbers. While the Granulocyte were main target cells of Sanguisorba Saponins. It might be to increase WBC via accelerating the proliferation and differentiation of myeloid stem cells into Granulocyte. Sanguisorba raised white blood cell could be a combined effect of sanguisorba tannins and saponins acting on HSPCs and Granulocyte.

Key words: sanguisorba tannins; sanguisorba saponins; HSPCs; granulocytes; proliferation

放化疗作为临床肿瘤治疗的主要方式, 其侵袭性和严重的细胞毒作用历来备受关注, 骨髓抑制就是其中之一。放化疗和许多其它抗肿瘤治疗方法, 都是针对生长活跃的细胞^[1]。而血流里的红细胞和白细胞都源于骨髓中的造血干细胞, 作为血细胞前体的干细胞, 生命力很旺盛但也很脆弱, 很容易被放化疗造成不可逆性损伤。因此, 造血干细胞损伤是骨髓抑制的生理基础。常用化疗药物中, 烷化剂(环磷酰胺、氮芥等)和鬼臼毒素(VP16)等药物的骨髓抑制作用较强^[2]。化疗药物可作用于癌细胞增殖周期的不同环节, 抑制DNA分裂增殖能力, 从

而起到对肿瘤的治疗作用。但由于化疗药物缺乏选择性, 在杀死大量肿瘤细胞的同时亦可杀死不少正常骨髓细胞, 尤其是对粒细胞系影响最大, 从而出现骨髓抑制, 见白细胞减少, 甚则全血细胞减少。

前期研究表明, 地榆鞣质和皂苷是地榆保髓升白的物质基础, 其活性作用主要体现在对外周血白细胞数量降低、骨髓DNA含量减少有良好的保护作用^[3-5]。从白细胞产生的生理过程来看, 白细胞升高的关键基础在于机体的造血机能, 白细胞生成主要有两个环节, 第一个环节是造血干细胞分化成集落形成单位细胞(骨髓样干细胞); 第二个环节是骨髓样干细胞分化成粒系定向干细胞(以中性粒细胞为主)。地榆鞣质和皂苷可能作用于不同的环节, 产生升白效应。为揭示鞣质和皂苷升高白细胞的作用机理, 本实验从体内外造血细胞干预, 从骨髓HSPCs

收稿日期: 2016-07-07 接受日期: 2016-11-22

基金项目: 国家自然科学基金(81373976); 国家科技重大新药创制专项(2013ZX09103002-013)

* 通信作者 E-mail: 574825214@qq.com

保护的作用机理为切入点,探索地榆鞣质和皂苷升高白细胞的作用靶点和二者协同增效作用机制。

1 实验材料

1.1 实验动物

C57BL/6 小鼠, SPF 级, 体重 20 ~ 25 g, 由成都达硕生物科技有限公司提供, 实验动物质量合格证号: scxkc(111)2008-24。

1.2 仪器

MiniMACS 分离器及 MS 分离柱, 购自 MiltenyiBiotec 公司; 三目生物显微镜, 型号: CX31, Olympus 公司生产; CO₂ 细胞恒温培养箱, 型号: FORMA-311, 美国 ThermoFisher 公司生产; 超净工作台, 型号: Heraguard ECO, 美国 Thermo Fisher 公司生产; 流式细胞仪, 型号: COULTER EPICS-XL, 美国 Coulter 公司生产; 多功能酶标仪: MK3 型, 美国 ThermoFisher 仪器有限公司生产; 低温离心机, 型号: S400-RT33D-E10FF, 美国 ThermoFisher 公司生产; 无菌培养皿、培养板, 美国 ThermoFisher 公司生产; 可调移液器: 5、10、20、500、1000 μ L 型, 美国 ThermoFisher 公司生产。

