

血细胞的分裂与繁殖特点分析

——人参总皂苷诱导红系血细胞增值的研究

睢景超¹ 刘叶睿² 苏娜³ 黑拓维⁴

1.北京市陈经纶中学保利小学 北京 100020

2.深圳方方乐趣中英文学校初中部（弘爵国际学校） 广东 深圳 518000

3. FLA（未来领导力学校） 海南 陵水 572400

4.北京市和平街第一中学 北京 100020

【摘要】目的：研究人参总皂苷（TSPG）刺激红系血细胞增殖有关的细胞内信号转导途径。方法：用集落形成实验检测 TSPG 刺激红系造血祖细胞（BFU-E、CFU-E）增殖的能力；噻唑蓝法（MTT）检测红细胞生成素（Epo）对脐血细胞增殖的影响；Western blotting 法检测 TSPG 刺激脐血细胞 24h 后 EpoR 表达的变化；免疫沉淀法检测 TSPG 对 EpoR 介导的蛋白酪氨酸激酶 JAK2 和信号传导及转录激活因子 5（STAT5）的酪氨酸磷酸化的影响。

【关键词】：人参总皂苷；红细胞生成素受体；JAK2；信号传导及转录激活因子；噻唑蓝法

DOI:10.12417/2705-098X.23.09.028

Analysis of the characteristics of blood cell division and reproduction: A study on the induction of red blood cell proliferation by total ginsenosides

Jingchao Sui¹, Yerui Liu², Na Su³, Tuowei Hei⁴

1. Beijing Chenjinglun High School Beijing 100020

2. Shenzhen Fangfang Fun Middle School (Hongjue International School) Guangdong Shenzhen 518000

3. Future Leadership Academy at Blue Bay Hainan Lingshui 572400

4. Beijing Heping Street No.1 Middle School Beijing 100020

Abstract: Objective: To study the intracellular signal transduction pathways related to the stimulation of red blood cell proliferation by total ginsenosides (TSPG). Method: Colony formation assay was used to detect the ability of TSPG to stimulate the proliferation of erythroid hematopoietic progenitor cells (BFU-E, CFU-E); MTT assay was used to detect the effect of erythropoietin (Epo) on the proliferation of cord blood cells; Western blotting method was used to detect the changes in EpoR expression in cord blood cells stimulated by TSPG for 24 hours; Immunoprecipitation method was used to detect the effect of TSPG on the tyrosine phosphorylation of EpoR mediated protein tyrosine kinase JAK2 and signal transduction and transcription activator 5 (STAT5).

Keywords: total saponins of ginseng; Erythropoietin receptor; JAK2; Signal transduction and transcription activating factors; Thiazole blue method

1 引言

血液由血浆和血细胞组成,血细胞分为红细胞、白细胞、血小板,且有次级分类。研究表明,在机体的生命过程中,血细胞不断地新陈代谢;同时,新陈代谢的活跃性与其生存环境密切相关。血细胞形态、数量、比例和血红蛋白含量的测定称为血像。患病时,血像常有显著变化,故检查血像对了解机体状况和诊断疾病十分重要。人参是祖国传统医学的“补气”要药,人参皂苷是人参中主要的有效药物成分。

2 血细胞基本概述

2.1 血细胞的发育

血细胞的发育是连续的,包括血细胞的增殖、分化、成熟和释放等过程。血细胞的增殖是指血细胞通过分裂而使其数量增加的现象。血细胞主要是通过有丝分裂方式增殖,在增殖过程中,母细胞有丝分裂后形成的子细胞同时都趋向分化成熟。子细胞还可以进一步增殖,每增殖一次就趋向于进一步分化。一般情况下,一个原始细胞到成熟细胞可经过4~5次有丝分裂,一个原始红细胞经4~5次增殖后可产生32个或64个成熟红细胞。由一个原始细胞经过数代的有丝分裂形成一大堆成熟细胞,这种血细胞的增殖称为“对称性增殖”。血细胞的分化是

