

枸杞对小鼠辐射损伤后造血系统修复的促进作用

石桂英, 白琳

(中国医学科学院北京协和医学院实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 探讨枸杞在小鼠辐射损伤后造血系统修复过程中的作用。**方法** 小鼠随机分为 3 组, 正常对照组不做任何处理, 喂饲正常饲料; 另外 2 组, 给予 4.5 Gy 照射后, 喂饲正常饲料或添加枸杞的饲料, 1 个月后, 处死小鼠, 应用流式细胞仪分析外周血、脾脏、胸腺及骨髓中各种血细胞。**结果** 枸杞饲料组小鼠, 外周血细胞总数及 B 细胞增多, 骨髓细胞总数减少, 骨髓前体 B 细胞及未成熟 B 细胞增多, 造血干、祖细胞均显著减少。**结论** 枸杞促进辐射损伤后造血干细胞动员及分化, 加速造血系统的恢复。

【关键词】 枸杞 辐射损伤 流式细胞术 造血干祖细胞

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 02-0038-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 002. 010

Promoting effect of *Lycium chinense* Mill on hematopoietic reconstruction in mice after radiation injury

SHI Gui-ying, Bai Lin

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of *Lycium chinense* Mill on hematopoietic reconstruction in mice after radiation injury. **Method** Female C57BL/6J mice were grouped to 3 groups at random: the control group, with normal food and no treatment, and the other 2 groups, treated with 4.5 Gy irradiation, with normal food or food added with *Lycium chinense* Mill. After 1 month, the mice were sacrificed and analyzed the peripheral blood, spleen, thymus and bone marrow cells by flow cytometer. **Results** In the mice fed with *Lycium chinense* Mill, the percentage of B cells was increased in the peripheral blood, the pre-B and immature B cells were increased, too, and the percentage of hematopoietic stem/progenitor cells was decreased. **Conclusion** *Lycium chinense* Mill can promote the mobilization and differentiation of hematopoietic stem/progenitor cells, and accelerate the hematopoietic reconstruction after irradiation injury.

【Key words】 *Lycium chinense* Mill; Radiation injury; Flow cytometer; Hematopoietic stem/progenitor cells; Mice

枸杞是常用滋补性中药,具有滋补和增强免疫功能的作用,广泛用于抗衰老、抗肿瘤及抗心血管疾病^[1-4]。可以促进骨髓细胞增殖,刺激造血系统,促进白细胞增高。研究认为,枸杞含有多糖、核黄素、烟酸等化学成分,具有较强的生理活性,如抗

衰老、抗疲劳、抗肿瘤、降血糖、降血脂等。本研究主要探讨枸杞在小鼠辐射损伤后造血系统修复过程中的作用。造血干细胞在造血系统修复中起重要作用,是各种血细胞的来源,同时其自我更新能

【基金项目】 国家自然科学基金青年科学基金项目[No. 81200256],北京市自然科学基金项目[No. 7132161]。

【作者简介】 石桂英,女,主管技师,研究方向:衰老与再生。

【通讯作者】 白琳, bailin49@163. com。

力维持造血干细胞的数量,以及造血系统的稳定状态^[5-7]。本研究分析了造血系统各种细胞的变化以及造血干细胞的改变。

1 材料和方法

1.1 动物与设备

实验所用动物为 2 月龄 C57BL/6J 雌性小鼠,共 30 只,购自北京华阜康生物科技有限公司。每组 10 只,小鼠饲养在 SPF 动物房内,动物生产及使用许可证号:SCXK(京)2009-007、SYXK(京)2011-0022。主要实验设备为美国 BD 公司 Aria 流式细胞仪。

1.2 中药喂养

将小鼠随机分为正常对照组、4.5 Gy 照射 + 正常饲料组、4.5 Gy 照射 + 枸杞饲料组。正常对照组小鼠,不进行照射,同时喂饲正常小鼠 SPF 维持料;4.5 Gy 照射 + 正常饲料组,给予小鼠总剂量 4.5 Gy 照射后,喂饲正常小鼠 SPF 维持料;4.5 Gy 照射 + 枸杞饲料组,给予小鼠总剂量 4.5 Gy 照射后,喂饲加入枸杞的饲料。药物剂量按成人与小鼠之间剂量换算系数计算,每只小鼠每天摄食量为 3 g,小鼠摄入枸杞的剂量为 100 mg/kg · d。按上述换算所得数据,在常规小鼠饲料中加入相应剂量的枸杞配制成枸杞饲料。