1.3 试剂

Percoll 分离液, 批号: P1644, 购自 sigma 公司生; 小鼠 CD34⁺ Sca 1⁺ 抗体(批号: ST012)、CD5 抗体(批号: LY-1)、CD45 抗体(批号: B220)、CD116 抗体(批号: Mac-1)、Gr-1 抗体(批号: Mye141)、Ter119 抗体(批号: DT172), 均购自 Sciencell 公司生; CD34-PE 磁珠试剂盒、抗生物素磁珠, 购自 MiltenyiBiotec 公司、Am-Blue 细胞活力检测试剂盒, 批号: SAB08001, 购自美国 Sciencell 公司; 无菌 DMSO, 批号 D1320, 购自 sigma 公司生; PBS 液, 批号 T023, 购自美国 Sciencell 公司; RPMI1640 培养基, 批号: 33210D, 购自美国 Sciencell 公司; 胎牛血清, 批号: K6201, 购自美国 Sciencell 公司; 链霉素、青霉素: 江苏恒瑞制药有限公司生产。

2 实验方法

2.1 小鼠造血细胞的分离纯化

2.1.1 小鼠骨髓造血干/祖细胞(HSPCs)的分离纯化^[6-8]

2.1.1.1 小鼠骨髓细胞的收集

小鼠眼眶取血, 用装有 EDTA 抗凝剂的 2.0 mL EP 管收集。断颈处死后分离出股骨和胫骨, 用无菌

PBS(含 2% FBS)冲洗骨髓腔, 100 μ m 无菌滤头过滤, 滤液于 1500 rpm 离心 10 min, 收集沉淀。所得沉淀用适量红细胞裂解液于 37 $^{\circ}$ C 裂解 4 min, 裂解体系于 1500 rpm 离心 10 min 后弃去上清液, 沉淀再用适量 PBS 液吹打悬浮至每毫升含有 $5 \times 10^7 \sim 8 \times 10^7$ 个细胞。所得细胞悬液按 50 μ L/1 mL 体积比加入胎牛血清, 4 $^{\circ}$ C 孵育备用。

2.1.1.2 免疫标记

取骨髓细胞悬液, 按 10 μ L/1 mL 体积比例加入混合抗体(CD5、CD45、CD116、Gr-1、和 Ter119), 用移液枪吹打混匀后 4 $^{\circ}$ C 孵育 15 min; 加 PBS(2% FBS)洗涤, 1200 rpm 离心 10 min, 去掉上清液。沉淀再用适量 PBS 液吹打悬浮至每毫升含有 $5 \times 10^7 \sim 8 \times 10^7$ 个细胞, 所得细胞悬液按 100 μ L/1 mL 体积比加入抗体聚合物, 4 $^{\circ}$ C 孵育 15 min, 再按 60 μ L/1 mL 体积比加入磁性胶体, 4 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。

2.1.1.3 免疫磁性分离

将免疫标记的骨髓细胞悬液转移至 MACS 系统中过 Stemsep 分离柱分离, 收集分离流出的骨髓细胞, 用细胞计数板进行计数。

2.1.1.4 流式细胞分析

取 MACS 系统分离富集的 HSPCs 细胞, 置于 5 mL 小试管中, CD34⁺ Sca 1⁺ 抗体染色, 平行 2 份。4 $^{\circ}$ C 避光孵育 45 min, 加入 3 mL PBS 洗涤 2 ~ 3 次, 2000 rpm 离心 5 min, 弃上清液。加入 0.5 mL 细胞固定液(浓度为 1% 的多聚甲醛)后用流式细胞仪检测分析。

2.1.1.5 HSPCs 细胞活力检测

取 MACS 系统分离富集的 HSPCs 细胞, 用 0.5% 的台盼蓝染色后进行显微计数, 计算 HSPCs 细胞活力(染色阴性细胞数/100 个细胞 \times 100%)。

2.1.2 小鼠粒细胞(Granulocyte)的分离鉴定^[9,10]

