

人参总皂甙诱导人内皮细胞和单核细胞 表达 GM-CSF 的实验研究 *

陈 笛 王莎莉 王亚平 姜 蓉

摘要 目的:研究人参总皂甙(TSPG)对人内皮细胞和单核细胞表达粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的影响,及其与人粒单系血细胞发生调控的关系。方法:采用造血祖细胞体外培养、造血生长因子生物学活性检测、免疫细胞化学和核酸分子原位杂交等技术,检测内皮细胞和单核细胞中 GM-CSF 的表达。结果:经 TSPG 诱导制备的内皮细胞和单核细胞条件培养液中富含 GM-CSF 样活性,能显著促进人粒单系造血祖细胞的增殖分化;TSPG 能显著促进内皮细胞与单核细胞的 GM-CSF 蛋白和 mRNA 表达。结论:TSPG 可能通过直接和间接途径促进造血诱导微环境中的内皮细胞和单核细胞合成和分泌 GM-CSF,进而促进血细胞生成。

关键词 人参总皂甙 血细胞生成 粒单系造血祖细胞 粒细胞 巨噬细胞集落刺激因子

Experimental Study on Expression of GM-CSF from Human Endothelial Cells and Monocytes Induced by Total Saponins of Panax ginseng CHEN Di, WANG Sha-li, WANG Ya-ping, et al *Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing (400016)*

Objective: To study the effect of total saponins of Panax ginseng (TSPG) on the expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) from human endothelial cells and monocytes and the relationship between TSPG and human granulocytopoiesis and monocytopoiesis modulation. **Methods:** Adopting the hematopoietic progenitor cells culture in vitro, hematopoietic growth factor biological assay, immunocytochemistry and nucleic acid in situ hybridization, the GM-CSF expression in the endothelial cells and monocytes were detected. **Results:** The conditioned cultural media of endothelial and monocytes induced and prepared by TSPG, could significantly promote the proliferation and differentiation of human colony forming unit-granulocyte macrophage (CFU-GM), and enhance the protein and mRNA expression of GM-CSF in endothelial cells and monocytes. **Conclusion:** TSPG could possibly through direct or indirect route, promote hematopoietic, induce endothelial cells and monocytes in the microenvironment to synthesize and secrete GM-CSF, so as to further promote the proliferation and differentiation of human CFU-GM.

Key words total saponins of Panax ginseng, hematopoiesis, colony-forming unit, hematopoiesis progenitor cells, granulocyte, macrophage colony-stimulating factor

人参是中医的补气要药,具有补气生血之功效,人参总皂甙(total saponins of Panax ginseng, TSPG)是其主要药效成分之一。我们既往的工作证实 TSPG 能促进贫血小鼠造血功能的恢复,亦能在体外促进造血祖细胞的集落形成^[1,2]。本研究采用造血祖细胞体外培养、造血生长因子生物学活性检测、免疫细胞化学和核酸分子原位杂交等实验血液学技术,探讨 TSPG 诱导人内皮细胞和单核细胞表达粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating fac-

tor, GM-CSF)及其与粒单系造血调控的相互关系,旨在阐明人参补气生血的细胞与分子生物学机理。

材料与方法

1 材料

1.1 人骨髓细胞(bone marrow cell, BMC) 取胸外科手术切除新鲜肋骨,供髓者无放化疗史,骨髓细胞涂片检查无造血系统异常。淋巴细胞分离液分离骨髓有核细胞, RPMI-1640 培养液洗涤制备单细胞悬液。

1.2 TSPG 重庆中药研究所提供,纯度为 98% 以上,用 RPMI-1640 培养液配制成所需浓度。

1.3 主要试剂 RPMI-1640 培养液:美国 GIBCO 公司产品;马血清:军事医学科学院提供;新生牛

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39670880)

重庆医科大学基础医学院(重庆 400016)

通讯作者:王莎莉;Tel: 023-68892728;E-mail: YPWang@public.

