

● 论 著 ●

丹参素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 江西南昌 330006 ; 2 江西省肿瘤医院 南昌 330029;

3 南昌大学研究生院医学部 2005 级 江西南昌 330006)

摘要:目的:探讨丹参素对小鼠外周血造血干细胞的动员作用及其对外周血细胞和骨髓基质细胞黏附分子的影响。方法:30 只 BALB/c 小鼠随机分为三组:丹参素组、G-CSF 组、生理盐水组,腹腔注射 d1~d7,每日 1 次,第 2~8 天,采用外周血 WBC 和 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:丹参素组给药第 7 天外周血 WBC、MNC 数量达到高峰,分别为给药前的 3 倍和 3.5 倍;丹参素组外周血 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(1.03±0.24)%、(12.59±2.64)%和(50.86±8.77)%,均明显高于生理盐水组($P<0.05$);其 CFU-GM、CFU-MK 和 CFU-E 产率分别为(14.90±2.88)%、(12.50±4.06)%和(16.10±6.36)%,均明显高于生理盐水组($P<0.01$)。结论:丹参素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黏附分子的表达有关。

关键词:丹参素;外周血造血干细胞;动员

Abstract:Objective:To study tanshinol 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 BABL/c mice.Methods:Thirty BABL/c mice were divided into three groups at random (n=10 each):From day 1 to 7,mice were intraperitoneally injected with tanshinol (Group Tanshinol) and rhG-CSF (Group G-CSF) respectively,normal control with equivalence saline.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 tanshinol, the numbers of WBC and MNC reached the maximum, which were 3 and 3.5 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 tanshinol was (1.03±0.24)%、(12.59±2.64)% and(50.86±8.77)% 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 (14.90±2.88)%、(12.50±4.06)% and (16.10±6.36)% respectively,were markedly higher than in NS group ($P<0.01$).Conclusion:Tanshinol 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: tanshinol; peripheral blood hematopoietic stem cell; Mobilization

中图分类号:R 285.5

文献标识码:B

文献编号:1671-4040(2009)05-0001-03

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。丹参为活血化瘀类中药,丹参素为其主要有效成分之一。研究表明丹参素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用^[1-4]。本研究以 BALB/c 小鼠为实验动物模型,研究丹参素对小鼠 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,为丹参素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 18~20g,由湖北省疾病预防控制中心动物中心提供。

1.2 药物 丹参素纯品(上海医科大学提供,含量为 99%,批号 060525);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,批号 060820)。

1.3 试剂和仪器 IMDM 培养基、胎牛血清(Hyclone 公司);SCF、IL-3、TPO (PeproTech 公

司);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);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);SABC 免疫组化染色试剂盒(VECTOR 公司);DAB 显色试剂盒(福州迈新生物技术开发公司);流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)。

1.4 分组与处理 将 30 只 BALB/c 小鼠随机分为三组(每组 10 只):生理盐水组、丹参素组(300mg/kg)、G-CSF 组(250μg/kg);各组均腹腔注射给药,0.2mL/次,1 次/d,连续给药 7d。

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 天断尾取外周血 20μL,用常规方法行外周血白细胞及有核细胞计数,观察丹参素给药后对外周血 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 给药后第 8 天用 1%戊巴比妥钠 0.3mL 腹腔注射麻

醉小鼠,用 5mL 抗凝注射器在无菌状态下剖胸直视心脏取血,约 0.8mL / 只。采用 Ficoll-Hypague 液常规离心制备外周血单个核细(PBMNC),用 PBS 洗涤 2 次后计数,调节 PBMNC 浓度为 $1\times 10^6/\text{mL}$,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^[5],CFU-GM 和 CFU-E 培养采用半固体培养体系:27g/L 甲基纤维素、胎牛血清、0.1g/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 培养采用血浆凝固块培养体系:27g/L 甲基纤维素、牛血浆、0.1g/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、SCF 及 TPO,终浓度均为 20 $\mu\text{g/L}$,每孔 PBMNC 数为 2×10^5 ,每孔总体积为 1mL。所有干 / 祖细胞培养板均置于 5%CO₂、37℃ 培养箱中培养 14d,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 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 $1\times 10^6/\text{mL}$,取 1mL 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℃ 丙酮固定 10min,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,对数据进行方差分析和 t 检验的统计学处理。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丹参素对小鼠外周血 WBC、MNC 影响的时效关系 丹参素组小鼠外周血 WBC、MNC 数量给药 2d 后开始升高,于第 7 天达高峰,分别为给药前的 3 倍和 3.5 倍,与用药前比较差异有统计学意义($P<0.01$);丹参素组给药第 7 天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、表 2。