2.1.2.1 Granulocyte 的分离纯化(Percoll 非连续密度梯度离心法)

取 EDTA 抗凝的小鼠血液, 用无菌 PBS 液 1:1 稀释, 加入适量淋巴细胞分离液后 1500 rpm 离心 20 min。所得白膜层用等体积红细胞裂解液于 37 $^{\circ}$ C 裂解 20 min, 1500 rpm 离心 20 min 得粗提 Granulocyte。向粗提物中加入适量 75% 和 60% 密度混合梯度 Percoll 液, 1200 rpm 离心 15 min 使体系分层, 纯化的 Granulocyte 位于取 75% 和 60% Percoll 液界面之间。小心吸取后用 PBS 液去除粘余的 Percoll 胶粒。

2.1.2.2 Granulocyte 细胞活力测定

取分离富集的 Granulocyte 细胞,用 0.5% 的台盼蓝染色后进行显微计数,计算 HSPCs 细胞活力(染色阴性细胞数/100 个细胞 \times 100%)。

2.1.2.3 Granulocyte 细胞纯度鉴定

取分离富集的 Granulocyte 细胞,瑞氏吉姆染色后于显微镜下观察细胞着色情况,并对细胞纯度进行检测。

2.2 鞣质和皂苷组分对造血细胞增殖分化的影响

2.2.1 HSPCs 接种及加样

按 1.2.1 中方法分离富集小鼠 HSPCs,加入 10% FBS 的无酚红 1640 培养基制成细胞悬液,并稀释细胞浓度至 4×10^4 个/mL 接种到 96 孔培养板,每孔 200 μ L,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的孵箱中培养。

培养过夜后,按受试药物将细胞分为两大组,分别为地榆鞣质组和地榆皂苷组,两组细胞分别加入 5、10、20、40、80、160 μ M 的地榆鞣质和地榆皂苷,每个浓度平行 10 孔;同时设置空白对照组和空白溶剂组,空白对照组加入等体积空白培养基,空白溶剂组加入 5% 的 DMSO 溶液。药物处理后的细胞在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的条件下继续培养 24 h。

2.2.2 Granulocyte 接种及加样

按 1.2.1 中方法制备收集小鼠全血 Granulocyte,加入 10% FBS 的无酚红 1640 培养基制成细胞悬液,并稀释细胞浓度至 4×10^4 个/mL 接种到 96 孔培养板,每孔 200 μ L,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的孵箱中培养。

培养过夜后,按受试药物将细胞分为两大组,分别为地榆鞣质组和地榆皂苷组,两组细胞分别加入

5、10、20、40、80、160 μ M 的地榆鞣质和地榆皂苷,每个浓度平行 10 孔。同时设置空白对照组和空白溶剂组,空白对照组加入等体积空白培养基,空白溶剂组加入 5% 的 DMSO 溶液。药物处理后的细胞在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的条件下继续培养 24 h。

2.2.3 细胞增殖率检测^[11]

(1) 细胞培养满 24 h 后每孔加入 10 μ L Am-Blue 细胞增殖与活性检测试剂,并于培养箱中孵育 4 h。

(2) 当培养基的颜色由靛青蓝变成粉红色后用荧光酶标仪测定各孔相对荧光单位(RFU 值),激发光波长 560 nm,发射光波长 590 nm。根据所测得的 RFU 值,计算造血细胞增殖率。

3 实验结果

3.1 HSPCs 分离鉴定结果

3.1.1 骨髓细胞计数

从每个 6 周龄、重 20 ~ 25 g C57BL/6 小鼠的胫骨和股骨骨髓可收集约 $(3.6 \pm 0.26) \times 10^7$ 个骨髓细胞。

3.1.2 MACS 分选造血干细胞

MACS 可富集约 $(1.3 \pm 0.3) \times 10^5$ 个 HSPCs。

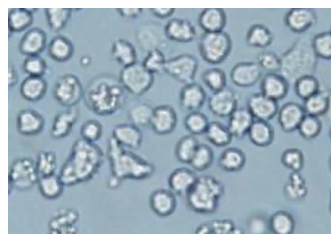


图 1 HSPCs 显微图片 (\times 400)

