

· 论 著 ·

黄芪注射液对人巨细胞病毒感染的粒-单系祖细胞体外增殖的影响

刘文君¹, 张迎春¹, 郭渠莲¹, 郭勇², 王琼²

(1. 泸州医学院附属医院儿科; 2. 泸州医学院中心实验室, 四川 646000)

[摘要] 目的 探讨黄芪注射液对人巨细胞病毒(HCMV)感染的粒-单系祖细胞(CFU-GM)体外增殖的影响。方法 采用造血祖细胞体外培养技术,用黄芪干预 HCMV 感染的 CFU-GM,观察计数 CFU-GM 的产率,大小,峰期及维持时间。结果 黄芪组每 2×10^5 个细胞中 CFU-GM 簇和集落的产率分别为 333.33 ± 12.69 和 81.23 ± 4.93 ,病毒组每 2×10^5 个细胞中簇和集落的产率分别为 167.80 ± 16.63 , 53.70 ± 1.67 ,两者相比差异有显著性($P < 0.01$)。黄芪组大集落的比例占 $(9.5 \pm 0.8)\%$,明显高于病毒组 $(2.7 \pm 1.0)\%$, $P < 0.01$ 。黄芪组大集落峰期出现早,集落和大集落维持时间长。结论 在体外黄芪注射液可以促进 HCMV 感染的 CFU-GM 增殖。

[关键词] 黄芪;人巨细胞病毒;粒-单系祖细胞

[中图分类号] R373 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2002)06-0473-03

Effect of Astragalus on the Proliferation of Colony-Forming Units Granulocyte/Monocyte infected by Human Cytomegalovirus in Vitro

LIU WenJun, ZHANG Ying-Chun, GUO QuLian, et al.

Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China

Abstract: **Objective** To study the effect of astragalus on the proliferative ability of colony-forming units granulocyte/monocyte (CFU-GM) infected by human cytomegalovirus (HCMV) in vitro. **Methods** With the culture technique of CFU-GM in vitro, the proliferation of CFU-GM infected by HCMV was assayed in a group treated with astragalus and another one without astragalus. **Results** The numbers of CFU-GM clusters and colonies in 2×10^5 cells in the astragalus-treated group [(333.33 ± 12.69) and (81.23 ± 4.93) , respectively] were significantly greater than those in the untreated group [(167.80 ± 16.63) and (53.70 ± 1.67) , respectively] ($P < 0.01$). The proportion of the production of big colonies in the astragalus-treated group [$(9.5 \pm 0.8)\%$] was significantly higher than that in the untreated group [$(2.7 \pm 1.0)\%$] ($P < 0.01$). The peak time of big colonies appeared earlier, and the colony and big colony could last longer in the astragalus-treated group compared with the untreated group. **Conclusions** Astragalus may promote the proliferation of CFU-GM infected by HCMV.

Key words: Astragalus; Human cytomegalovirus; Colony-forming units granulocyte/monocyte

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)是人群中病毒感染常见的病因^[1]。近年又发现其感染可导致造血功能紊乱^[2]。但对 HCMV 感染至今仍缺乏安全高效的药物。一些药物如阿糖胞苷等化疗药物,在体外能抑制 HCMV,但临床上无明显效果。目前临床上以更昔洛韦等药物最为常

用,但该药费用较昂贵,因而积极从祖国医学宝库中筛选抗 HCMV 药物有一定的临床意义。本研究采用造血祖细胞培养技术,用中药黄芪干预 HCMV 感染的人骨髓粒-单系祖细胞(colony-forming units-granulocyte/monocyte, CFU-GM),观察黄芪对病变细胞集落生成能力的影响,为临床 HCMV 感染的治

疗提供客观依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 脐血标本 20 例脐血标本由本院产科提供,为正常足月顺产新生儿断脐后的胎盘段脐带血。供脐血者造血系统检查基本正常,标本血清抗 HCMV-IgG,HCMV-IgM 均阴性。

1.1.2 病毒来源 HCMV AD₁₆₉株购自同济医科大学同济医院,感染滴度为 10⁻⁴空斑形成单位(plaque forming unite, PFU)。分装后于 - 70 冰箱保存备用,全部实验用同一批 HCMV AD₁₆₉原液。