表 1 给药后不同时间小鼠外周血 WBC 数量比较 ($\bar{X}\pm S$) $\times 10^9/\text{L}$										
组别	n	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	10	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	
丹参素组	10	6.12 $\pm$ 1.68	6.52 $\pm$ 1.36	10.32 $\pm$ 1.67	11.92 $\pm$ 1.32	15.85 $\pm$ 1.96	16.58 $\pm$ 1.56	18.41 $\pm$ 1.72	16.84 $\pm$ 1.72	
G-CSF 组	10	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 ($\bar{X}\pm S$) $\times 10^9/\text{L}$										
组别	n	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	10	4.10 $\pm$ 1.00	4.49 $\pm$ 0.82	4.35 $\pm$ 0.99	4.49 $\pm$ 0.71	3.71 $\pm$ 1.01	3.86 $\pm$ 0.75	4.37 $\pm$ 0.53	4.33 $\pm$ 0.93	
丹参素组	10	4.11 $\pm$ 1.13	4.44 $\pm$ 1.13	7.22 $\pm$ 1.41	7.92 $\pm$ 1.40	11.68 $\pm$ 1.71	13.58 $\pm$ 1.56	14.56 $\pm$ 1.26	13.79 $\pm$ 2.19	
G-CSF 组	10	4.03 $\pm$ 1.17	6.96 $\pm$ 1.01	11.56 $\pm$ 1.54	14.50 $\pm$ 1.54	15.87 $\pm$ 1.38	17.41 $\pm$ 1.77	20.13 $\pm$ 2.82	18.7 $\pm$ 3.26	

2.2 丹参素对小鼠外周血 CD34⁺ 细胞和 CD49d 阳性细胞的影响 丹参素组小鼠外周血 CD34⁺ 细胞和 CD49d 阳性细胞百分率均明显高于生理盐水组($P<0.05$);丹参素组与 G-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。

表 4。

表 4 给药后各组小鼠 CFU-GM、CFU-MK、CFU-E 集落产率 ($\bar{X}\pm S$) %				
组别	n	CFU-GM	CFU-MK	CFU-E
生理盐水组	10	1.5 $\pm$ 1.27	0.8 $\pm$ 1.03	0.4 $\pm$ 0.52
丹参素组	10	14.9 $\pm$ 2.88*	12.5 $\pm$ 4.06*	16.1 $\pm$ 6.36*
G-CSF 组	10	53.1 $\pm$ 9.63 [△] *	20.4 $\pm$ 5.36 [△] *	128.5 $\pm$ 28.19 [△] *

注:与生理盐水组比较,* $P<0.01$;与丹参素组比较,[△] $P<0.01$ 。

表 3 给药后各组小鼠 CD34 ⁺ 、CD49d 及 VCAM-1 表达 ($\bar{X}\pm S$) %				
组别	n	CD34 ⁺	CD49d ⁺	VCAM-1
生理盐水组	10	0.21 $\pm$ 0.10	4.94 $\pm$ 1.92	31.23 $\pm$ 9.36
丹参素组	10	1.03 $\pm$ 0.24 [△]	12.59 $\pm$ 2.64 [△]	50.86 $\pm$ 8.77 [△]
G-CSF 组	10	3.16 $\pm$ 1.32 [△] *	22.81 $\pm$ 8.92 [△] *	71.60 $\pm$ 9.44 [△] *

注:与生理盐水组比较,* $P<0.01$,[△] $P<0.05$;与丹参素组比较,[△] $P<0.01$ 。

3 讨论

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。本实验结果表明,给药后丹参素组小鼠外周血 WBC 计数、CD34⁺ 细胞百分率及干 / 祖细胞集落计数与生理盐水组相比均明显增加;但丹参素组以上指标均低于 G-CSF 组。证明丹参素对小鼠外周血干细胞有一定的动员作用,但其动员效果不如 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黏附分子实现的,在众多的干细胞表面

2.3 丹参素对小鼠骨髓基质细胞 VCAM-1 表达影响 丹参素组小鼠骨髓基质细胞 VCAM-1 阳性细胞数量明显比生理盐水组多($P<0.05$)。结果见表 3。

