

血小板相关抗体对巨核细胞增殖的实验研究^{*}

★ 汤喜兰¹ 黄立新² 曾治君¹ 张启云¹ 单义民¹ 徐国良^{1**} (1. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室 南昌 330004; 2. 江西艺术职业学院基础部 南昌 330013)

摘要:目的:探讨血小板相关抗体(platelet-associated antibody, PAIgG)对巨核细胞体外增殖的影响。方法:制备骨髓成纤维细胞无血清条件培养液,采用小鼠骨髓巨核细胞原代培养的方法,探讨 PAIgG 对巨核细胞体外增殖的影响。结果:50 倍和 100 倍稀释的 PAIgG 能够显著抑制巨核细胞的增殖。结论:PAIgG 对巨核细胞的体外增殖有抑制作用。

关键词:血小板相关抗体;巨核细胞;增殖

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

The Effect of Platelet-Associated Antibody on Megakaryocyte Proliferation

TANG Xi-lan¹, HUANG Li-xin², ZENG Zhi-jun¹, ZHANG Qi-yun¹, SHAN Yi-min¹, XU Guo-liang¹

1. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM(Ministry of Education), Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004

2. Basis Department, Jiangxi Vocational College of Art, Nanchang 330013

Abstract: Objective: To investigate the effect of platelet-associated antibody (PAIgG) on the expansion of mature megakaryocytes in vitro. Methods: Serum-free bone marrow fibroblasts conditioned medium (F-CM) was prepared and collected. The method of bone marrow megakaryocytes primary culture was used and The effect of PAIgG on the expansion of megakaryocytes was discussed. Results: PAIgG that diluted for 50 times and 100 times can significantly inhibit megakaryocytes proliferation. Conclusion: PAIgG can successfully inhibit megakaryocytes expansion in vitro.

Key words: platelet-associated antibody; megakaryocyte; proliferation

多因偏食油腻厚味,损伤脾胃,使气机壅塞,升降失常,土壅木郁,肝胆疏泄失职或忧思恼怒,肝失疏泄,累及胆腑,胆汁通降不畅,久郁蕴热或内损外感所致。现代医学认为,本病发生与胆汁成分改变和胆道动力障碍有关,使胆囊壁增厚,肌肉纤维萎缩,故胆囊的收缩功能减退。因此在治疗上的一个难点是胆囊壁的不良重构而引起胆囊收缩功能的丧失,单纯应用西药抗感染很难达到恢复胆囊收缩功能的目的^[4]。

而目前采用中药复方治疗胆囊炎具有良好疗效。本方以《金匱要略》治疗湿热黄疸的名方茵陈五苓散加减化裁,在疏肝的同时加强其利胆的功效。实验所得结果表明胆乐汤具有抗炎利胆作用,可以

明显加快胆汁的排出量,这提示了本药在肝胆疏泄失职,胆汁动力障碍通降不畅等原因所致的急慢性胆囊炎中有较好的治疗作用,临床上有值得推广意义。

参考文献

- [1] 徐叔云. 药理学实验方法[M]. 人民卫生出版社, 2002.
- [2] 龙子江, 方金红. 消炎利胆胶囊利胆抗炎的实验研究[J]. 中国中西医结合脾胃杂志. 2000, 8(1): 34-35, 45.
- [3] 董培良, 王和平, 王建明. 肝复康滴丸对大鼠利胆作用的实验研究[J]. 中国药师, 2007, 10(9): 848-849.
- [4] 庞学龙, 魏鹏. 中药治疗胆囊炎的临床疗效观察[J]. 中华临床研究杂志, 2007, 13(17): 2557.

