

天山雪莲细胞培养物多糖对免疫介导的再生障碍性贫血模型小鼠的治疗作用研究

袁绍鹏 陈日道 史 记 白金叶 玄玲玲 戴均贵 侯 琦

摘 要 **目的** 研究并探讨天山雪莲细胞培养物多糖对治疗再生障碍性贫血 (AA) 的疗效。**方法** BALB/c 小鼠, 随机分为 4 组: ①正常对照组; ②AA 模型组; ③再造生血片组 (生药 7g/kg); ④雪莲多糖组 (500mg/kg)。建立免疫介导 AA 小鼠模型, 于造模当日开始灌胃给药, 每天灌胃 2 次, 连续给药 14 天。给药结束后, 分别测量小鼠体重及脾脏、胸腺指数, 血常规检测细胞分类并计数, 流式细胞仪检测骨髓造血祖细胞 CD34 表达量, 并检测小鼠股骨病理变化。**结果** 雪莲多糖组在给药 14 天后, 血常规红细胞计数、血红蛋白含量等多项数据相比 AA 模型组有显著的提高 ($P < 0.05$)。同时, 给予雪莲多糖提取物后, 明显促进 CD34⁺ 造血细胞在整体细胞中所占比率, 并可不同程度减轻辐射照射诱发小鼠骨髓造血功能病理学改变, 其活性与阳性药再造生血片相当。**结论** 本研究的实验结果初步验证了天山雪莲细胞培养物多糖对免疫介导的 AA 小鼠模型的治疗活性, 提示雪莲多糖提取物对治疗再生障碍性贫血有一定的治疗及改善活性。

关键词 再生障碍性贫血 天山雪莲 多糖 骨髓造血细胞 CD34

[中图分类号] R973

[文献标识码] A

Investigations for the Effects of Polysaccharides Isolated from Saussurea Involucrate on Immunologically Mediated Aplastic Anemia Mice Model. Yuan Shaopeng, Chen Ridao, Shi Ji, Bai Jinye, Xuan Lingling, Dai Jungui, Hou Qi. Beijing Key Laboratory of New Drug Mechanisms and Pharmacological Evaluation Study, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract Objective To investigate the effects of polysaccharides isolated from Saussurea involucrate on mice with immunologically mediated aplastic anemia (AA). **Methods** Male BALB/c mice (20 ~ 22g, $n = 20$ per groups) were randomly grouped into control, AA model, Zaizaoshengxuepian and polysaccharides. The AA mice model have been developed as the method previously reported, following treatment with polysaccharides (500mg/kg, *p. o.*) twice one day for 14 days continuously. The Zaizaoshengxuepian pellets (7g/kg, *p. o.*) were given as positive control. After euthanization, the body weight, spleen index, and thymus index of the mice were assayed. Meanwhile, the peripheral WBC, RBC, HGB, PLT, and RET in the serum were examined. Moreover, the expression levels of CD34 on the femoral bone marrow nucleus cell have been examined by FACS, following with pathological analysis of the femoral bone marrow. **Results** The values of peripheral WBC, RBC, HGB, PLT, RET, spleen index, and thymus index are significantly decreased in the AA model compared with those of the control groups. However, treatment of polysaccharides from Saussurea involucrate could clearly increase the amount of WBC, RBC, and HGB ($P < 0.05$, vs AA model group). Moreover, the expression levels of CD34 on the femoral bone marrow nucleus cell have been significantly increased upon polysaccharides administration. In addition, pathological analysis results showed that the polysaccharides increased the amounts of hematopoietic cells on the femoral bone marrow. **Conclusion** The polysaccharides isolated from Saussurea involucrate have clearly function in rescuing hematopoiesis in the AA mice model and have the potential use for the treatment of aplastic anemia.

Key words Aplastic anemia; Saussurea involucrate; Polysaccharides; Bone marrow hematopoietic cell; CD34

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (20101106120023); 中国科学院环境化学与生态毒理学国家重点实验室开放基金资助项目 (KF2012-16)

作者单位: 100050 北京, 中国医学科学院/北京协和医学院药物研究所、新药作用机制研究与药效评价北京市重点实验室 (袁绍鹏、史记、白金叶、玄玲玲、侯琦), 天然药物活性物质与功能国家重点实验室 (陈日道、戴均贵)