Fig. 1 Micrograph of HSPCs (\times 400)

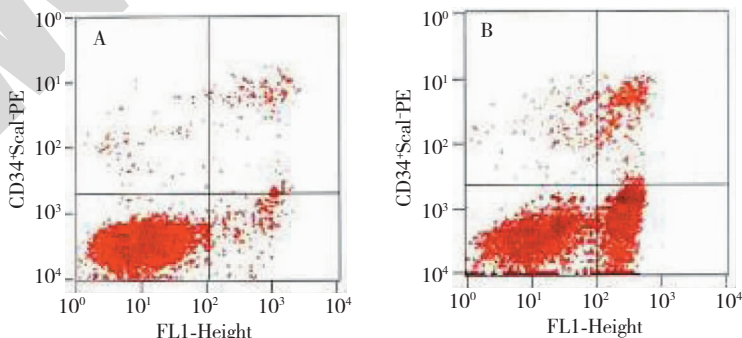


图 2 HSPCs 流式细胞检测图片

Fig. 2 Pictures of HSPCs detected by flow cytometry

注:A:纯化前 CD34⁺Scal⁺ 流式细胞检测图片;B:纯化后 CD34⁺Scal⁺ 流式细胞检测图片

Note:A: before purification; B: After purification

3.1.3 HSPCs 纯度检测结果

流式细胞仪检测证实,免疫磁珠纯化前,CD34⁺Scal⁺阳性细胞纯度为(36.54 ± 3.28)%,纯化后CD34⁺Scal⁺阳性细胞纯度为(92.54 ± 4.26)%。HSPCs 流式细胞仪检测结果见图2。

3.1.4 细胞活力测定结果

将分离的 HSPCs 经台盼蓝染色后在显微镜下观察,经检测和计算,HSPCs 的回收率为 87.5%,细胞活力为(95.8 ± 5.29)%。

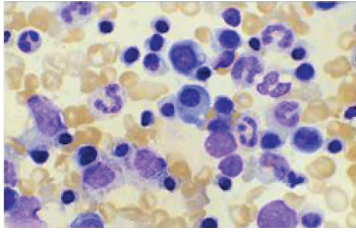


图3 HSPCs 台盼蓝染色图片(×200倍)

Fig. 3 Picture of HSPCs stained by trypan blue (×200)

3.2 Granulocytes 分离鉴定结果

3.2.1 Percoll 非连续密度梯度离心法分选 Granulocytes

Percoll 非连续密度梯度离心法可富集约(2.4 ± 0.17) × 10⁶ 个 Granulocyte,其细胞显微形态见图4。

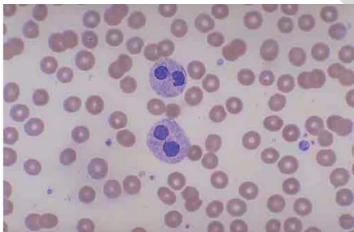


图4 Granulocytes 显微图片(×200倍)

Fig. 4 Micrograph of Granulocytes (×200)

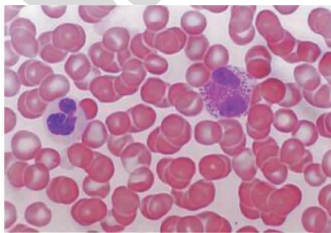


图5 Granulocytes 瑞氏染色图片(×400倍)

Fig. 5 Picture of Granulocytes stained by wright (×400)

3.2.2 Granulocytes 纯度检测结果

采用瑞氏-姬母染色 Granulocyte,显微镜下观察

可见 Granulocyte 呈紫红色,多数核呈分叶状态,对平行分离的结果进行统计学分析,Percoll 非连续密度梯度离心法分离的粒细胞纯度达 95%。Granulocyte 瑞氏染色涂片见图5。

