

川芎嗪对骨髓移植小鼠骨髓造血的影响*

孙汉英 房明皓 任天华 戴琪琳 刘文励 路 武 徐慧珍

内容提要 目的 探讨川芎嗪对同基因骨髓移植(bone marrow transplantation, BMT)小鼠 BMT 后骨髓造血的影响。方法 建立典型同基因 BMT 小鼠模型 随机分成两组:骨髓移植(BMT)组和 BMT 加川芎嗪处理组(川芎嗪组),另设正常组(未做任何处理)。BMT 组胃饲生理盐水,每次 0.2ml/只,每天 2 次。川芎嗪组胃饲磷酸川芎嗪注射液,每次 0.2ml/只,每天 2 次。分别于 BMT 后第 1、7、14 天观察外周血细胞、骨髓单个核细胞(BMMNC),采用免疫组化 SABC-AP 法测定骨髓组织切片中硫酸肝素(HS)表达水平;基质细胞来源因子-1(stromal derived factor, SDF-1)的表达水平;CXC 趋化因子受体 4(CXCR4)表达水平。结果:川芎嗪组第 7、14 天外周血白细胞、红细胞、血小板、BMMNC 及 CXCR4、HS、SDF-1 表达水平均显著高于 BMT 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:川芎嗪能够在骨髓移植造血重建早期促进骨髓造血。

关键词 川芎嗪 骨髓移植 造血重建 硫酸肝素 基质细胞来源因子-1 CXC 趋化因子受体 4

Effect of Ligustrazine on Bone Marrow Hematopoiesis in Mice after Bone Marrow Transplantation SUN Han-ying, FANG Ming-hao, REN Tian-hua, et al *Department of Hematology, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan (430030)*

Objective: To investigate the effect of ligustrazine (LT) on hematopoiesis in mice after bone marrow is transplantation (iso-BMT). **Methods:** The typical model of iso-BMT was established and the model mice were randomly divided into two groups, the LT group treated with LT injection 0.2 ml and the control group treated with normal saline 0.2 ml, twice a day by gastrogavage. The following parameters were observed in the day 1, 7 and 14: peripheral blood cells, bone marrow mono-nuclear cells (BMMNC), heparin sulfate (HS) expression in bone marrow section by immunohistochemical SABC-AP method, stromal cell derived factor-1 (SDF-1) expression and CXC chemotaxis factor receptor 4 (CXCR4) expression. **Results:** The levels of peripheral WBC, platelet, BMMNC, CXCR4, HS, SDF-1 at the day 7 and 14 in the LT group were all higher significantly than those in the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** LT could improve the bone marrow hematopoiesis in the early hematopoietic re-establishing stage after BMT.

Key words ligustrazine, bone marrow transplantation, hematopoietic re-establishing, heparin sulfate, stromal cell derived factor 1, CXC chemotaxis factor receptor 4

造血干细胞(HSC)移植回髓及骨髓造血重建过程是一个有多种因素介入的复杂过程,不仅取决于回髓的 HSC 的质与量,还取决于造血微循环(HIM)的修复情况,需 HIM 与 HSC 密切接触并调节 HSC 增殖、分化与自身维持,才能使骨髓造血重建。本实验探讨川芎嗪对骨髓移植(BMT)小鼠 BMT 后骨髓造血的影响。

材料与方法

1 材料

1.1 实验动物 清洁级近交系 BALB/C 小鼠 56 只 8~10 周龄,体重 17~20g,雌雄兼用,由湖北省医学科学院实验动物中心提供。于照射前 3 天至照射后 14 天灌喂庆大霉素注射液(200u/只)清洁胃肠道。

1.2 药物 磷酸川芎嗪注射液,每毫升含磷酸川芎嗪 10mg,丽珠利民制药厂生产,批号为 990101。

1.3 试剂 兔抗小鼠 SDF-1 单抗,购自 Tonoy Pines Biolabs 公司,即用型 SABC-AP(兔 IgG)试剂盒,购自武汉博士德公司;羊抗小鼠 CXC 趋化因子受体 4

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39870926)