通讯作者: 侯琦, 电子信箱: houq@imm.ac.cn

再生障碍性贫血 (aplastic anemia, AA, 以下简称再障) 是由多种原因引起的造血干细胞数量下降, 功能异常, 从而导致机体血细胞减少的一种病症^[1, 2]。目前的临床和分子机制研究表明, AA 发病机制除与造血干细胞自身缺陷、造血组织微环境损伤有关外, 免疫系统失调在 AA 的发生、发展中起着重要的作

用,多种免疫细胞和炎症因子参与调控 AA 的发病机制^[3,4]。T 细胞分化和亚群异常、炎症因子调控失常、Fas/FasL 系统和活化 T 细胞介导的细胞凋亡、免疫遗传因素等免疫机制紊乱,最终引起造血干/祖细胞的减少和(或)缺陷,从而引发造血衰竭^[5]。CD34 蛋白属于黏附分子中的黏蛋白样家族,存在于造血干细胞和原始细胞表面,被视为骨髓造血干细胞标志之一,可调控早期造血^[6]。与正常骨髓 CD34⁺ 细胞相比,AA 患者的 CD34⁺ 细胞凋亡比例高于正常人,因此,抑制 CD34⁺ 细胞凋亡,促进其数量增加及活化将在 AA 的治疗中发挥重要的功能^[7]。

天山雪莲(*Saussurea involucrata* Kar. et Kir.) 为菊科风毛菊属植物,主产于新疆、西藏等地,民间多用于风湿性关节炎、散热除湿、活血通络、抗疲劳等症的治疗。野生天山雪莲次生代谢产物成分复杂,具有药理活性的化合物主要集中在黄酮、生物碱和多糖类^[8]。由于野生雪莲生境特异,生长缓慢,人工栽培困难,加上长期以来对雪莲的掠夺性采挖,造成野生资源的严重匮乏,近年来,国内外的研究人员开展了植物组织细胞培养等研究工作^[9]。药理研究表明,天山雪莲培养物与野生天山雪莲具有同样的抗炎、镇痛等作用。既往研究多关注野生天山雪莲以及天山雪莲培养物的免疫调节、镇痛等功能,但对其治疗再生障碍性贫血等活性,特别是天山雪莲培养物的多糖成分对再生障碍性贫血作用甚少报道。本实验主要研究及观察天山雪莲细胞培养物多糖对辐射免疫介导的再生障碍性贫血模型小鼠的治疗作用,对模型小鼠的免疫功能及造血功能进行初步研究,旨在探讨雪莲多糖提取物治疗再障的疗效。

材料与方法

1. 实验动物:DBA/2 小鼠,20~22g,雄性,SPF 级,由中国医学科学院实验动物研究所提供[实验动物合格证:SCXK-(京)2009-0007]。BALB/c 小鼠,20~22g,雄性,SPF 级,由中国医学科学院实验动物研究所提供[实验动物合格证:SCXK-(京)2009-0007]。

2. 试剂和实验设备:天山雪莲细胞培养物多糖(简称 XL),由本所戴均贵研究员课题组提供。天山雪莲细胞培养:细胞培养采用附加 30g/L sucrose,0.5mg/L NAA(α -naphthalene acetic acid),0.5mg/L 6-BA(6-benzyl aminopurine),0.2mg/L 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid)的 MS 培养基,于黑暗下摇床旋转振荡培养,摇床转速为 110r/min,培养温度为 25±1℃。多糖的制备:称取天山雪莲干燥细胞培养物,95% 乙醇回流脱脂,挥干溶剂,采用 10 倍水 85℃ 浸提 3 次,每次 2h,减压过滤,合并滤液,减压浓缩,加入无水乙醇至

醇浓度为 80% 沉淀多糖,4℃ 静置 24 h,减压过滤沉淀,无水乙醇洗涤,低温干燥后得到雪莲粗多糖。阳性对照药:再造生血片(简称生血片),生药含量 0.7 克/片,国药准字 Z22025856,由辽源誉隆亚东药业有限责任公司生产,批号:110101。Co⁶⁰ 辐照装置(北大辐射中心);血细胞分析仪(中国医学科学院实验动物研究所安评中心)。