3.2.3 细胞活力测定结果

将分离的 Granulocyte 经台盼蓝染色后在显微镜下观察,经检测和计算,Granulocyte 的细胞活力为(96.4 ± 4.26)%。Granulocyte 台盼蓝染色涂片见图6。

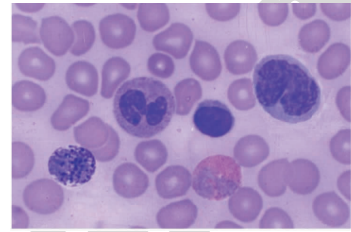


图6 Granulocytes 台盼蓝染色图片(×400倍)

Fig. 6 Picture of Granulocytes stained by trypan blue (×400)

3.3 对造血细胞增殖分化的影响

3.3.1 对 HSPCs 增殖率的影响

如图7所示,地榆鞣质 10、20、40、80 μM 组 HSPCs 的增殖率显著高于空白对照组($P < 0.05$),但 160 μM 表现出一定的抑制作用。地榆皂苷 20 和 40 μM 组表现出一定的促增殖作用,但与空白组比较无显著差异。DMSO 组与空白组比较无统计学意义,可以排除空白溶剂的干扰。该实验表明,地榆鞣质对 HSPCs 具有明显的促增殖分化作用,地榆皂苷未表现出明显活力。

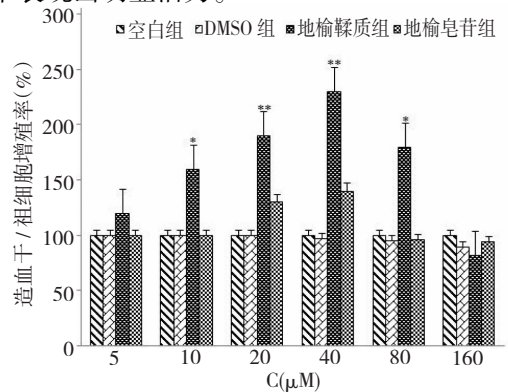


图7 地榆鞣质/皂苷对 HSPCs 增殖分化的影响

Fig. 7 Effect of Sanguisorba Tannins/Saponins on proliferation and differentiation of HSPCs

注:与空白组比较, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

Note: compared with blank, * $P < 0.01$, * $P < 0.05$

3.3.2 对 Granulocytes 增殖率的影响

如图 8 所示,地榆皂苷 10、20、40、80 μM 组 Granulocytes 的增殖率显著高于空白对照组 ($P < 0.05$)。地榆鞣质对 Granulocytes 未表现出促增殖效应,DMSO 组与空白组比较无统计学意义,可以排除空白溶剂的干扰。该实验表明,地榆皂苷对 Granulocytes 具有明显的促增殖分化作用,地榆鞣质未表现出明显活力。

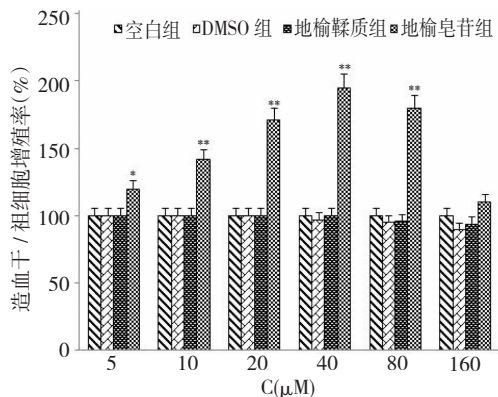


图 8 地榆鞣质/皂苷对 Granulocytes 增殖分化的影响

Fig. 8 Effect of Sanguisorba Tannins/Saponins on proliferation and differentiation of Granulocytes