华中科技大学同济医学院附属同济医院血液科(武汉 430030)

(CXCR4)多抗(Fusin)及 FTTC-大鼠 IgG 单抗,购自北京中山公司;小鼠抗小鼠硫酸肝素(HS)单抗(美国, Biological),即用型 SABC-AR(小鼠 IgM)试剂盒,购自武汉博士德公司;大鼠抗小鼠 IgM 单抗,购自 Pharmingen 公司。

1.4 仪器 K4500 血细胞计数仪(Sysmex 公司);流式细胞仪(Becton Dickinson FAC Sort 公司);HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图像测量系统。

2 动物分组及处理 BALB/C 小鼠 56 只分为 3 组。正常组 8 只,未作任何处理;BMT 组及 BMT 加川芎嗪组(川芎嗪组)各 24 只,均经 ^{60}Co γ 射线全身均匀照射,剂量为 1.644Gy/min,总剂量 7.5Gy。

3 BMT 模型的建立 参照文献^[1]方法。取正常的 BALB/C 小鼠,颈椎脱臼处死后,立即取双侧股骨制备有核细胞悬液并计数,调浓度至 $5 \times 10^6/\text{ml}$,将此在 4h 内经尾静脉输入受照射的 BMT 组及川芎嗪组小鼠体内,输入细胞数 $2 \times 10^6/\text{只}$,液体量 0.2ml/只。

4 动物用药 BMT 模型建立后,川芎嗪组小鼠立即腹腔注射磷酸川芎嗪注射液 0.2ml/只,每天 2 次。BMT 组腹腔注射生理盐水 0.2ml/只,每天 2 次。分别在 BMT 后第 1、7、14 天分批处死各组小鼠。

5 观察项目

5.1 外周血细胞计数 收集眼眶血以二乙酸四乙二钾抗凝,计数外周血红细胞、白细胞和血小板。

5.2 骨髓单个核细胞(BMMNC)计数 小鼠处死后立即取双侧股骨,分离出 BMMNC 并计数。

5.3 骨髓组织学观察 小鼠处死后即取双侧尺骨,以体积分数为 10% 的中性甲醛固定,采用文献^[2]方法,低温塑料包埋,室温下尺骨中段横面切片和矢状面切片,HE-Giemsa 染色,于 10×40 高倍镜下使用 5×5 网格计微器观察以下指标:随机计取 15 个视野中造血组织、脂肪组织、微血管及血液中红细胞各自的点击数(各自所占的比例即为各自所占的容量)。

5.4 CXCR4 表达水平分析 小鼠处死后,分离出 BMMNC,参照文献^[3]方法,采用流式细胞仪测定各组 CXCR4 的表达水平。

5.5 重建骨髓组织切片中基质细胞来源因子-1(SDF-1)表达 小鼠处死后,即取一侧尺骨,常规固定脱钙,浸蜡包埋。尺骨矢状切片($3\mu\text{m}$),常规脱蜡至水,复方消化液消化 30min 后,正常山羊血清封闭,甩干。以 1:100 稀释度加入一抗(兔抗小鼠 SDF-1 多抗)4℃ 孵育过夜,0.01mol/L TBS(NaCl 加 Tris 加乙酸)洗 3 次后,依次加入生物素化二抗(山羊抗兔 IgG)37℃ 孵育 20min, SABC-AP 37℃ 孵育 20min, BCIP/

NBT 显色剂室温显 10~30min,镜下控制反应时间,蒸馏水洗,干燥后水溶性片剂封闭,显微镜下观察并进行图像分析。

5.6 重建骨髓组织切片中 HS 表达水平 小鼠处死后,取一侧肱骨,常规固定脱钙,浸蜡包埋。肱骨矢状面切片($3\mu\text{m}$)常规脱蜡至水,复方消化液消化 30min 后,正常山羊血清封闭,甩干。以 1:200 稀释度加入一抗(小鼠抗小鼠 HS 单抗),4℃ 孵育过夜,0.01mol/L TBS(NaCl 加 Tris 加乙酸)洗 3 次后,依次加入生物素化二抗(山羊抗小鼠 IgM)37℃ 孵育 20min, SABC-AP 37℃ 孵育 20min, BCIP/NBT 显色剂室温显色 10min,显微镜下控制反应时间,蒸馏水洗,干燥后水溶性片剂封片,计算机图像分析测量 HS 阳性面积百分数。

