

论著 · 实验研究

黄芪甲甙对骨髓间充质干细胞分泌干细胞因子的影响

谭艳芳¹ 殷小成¹ 熊玉娟² 王艳¹

(1. 南华大学附属第一医院儿科, 湖南 衡阳 421001; 2. 湖南省儿童医院康复科, 湖南 长沙 410000)

[摘要] **目的** 初步探讨中药黄芪甲甙对大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)表达细胞因子的影响。**方法** 全骨髓贴壁法和单克隆培养法分离培养大鼠 MSCs, 间接免疫荧光法鉴定其生物学特性, 用 MTT 法检测黄芪甲甙对 MSCs 增殖的影响, RT-PCR 方法检测多种细胞因子的表达及黄芪甲甙对细胞因子的影响。**结果** 成功分离出大鼠 MSCs, 有干细胞因子(SCF)、血小板生成素(TPO)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、转化生长因子(TGF-β1)的表达, 不表达白介素-3(IL-3); 加入不同浓度的黄芪甲甙与 MSCs 共培养 24、48、72 h 后, 以 200 mg/mL 黄芪甲甙组 72 h 增殖作用最明显($P < 0.05$); RT-PCR 分析示黄芪甲甙培养组 MSCs 分泌 SCF mRNA 高于未加黄芪甲甙的对照组($P < 0.01$), 其余细胞因子表达量与对照组相比差异无统计学意义。**结论** 黄芪甲甙能促进 MSCs 体外增殖, 并可以诱导和促进 MSCs 分泌 SCF, 这可能揭示了其促进 MSCs 增殖和分化的部分机制。

[中国当代儿科杂志, 2010, 12(4):290-292]

[关键词] 黄芪甲甙; 干细胞因子; 间充质干细胞
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)04-0290-03

Stem cell factor secretion by bone mesenchymal stem cells stimulated with astragaloside IV

TAN Yan-Fang, YIN Xiao-Cheng, XIONG Yu-Juan, WANG Yan. Department of Pediatrics, First Hospital, Nanhua University, Hengyang, Hunan 421001 (Yin X-C, Email: xcyin108@sina.com)

Abstract: Objective To study the effect of astragaloside IV on the expression of cytokines in bone mesenchymal stem cells (MSCs) in rats. **Methods** MSCs were isolated from Wistar rats by the method of adhesive cultivation and clone, and then their biological activities were assessed using indirect immunofluorescence. Proliferation of MSCs stimulated with astragaloside IV was ascertained by the MTT method. Expression of cytokines was ascertained using RT-PCR in MSCs with astragaloside IV stimulation or not. **Results** MSCs were effectively isolated and purified *in vitro*, and had expression of many cytokines except IL-3, such as stem cell factor (SCF), thrombopoietin (TPO), granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and transforming growth factor (TGF-β1). Astragaloside IV stimulation promoted MSCs proliferation, and 200 mg/mL astragaloside IV treatment produced a peak effect 72 hrs after culture. The SCF expression in MSCs stimulated with astragaloside IV increased significantly compared with that in MSCs without astragaloside IV stimulation. **Conclusions** Astragaloside IV may promote MSCs proliferation and increase SCF secretion *in vitro*. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(4):290-292]

Key words: Astragaloside IV; Stem cell factor; Mesenchymal stem cell

机体正常的造血活动依赖于造血细胞和支持造血细胞生长发育的造血微环境的相互作用。源于骨髓中的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是造血微环境的重要组成部分,它通过与造血细胞直接接触,分泌细胞外基质及多种细胞因子调控造血,其结构和功能的完整性对于保持机体在生理状况下尤其是应激状态下造血的稳定性具有十分重要的作用。以往研究表明,黄芪甲甙可以影响

MSCs 增值并诱导其分化^[1],本研究以大鼠 MSCs 为对象,探讨黄芪甲甙对 MSCs 增殖活性及部分细胞因子表达的影响,从而探索其促增殖和诱导分化的生物学机制,为黄芪甲甙在临床血液病中的应用提供实验依据。