(收稿日期: 2009-06-14)

* 基金项目: 江西省自然科学基金资助项目(0640161)

** 通讯作者: 徐国良, 教授, 博士, Tel: 0791-7118657; E-mail: xuguoliang6606@126.com。

免疫性血小板减少性紫癜(idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP)是一种临床上常见的以血小板减少为特征的出血性疾病^[1],血小板减少的机制是由于自身免疫功能异常导致血液中产生血小板相关抗体(platelet-associated antibody, PAIgG),PAIgG结合于血小板膜的抗原部位,使得血小板在单核巨噬系统内的破坏增加^[2]。巨核细胞(megakaryocytes, MK)是血小板的前体细胞,与血小板有着相同的系列特异性抗原决定簇,同样受到PAIgG的影响而发生成熟障碍导致血小板减少^[3]。临床研究报道^[2]表明:在PAIgG > 500 ng/10⁷ PA时,随着PAIgG值的增高,ITP患者的成熟产板巨核细胞数量明显减少。白松婷研究^[4]报道,去除ITP患儿血液中的血小板抗体等致病因素,进行骨髓巨核细胞的体外无血清培养,结果发现骨髓巨核祖细胞造血功能活跃,骨髓巨核细胞标化计数明显升高。临床研究结果提示:PAIgG可能作用于巨核细胞,影响巨核细胞的增殖分化和成熟。本研究考察了小鼠骨髓成纤维细胞条件培养液(F-CM)对巨核细胞增殖的作用,探讨了PAIgG对巨核细胞体外增殖的影响,为提升血小板药物提供一种细胞水平的研究方法。

1 材料与方法

1.1 材料

Balb/C小鼠,雌、雄不限,由南昌大学医学院提供,合格证号:021-9602。PAIgG(豚鼠抗Balb/C小鼠)为本实验室参考文献^[5]制备。IMDM培养基购自美国GIBCO公司;牛血清白蛋白(BSA)和谷氨酰胺为solarbio产品;超级无噬菌体、低内毒素新生牛血清(NCS)为杭州四季青生物工程材料研究所产品;马血清(horse serum, HS)为北京中杉金桥产品;骨髓成纤维细胞生长因子(bFGF)为英国peprotech公司产品;碘化乙酰胆碱(acetylthiocholine iodide, TLC)和β-巯基乙醇均购自美国sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 F-CM的制备^[6] 无菌条件下取股骨、胫骨,用IMDM培养液冲出骨髓细胞,制备单细胞悬液;细胞计数,以1 × 10⁷个/ml接种到含15%小牛血清、2 ng/ml bFGF的5 ml IMDM培养体系中;37℃,5% CO₂,饱和湿度下培养5 d;弃去培养液,无菌PBS洗细胞3次,重新加入上述培养体系,继续培养6 d;当显微镜下可见亚汇合的贴壁细胞层,其中成纤维细胞约占90%以上时,弃去培养液,无菌PBS轻洗细胞3次,再加IMDM培养液(1 cm²培养瓶底面积加IMDM培养液0.1 ml),置37℃,5% CO₂,饱

和湿度下培养48 h;取上悬液,离心、过滤,收集F-CM。

1.2.2 采用不同浓度的F-CM进行巨核细胞的体外培养 无菌条件下取股骨、胫骨,制备骨髓细胞单细胞悬液。以1 × 10⁶个/ml接种于含5%马血清(HS),0.045%谷氨酰胺,10~5 mol/L β-巯基乙醇,0.5%牛血清白蛋白的IMDM培养体系;实验组培养体系中除上述成分外分别加入终浓度为10%,20%,30%,40%,50%的F-CM,对照组加入等量的IMDM。各培养体系接种于24孔培养板中,1 ml/孔,3孔/组,37℃,5% CO₂饱和湿度下培养,第5 d半量换液,半量换液后两天进行乙酰胆碱酯酶染色,细胞大而亮,乙酰胆碱酯酶染色为阳性的细胞为成熟巨核细胞。