6 统计学处理 统计学分析数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SAS 6.12 进行 t 检验和相关分析。

结 果

1 外周血白细胞、红细胞及血小板计数测定结果 见表 1。川芎嗪组在 BMT 后第 7、14 天的红细胞、白细胞、血小板计数均显著高于 BMT 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),低于正常组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2 骨髓 BMMNC 计数测定结果 见表 1。BMT 后第 1 天川芎嗪组和 BMT 组的 BMMNC 急剧减低($P < 0.01$);川芎嗪组在 BMT 后第 7、14 天 BMMNC 数均显著高于 BMT 组($P < 0.05$)。

3 骨髓组织学观察结果 见表 2。观察同一张切片上造血组织及微血管血窦的相对比例,川芎嗪组在 BMT 后第 7、14 天的造血组织容量百分率均显著高于 BMT 组($P < 0.05$),而均低于正常组($P < 0.01$);川芎嗪组骨髓微血管及血窦中成熟红细胞容量在第 7、14 天均显著低于 BMT 组($P < 0.05$, $P < 0.01$),而两组的成熟红细胞容量均显著高于正常组($P < 0.01$)。第 7 天川芎嗪组和 BMT 组均未见到巨核细胞,第 14 天仅川芎嗪组出现巨核细胞。

4 CXCR4 表达水平分析结果 见表 3。BMT 后第 7、14 天川芎嗪组和 BMT 组的 CXCR4 荧光强度显著高于正常组($P < 0.01$),而川芎嗪组显著高于 BMT 组($P < 0.01$)。

5 重建骨髓组织切片中 SDF-1、HS 的表达水平结果 见表 4。BMT 后第 7、14 天川芎嗪组 SDF-1 表达水平显著高于 BMT 组($P < 0.05$)。BMT 后川芎嗪组和 BMT 组中 HS 的表达水平急剧减低,但川芎嗪组

表 1 各组小鼠外周血细胞计数及 BMMNC 计数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	BMT 后时间 (d)	鼠数	WBC ($\times 10^9/L$)	RBC ($\times 10^{12}/L$)	BPC ($\times 10^9/L$)	BMMNC ($\times 10^6/\text{根股骨}$)
正常		8	4.90 $\pm$ 0.69	9.43 $\pm$ 0.25	879.00 $\pm$ 97.51	3.50 $\pm$ 0.20
BMT	1	6	2.13 $\pm$ 0.63 *	8.79 $\pm$ 0.30 *	792.00 $\pm$ 51.33	0.27 $\pm$ 0.04 **
	7	6	0.30 $\pm$ 0.08 *	7.26 $\pm$ 0.88 **	54.50 $\pm$ 21.20 **	0.34 $\pm$ 0.01 **
	14	6	0.33 $\pm$ 0.08 **	7.60 $\pm$ 0.76 **	84.80 $\pm$ 8.99 **	0.65 $\pm$ 0.02 **
	14	6	0.33 $\pm$ 0.08 **	7.60 $\pm$ 0.76 **	84.80 $\pm$ 8.99 **	0.65 $\pm$ 0.02 **
川芎嗪	1	6	2.37 $\pm$ 0.68 **	8.89 $\pm$ 0.30	842.00 $\pm$ 61.92	0.30 $\pm$ 0.02 **
	7	6	0.56 $\pm$ 0.21 ** $\triangle\triangle$	8.25 $\pm$ 1.11 * $\triangle\triangle$	136.80 $\pm$ 33.87 ** $\triangle$	0.45 $\pm$ 0.02 ** $\triangle$
	14	6	0.58 $\pm$ 0.19 ** $\triangle\triangle$	8.12 $\pm$ 0.32 * $\triangle\triangle$	188.00 $\pm$ 25.10 ** $\triangle\triangle$	0.79 $\pm$ 0.02 ** $\triangle$
	14	6	0.58 $\pm$ 0.19 ** $\triangle\triangle$	8.12 $\pm$ 0.32 * $\triangle\triangle$	188.00 $\pm$ 25.10 ** $\triangle\triangle$	0.79 $\pm$ 0.02 ** $\triangle$