3. 动物模型建立方法:(1)动物分组:对照组进行假照射,AA 模型组和给药组按照模型制备方法造模,给药后每周称重 1 次。BALB/c 小鼠,随机分为 4 组:①正常对照组(Control 组),20 只;②模型对照组(Model 组),20 只;③再造生血片组(中药对照组),20 只;④XL 组,20 只。(2)AA 动物模型制备:①胸腺细胞混悬液的制备:DBA/2 小鼠,断颈处死,75% 乙醇浸泡消毒后,在超净台中无菌取出胸腺,置于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,除去黏附的结缔组织、剪碎、轻磨、200 目不锈钢网过滤,制成单细胞悬液,台盼蓝鉴定细胞活性(95% 以上),计数后用 RPMI 1640 培养液调细胞浓度为 5×10^6 cell/ml,置 CO₂ 孵箱中待用;②Co⁶⁰ γ 射线的照射:BALB/c 小鼠,给予 4.0Gy 剂量 Co⁶⁰ 源 γ 射线全身照射。另取 BALB/c 小鼠,进行假照射,为 Control 组;③小鼠尾静脉注射胸腺细胞混悬液:BALB/c 小鼠于射线照射后的当天,由尾静脉注射上述新鲜配制的胸腺细胞悬液 0.2 毫升/只,含细胞数为 1×10^6 。

4. 给药方式和初始剂量:各组动物分别于造模当日开始灌胃给药,每天灌胃 2 次,连续给药 14 天。各组每次给药剂量依次为:再造生血片组 3.8g/kg;XL 组 500mg/kg。

5. 指标检测:(1)外周血常规指标测定:小鼠于末次给药 30min 后,眼眶取血约 0.2ml,置抗凝管中,混匀,在血细胞分析仪上进行血常规测定,包括红细胞计数、白细胞计数、血红蛋白含量、血小板计数、网织红细胞百分比等。(2)骨髓免疫学和病理分析:小鼠断颈处死,取出右侧股骨,置冰上,按统一尺度截取股骨干部分(去除两端),用 800 μ l 胎牛血清冲出全部骨髓,离心后重悬,吸取 500 μ l 骨髓细胞悬液,以 FITC 标记的抗小鼠 CD34 单克隆抗体标记细胞,进行 FACS 检测,检测细胞膜 CD34 表达及荧光信号强度。各组股骨标本经 10% 甲醛固定,5% 硝酸脱钙,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,HE 染色,光镜检查并拍照。(3)动物脏器指数测定:处死小鼠后,对小鼠的体重、脾脏和胸腺进行称重,计算脾脏指数及胸腺指数。

6. 统计学方法:使用 SPSS 软件,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 动物体重、脾脏及胸腺指数的变化:各组动物体重、脾脏及胸腺指数的变化相比见表 1。与对照组相比,AA 模型组的体重、脾脏和胸腺指数均明显降低。与模型组相比,XL 组给药后,明显促进小鼠脾脏指数($P < 0.05$)。

表 1 小鼠体重、脾脏及胸腺指数($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	体重(g)	脾脏指数	胸腺指数
		(mg/10g 体重)	(mg/10g 体重)
对照组	20.014 ± 1.096	34.923 ± 3.586	17.093 ± 2.925
AA 模型组	18.767 ± 1.302	29.180 ± 5.732 *	12.39 ± 2.802 *
生血片组	19.344 ± 1.077	31.599 ± 5.912	14.524 ± 3.234 #
雪莲多糖组	18.833 ± 1.733	34.173 ± 11.385 #	11.608 ± 3.097

与对照组相比, * $P < 0.001$; 与 AA 模型组相比, # $P < 0.05$

表 2 小鼠外周血常规及网织红细胞计数($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	WBC ($10^9/L$)	RBC ($10^{12}/L$)	HGB(g/L)	PLT($10^9/L$)	RET%
对照组	8.5 ± 2.8	10.8 ± 0.3	170.3 ± 4.7	728.1 ± 135.9	2.7 ± 0.5
AA 模型组	2.6 ± 1.8 **	8.5 ± 0.7 **	137.7 ± 10.3 **	558.4 ± 149.7 **	3.6 ± 1.6 *
生血片组	2.4 ± 1.7	9.0 ± 0.4 ##	147.1 ± 7.1 ##	679.0 ± 258.3 #	3.7 ± 0.9
雪莲多糖组	2.2 ± 1.6 #	9.0 ± 0.5 ##	146.9 ± 11.1 #	508.7 ± 143.9	3.0 ± 1.4

与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$; 与 AA 模型组相比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3. 骨髓造血祖细胞检测结果:为进一步证明 XL 多糖提取物对小鼠骨髓造血功能的改善活性,笔者提取小鼠骨髓细胞,对骨髓的造血祖细胞生物标志物 CD34 的表达进行了流式检测。实验结果显示,与正常对照组相比,模型组 CD34⁺ 阳性细胞所占比率降低,且细胞数明显减少。给予药物治疗后,多糖提取物以及阳性药再造生血片均提高了 CD34⁺ 造血祖细胞在骨髓总细胞中所占的比率(图 1),以及 CD34⁺ 阳性造血细胞数目(图 2)。