指分裂后产生新的子细胞在生物学性状上产生了新的特点,即通过特定基因的表达合成了特定的蛋白质,与原来的细胞有了质的不同。这种分化过程是不可逆的,是血细胞失去某些潜能同时又获得新功能的过程。

2.2 血细胞成熟的一般规律

血细胞的发育成熟是连续的过程,为了研究等目的,人为地将其划分为各个阶段。在细胞分类中,处于发育阶段之间的细胞一般划入下一阶段。血细胞发育过程中的形态演变规律见表1。

表1 血细胞发育过程中形态演变一般规律

项目	原始→幼稚→成熟	备注
细胞大小	大→小	巨核细胞由小变大,早幼粒细胞比原始粒细胞大
核大小	大→小	成熟红细胞核消失
核形态	规则→不规则(如:圆→凹陷→分叶)	有的细胞不分叶
核染色质	细致→粗糙,疏松→致密	
核染色	淡紫色→深紫色	
核膜	不明显(薄)→明显(厚)	
核仁	有→无	
胞质量	少→多	小淋巴细胞胞质少
胞质颜色	深蓝→浅蓝→红	
胞质颗粒	无→少→多	红细胞系统无颗粒,粒细胞特异性颗粒分为三种
核质比例	大→小	

3 材料与方法

3.1 材料

脐血细胞来源:取自足月妊娠正常分娩脐带血(重庆医科大学第一附属医院提供),采集方法按 Broxmeyer 的报道 细胞在 24h 内经 Ficoll (相对密度 1.077) 梯度离心 制成单个核细胞 (MNC) 悬液。

人参总皂苷 (TSPG): 重庆中药研究所惠赠,纯度 95% 以上 RPMI-1640 培养液配成 1g/L 的工作液,正压过滤除菌。

主要试剂及材料: RPMI-1640 培养基 (GIBCO 公司) 马血清 (HS 军事医学科学院提供), 抗 EpoR (Ant-iEpoR)、抗 JAK2 (Am-iJAK2) 为相对分子质量 55kD、130kD 的抗体; 抗 STAT5 包含 STAT5a (Ant-iSTAT5a) 和 STAT5b (Ant-iSTAT5b), 相对分子质量分别为 94kD 和 96kD。EpoR、

JAK2、STAT5、PTyr 抗体 (Santa Cruz 公司), β -actin 抗体 (博士德生物公司), IgG 抗体、DAB 显色试剂盒 (中山生物试剂公司), PVDF 膜 (美国 DUPONT 公司)。SCF、IL-3 (军事医学科学院提供), Epo (Amgen 公司)。

3.2 方法

集落形成实验: 用以检测 TSPG 刺激红系造血祖细胞 (BFU-E、CFU-E) 增殖能力。体系中含 30%HS、10%BSA、SCF、IL-3、Epo 及脐血 MNC, RPMI-1640 及 0.9% 甲基纤维素。加药组为在其中加入不同剂量的 TSPG, 终浓度分别为 10、25、50、75、100mg/L, 以不加 TSPG 为对照组, 所有培养均在 96 孔板 (每孔 0.2ml, 复种 3~5 孔), 37℃, 5%CO₂ 及饱和湿度下培养 14d 计数 BFU-E, 6d 计数 CFU-E。

MTT 法: 用以检测 Epo 对脐血细胞增殖的影响。将脐血造血细胞 (5×10^5 个 / ml) 单细胞悬液 100 μ l 和等量的不同稀释度的 Epo 加入 96 孔细胞培养板, 每个稀释度设 4 个复孔, 培养 24h, 加入 MTT (20 μ l / 孔), 继续培养 8h, 500 $\times$ g 离心 15min, 弃上清, 加 DMSO200 μ l / 孔, 待甲颗粒充分溶解后, 以自动酶标读数仪 (Bio-RadE2550 型 $\lambda=570$ nm) 测定 A 值, 借以反映 Epo 对脐血细胞的增殖情况。相同实验重复 3 次。