[收稿日期]2009-07-14;[修回日期]2009-10-12
[作者简介]谭艳芳,女,硕士研究生,住院医师。
[通信作者]殷小成,副主任医师。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级4~6周龄Wistar大鼠,体重120~160 g,由南华大学实验动物中心提供。黄芪甲甙由成都曼斯特生物科技有限公司提供(纯度>98%),助溶剂为羧甲基纤维素钠。cy3标记羊抗兔二抗、兔抗鼠CD44多克隆抗体、CD45多克隆抗体购自北京奥博深生物科技公司,PCR引物由上海生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 MSCs的分离、培养、鉴定和细胞增殖活性检测 全骨髓贴壁法和单克隆培养法相结合分离培养大鼠MSCs。取大鼠股骨、胫骨(去掉两端骨髓),用无血清的DMEM-LG反复抽吸骨髓腔,重悬后取瓶底白色沉淀物,加10%培养基吹匀移至培养瓶,置37℃,5% CO₂培养箱培养。24 h后弃去非贴壁细胞,2~3 d换液一次。当细胞达80%~90%融合时,0.125%胰酶消化传代。间接免疫荧光法检测大鼠MSCs的免疫表型。取第3代传代培养第2天的细胞接种于24孔板中(1×10⁴细胞/孔),经固定、透膜、封闭处理后,再分别加入兔抗鼠CD44、CD45抗体4℃过夜,回收一抗,避光加入cy3标记羊抗兔IgG,室温孵育1 h后PBS洗2次,荧光显微镜下观察并拍照,阴性对照仅加入PBS。

采用MTT法检测不同浓度的黄芪甲甙对MSCs增殖活性的影响。收集对数期细胞,调整细胞悬液浓度加入96孔板中(<10³/孔),放置培养箱中孵育

2 h后,每孔加入不同浓度的黄芪甲甙100 μL,阳性对照仅加100 μL DMEM-LG培养液,孵育12 h、24 h、72 h后,每孔加MTT(5 mg/mL)及DMSO处理后,用全自动酶标仪490 nm波长进行比色分析。

1.2.2 黄芪甲甙干预MSCs的培养 取第3代传代培养第2天的细胞,更换含有黄芪甲甙的培养液,终末浓度分别为25、50、100、200、400 mg/mL,对照组仅用培养液培养,置于37℃,5% CO₂培养箱中培养72 h中止培养,制备细胞裂解液,保存于-80℃,备用。

1.2.3 RT-PCR法检测MSCs细胞因子的表达 各代大鼠MSCs总RNA的提取,按TRIZOL试剂盒说明书进行。引物序列见表1。按RT-PCR试剂盒(TaKaRa公司)的说明书进行逆转录反应,反应体系总体积20 μL,含有RNA 1.0 μg,随机引物0.25 μg/μL,AMV逆转录酶15 u。逆转录产物于95℃灭活5 min后,存于-20℃备用。聚合酶链反应体系总体积50 μL中含:10×Buffer(Mg²⁺)5.0 μL,dNTP(10 Mm)1.0 μL,Primer1:(25 μM)1.0 μL,Primer2:(25 μM)1.0 μL,Taq Polymerase(5 U/μL)0.5 μL,Template DNA 3.0 μL,DEPC水38.5 μL,各细胞因子PCR反应条件参考文献^[2]。扩增产物再用2.5%琼脂糖电泳,溴化乙锭染色,紫外线下观察拍照并以Gel Doc1000凝胶成像系统进行灰度扫描,检测电泳条带光密度值,以GAPDH作为内参进行半定量分析。MBP mRNA表达的相对量就是DNA的光密度强度比值(ratio)=MBP mRNA/GAPDH mRNA。