注 :与正常组比较 ,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 BMT 组同期比较 , $\triangle P<0.05$, $\triangle\triangle P<0.01$

表 2 各组小鼠组织学观察结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	BMT 后时间 (d)	鼠数	巨核细胞数 (个/HGF)	微血管面积 (格/根血管)	造血组织容量 (Vol%)	成熟红细胞容量 (Vol%)
正常		8	5.78 $\pm$ 0.57	0.80 $\pm$ 0.36	93.38 $\pm$ 2.30	2.80 $\pm$ 1.20
BMT	1	6	5.60 $\pm$ 0.32	4.10 $\pm$ 1.10 *	59.94 $\pm$ 4.56	21.85 $\pm$ 3.20 *
	7	6	0	—	17.99 $\pm$ 3.17 *	54.66 $\pm$ 3.23 *
	14	6	0	—	28.75 $\pm$ 3.00 *	39.31 $\pm$ 4.20 *
	14	6	0	—	28.75 $\pm$ 3.00 *	39.31 $\pm$ 4.20 *
川芎嗪	1	6	5.67 $\pm$ 0.15	3.89 $\pm$ 0.93 *	60.16 $\pm$ 4.96	21.05 $\pm$ 2.50 *
	7	6	0	—	31.96 $\pm$ 3.27 * $\triangle$	45.15 $\pm$ 3.13 * $\triangle$
	14	6	0.78 $\pm$ 0.59 * $\triangle\triangle$	—	37.25 $\pm$ 2.50 * $\triangle$	18.52 $\pm$ 2.80 * $\triangle\triangle$
	14	6	0.78 $\pm$ 0.59 * $\triangle\triangle$	—	37.25 $\pm$ 2.50 * $\triangle$	18.52 $\pm$ 2.80 * $\triangle\triangle$

注 :与正常组比较 ,* $P<0.01$;与 BMT 组同期比较 , $\triangle P<0.05$, $\triangle\triangle P<0.01$;由于 BMT 后第 7、14 天微血管、血窦扩张破裂 ,弥漫出血 ,难以测定微血管面积 ,因此该时点微血管面积项无数值

表 3 各组小鼠 CXCR4 在 BMMNC 表面表达变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	BMT 后时间 (d)	鼠数	CXCR4 表达量 (荧光强度)
正常		8	3.99 $\pm$ 0.76
BMT	7	6	9.82 $\pm$ 2.56 *
	14	6	5.79 $\pm$ 0.51 *
川芎嗪	7	6	13.51 $\pm$ 2.23 * $\triangle$
	14	6	8.75 $\pm$ 1.13 * $\triangle$

注 :与正常组比较 ,* $P<0.01$;与 BMT 组同期比较 , $\triangle P<0.01$

表 4 各组小鼠重建骨髓组织切片中 SDF-1、
HS 表达的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	BMT 后 时间(d)	鼠数	HS (Vol%)	SDF-1 (Vol%)
正常		8	19.56 $\pm$ 2.25	—
BMT	7	6	4.47 $\pm$ 1.16	3.84 $\pm$ 2.90
	14	6	6.23 $\pm$ 1.65	6.43 $\pm$ 3.46
川芎嗪	7	6	6.33 $\pm$ 1.70 *	10.38 $\pm$ 8.63 *
	14	6	9.02 $\pm$ 1.84 **	11.82 $\pm$ 6.50 *