1.3 流式分析

从小鼠眼眶静脉丛取外周血 100 μ L,加红细胞裂解液,充分混匀,室温静置 5 min 裂解红细胞,离心后 PBS 缓冲液重悬备用。小鼠脱颈椎处死,取脾脏、胸腺及后肢骨,置于冰上预冷的 PBS 缓冲液中。用磨砂玻片将脾脏、胸腺分别研磨成细胞悬液;后肢骨用研钵压碎,加 6 mL PBS 缓冲液反复吹打,制成细胞悬液。将上述细胞悬液用 300 目尼龙膜过滤后收集到 15 mL 离心管中,取 10 μ L 细胞悬液,用 PBS 缓冲液稀释 10 倍后计数。细胞悬液离心,1000 rpm,10 min,用 PBS 缓冲液重悬细胞,并调整细胞浓度为 1×10^8 个细胞/mL。取 10^6 细胞标记荧光抗体(eBioscience 公司)。

造血干细胞标记抗体为: B220-biotin、CD4-biotin、CD8-biotin、Mac-1-biotin、Gr-1-biotin、Ter-119-biotin、Mac-1-biotin、IL-7R-biotin、CD34-FITC、CD16/32-Percep-cy5.5、Flt3-PE、Sca1-E-Cy7、cKit-APC、biotin-APC-Cy7。造血干细胞(LSK)表面标记为: lin- sca1⁺ c-kit⁺, CD34⁻ Flt3⁻ Lin- Sca1⁺ c-Kit⁺ 标记

长期造血干细胞(LT-HSC), CD34⁺ Flt3⁻ Lin- Sca1⁺ c-Kit⁺ 标记短期造血干细胞(ST-HSC), CD34⁺ Flt3⁺ Lin- Sca1⁺ c-Kit⁺ 标记多潜能祖细胞(MPP), Lin- Sca1⁻ c-Kit⁺ 标记髓系祖细胞(MP), CD34⁺ CD16/32^{low} Lin- Sca1⁻ c-Kit⁺ 标记共同髓系祖细胞(CMP), CD34⁺ CD16/32^{high} Lin- Sca1⁻ c-Kit⁺ 标记粒单系祖细胞(GMP), CD34⁻ CD16/32^{low} Lin- Sca1⁻ c-Kit⁺ 标记巨核单系祖细胞(MEP)。骨髓 B 淋巴细胞标记的抗体有: B220-PE-Cy7、CD43-PE、IgD-FITC、IgM-APC,根据表面标记不同, B 淋巴细胞可分为不同的发育阶段。CD4-FITC、CD8-Percep-cy5.5、B220-PE-Cy7、CD11B-APC-Cy7 标记骨髓、脾脏、外周血中的 T、B 淋巴细胞及髓系细胞。胸腺细胞用 CD4-FITC、CD8-Percep-cy5.5 标记。分别配制上述抗体混合液加入细胞悬液,冰上避光,30 min;加 1 mL PBS 缓冲液,离心,2600 rpm,5 min,弃上清液,加 200 μ L PBS 缓冲液重悬细胞,用 300 目尼龙膜过滤,冰上避光备用。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 软件包进行数据统计分析,各组数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间资料分析采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 枸杞对外周血细胞的影响

小鼠 4.5 Gy 照射后,喂饲正常饲料或枸杞饲料 1 个月后,取外周血计数,流式分析 B 细胞(B220⁺)、粒细胞(CD11b⁺)及 T 细胞(CD4⁺/CD8⁺)细胞,发现照射后小鼠外周血细胞显著减少,与正常饲料组相比,枸杞饲料组小鼠外周血细胞总数显著增多(图 1A), B 细胞比例显著升高(图 1B)。可见,枸杞促进外周血细胞总数及 B 细胞恢复。