2.4 丹参素对小鼠外周血 CFU-GM、CFU-MK、CFU-E 集落产率的影响 丹参素组 CFU-GM、CFU-MK 和 CFU-E 集落产率明显高于生理盐水组($P<0.01$),但明显低于 G-CSF 组($P<0.01$)。结果见

黏附分子中,VLA-4(CD49d)是介导干细胞与骨髓黏附的最重要受体,它通过与 VCAM-1、Fn 的结合介导干细胞与骨髓微环境的黏附,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^[6]。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,其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^[7]。本研究结果表明丹参素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,说明丹参素有可能通过作用于造血细胞和基质细胞,提高黏附分子受体和黏附分子配体表达,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.活血化痰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]叶铁真,吴梓梁.丹参注射液对家兔粒-巨噬系细胞动员作用的研究[J].实验血液学杂志,1995,3(1):68-73
[5]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
[6]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
[7]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:2009-04-24)

中药溃疡油局部治疗糖尿病皮肤化脓性溃疡 31 例体会

易学招 陈四萍

(江西省萍乡市人民医院 萍乡 337000)

关键词:糖尿病;皮肤化脓性溃疡;中药溃疡油

中图分类号:R 587.1

文献标识码:B

文献编号:1671-4040(2009)05-0003-01

糖尿病患者可并发疔、痈等皮肤化脓性感染,使皮肤形成难以愈合的慢性溃疡,治疗时除积极控制感染和血糖外,局部溃疡面的清创换药也至关重要。我院于 2005 年 9 月~2007 年 12 月应用中药溃疡油治疗糖尿病皮肤化脓性溃疡 31 例,取得满意的临床疗效。现将体会报告如下:

1 临床资料

1.1 一般资料 本组病例男性 20 例、女性 11 例,年龄 24~72 岁。31 例皮肤化脓性溃疡患者均已确诊为 2 型糖尿病,其中 12 例溃疡发生在足部、8 例在小腿、3 例在颈部、4 例在单侧上臂、1 例在背部、3 例在骶尾部及臀部。

1.2 治疗方法 传统治疗方法采用手术为主,积极控制血糖和感染,创面切开排脓后使用凡士林纱条引流,待其自行吸收愈合后手术缝合或植皮。我科引进北京中医药大学附属医院“糖尿病皮肤化脓性溃疡”治疗新技术后,溃疡前期在局部波动明显张力最大点采用外科切开排脓,并取脓液标本做细菌培养+药敏实验,常规清洗消毒创面,坏死组织与正常组织分界渐清即采用“蚕食法”分次清除坏死组织以全面暴露伤口,祛除腐烂组织,减少溃疡处压力;待创面渗出减少、无异味、可见新鲜肉芽组织时改用中药溃疡油湿敷换药,每日 1~2 次。

1.3 疗效标准 临床治愈:临床症状消失,溃疡面愈合;显效:临床症状明显好转,溃疡面缩小 2/3 以上;有效:临床症状好转,皮肤颜色明显改善,溃疡面缩小 1/2 以上;无效:溃疡及全身症状无改变。

1.4 结果 31 例皮肤溃疡均愈合。愈合时间与溃疡面积大小以及部位有关,溃疡面积小,愈合较快,溃疡面积大,愈合较慢,颈部、背部、上肢愈合快,臀部、下肢愈合慢。其中临床治愈 27 例(87.10%),显效 2 例(6.45%),有效 2 例(6.45%),平均住院日为 20.3d,愈合时间平均为 34.1d。

2 讨论

糖尿病患者由于机体抵抗力低下,以及微血管病变的发生,皮肤感染是常见的并发症,其中化脓性感染约占 20%,主要是金黄色葡萄球菌感染,往往难以控制而发展成疔、痈、脓肿,直至形成难以愈合的慢性溃疡。溃疡油有黏附性,易保持创面湿润,其主要成分大黄、白芷具有消炎、活血、祛风、散湿等作用,均有利于肉芽组织生长。成熟的肉芽组织及温暖湿润的创面环境是形成上皮的必要条件,从而达到促进创面尽快愈合的目的。本技术由于无须加重创伤,减少了住院时日,后期可门诊换药,避免二次手术的风险和痛苦,无并发症,疗效确切满意。

(收稿日期:2009-04-03)