注 :与 BMT 组同期比较 ,* $P<0.05$,** $P<0.01$

在 BMT 后第 7、14 天 HS 表达水平均高于 BMT 组($P<0.05$, $P<0.01$)。

讨 论

我们所建立的小鼠 BMT 模型 ,其外周血象、BMMNC 计数以及骨髓组织学的变化特点与文献⁽⁴⁾报道基本一致 ,说明模型建立是成功的。

观察小鼠 BMT 后骨髓造血重建的过程 ,发现这一过程可能是依次出现以下组织学特征 :早期骨髓微

血管、血窦扩大破裂 ,大面积出血 ,随后造血组织增殖、扩增。川芎嗪组小鼠的骨髓早期骨髓微血管、血窦扩张瘀血 ,都明显较正常组轻 ;同时 ,川芎嗪组小鼠的 BMMNC 和造血组织容量显著升高 ,巨核细胞提早出现 ,这些结果说明 ,川芎嗪能通过改善骨髓造血微环境 ,促进造血组织恢复而加快了 BMT 后骨髓的造血重建。

CXCR4 是一种 7 次跨膜 C 蛋白耦联受体 ,大量表达于 CD₃₄⁺ 加造血细胞及巨核细胞的表面 ,与 SDF-1 相互作用 ,可以加速造血祖细胞的跨内皮迁移 ,间接促进巨核细胞的生长。我们观察到 CXCR4 的水平在川芎嗪组有明显的提高 ,说明了川芎嗪能促进 BMT 后 BMMNC 上的 CXCR4 早期大量的表达 ,其表达水平又反映了造血干细胞迁移、造血重建的进程。这可能是川芎嗪加速 BMT 造血重建的作用之一。

SDF-1 属于 CXC 趋化因子家族 ,主要由骨髓基质细胞分泌 ,可与造血干细胞表面的 CXCR4 相互作用。SDF-1 不仅可以高效趋化 CD₃₄⁺ 加造血干细胞(HSC) ,还能激活造血细胞上表达的粘附分子(VLA-4、VFA-1) ,并增强与内皮细胞上相互配体(VCAM-1、ICAM-1)的相互作用 ,使滚动于血管内皮细胞上的造血干细胞与骨髓内皮细胞紧密结合 ,使外周血中 HSC 向骨髓的跨内皮迁移加快 ,促进 HSC 回髓。因而 ,BTM 后 SDF-1 的表达水平与骨髓造血重建密切相关。我们的实验显示 :BMT 后川芎嗪组织切片中

SDF-1 的表达水平,在第 7、14 天均高于 BMT 组,说明川芎嗪之所以能使 BMT 后 HSC 回髓,增加基质细胞和细胞粘附功能,促进造血重建,基质细胞大量表达 SDF-1 可能是其又一机制。

HS 是一类由线性硫酸化二糖重复单位(即葡萄糖胺→葡萄糖醛酸)构成的糖胺聚糖大分子,与核心蛋白共价结合,从而以蛋白多糖的形式存在于几乎所有组织微环境中(包括骨髓微环境)。HS 在骨髓中主要分布于基质细胞表面和细胞外基质(ECM)中,能与多种细胞因子(CK)和 ECM 成分相互作用,保护这些配体免遭酶解或将之滞留在 ECM 中;HS 在细胞表面作为共受体来增加与特异性受体结合机率,形成多分子干细胞龛⁽⁵⁾,一方面参与介导 HSC 与基质细胞和 ECM 的粘附,另一方面通过与 CK 和 ECM 成分选择性定位,诱导 HSC 静止/存活或增殖/分化。HS 能促进巨核细胞造血⁽⁶⁾和 B 淋巴细胞造血⁽⁷⁾,我们对骨髓 HS 的表达水平的动态观测显示:BMT 后小鼠骨髓组织切片中 HS 表达水平显著下降,但川芎嗪组 HS 的表达水平明显高于正常组,说明川芎嗪可促进 BMT 小鼠骨髓 HS 的表达。参与介导 HSC 粘附定居和增殖分化,故川芎嗪通过作用于 HS 而加速 BMT 后造血微环境的修复。这可能是川芎嗪促进 BMT 后造血重建过程又一机制。