注:与空白组比较, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

Note: compared with blank, * $P < 0.01$, * $P < 0.05$

4 小结与讨论

小鼠 HSPCs 的表面标志有 CD34、Thy-1、C-kit 抗原及鼠类特有的 Scal-1、Scal-2 等表面抗原^[12],其中 CD34 和抗原广泛存在于人、鼠、犬的造 HSPCs 表面,是目前临床衡量 HSPCs 质与量较好的标志^[13]。目前应用最多的是生物素-亲和素免疫亲和柱层析系统(Ceprate 系统)和免疫磁珠分离系统(MACS 系统)。MACS 法是将单个核细胞与 CD34、Scal 等单抗孵育,使 CD34⁺、Scal⁺ 等细胞被 CD34、Scal 等单抗标记,然后再与包被磁珠微粒来源于羊或兔的 IgG 二抗孵育,通过磁场作用将 CD34⁺、Scal⁺ 等细胞分离^[14]。Kruger 等^[15]对比了 MiniMACS 和 Ceprate-LC 对人 CD34⁺ 细胞的纯化能力,显示 MiniMACS 在净化肿瘤细胞、体外 T 细胞、提高产品 CD34⁺ 细胞纯度上优于 Ceprate-LC。本实验采用 MiniMACS 纯化小鼠 CD34⁺ Scal⁺ HSPCs 是因为 MiniMACS 系统本身所具有的优点以及表达 CD34⁺ Scal⁺ 分子的人、鼠的 HSPCs 功能相似,结果显示可以获得高纯度 CD34⁺ Scal⁺ 细胞,且细胞活力不受

影响。目前 HSPCs 的体外扩增与诱导分化调控机理已经基本阐明,这为我们研究 CTX 诱导 HSPCs 凋亡的机理提供了重要的技术支持。

本实验在 Granulocyte 分离过程中,采用血浆替代生理盐水稀释高密度 Percoll 液,并通过配制不同浓度的 Percoll 液,最大限度地减少 Percoll 液对细胞的影响。中性粒细胞的分离通常采用 1.077 和 1.090 两种密度的 percoll 液,比重较轻的 percoll 液可以将血小板、淋巴细胞和单核细胞分离到上层,而比重较大的 percoll 液可将红细胞和嗜酸性粒细胞沉到下层,Granulocyte 则在两层 percoll 液之间。同时,在分离过程中分离时间和洗涤时间都要求尽可能地短。配制 Percoll 液密度梯度的时候应充分混匀,以防止由于密度不均匀而影响分离效果。同时,在配制 Percoll 梯度密度液的时候还应该注意要让 Percoll 液恢复至室温再配制。在移出上清液的时候,应选择量程较小的移液器,并且使吸头尽量贴着试管壁,从溶液的最上端慢慢向下吸取,吸头最好刚刚接触液面,以防止破坏分层。本实验采用 Percoll 非连续密度梯度离心法分离纯化小鼠全血中的 Granulocyte,结果显示可以获得高纯度的 Granulocyte 细胞,且细胞活力不受影响。

本实验研究显示,地榆升高白细胞作用是鞣质和皂苷共同作用的综合效应,二者均具有升白活性,但二者发挥作用的侧重点各有不同,地榆鞣质的靶细胞主要集中在 HSPCs,其升白效应的产生可能是通过促进 HSPCs 的增殖分化增加下游骨髓干细胞的数量,即促进祖系向髓系变化。地榆皂苷的靶细胞则集中在骨髓样干细胞和粒细胞群,其升白效应的产生可能是通过促进骨髓样干细胞向粒细胞的增殖分化,从而增加白细胞的数量,即髓系向粒系的变化。但二者协同增效的作用机制尚待进一步研究。

参考文献

- 1 Davey D, Jeffrey C. Myelotoxicity from chemotherapy. *Seminars in Oncology*, 2006, 33(2): 74-85.
- 2 Khuri FR. Weighing the hazards of erythropoiesis stimulation in patients with cancer. *N Engl J Med*, 2007, 356: 2445-2448.
- 3 Xiong YA, Yu QN, Yang M. Protective effects of sanguisorba tannins on myelosuppression mice. *Chin Herbal Med*, 2014, 6: 222-227.