万方数据

血清(BS):杭州四季青公司产品;重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF):购自军事医学科学院基础医学研究所;鼠抗人 GM-CSF 单克隆抗体:美国 Pharmingen 公司产品。

1.4 GM-CSF 寡核苷酸探针合成与标记 上海博亚生物技术有限公司按核酸序列 5'-ATGTGGCT-GCAGAGCCTGCTGC-3'在 DNA 合成仪上合成,经 PAGE 纯化达 99%,并在 5'端用 Digoxigenin-11-dUTP 进行末端标记。

1.5 人内皮细胞条件培养液(HEcCM)和单核细胞条件培养液(HMCM)制备 人脐静脉内皮细胞株(EcV304)和人单核细胞株(THP-1)购自中国科学院上海细胞生物研究所。实验分组:未诱导组(简称 B 组),在含 10%BS 的 RPMI-1640 培养液中常规传代培养;TSPG 组(简称 C 组),培养体系中加入 TSPG(终浓度 50μg/ml);阳性诱导剂组(简称 D 组),培养体系中加入阳性诱导剂 IL-1(终浓度 100U/ml)。分组加药后,置 37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养 24h,离心收集各组培养上清液。

2 方法

2.1 TSPG 诱导制备的 HEcCM 和 HMCM 中所含 GM-CSF 生物学活性检测 人粒单系造血祖细胞(colony-forming unit-granulocyte macrophage, CFU-GM)的体外培养集落鉴定与计数按本室常规方法进行^[3]。在 CFU-GM 培养体系中设置:对照组(简称 A 组):常规培养;未诱导组(B 组):在常规培养基础上分别加 10%(V/V)未经诱导制备的各组条件培养液;TSPG 组(C 组):在常规培养基础上分别加入 10%(V/V)经 TSPG 诱导制备的各组条件培养液;阳性诱导剂组(D 组):在常规培养基础上分别加入 10%(V/V)经 IL-1 诱导制备的各组条件培养液。根据 1×10⁵BMC 所生成的 CFU-GM 集落数,评价各组条件培养液中所含 GM-CSF 的生物活性。

2.2 TSPG 对内皮细胞和单核细胞表达 GM-CSF 蛋白的影响 采用 SP 免疫细胞化学技术检测^[4]未诱导组(B 组)、TSPG 组(C 组)和阳性诱导剂组(D 组)作用浓度和时间同“1.5”的内皮细胞和单核细胞胞质内 GM-CSF 蛋白表达,并设置不加一抗的阴性对照组。每张载片计数 300 个细胞,计算 GM-CSF 蛋白表达阳性率。

2.3 TSPG 对内皮细胞和单核细胞表达 GM-CSFmRNA 的影响 采用核酸原位杂交技术检测^[5]内皮细胞和单核细胞中 GM-CSFmRNA 表达(实验分组同“2.2”,诱导时间为 12h),并设置不加探针和 RNA 酶处理载片的阴性对照组。光镜下每张载片计数 200 个细

胞,计算阳性细胞的百分比和积分指数。反应强度依据胞浆中杂交信号的多少及颜色深浅分为强阳性(+++)、阳性(++)、弱阳性(+)和阴性(-)4 级,分别记为 3、2、1 和 0 分。积分指数=阳性百分率×强度积分。

3 统计学方法 采用方差分析及 q 检验。

结 果

1 各组 GM-CSF 生物活性的检测结果 见表 1。A 组常规制备的 HEcCM 和 HMCM 对 CFU-GM 的增殖分化的刺激作用较弱,而经 TSPG 或阳性诱导剂体外诱导 24h 制备的各组(C、D 组)条件培养液能显著促进 CFU-GM 的增殖分化,其集落产率明显提高,与未诱导组(B 组)比较差异有显著性(P<0.05)。提示 TSPG 能诱导内皮细胞和单核细胞生成 GM-CSF 样活性物质。

表 1 各组 CFU-GM 生物活性检测结果
(集落数/1×10⁵BMC, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	GM-CSF	
		HEcCM	HMCM
A	24	51.78±6.15	55.57±7.32
B	24	55.43±5.65*	59.35±7.29*
C	24	66.52±5.21 [△]	73.22±8.90 [△]
D	24	65.04±6.31 [△]	68.57±9.37 [△]

