

方 药 研 究

左归丸促进骨髓形成肝细胞的分子机制研究

李瀚[✉]* 高翔* 晏雪生* 明安萍* 彭亚琴*

摘要 目的:探讨左归丸促进骨髓形成肝细胞的分子机制。方法:采用交叉性别骨髓移植模型,雌性 BALB/c 小鼠接受 9.0Gy ⁶⁰Co 源 γ射线照射后,经尾静脉注射输入同种系雄性小鼠骨髓细胞,分左归丸组和模型组,6 个月后处死实验动物,取肝组织标本。选用小鼠基因表达谱寡核苷酸芯片,观察实验小鼠肝组织基因表达谱的变化。结果:左归丸组小鼠在骨髓移植 6 个月后肝组织的基因表达谱与模型组比较有显著不同,差异表达基因有 1147 条,已知功能基因有 533 条,其中上调基因 264 条,下调基因 269 条。结论:左归丸可能是通过影响肝组织基因表达谱的变化促进骨髓形成肝细胞。

主题词 骨髓细胞/药物作用 左归丸/治疗应用

Study on Molecular Mechanism of Zuoguiwan in Promoting Bone Marrow Cells to Form Hepatic Cells

Li Hanmin, Gao Xiang, Yan Xuesheng, et al.

(Hepatopathy Institute, Affiliated Hospital of Hubei College of TCM, Wuhan 430061)

Objective: To study the molecular mechanism of Zuoguiwan in promoting bone marrow cells to form hepatic cells. **Methods:** After irradiation with 9.0Gy ⁶⁰Co γrays, the female BALB/c mice were injected via the tail vein with bone marrow cells of homogenic male mice to establish bone marrow transplantation model. The female BALB/c mice were randomly divided into a Zuoguiwan group, and a model group. After 6 month, all mice were sacrificed and liver tissues were taken. Changes of gene expression profile was detected using the mouse gene expression profile oligo-nucleotide chip. **Results:** There were significant differences in gene expression profile of the liver tissue between the two groups after 6 months of transplantation, with 1147 genes of differential expression, of which 533 genes were function-known and 264 genes were up-regulated, 269 genes down-regulated. **Conclusion:** The molecular mechanism of Zuoguiwan in promoting bone marrow cells to form hepatic cells is exerted possibly via influencing the changes of gene expression profile.

Key Words Bone marrow cell/drug effect; Zuoguiwan/therapeutic application

为了研究左归丸提高骨髓形成肝细胞的转化率,我们采用骨髓形成肝细胞动物模型对比观察左归丸对实验小鼠骨髓形成肝细胞的影响。以往的实验结果显示,左归丸能够促进骨髓形成肝细胞,且作用优于八珍汤^[1]。本实验在前期研究基础上,采用基因芯片技术研究左归丸促进骨髓形成肝细胞的分子机制。

1 材料与方法

1.1 动物与分组:4 周龄 SPF 级 BABL/c 小鼠,由湖北省预防医学院动物中心提供。雌性小鼠随机分为左归丸组(灌服左归丸溶液)40 只和模型组(灌服生理盐水)40 只,骨髓移植术前 1 周起饮水中加入红霉素(250mg/L)和庆大霉素(320mg/L)以清洁消化道。

1.2 实验药物:左归丸由熟地黄、山药、枸杞子、山茱

萸、菟丝子、川牛膝、鹿角胶、龟甲胶依次按 8:4:4:4:4:3:4:4 称重,前 6 味水煎,后两味加温熔于其中,用蒸馏水调浓度为 100%,0.1mPa 下 15 分钟灭菌,4℃ 保存。

1.3 骨髓移植与标本采集:雄性小鼠颈椎脱臼处死,75%乙醇浸泡 10 分钟,无菌条件下取股骨,剪开干骺端,用 5ml 注射器吸取 RPMI-1640 液 0.5ml 冲出骨髓,过 6 号针头 3 次、4 号针头 2 次制成单个细胞悬液,计数并调整细胞浓度为 1×10^7 /ml。雌性小鼠接受 ⁶⁰Co 源 γ射线全身照射,总剂量为 9Gy,然后经尾静脉输入制备好的雄性小鼠骨髓细胞悬液 0.2ml(约 2×10^6 个细胞)。移植雄性小鼠骨髓的雌性小鼠饲养于 SPF 级动物房,饮水中加入红霉素(250mg/L)和庆大霉素(320mg/L),每天更换垫料和饮水,垫料、饲料和饮水均经高温消毒。骨髓移植 6 个月后,颈椎脱臼处死小鼠,无菌条件下切取肝组织用液氮速冻后保存于一 80℃ 待测。