Western blotting 法: (1) 蛋白提取: 分别将 TSPG0、25、50、100mg/L 与脐血造血细胞 1×10^6 个/ml 共培养 24h, 收集细胞: 以上细胞悬液离心后去掉上清, 分别加入 20 μ l 细胞裂解液, 冰上放置 30min 后, 4℃, 25000 $\times$ g 离心 15min, 吸上清为细胞总蛋白。Bradford 法测定蛋白浓度, 用相应的蛋白提取液将各组全细胞总蛋白浓度调整一致。(2) Western blotting: 取每组样品各 20 μ l 分别与 20 μ l 凝胶加样缓冲液混匀, 100℃ 煮沸 5min, 离心后取上清 16 μ l 进行 SDS-PAGE。积层胶电泳电压 60V, 分离胶电泳电压 120V, 电泳结束后转移到聚偏二氟乙烯印迹膜 (PVDF) 上。用 5% 脱脂奶粉封闭 2h, 加入兔抗人 EpoR 一抗 1:200 或 β -actin 抗体 1:300, 室温 1.5h。TTBS 漂洗后加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 二抗 1:500, 室温 2h。TBS 充分洗膜 4 次 DAB 显色。晾干、扫描并进行图像分析。

免疫沉淀法: 实验分组: (1) 对照组, 在含 10% 马血清的 RPMI-1640 培养液中培养脐血造血细胞 (1×10^6 /ml); (2) TSPG 组, 在常规培养体系中加入 TSPG (终浓度 25mg/L)。分别以 Epo 5×10^3 IU/L 诱导 0、2、5 和 30min 后终止反应, 经细胞裂解液裂解, 将裂解产物用抗 JAK2、STAT5 抗体免疫沉淀后, 再用抗 p-Tyr 抗体做 Western blotting, 以检测 JAK2、STAT5 蛋白的酪氨酸磷酸化。

统计学分析: 显著性分析用 t 检验 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

4 结果

4.1 TSPG 刺激红系造血细胞 (BFU-E、CFU-E) 增值能力

TSPG 10~75mg/L 均能提高脐血细胞形成 BFU-E、CFU-E 的集落产率 以 25mg/L 提高幅度最明显, 详见表 2:

表 2 人参总皂苷对气血红系造血祖细胞 (BFU-E、CFU-E) 的增殖作用 (n=12)

TSPG (mg/L)	BFU-E (个/well)	CFU-E (个/well)
0 对照 (control)	7.11±1.764	126.4±11.07
10	9.00±2.291*	134.8± 8.45*
25	10.00±1.936* *	140.9± 9.506* *
50	9.67±1.803* *	135.1± 8.908*
75	8.89±1.965*	134.9± 9.293*
100	7.33±2.179	124.8±10.15

与对照组相比较 (Compared with control group), * P<0.05; * * P<0.01

4.2 Epo 对脐血细胞增殖的影响

以 MTT 法测定得出 $Epo 2 \times 10^{-5} \sim 10^4 IU/L$ 均能促进脐血细胞的增殖, 以 $5 \times 10^3 IU/L$ 促进增殖最明显, 见图 1。