注:与 A 组比较,*P<0.05;与 B 组比较,[△]P<0.05

2 TSPG 对内皮细胞和单核细胞表达 GM-CSF 蛋白的影响 见表 2。免疫细胞化学检测显示未诱导组(B 组)的内皮细胞和单核细胞胞浆中 GM-CSF 蛋白表达水平较低;经 TSPG 体外诱导 24h(C 组)及 IL-1 阳性诱导剂作用(D 组)后,上述细胞表达 GM-CSF 蛋白的阳性率显著提高,与未诱导组(B 组)比较的差异有显著性(P<0.05)。提示 TSPG 可诱导和促进上述细胞表达 GM-CSF 蛋白。

表 2 TSPG 对内皮细胞和单核细胞表达 GM-CSF 蛋白的影响 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	内皮细胞	单核细胞
B	5	15.13±4.10	19.04±2.51
C	5	27.30±2.43*	32.83±8.88*
D	5	34.16±3.50*	29.66±3.06*

注:与 B 组比较,*P<0.05

3 TSPG 对内皮细胞和单核细胞表达 GM-CSFmRNA 的影响 见表 3。核酸原位杂交结果显示:未诱导组(B 组)内皮细胞和单核细胞表达 GM-CSFmRNA 的水平较低;经 TSPG 诱导 12h(C 组)及 IL-1 阳性诱导剂(D 组)作用后,上述细胞 GM-CSFmRNA 表达阳性率和表达阳性强度积分值均显著提高,与 B 组比较差异有显著性(P<0.05)。提示 TSPG 能促进上述细胞 GM-CSFmRNA 的表达。

表 3 TSPG 对内皮细胞和单核细胞表达 GM-CSFmRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	内皮细胞		单核细胞	
		阳性率(%)	积分指数	阳性率(%)	积分指数
B	5	16.90±3.27	0.23±0.04	26.88±4.88	0.45±0.09
C	5	28.30±1.75*	0.69±0.05*	50.38±3.79*	0.84±0.12*
D	5	31.32±4.62*	0.73±0.04*	52.86±4.47*	1.03±0.16*

注:与 B 组比较,*P<0.05

讨 论

TSPG 是人参补气生血或促进血细胞发生的有效成分之一,能促进小鼠造血干(祖)细胞的增殖分化,但其机理尚有待阐明^[1,6]。造血诱导微环境(haematogenesis induction microenvironment, HIM)是造血干(祖)细胞定居、增殖和分化的场所,骨髓基质细胞是构成 HIM 的核心成分,它包括成纤维细胞、单核-巨噬细胞、内皮细胞和载脂细胞等。实验证明,造血基质细胞不仅为血细胞发生提供有活力的支架,还可通过细胞间直接接触来调节血细胞生成^[7],更为重要的是它们能分泌多种造血生长因子和(或)受体,促进或抑制造血发生^[8]。我们前期工作已经证明:TSPG 在体外可诱导骨髓基质细胞表达 GM-CSF。

骨髓基质细胞是一混合细胞群体,而内皮细胞和巨噬细胞是其主要组成成分。单核-巨噬细胞来源于骨髓造血细胞,又反过来对造血发生起着调控作用。无论是骨髓中单核巨噬细胞,还是骨髓外巨噬细胞,都可通过分泌造血生长因子等活性物质调节造血。内皮细胞不仅是造血细胞进出血循环的通路,也可通过分泌造血生长因子对血细胞发生进行调控^[9-11]。为明确 TSPG 对内皮细胞和单核细胞分泌 GM-CSF 样活性的影响,我们分别采用人单核细胞株 THP-1 和脐静脉内皮细胞株 EcV304 为单核-巨噬细胞和内皮细胞模型,对其在 TSPG 刺激下分泌 GM-CSF 样活性进行了检测。本研究结果显示,经 TSPG 诱导制备的 THP-1 和 EcV304 培养上清液对 CFU-GM 的增殖分化有明显促进作用,提示其中 GM-CSF 样活性有所增加。可以推测 TSPG 对内皮细胞和单核-巨噬细胞表达 GM-CSF 具有明显的刺激作用。