1.4 基因芯片检测:小鼠 16K v1.0 基因表达谱寡核苷酸芯片及其检测试剂盒由上海生物芯片公司提供。

基金项目:国家自然科学基金(30271562、30371787)、国家科委重大基础研究前期研究专项(2002CCC00300)、湖北省自然科学基金(2001ABB171)资助项目

* 湖北中医药大学附属医院肝病研究所、武汉市武昌区花园山 4 号(430061)

收稿日期:2005-12-08;修回日期:2006-03-16

Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

抽提并纯化肝组织总 RNA 后完成如下操作。

1.4.1 cDNA 探针制备:在 cDNA 第一链合成过程中,通过反转录酶将 CyDye 标记核苷酸直接掺入到 cDNA 链中制备荧光探针。将纯化好的探针转入酶标板,分别测定 OD₂₆₀、OD₅₅₀、OD₆₅₀ 以定量, Cy³ 探针 (pmol) = A₅₅₀ × 洗脱体积/0.15, Cy⁵ 探针 (pmol) = A₆₅₀ × 洗脱体积/0.25。将探针吸回 PCR 管,真空加热抽干,避光保存于 -20℃,待杂交。Cy³ 标记左归丸组, Cy⁵ 标记模型组。

1.4.2 芯片杂交:洗涤盖玻片,用 50ml 离心管分别配制 ddH₂O、95% 乙醇并置于沸水中加热,将盖玻片依次放入 ddH₂O、95% 乙醇、ddH₂O,各 3 分钟,最后放入 50ml 离心管中 1000r/min 离心 3 分钟,去除残留的水渍,放置备用。用纯水配制 PBS 溶液,杂交前加入适量到杂交盒内以保持杂交体系 100% 的湿度。平衡杂交炉,用水平仪校准杂交炉以保持水平,确保杂交芯片的均一性。配制洗片液,洗液 I 为含 0.1%SDS 的 1 倍 SSC,洗液 II 为 0.1 倍的 SSC。

1.5 检测与分析:使用 Agilent Scanner 获取图像,利用 Split-tiff 软件和图像分析软件 Imagen 确定杂交点的范围,过滤背景噪音,提取得到基因表达的荧光信号强度值。将所得数据导入分析软件 Genespring 进行数据标准化处理,计算得到两种荧光 Cy³ 与 Cy⁵ 的比值。一般认为比值在 0.5~2.0 范围内的基因不存在显著的表达差异,而在该范围之外的基因则被认为表达出现显著改变,比值 ≤ 0.5 为基因表达水平下调,比值 ≥ 2 为基因表达水平上调。

2 结果

2.1 左归丸组与模型组小鼠肝组织基因表达谱的差异:在所检测的基因中,左归丸组相对于模型组小鼠的差异表达基因有 1147 条,已知功能基因有 533 条,其中上调基因 264 条,下调基因 269 条。

2.2 左归丸影响上调及下调表达的基因:在所检测的基因中,补肾(左归丸)组相对于对照组小鼠的差异表达基因有 1147 条,已知功能基因有 533 条,其中上调基因 264 条、下调基因 269 条。其差异表达基因中已知功能分类基因见附表。

3 讨论

在体内骨髓形成肝细胞这一过程可以分为骨髓细胞迁移至肝脏和骨髓细胞在肝脏分化为肝细胞两个阶段。左归丸能够提高骨髓形成肝细胞的转化率,促进骨髓形成肝细胞,其分子机制可能是对骨髓形成肝细胞这一过程的基因表达谱产生了影响,体现了中医药多靶点、多途径、多层次综合作用的特点和优势。实验结