2.2 枸杞对骨髓及脾脏血细胞的影响

同时,我们取小鼠的骨髓和脾脏细胞,流式分析 B、粒及 T 细胞,发现照射后 B 细胞比例无显著变化,粒细胞比例升高,而 T 细胞比例下降,枸杞饲料组与正常饲料组无显著差异(图 2)。可见,枸杞对骨髓、脾脏血细胞无显著影响。

2.3 枸杞对骨髓前体 B 细胞的影响

B 细胞是在骨髓中发育成熟的,枸杞饲料组小鼠外周血 B 细胞显著高于正常饲料组,枸杞可能影响了骨髓中 B 细胞的发育,为此,我们分析了骨髓前体 B 细胞的发育。结果发现,照射后骨髓前体 B

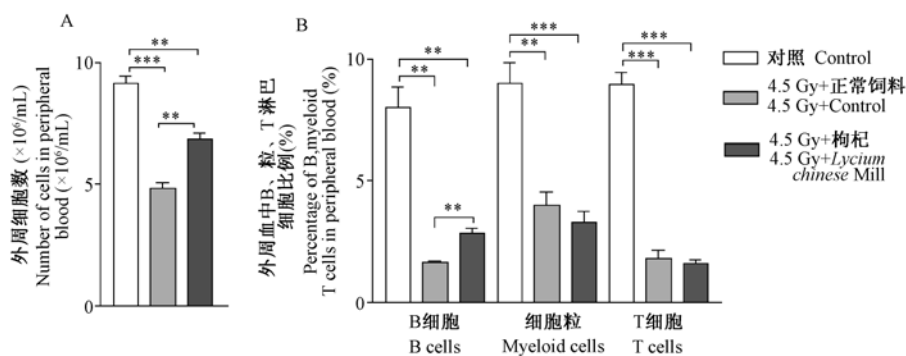


图 1 外周血计数及 B、粒、T 淋巴细胞的比例

Fig. 1 Number of cells and percentage of B, myeloid, T cells in the peripheral blood

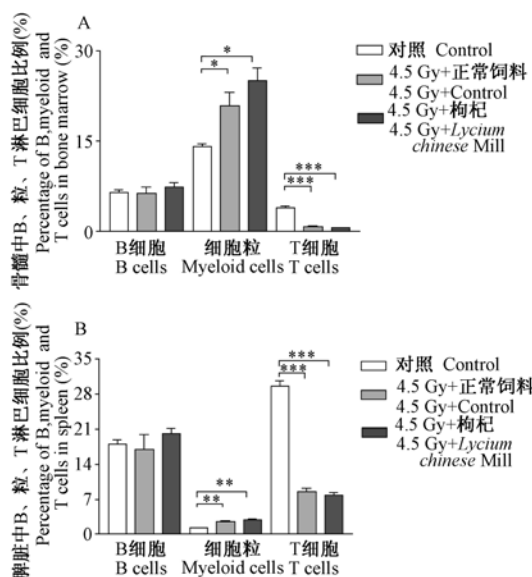


图 2 骨髓及脾脏中 B、粒、T 细胞比例

Fig. 2 Percentage of B, myeloid, T cells in the bone marrow and spleen

细胞及未成熟 B 细胞显著增多,成熟 B 细胞显著减少(图 3)。与正常饲料组相比,枸杞饲料组骨髓前体 B 细胞及未成熟 B 细胞显著增多,成熟 B 细胞显著减少。由此可见,枸杞促进成熟 B 细胞进入血液,增强机体免疫力。

2.4 枸杞对胸腺细胞的影响

T 细胞在胸腺中发育成熟。胸腺 T 细胞可以分为几个阶段,双阴性细胞($CD4^- CD8^-$)、双阳性细胞($CD4^+ CD8^+$)、单阳性细胞($CD4^+$ 或 $CD8^+$)。分析发现,照射后胸腺单阳性细胞显著减少,双阴性细胞显著增加,双阳性细胞比例升高,但没有显著性(图 4)。与正常饲料组相比,枸杞饲料组 $CD4^+$ 细胞增多。这说明,枸杞可能促进胸腺细胞发育为 $CD4^+$ 细胞。