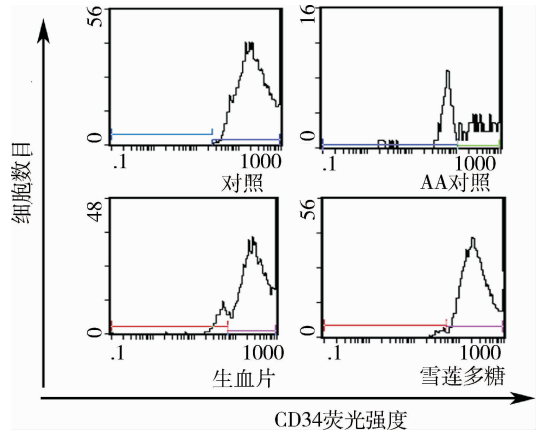


图 1 小鼠骨髓细胞 CD34⁺ 流式检测

4. 病理分析结果:骨髓病理学检查结果显示,4Gy 辐射照射可诱发小鼠骨髓造血功能病理学改变,表现为骨髓空虚,造血组织不同程度减少,可见广泛脂肪细胞浸润,白系细胞明显减少,骨髓红/白细胞比例失调。骨髓血窦明显扩张、充血和片状出血。与模型组相比,XL 多糖治疗组和再造生血片组可不同程度减轻辐射照射诱发小鼠骨髓造血功能病理学改变,

2. 血常规细胞分类计数测定:与正常对照组相比,Co⁶⁰ 辐照兼免疫介导的再生障碍性贫血模型组与对照组相比,红细胞计数、白细胞计数、血红蛋白含量、血小板计数($P < 0.001$)和网织红细胞百分比明显降低($P < 0.05$),各组数据比较有统计学差异。与之相比,生血片和 XL 明显促进了血液中红细胞和血红蛋白含量,有统计学差异(表 2)。

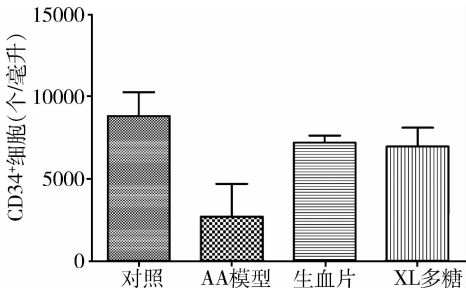


图 2 小鼠骨髓 CD34⁺ 阳性造血细胞统计

其病理学结果见图 3。

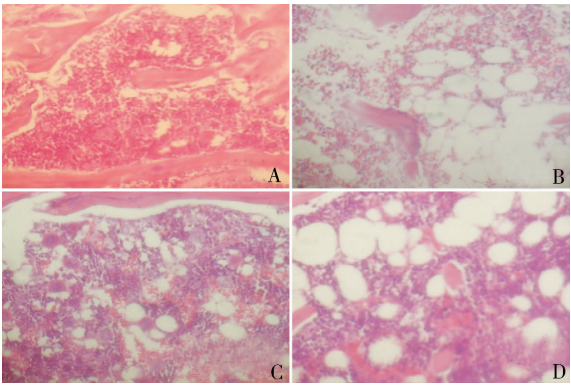


图 3 小鼠骨髓病理学观察结果(HE, ×100)

A. 对照组;B. 模型组;C. 生血片组;D. XL 多糖组

讨 论

再生障碍性贫血是一组以造血组织功能衰竭为特征的综合征,对外周血常规检测和骨髓病理分析是从动物模型进行评价的基本方法^[4]。本次实验中,与正常对照组相比,Co⁶⁰ 辐照兼免疫介导的再生障碍性贫血模型组与对照组间血常规红细胞计数、白细胞

计数、血红蛋白含量、血小板计数和网织红细胞百分比等各组数据有统计学差异($P < 0.05$),说明笔者成功建立了小鼠再生障碍性贫血模型。在外周血常规测定结果中,阳性对照药再造生血片(7g/kg)在给药 14 天后,血常规红细胞计数、血红蛋白含量、血小板计数、网织红细胞计数等各组数据有显著的统计学差异($P < 0.05$),网织红细胞百分比相对模型也有所提高,证明再造生血片的治疗活性在本次实验中得到验证。雪莲多糖(XL)在给药 14 天后,与 AA 模型组相比,红细胞计数和血红蛋白含量有比较明显的提升,且与模型组相比有统计学差异($P < 0.05$),以上结果提示化合物对该模型治疗有一定的改善活性。