附表 补肾(左归丸)组与对照组小鼠肝组织差异表达基因分类

基因分类 (按产物已知功能分类)	差异表达基因数	
	上调基因数	下调基因数
DNA 合成、重组和修复相关	6	3
DNA 结合蛋白	9	5
RNA 加工、更新和转运相关	6	4
癌基因和肿瘤抑制基因	—	4
打靶蛋白	5	14
蛋白质翻译后修饰	7	12
蛋白更新相关	12	13
凋亡相关蛋白	4	4
翻译相关	3	13
免疫系统蛋白	7	4
膜通道转运子	19	21
转录相关	45	21
细胞表面抗原	6	8
细胞骨架蛋白	13	7
细胞内效应器	15	31
细胞黏附受体	5	9
细胞受体	37	15
细胞外基质蛋白	4	2
细胞外通讯蛋白	10	10
细胞外转运蛋白	4	7
细胞周期相关	2	4
新陈代谢相关	26	47
张力感应蛋白	1	—
总计	264	269

果表明,左归丸组小鼠的基因表达谱与模型组小鼠相比较,细胞因子/生长因子类表达上调的有表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子 2(FGF2)、成纤维细胞生长因子 16(FGF16)、粒细胞集落刺激因子 3(G-CSF3)等;表达下调的有白细胞介素 18(IL-18)、白细胞介素 12a(IL-12a)、肿瘤坏死因子(TNF)超家族成员 8 等;受体类表达上调的有粒-巨噬细胞集落刺激因子 2(GM-CSF2)受体 β、促甲状腺激素受体(TSHR)、睫状神经营养因子(CNTF)受体等;激素类促甲状腺素释放激素(TRH)表达下调。

EGF 是最早发现的生长因子之一,通过靶细胞的特异受体起作用,具有刺激表皮细胞生长等多种生理作用。肝细胞膜上存在 EGF 受体,是 EGF 的靶细胞之一。EGF 单独或者和其他因子联合应用均能刺激体外培养肝细胞的 DNA 合成,体内实验也证明 EGF 具有刺激肝细胞增殖的作用。FGF 属于肝素结合生长因子家族,亦可刺激体外培养肝细胞的 DNA 合成,还可刺激成纤维细胞生长,促进实质细胞与细胞外基质连接。EGF、FGF 对肝细胞生长因子(HGF)诱导骨髓细胞转化为肝细胞的作用具有协同效应^[2~3]。而 G-CSF 是刺激骨髓干细胞动员和归巢的信号之一,广泛用于干细胞的动员和归巢。这些因子表达上调有利于动员骨髓

细胞肝脏归巢,并诱导其向肝细胞方向转化。

IL-18 主要由活化的单核-巨噬细胞、肝枯否细胞等产生,在介导组织免疫、炎症损伤、免疫调节、抗病毒、抗肿瘤等方面均具有重要作用^[6]。IL-18 可通过促进 γ 干扰素 (INF- γ 、TNF、Fas 配体的表达使肝细胞坏死,是内毒素所致肝损伤的重要诱导因子。IL-12 是由巨噬细胞、B 淋巴细胞等抗原递呈细胞在免疫应答中产生的细胞因子,具有显著的抗肿瘤和移植癌转移的作用。IL-12 作用于正常小鼠可引起肝实质中单核细胞包括 CD8⁺ 细胞、NK 细胞和单细胞的多处浸润,引起髓外造血细胞增生,抑制骨髓中的造血细胞生成,造成小鼠肝损伤和贫血^[7]。此外,还有研究提出 IL-12 可通过激活 IL-12/STAT4/IFN- γ 信号途径而诱导同种部分肝移植发生排斥反应。TNF 能增强多聚酶活性,使 DNA 复制增加,诱使内皮细胞和成纤维细胞增殖^[8]。有研究显示,TNF 对体外培养肝细胞的 DNA 代谢呈双相影响,低浓度 TNF 能刺激 DNA 合成,高浓度 TNF 则使 DNA 复制受阻,并造成肝细胞损伤^[9]。这些因子在肝组织下调表达有可能起到保护肝细胞,减少肝损伤的作用。