表1 检测各细胞因子的引物序列

基因	引物(正向)	引物(反向)	产物大小(bp)
GAPDH	ACTCAGAAGACTGTGGATGG	GTTGCTGTTGAAGTCCACGG	323
TPO	AGCTTGCAACAAGCTCTCGG	GGTCTGTGATGAGGTCCCAGC	357
GM-CSF	GCTCACCCAAACCCTGTCACCCG	CCTCATTTCTGGACCGGCTTCC	376
IL-3	TGCCTTGGAGATTTTGTTGAAGCTCCC	CAGGTCCTTAAGATGGATCACGTAGA	295
TGF-β1	GCCTCCGCATCCACCTTTG	GCGGGTGACTTCTTTGGCGT	245
SCF	TTCGCTTGTAATTGGCTTTGC	TTCAACTGCCCTTGTAAGACTTGA	296

1.2.4 统计学方法 使用SPSS 13.0软件进行统计学分析。数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组之间采用t检验,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSCs细胞形态学观察及鉴定

大鼠骨髓单个核细胞接种0.5 h开始贴壁,24 h~48 h后贴壁完成,散在分布,伸出伪足为梭形或

多角形,5~7 d后形态一致,以梭形为主,胞体饱满,成纤维样放射状集落形成,7~10 d细胞达培养瓶底部80%左右。传代后的细胞均匀分布生长,24 h内细胞完全贴壁,3~4 d达对数生长期,呈较均匀的纺锤体,传代细胞生长旺盛时呈旋涡状。传至10代时细胞形态基本保持不变。通过不断传代纯化MSCs,CD44表达率为92.3%,CD45表达率为6.9%。各代间差异无显著性,表明MSCs传代过程中保持了其细胞表面标志的稳定性。

2.2 黄芪甲甙对 MSCs 增殖水平的影响

MSCs 与黄芪甲甙共培养后, MSCs 的增殖指数明显增加, 与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 100 mg 组与 200 mg 组比较差异也有统计学意义 ($P < 0.05$), 但 400 mg 组与 200 mg 组相比, 200 mg 组的增殖作用更明显 ($P < 0.05$), 以 200 mg/mL 黄芪甲甙培养 72 h 增殖作用最明显, 说明黄芪甲甙的促增殖作用有时间依赖性而无剂量依赖性, 当达到一定的药物浓度后, 增殖指数将不再增加 (表 2)。

表 2 不同浓度的黄芪甲甙对 MSCs 增殖的影响
($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.02
25 mg 组	0.19 ± 0.02 ^a	0.20 ± 0.02 ^a	0.21 ± 0.02 ^a
50 mg 组	0.20 ± 0.01 ^a	0.21 ± 0.02 ^a	0.22 ± 0.01 ^a
100 mg 组	0.21 ± 0.02 ^a	0.22 ± 0.01 ^a	0.25 ± 0.01 ^a
200 mg 组	0.23 ± 0.02 ^{a,b,c}	0.25 ± 0.02 ^{a,b,c}	0.27 ± 0.02 ^{a,b,c,d}
400 mg 组	0.20 ± 0.02 ^a	0.21 ± 0.02 ^a	0.21 ± 0.01 ^a

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与 100 mg 组比较, $P < 0.05$; c: 与 400 mg 组比较, $P < 0.05$; d: 与同组 24 h 及 48 h 时间段比较, $P < 0.05$ 。

2.3 黄芪甲甙干预后 MSCs 表达细胞因子的检测

大鼠 MSCs 稳定表达 SCF、TPO、GM-CSF、TGF- β 1, 不表达 IL-3。经黄芪甲甙作用后 MSCs 表达 SCF 增加, 其余表达不变; 与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (表 3)。

表 3 黄芪甲甙干预后 MSCs 细胞因子 mRNA 表达的相对量
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	TPO	GM-CSF	TGF- β 1	SCF
对照组	51.4 ± 10.3	89.6 ± 22.5	79.2 ± 17.3	97.7 ± 15.2
200 mg 组	53.2 ± 12.8	94.5 ± 18.8	86.0 ± 20.8	114.1 ± 10.6
t 值	0.336	0.529	0.795	2.801
P 值	> 0.05	> 0.05	> 0.05	< 0.01