为进一步证明雪莲多糖提取物对小鼠骨髓造血功能改善的活性,笔者对骨髓的造血祖细胞及其生物标志物 CD34 的表达进行了流式检测。CD34 分子是高度糖基化的跨膜糖蛋白,其选择性地表达于人类及其他哺乳动物造血祖细胞表面,并随细胞的成熟逐渐减弱至消失^[10]。实验观察到模型组与正常对照组相比,CD34⁺细胞所占比率降低且细胞数明显减少,证明辐射对于小鼠骨髓祖细胞具有明显的破坏作用。给予受试化合物治疗后,无论是对照药物再造生血片,还是受试药物雪莲多糖均可促进 CD34⁺细胞在骨髓总细胞中所占比率,这一结果初步证明雪莲多糖对 CD34⁺造血祖细胞的成熟与分化具有较明显的活性。

小鼠骨髓病理学检查结果显示,4Gy 辐射照射可诱发小鼠骨髓造血功能病理学改变,表现为骨髓空虚,造血组织不同程度减少,可见广泛脂肪细胞浸润,骨髓红/白细胞比例失调。骨髓血窦明显扩张、充血和片状出血,相对于模型组,雪莲多糖和阳性药生血组可不同程度减轻辐射照射诱发小鼠骨髓造血功能病理学改变。这一结果与李永萍等^[11]报道再生障碍性贫血患者经免疫抑制剂环孢素 A 治疗前后骨髓活检的病理改变情况相近,证明雪莲多糖提取物多糖对再生障碍性贫血小鼠模型有治疗活性。

综合以上实验结果,笔者的研究成功构建了辐射免疫介导的再生障碍性贫血的小鼠模型,并且初步评

价了雪莲多糖提取物多糖对于该模型的治疗效果。笔者的结果证明雪莲多糖对于治疗辐射免疫介导的再生障碍性贫血小鼠具有较明显的治疗改善活性,后续实验有待进一步研究探索药物剂量与药效及药物的安全性之间的关系。

参考文献

- 1 刘苹,朱传江.再生障碍性贫血的研究进展[J].临床和实验医学杂志,2009,8(2):137-140
- 2 Young NS,Calado RT,Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia [J]. Blood. 2006, 108 (8): 2509-2519
- 3 Dufour C,Ferretti E,Bagnasco F, *et al.* Changes in cytokine profile pre- and post-immunosuppression in acquired aplastic anemia [J]. Haematologica, 2009, 94(12): 1743-1747
- 4 张恒,王月英,孟爱民等.再生障碍性贫血小鼠模型的免疫学评价[M].中国实验诊断学,2011,15(9):1421-1424
- 5 Locasciulli A, Oneto R, Bacigalupo A, *et al.* Outcome of patients with acquired aplastic anemia given first line bone marrow transplantation or immunosuppressive treatment in the last decade: a report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Severe Aplastic Anemia Working Party of the European Blood and Marrow Transplant Group [J]. Haematologica, 2007, 92(1):11-18
- 6 Maciejewski J, Selleri C, Anderson S, *et al.* Fas antigen expression on CD34⁺ human marrow cells is induced by interferon gamma and tumour necrosis factor alpha and potentiates cytokine-mediated hematopoietic suppression in vitro [J]. Blood, 1995, 85(11):3183-3190
- 7 Young NS, Bacigalupo A, Marsh JC. Aplastic anemia: pathophysiology and treatment [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2010, 16 (1 Suppl):S119-125
- 8 杨林,邹建华,戴均贵,等.天山雪莲培养物的化学成分研究[J].天然产物研究与开发,2009,21(5):9-10,16
- 9 Chen R,Liu X,Zou J, *et al.* Qualitative and quantitative analysis of phenylpropanoids in cell culture, regenerated plantlets and herbs of *Saussurea involucrata* [J]. J Pharmaceut Biomed Anal, 2013, 74: 39-46
- 10 Ehlert K, Groll AH, Rossig C, *et al.* Late graft failure in FA - a case report and review of the literature [J]. Pediatr Transplant, 2012, 16 (8):E360-363
- 11 李永萍,黄维彦,顾凤兰,等.再生障碍性贫血治疗前后骨髓病理改变分析[J].医学研究杂志,2006,(4):27-28

(收稿日期:2013-09-24)

(修回日期:2013-09-29)