GM-CSF² 受体、TSHR、CNTF 受体等上调表达可能反映了 GM-CSF²、TSH 及 CNTF 的表达下调,造成相应受体病理性上调表达。GM-CSF 也是刺激骨髓干细胞动员和归巢的信号之一,可引导人 CD34⁺ 造血祖细胞骨髓归巢,还能增加骨髓内皮前体细胞和肌源性前体细胞的动员。GM-CSF 能诱导 c-fac 基因及 IL-1、IL-6、G-CSF 及 TNF- α 基因表达,增加中性粒细胞存活,增加其胞外基质的酪氨酸磷酸化,调节其细胞膜表面表型,增加中性粒细胞在趋化作用中的氧化代谢能力,还能增加中性粒细胞及单核细胞黏附因子的表达^[10]。CNTF 属于神经调节细胞因子家族,和造血细胞因子如 IL-6、白血病抑制因子、抑瘤素 M、G-CSF 及骨髓单核细胞生长因子等有相似的螺旋框架结构,故被认为是造血因子超家族的成员之一。CNTF 具有多

种生物活性,能调节神经细胞的生长分化,诱导急性期反应蛋白的产生,还可调节某些癌基因的表达,参与肿瘤生长和分化调控。GM-CSF、CNTF 及 TSH 表达减少可能与机体抑制肝细胞过度增殖有关。

左归丸促进骨髓转化为肝细胞的基因表达谱变化从整体调控角度反映了分子网络作用的复杂性,以上讨论只涉及细胞因子/生长因子、激素及其受体相互作用的部分机制,有关信号通路、代谢酶等作用机制尚待进一步分析。此外,许多未知功能的基因与骨髓形成肝细胞的相关机制尚待进一步深入研究。

参考文献

- 李瀚,高翔,晏雪生,等.左归丸促进骨髓形成肝细胞的研究.世界华人消化杂志,2005,13(24):2818~2822.
- Miyazaki M, Akiyama I, Sakaguchi M, et al. Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 298(1):24~30.
- Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. J Clin Invest, 2002, 109(10):1291~1302.
- 唐力军,高毅,张志,等.HGF+FGF-4 体外定向诱导人骨髓来源的多能成体祖细胞向肝样细胞分化的特征性表型鉴定.解放军医学杂志,2004,29(11):973~976.
- Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. Mol Biol Cell, 1993, 4(12):1317~1326.
- Tominaga K, Yoshimoto T, Torigoe K, et al. IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1 beta for IFN- γ production from human T cells. Int Immunol, 2000, 12(2):151~160.
- 咎云红.白细胞介素 12 研究进展.国外医学分子生物学分册,1996,18(2):76~79.
- Feingold KR, Barker ME, Jones AL, et al. Localization of tumor necrosis factor-stimulated DNA synthesis in the liver. Hepatology, 1991, 13(4):773~779.
- 卞建民,陈易人,胡振雄,等.肿瘤坏死因子对肝细胞的影响.中华实验外科杂志,1995,12(6):358~359.
- Ragnhammar P. Anti-tumoral effect of GM-CSF with or without cytokines and monoclonal antibodies in solid tumors. Med Oncol, 1996, 13(3):167~176.

(上接第 774 页)

- 中华人民共和国卫生部.中药新药临床研究指导原则.1993:32.
- 全国第四次脑血管疾病学术会议.各类脑血管疾病诊断要点.中华神经科杂志,1996,29(6):381.
- Kanellis J, Johnson RJ. Elevated uric acid and ischemic stroke:accumulating evidence that it is injurious and not neuroprotective. Stroke, 2003, 34(8):1956~1957.
- Lehto S, Niskanen L, Ronnema T, et al. Serum uric acid is a strong predictor of stroke in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. Stroke, 1998, 29(3):635~639.

- De Scheerder IK, van de Kraay AM, Lamers JM, et al. Myocardial malondialdehyde and uric acid release after short-lasting coronary occlusions during coronary angioplasty:potential mechanisms for free radical generation. Am J Cardiol, 1991, 68(4):392~395.
- Ginsberg MH, Kozin F, O'Malley M, et al. Release of platelet constituents by monosodium urate crystals. J Clin Invest, 1977, 60(5):999~1007.
- Shinozaki K, Naritomi H, Shimizu T, et al. Role of insulin resistance associated with compensatory hyperinsulinemia in ischemic stroke. Stroke, 1996, 27(1):37~43.