1.1.3 药物 黄芪注射液由泸州医学院附属医院药房提供,10 ml/支,每支相当于含生药 20 g,批号 05060,实验时参照文献^[3]用伊思柯夫改良培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium,IMDM)稀释成 1.5 mg/ml。更昔洛韦由泸州医学院附属医院药房提供,50 mg/支,批号 000703,实验时参照文献^[4]用 IMDM 稀释成 100 μg/ml。4 冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 脐血单个核细胞分离 按脐血单个核细胞分离术,在无菌操作下,用比重 1.077 的淋巴细胞分离液 1 500 rpm 离心 30 min,用 IMDM 配成 2 × 10⁹/L 的细胞悬液。

1.2.2 CFU-GM 培养 按本室建立的方法进行^[5],体系组成为:2.5 %甲基纤维素 0.9 ml,灭活小牛血清 0.6 ml,粒—单系集落刺激因子(granulo-

cyte monocyte colony stimulating factor, GM-CSF) 0.2 ml,终浓度 50 mg/L,细胞液:0.2 ml,终浓度 2 × 10⁹/L,药物稀释液及 HCMV AD₁₆₉原液各 0.1 ml,适量的 IMDM 补足总体积 2.2 ml。每组设 2 个复孔,每孔按 1 ml 加入 24 孔板中,置 37、饱和湿度、5 % CO₂ 的培养箱中培养。

1.2.3 簇、集落、大集落计数标准 簇:细胞团含量在 3~39 个;集落:细胞团含量 ≥40 个;大集落:细胞团含量在 1 000 个以上。于第 7 天在倒置显微镜下观察计数每孔簇、集落、大集落的数目,取两孔均值为其产率。

1.2.4 实验分组及 HCMV AD₁₆₉感染方式 实验共分 4 组,空白组:为不加任何处理因素的空白对照。病毒组:细胞 + HCMV AD₁₆₉。更昔洛韦组:细胞 + HCMV AD₁₆₉ + 更昔洛韦(培养 3 d 后)。

黄芪组:细胞 + HCMV AD₁₆₉ + 黄芪注射液(培养 3 d 后)。感染方式为持续感染。

1.2.5 统计处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用方差分析,其中两两比较使用 *q* 检验。

2 结果

2.1 黄芪注射液对 HCMV 感染的 CFU-GM 簇、集落产率的影响

黄芪组 CFU-GM 簇的产率明显高于病毒组、空白组和更昔洛韦组(*P* < 0.01),黄芪组 CFU-GM 集落的产率亦明显高于病毒组和更昔洛韦组(*P* < 0.01),与空白组比较无明显差异(*P* > 0.05)。见表 1。

表 1 黄芪注射液对 HCMV 感染的 CFU-GM 簇、集落产率的影响

Table 1 Effect of astrogalus on production rates of HCMV infected CFU-GM colonies and clusters (n = 20, $\bar{x} \pm s$)				
分组	CFU-GM(/2 × 10 ⁵)		CFU-GM(/2 × 10 ⁵)	
	簇	增殖率(%)	集落	增殖率(%)
空白组	264.31 ± 12.30		79.30 ± 4.67	
病毒组	167.80 ± 16.63		53.70 ± 1.67	
更昔洛韦组	262.83 ± 17.67	56.6	63.79 ± 6.51	18.3
黄芪组	333.33 ± 12.69 ^{a,b,c}	98.6	81.23 ± 4.93 ^{b,c}	51.3

注: a 与空白组比较 *P* < 0.01; b 与病毒组比较 *P* < 0.01; c 与更昔洛韦组比较 *P* < 0.01

2.2 黄芪注射液对 HCMV 感染的 CFU-GM 集落大小的影响

于培养第 7 天,观察各组大集落所占比例,正常组为(5.2 ± 0.7) %,病毒组(2.7 ± 1.0) %,更昔洛韦组(3.6 ± 0.9) %,黄芪组(9.5 ± 0.8) %,黄芪组大集落比例明显高于病毒组、更昔洛韦组及空白组(*P*