3 讨论

MSCs 是存在于骨髓的非造血干细胞, 具有支持造血、免疫调节功能和多向分化潜能。本实验成功提取了大鼠骨髓 MSCs, 并通过其贴壁生长的特性高度纯化 MSCs, 其形态类似成纤维样细胞, 呈平行或纺锤体样生长, 传至 10 代以上, 细胞形态基本保持不变, 表达特异性标志物 CD44, 不表达或低表达造血细胞标志 CD45, 并在长期培养中生物学特性稳定, 与文献报道一致^[2]。而 MSCs 在增殖分化的过程中分泌一些造血功能必需的细胞因子如 SCF、TPO、GM-CSF、TGF- β 1 等, 这些细胞因子均与造血密切相关^[3], 本实验在体外用 RT-PCR 的方法检测它们的表达, 发现这些细胞因子能持续表达, 各代之

间差异无统计学意义, 但不表达 IL-3, 因此推测这些细胞因子对 MSCs 的生长有一定的作用。

本研究结果显示黄芪甲甙与 MSCs 共培养后, MSCs 的增殖指数明显增加, 黄芪甲甙促进 MSCs 增殖呈时间依赖性, 但当达到一定的药物浓度后, 增殖指数将不再增加。对于黄芪甲甙是如何作用于 MSCs 的, 目前国内外尚未见报道。本实验通过检测 SCF、TPO、GM-CSF、TGF- β 1 的表达发现, 加入黄芪甲甙后 SCF 的表达较对照组明显增高, 其他细胞因子的表达差异无统计学意义, 亦未见 IL-3 mRNA 的表达, 推测黄芪甲甙可以诱导和促进 MSCs 分泌 SCF。

SCF 为 c-kit 原癌基因编码受体的配体蛋白, 参与机体发育中多种细胞生长的调控, 是一种多功能细胞生长因子, 在细胞增殖、分化和迁移过程中发挥重要的调控作用。有研究表明^[1], 黄芪甲甙可以定向诱导 MSCs 转化为心肌细胞、神经胶质细胞等, 但诱导率仍有待提高, 其诱导分化的机制目前尚不明确。本研究提示黄芪甲甙促进 MSCs 增殖和分化的机制可能是其促进了 MSCs 分泌 SCF, SCF 同样可以促进 MSCs 的增殖和诱导分化^[4-5]。

SCF 在血液学方面的作用主要表现在: ①在骨髓中与造血干细胞表面表达的 c-kit 结合, 直接对造血干细胞的生存、增殖、分化和粘附及骨髓微环境起着关键作用; ②提高造血干细胞对于其他造血生长因子的敏感性, 反应骨髓基质的造血调控作用; ③促进 MSCs 分化为造血细胞; ④促进造血干细胞的移植。因此在血液系统疾病中具有广阔的应用前景。本实验证实黄芪甲甙可以促进 MSCs 分泌 SCF, 为黄芪甲甙的机制研究及临床应用提供了线索, 也为黄芪甲甙应用于血液系统疾病提供了理论依据。

[参 考 文 献]

[1] 洗绍祥, 杨忠奇, 汪朝晖, 李南夷, 赵立诚. 黄芪甲甙体外诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的实验研究[J]. 广州中医药大学学报, 2007, 24(1): 37-40.

[2] 张翼鹭, 赵丹丹, 韩晓苹, 靳海杰, 达万明, 于力. 低危骨髓增生异常综合征患者间充质干细胞的生物学特性的实验研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2008, 16(4): 813-818.

[3] Ookura N, Fujimori Y, Nishioka K, Kai S, Hara H, Ogawa H. Adipocyte differentiation of human marrow mesenchymal stem cells reduces the supporting capacity for hematopoietic progenitors but not for severe combined immunodeficiency repopulating cells[J]. Molecular Medicine, 2007, 19: 387-392.

[4] 鲍翠玉, 郭军, 马业新, 郑敏. 干细胞因子促进骨髓间充质干细胞向心肌细胞的分化[J]. 中国临床康复, 2006, 10(41): 180-182.

[5] 郭军, 林国生, 鲍翠玉, 贾光宏, 杨波, 汪蕾, 等. 干细胞因子对大鼠骨髓间充质干细胞增殖与分化的影响[J]. 中国医师杂志, 2004, 6(12): 1601-1604.

(本文编辑: 黄 榕)