采用造血祖细胞体外培养检测造血生长因子的生物活性仅反映细胞条件培养液具有 GM-CSF 样活性,但由于造血生长因子具有多效性和冗余性的特点,故该方法的特异性不强。为进一步验证 TSPG 是否能影响上述细胞表达 GM-CSF,本研究采用免疫细胞化学技术检测了 THP-1 和 EcV304 的 GM-CSF 蛋白表达水平。结果显示,经 TSPG 诱导后上述两种细胞的 GM-CSF 蛋白

表达阳性率显著高于未诱导组,这与生物活性检测的结果相一致。为了进一步明确 TSPG 能否在转录水平上促进 GM-CSF 表达,我们制备 GM-CSF 寡核苷酸探针,运用原位杂交技术对 THP-1 和 EcV304 的 GM-CSFmRNA 表达水平进行检测,结果提示 TSPG 能促进内皮细胞和单核-巨噬细胞中 GM-CSFmRNA 的表达。

现代造血理论认为,造血调控因子与造血细胞膜上相应受体结合,启动调控信号向核内转导,引起核内某些基因转录增强和(或)其他基因转录抑制,最终表现为蛋白质合成改变,导致细胞行为的变化。尽管在 CFU-GM 的增殖分化中受到诸多造血调控因子的控制,但 GM-CSF 与 GM-CSF 受体相互作用却是粒单系血细胞发生调控的关键环节。本研究结果提示:TSPG 能诱导造血微环境中的内皮细胞和单核-巨噬细胞表达 GM-CSF 蛋白和 mRNA,这可能是 TSPG 调控粒单系血细胞发生和促进免疫功能的生物学机理之一。

参 考 文 献

- 1 王 勇,王亚平,祝彼得.人参总皂甙对小鼠造血细胞增殖的影响.解剖学杂志 1995;18(2):153—156.
- 2 黄 干,祝彼得,张慎淑.人参总皂甙对小鼠血细胞发生的影响.中华血液学杂志 1990;11(1):66—68.
- 3 姜 蓉,王亚平,戴 勤.粒单系造血祖细胞 CFU-GM 琼脂半固体培养的原位固定及鉴定染色.中国组织化学与细胞化学杂志 2000;3(3):344—346.
- 4 顾广玉,朱明华,王文亮,等.细胞信号传导分子 P36 在人肝细胞癌中的表达.第二军医大学学报 1998;19(4):314.
- 5 王亚平,王 勇,郑 敏,等.地高辛标记的 cDNA 探针检测 GM-CSFmRNA 表达.免疫学杂志 1999;15(4):266—269.
- 6 王 勇,祝彼得,王亚平.人参总皂甙体外刺激小鼠造血作用机理的研究.中华血液学杂志 1995;16(12):648—649.
- 7 Weimar IS, Miranda N, Muller EJ, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) is produced by human bone marrow stromal cells and promotes proliferation, adhesion and survival of human hematopoietic progenitor cells (CD34⁺). Exp Hematol 1998;26(9):885—894.
- 8 Kittler EL, McGrath H, Temeles D, et al. Biologic significance of constitutive and subliminal growth factor production by bone marrow stroma. Blood 1992;79(12):3168—3178.
- 9 滕小伟,赵 佼,谭文松.内皮细胞在调控造血中的作用.国外医学.输血及血液学分册 2001;24(1):16—18.
- 10 Jazwiec B, Solanilla A, Grosset C, et al. Endothelial cell support of hematopoiesis is differentially altered by IL-1 and glucocorticoids. Leukemia 1998;12(8):1210—1220.
- 11 吴 岩,祝彼得,潘克俭.内皮细胞对小鼠粒系、红系和巨核系造血的调控作用.华西医科大学学报 2001;32(1):66.