总之,川芎嗪能促进 BMT 小鼠骨髓微血管的修复,增加微血管数量,增加骨髓微环境供氧,促进造血细胞增生,增加骨髓 BMMNC 上 SDF-1 受体 CXCR4

及骨髓组织中 SDF-1 的表达,促进骨髓组织在 BMT 后表达 HS。川芎嗪能促使 BMT 后骨髓重建造血。

参 考 文 献

1. 高汉林,谢蜀生,杨四旬,等. 胸腺基质细胞促进骨髓移植小鼠免疫功能重建. 中华血液学杂志 1995;16(2):81—83.
2. 孙汉英,舒砚君,刘文励,等. 川芎嗪改善免疫诱导再生障碍性贫血小鼠骨髓微环境作用的研究. 中华血液学杂志 1998;19(4):178—180.
3. Mohle R, Bantz F, Rafii, et al. The chemokine receptor CXCR4 is expressed on CD34⁺ hematopoietic progenitors and leukemic cell and mediates transendothelial migration induced by stromal cell derived factor-1. Blood 1997;91(12):4523—4530.
4. 丁顺利,褚建新,赵钧铭,等. 骨髓移植后造血重建过程中干/祖细胞增殖特性的研究. 中国实验血液学杂志 1999;7(2):138—141.
5. Gupta P, Oegema TR, Braizil JJ, et al. Structurally specific heparin sulfates support primitive human hematopoiesis by formation of a multimolecular stem cell niche. Blood 1998;92(12):4641—4651.
6. Han ZC, Bellucci S, Shen ZX, et al. Glycosaminoglycans enhance megakaryocyte cytopoiesis by modifying the activities of hematopoietic growth regulators. J Cell Physiol 1996;168(1):97—104.
7. Borghesi LA, Yamashita Y, Kincade PW. Heparin sulfate proteoglycans mediate interleukin-7-dependent B lymphopoiesis. Blood 1999;93(1):140—148.

(收稿 2001-04-06 修回 2001-09-22)

关于举办“中华中医药学会学术年会暨创新优秀论文评选活动”的通知

为了促进中医药学术在新世纪的发展,总结我会建会以来的中医药学术成就,研讨我国加入 WTO 后中医药发展的战略和对策,做好中医药的继承、发展、创新工作,促进中医药整体学术水平的提高,推动中医药行业技术创新,实现中医药现代化,中华中医药学会主办、浙江康莱特药业有限公司协办,定于 2002 年 10 月在杭州举办“中华中医药学会学术年会暨创新优秀论文评选活动”。现将有关事项通知如下。

1 征文内容 (1)中医内、外、妇、儿等临床各科研究进展及发展趋势 (2)中医基础理论研究及进展 (3)中西医结合研究的思路与方法 (4)经络临床研究与应用 (5)中医现代化研究 (6)如何作好中医药学术的继承与发展 (7)中医药创新研究 (8)中药现代化研究 (9)中医药在农村基层医疗中的应用; (10)中医药人才的教育与培养 (11)中医药养生、康复、保健研究与实践 (12)中医药古籍的整理 (13)中医药与信息技术 (14)中医专科专病建设 (15)中药新药开发研究 (16)中医

药如何迎接 WTO 挑战 (17)中药剂型改革 (18)中药材的栽培、炮制及中药提取技术研究 (19)中医药多学科研究 (20)中药复方配伍及药性研究 (21)中医医院管理、中医护理经验总结 (22)与中医药相关的其他内容。

2 征文要求 (1)来稿要求有创新性,论据充分,观点鲜明,内容充实,字数限 4000 字以内,附 800 字以内摘要,请一律用打印稿并寄送软盘或将文章发送到我会 E-mail 上 (2)来稿请详细注明作者单位、职务、职称、邮编、地址等 (3)请自留底稿,恕不退稿,来稿一律文责自负 (4)大会学术委员会将对所录用的论文进行评审,并设创新优秀论文奖 (5)截稿日期:2002 年 7 月 30 日。

3 来稿联络处:100029 北京市朝阳区樱花区东街甲 4 号 中华中医药学会学术部(收),请在信封右上角注明“学术年会”字样。咨询电话:010—64212828,传真:010—64297983, E-mail:jfaaa@263.net jflaa@sohu.com。