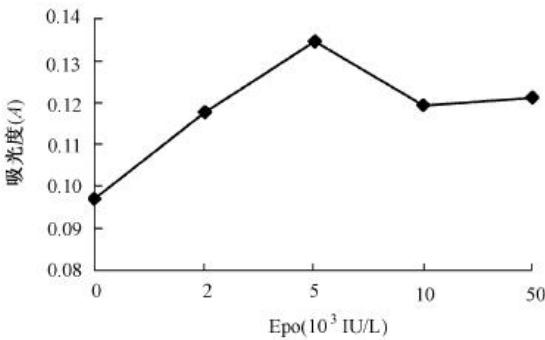


图 1 Epo 对脐血造血细胞增殖的影响

4.3 Western blotting 法

不同剂量的 TSPG 作用造血细胞 24h 后, EpoR 的表达无

变化。

4.4 免疫沉淀法

用抗 JAK2 免疫沉淀后, 再行 Western blotting 法, 一抗为抗 PTyr。图 4-2A 可见 Epo 刺激前, 于相对分子质量 130kD 处可见一浅淡的酪氨酸磷酸化蛋白带, Epo 刺激 2min 时 JAK2 酪氨酸磷酸化明显增强, 30min 时仍很强。TSPG 作用造血细胞 24h 后, JAK2 酪氨酸磷酸化增强, 当再加入 Epo 刺激时, 可见相应时相的 JAK2 酪氨酸磷酸化进一步增强。

用抗 STAT5 免疫沉淀后, 再行 Western blotting 法, 一抗为抗 PTyr。图 4-2B 可见 Epo 刺激前, 于相对分子质量 96kD 处可见一浅淡的 STAT5b 酪氨酸磷酸化蛋白带, 而未出现 STAT5a 酪氨酸磷酸化蛋白带。Epo 刺激 2min 时 STAT5b 酪氨酸磷酸化增强, 5min 时同时可见 STAT5a 酪氨酸磷酸化, 30min 时 STAT5a 和 STAT5b 酪氨酸磷酸化仍很强。TSPG 作用造血细胞 24h 后, 未加入 Epo 即可看到 STAT5a 和 STAT5b 酪氨酸磷酸化, 当再加入 Epo 刺激时, 可见相应时相的 STAT5a 和 STAT5b 酪氨酸磷酸化进一步增强。

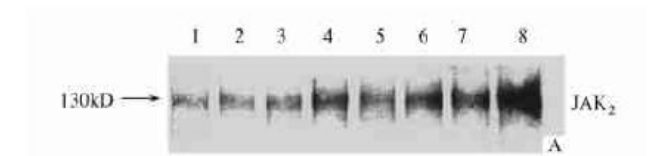


图 2 A 免疫沉淀检测 JAK2 酪氨酸磷酸化: 泳道 1~4: 未经 TSPG 作用, 只 $Epo 5 \times 10^3 IU/L$ 分别刺激 0、2、5、30min; 泳道 5~8: 经 TSPG 作用 24h 后, $Epo 5 \times 10^3 IU/L$ 分别刺激 0、2、5 和 30min。

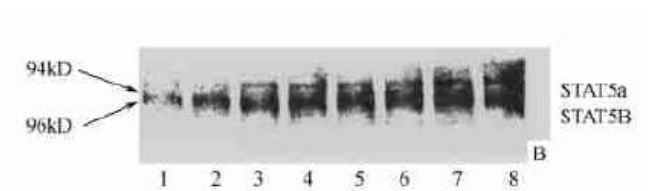


图 3 B 免疫沉淀检测 STAT5 酪氨酸磷酸化: 泳道 1~4: 未经 TSPG 作用, 只 $Epo 5 \times 10^3 IU/L$ 分别刺激 0、2、5、30min; 泳道 5~8: 经 TSPG 作用 24h 后, $Epo 25 \times 10^3 IU/L$ 分别刺激 0、2、5 和 30min。

参考文献:

[1] 王璐,王亚平.人参总皂甙诱导人造血基质细胞表达 IL-3 的实验研究[J].解剖学报,2004,35(1):49-54.
[2] 王莎莉,陈笛,王亚平,等.人参总皂甙对人 GM-CSF 和 GMCSFRa 表达的调控[J].生理学报,2003,55(4):487-492.
[3] Li K , Miller C , Hegde S ,et al.roles for an epo receptor tyr-343 stat5 pathway in proliferative co-signaling with kit* downloaded from[J].[2023-06-09].