2.5 枸杞对造血祖细胞的影响

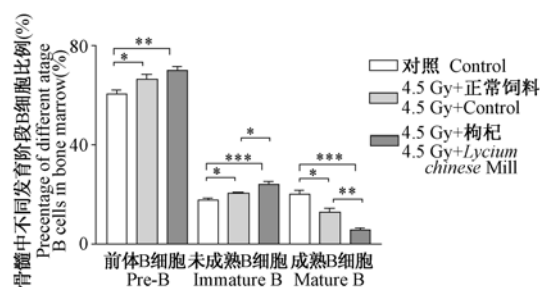


图 3 骨髓中不同发育阶段 B 细胞比例

Fig. 3 Percentage of different stage B cells in the bone marrow

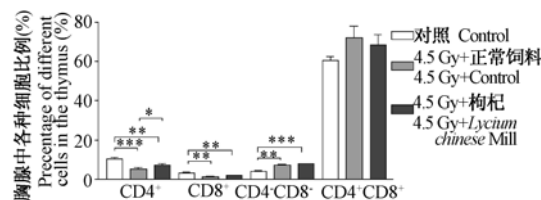


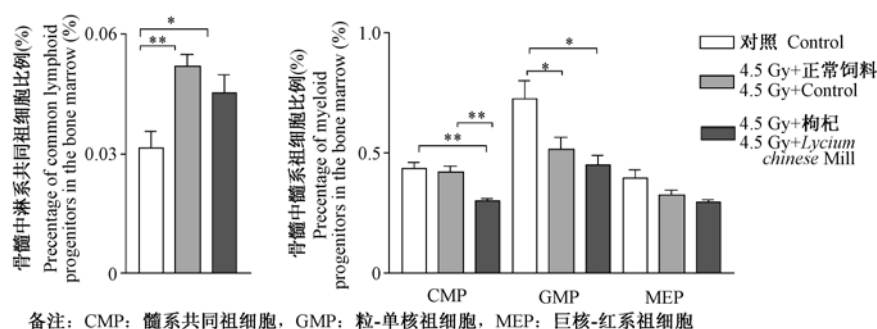
图 4 胸腺中各种细胞的比例

Fig. 4 Percentage of different cells in the thymus

为了进一步了解辐射损伤修复过程中枸杞的作用,我们分析了造血祖细胞的变化。结果表明,辐射损伤后淋系共同祖细胞增多,而髓系共同祖细胞没有显著变化,粒-单核祖细胞显著减少。与正常饲料组相比,枸杞饲料组,淋系共同祖细胞减少,但没有显著性;髓系共同祖细胞明显减少,粒-单核祖细胞及巨核-红系祖细胞无显著变化(图 5)。这说明,枸杞促进髓系共同祖细胞的分化。

2.6 枸杞对造血干细胞的影响

为了确定半致死剂量辐射 30 天后小鼠骨髓细胞的变化,我们取小鼠一只后肢的股骨、胫骨的骨髓细胞进行计数,发现此时小鼠骨髓细胞较正常野生型小鼠偏低,但差异无显著性。与正常饲料组相比,枸杞饲料组细胞数显著减少(图 6A)。对三组