< 0.01)。

2.3 黄芪注射液对 HCMV 感染的 CFU-GM 集落峰期及维持时间的影响

各组集落峰期均在 7~10 d 左右出现,病毒组集落维持时间在 14 d 左右,黄芪组、空白组及更昔洛韦组集落维持时间在 19 d 左右。黄芪组大集落

峰期出现约在第7天,大约可维持15 d,其他各组大集落峰期出现约在第9天,大约可维持11 d。

3 讨论

HCMV 感染可导致患儿造血系统损害,其作用机制不清。我们曾报道过 HCMV 在体外能明显抑制 CFU-GM 的生长增殖,提示 HCMV 感染患儿外周血白细胞减少及骨髓抑制可能与 HCMV 损伤 CFU-GM 有关。

中医认为黄芪具有扶正,祛邪等作用,可以抑制病毒在细胞内复制,保护病变细胞不受损伤,有研究表明黄芪可以显著抑制感染细胞中柯萨奇 B₃ 病毒的复制,从而减轻病毒对细胞的损伤^[6]。此外,黄芪还是中医临床补气、摄血要药。黄芪水煎液可以提高骨髓抑制期小鼠血红蛋白、白细胞及骨髓有核细胞数^[7]。后盾等^[8]实验证实黄芪与白术配伍能促进生血,显著提高再生障碍性贫血患者红系晚期祖细胞及红系早期祖细胞爆式集落的产率。洪介民等^[9]研究表明黄芪多糖在体外对小鼠巨核系祖细胞的生成有促进作用。

因此,我们有目的地选择了黄芪这味中药来观察其对 HCMV 感染的人骨髓 CFU-GM 集落增殖的影响。实验结果显示黄芪组 CFU-GM 簇和集落的产率明显高于病毒组及更昔洛韦组,大集落所占比例高,出现时间早,且集落和大集落维持时间均延长,表明在体外黄芪注射液对 HCMV 感染的 CFU-GM 有较强的促增殖作用。提示临床上巨细胞病毒

感染患儿可以试用黄芪注射液治疗。在此基础上我们又进一步将黄芪组与空白组进行了比较,发现黄芪组 CFU-GM 簇的产率、大集落所占比例、大集落峰期出现时间及维持时间均优于空白组。表明黄芪注射液有促进 CFU-GM 增殖的作用。

【参 考 文 献】

- [1] Minton EJ, Tysoe C, Sinclair JH, et al. Human cytomegalovirus infection of the monocyte/macrophage lineage in bone marrow [J]. J Virol, 1994, 68(6): 4017 - 4021.
- [2] 刘文君,郭渠莲,杨燕玲,等. 人巨细胞病毒感染对人骨髓粒-单系祖细胞生长的影响 [J]. 中国实用儿科杂志, 2000, 15(2): 91 - 92.
- [3] 王瑞,殷学军,黄国香. 黄芪注射液对人淋巴细胞 SCE 和细胞增殖的影响 [J]. 现代康复, 1999, 3(2): 159 - 160.
- [4] 李红,董永绥,方峰. 大蒜素和更昔洛韦抑制巨细胞病毒所致的细胞凋亡的实验研究 [J]. 中华儿科杂志, 1999, 37(4): 219 - 223.
- [5] 刘文君,何政贤,林桂真,等. 造血干细胞集落染色体 SCE 的制备 [J]. 中华医学遗传学杂志, 1996, 13(2): 112 - 113.
- [6] 郭棋,彭天庆,杨英珍. 黄芪对柯萨奇 B₃ 病毒感染的培养大鼠心肌细胞 Ca²⁺ 内流及病毒 RNA 复制的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 1995, 15(8): 483 - 485.
- [7] 全宏勋,李海生. 黄芪对辐射小鼠造血功能的影响 [J]. 中国中药杂志, 1994, 19(12): 741 - 743.
- [8] 后盾,吴正翔. 黄芪,白术对再生障碍性贫血骨髓红系祖细胞促增殖作用的实验研究 [J]. 江西中医学院学报, 1999, 11(1): 28 - 29.
- [9] 洪介民,王培训,邱建行. 黄芪多糖对小鼠巨核系祖细胞的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 1998, 9(3): 161 - 163.

(本文编辑:尹飞)