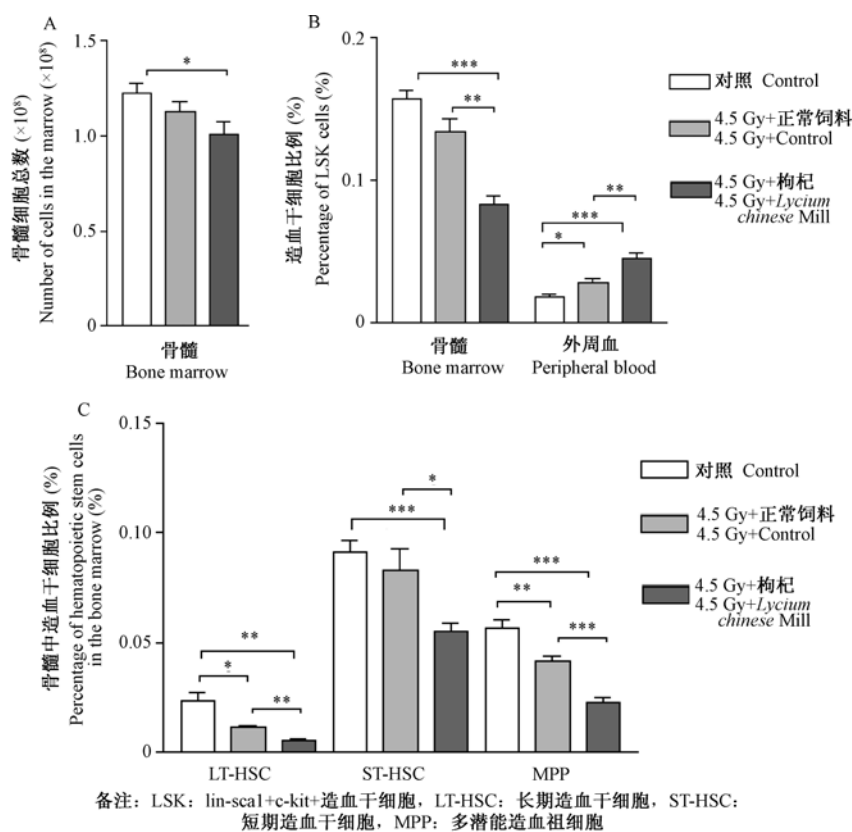


备注: CMP: 髓系共同祖细胞, GMP: 粒-单核祖细胞, MEP: 巨核-红系祖细胞

图 5 骨髓中造血祖细胞的比例

Note: CMP: Common myeloid progenitor cells; GMP: Granulocyte-macrophage progenitor cells; MEP: Megakaryocyte-erythrocyte progenitor cells.

Fig. 5 Percentage of hematopoietic progenitors in the bone marrow



备注: LSK: lin-sca1⁺c-kit⁺造血干细胞, LT-HSC: 长期造血干细胞, ST-HSC: 短期造血干细胞, MPP: 多潜能造血祖细胞

图 6 骨髓细胞数及造血干细胞的比例

Note: LSK: lin-sca1⁺c-kit⁺; Hematopoietic stem cells; LT-HSC: Long term hematopoietic stem cells;

ST-HSC: Short term hematopoietic stem cells; MPP: Multipotential progenitor cells.

Fig. 6 Percentage of hematopoietic stem cells in the bone marrow

小鼠骨髓造血干细胞的分析结果显示, 辐射损伤后, 小鼠造血干细胞(lin-sca1⁺c-kit⁺, LSK)减少, 枸杞饲料组显著低于对照及正常饲料组(图 6B)。骨髓中造血干细胞/祖细胞的比例的降低, 可能的原因包括: 造血干细胞/祖细胞自我更新能力降低, 造

血干细胞/祖细胞分化能力增强, 或者造血干细胞动员增加。外周血中造血干细胞的比例是否增加是衡量造血干细胞动员的关键指标之一, 为此, 我们分析了各组外周血中的造血干细胞。结果显示, (下转第 66 页)

- mediated cognitive enhancement in aged 3xTg Alzheimer's disease mice is associated with neurogenesis and neurotrophic activity [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e21660.
- [23] Mangialasche F, Solomon A, Winblad B, et al. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development [J]. *Lancet Neurol*, 2010, 9(7): 702–716.
- [24] Martinez-Coria H, Green KN, Billings LM, et al. Memantine improves cognition and reduces Alzheimer's-like neuropathology in transgenic mice [J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(2): 870–880.
- [25] Pinnen F, Sozio P, Cacciatore I, et al. Ibuprofen and glutathione conjugate as a potential therapeutic agent for treating Alzheimer's disease [J]. *Arch Pharm (Weinheim)*, 2011, 344(3): 139–148.
- [26] McKee AC, Carreras I, Hossain L, et al. Ibuprofen reduces Abeta, hyperphosphorylated tau and memory deficits in Alzheimer mice [J]. *Brain Res*, 2008, 1207: 225–236.
- [27] Medina DX, Caccamo A, Oddo S. Methylene blue reduces abeta levels and rescues early cognitive deficit by increasing proteasome activity [J]. *Brain Pathol*, 2011, 21(2): 140–149.
- [28] Gong EJ, Park HR, Kim ME, et al. Morin attenuates tau hyperphosphorylation by inhibiting GSK3 β [J]. *Neurobiol Dis*, 2011, 44(2): 223–230.
- [29] Caccamo A, Oddo S, Tran LX, et al. Lithium reduces tau phosphorylation but not A β or working memory deficits in a transgenic model with both plaques and tangles [J]. *Am J Pathol*, 2007, 170(5): 1669–1675.
- [30] Green KN, Steffan JS, Martinez-Coria H, et al. Nicotinamide restores cognition in Alzheimer's disease transgenic mice via a mechanism involving sirtuin inhibition and selective reduction of Thr231-phosphotau [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(45): 11500–11510.
- [31] McManus MJ, Murphy MP, Franklin JL. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ prevents loss of spatial memory retention and early neuropathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(44): 15703–15715.
- [32] Corona C, Frazzini V, Silvestri E, et al. Effects of dietary supplementation of carnosine on mitochondrial dysfunction, amyloid pathology, and cognitive deficits in 3xTg-AD mice [J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17971.
- [33] Parachikova A, Vasilevko V, Cribbs DH, et al. Reductions in amyloid-beta-derived neuroinflammation, with minocycline, restore cognition but do not significantly affect tau hyperphosphorylation [J]. *J Alzheimers Dis*, 2010, 21(2): 527–542.

[修回日期]2014-11-22

(上接第 41 页)

与对照组相比,辐射后正常饲料及枸杞饲料组外周血中造血干细胞比例显著升高,枸杞饲料组又显著高于正常饲料组(图 6B),这说明辐射损伤动员造血干细胞,枸杞也促进了骨髓造血干细胞的动员。同时,枸杞饲料组骨髓长期造血干细胞、短期造血干细胞及多潜能祖细胞均显著减少(图 6C),而淋系及髓系共同祖细胞显著增多(图 5),说明枸杞促进造血干细胞的分化。

3 讨论

枸杞是常用滋补性中药,具有滋补和增强免疫功能的作用,具有广泛用途。枸杞多糖是枸杞中最主要的活性成分,具有促进免疫、抗衰老等多种功能^[1-4]。甜菜碱是枸杞中主要的生物碱之一,在脂质代谢中有重要作用。枸杞色素是存在于枸杞浆果中的各类呈色物质,是枸杞籽的重要生理活性成分,很多研究证明枸杞色素具有提高人体免疫功能、预防和抑制肿瘤及预防动脉粥样硬化等作用^[8]。本研究发现,枸杞在辐射损伤后造血系统的修复中起重要作用。枸杞可以动员骨髓造血干细胞进入外周血,同时促进其分化为各系造血祖细胞,并促进成熟 B 细胞进入血液,加快辐射损伤后

成熟血细胞水平的恢复,提高机体免疫功能。

参考文献:

- [1] 罗琼,闫俊,李瑾玮,等. 纯品枸杞多糖对小鼠免疫功能的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 1999, 19(1): 38–41.
- [2] 闫秀英,许志华,韩丽莎,等. 枸杞子对四氯化碳致大鼠肝脂类过氧化作用的抑制 [J]. *包头医学院学报*, 1998, 14(1): 7–9.
- [3] 李明,张凤英. 枸杞子对成年大白鼠血超氧化物歧化酶活性影响的研究 [J]. *宁夏医学院学报*, 1993, 15(1): 67.
- [4] 石瑞如,刘艳红,赵胜利,等. 人参、枸杞子对老年大鼠心肌 β 受体的影响 [J]. *中草药*, 1998, 29(6): 389–390.
- [5] Chen J, Astle CM, Harrison DE. Genetic regulation of primitive hematopoietic stem cell senescence [J]. *Expe Hematol*, 2000, 28: 442–450.
- [6] Mandal PK, Blanpain C, Rossi DJ. DNA damage response in adult stem cells: pathways and consequences [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12: 198–202.
- [7] Pietras EM, Warr MR, Passegue E. Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells [J]. *J Cell Biol*, 2011, 195: 709–720.
- [8] 霍超,徐桂花. 枸杞生理功效和活性成分的研究进展 [J]. *中国食物与营养*, 2007, 13(11): 50–53.

[修回日期]2014-11-04