1.2.3 PAIgG对巨核细胞增殖的影响 小鼠骨髓单个核细胞1 × 10⁶/ml接种于含5% HS,0.045%谷氨酰胺,10~5 mol/L β-巯基乙醇,0.5%牛血清白蛋白的IMDM培养体系中。试验分为4组:30% F-CM对照组、PAIgG 50倍稀释组、PAIgG 100倍稀释组、PAIgG 200倍稀释组。各组培养体系中均加入F-CM(30%, V/V)。试验组分别加入不同稀释倍数的PAIgG,30% F-CM对照组加入等量的IMDM。各培养体系接种于24孔培养板中,1 ml/孔,3孔/组,37℃,5% CO₂,饱和湿度下培养,第5 d半量换液。半量换液后两天进行乙酰胆碱酯酶染色,显微镜下计数成熟巨核细胞数。

1.2.4 统计方法 采用SPSS 13.0软件包进行方差分析(ANOVA)检验,组间比较采用LSD检验。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

成熟的巨核细胞大而亮,折光性好,胞浆和细胞核较为明显,经过乙酰胆碱酯酶染色后的巨核细胞呈棕褐色表达(见图1)。镜下观察:与对照组相比较,稀释倍数为50倍和100倍的PAIgG造模组的巨核细胞数目有减少趋势。

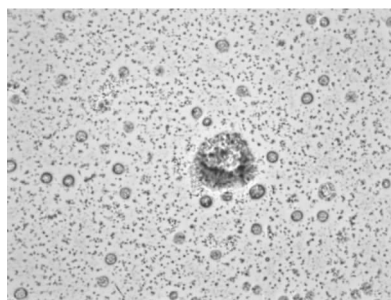


图1 巨核细胞乙酰胆碱酯酶染色(400 ×)

2.2 F-CM 对巨核细胞增殖的影响

与对照组(0% F-CM 组)相比较,各个浓度的 F-CM 均能促进巨核细胞增殖。随着 F-CM 在一定浓度范围(10%~50%)的增加,其促进巨核细胞增殖的作用呈先逐渐增强后逐渐递减的趋势,以 F-CM 为 30% 浓度时增强作用最为显著(与对照组相比较, $P < 0.05$)。具体见图 2。

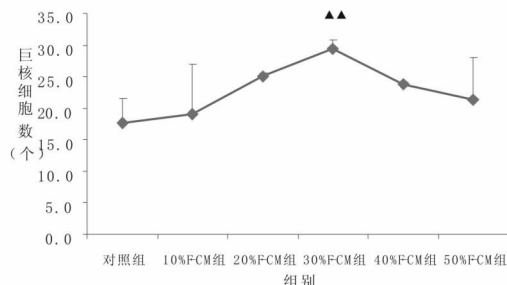


图 2 不同浓度 F-CM 对巨核细胞增殖的影响
(与对照组相比较, $P < 0.01$)

2.3 PAIgG 不同稀释倍数对巨核细胞增殖的影响

PAIgG 50、100、200 倍稀释组对成熟巨核细胞的增殖均有抑制作用。稀释倍数越小,其抑制作用越明显。与 30% F-CM 对照组相比较,50 倍和 100 倍稀释的 PAIgG 组均有极显著性差异 ($P < 0.01$),能显著抑制巨核细胞的增殖。具体见图 3。

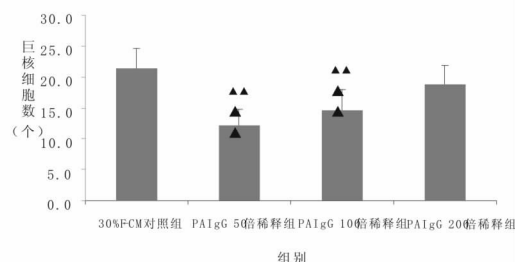


图 3 PAIgG 不同稀释倍数对巨核细胞增殖的影响
(与 30% F-CM 组相比较, $P < 0.01$)

3 讨论

F-CM 中含有 SCF, IL-1, IL-6, IL-11, GM-CSF, FGF 等较多的造血刺激因子以及部分造血抑制因子,但主要以造血刺激因子为主,因而 F-CM 对巨核细胞体外扩增有刺激作用,能够促进巨核系祖细胞尤其是巨核细胞的增殖与分化^[6]。试验结果表明: F-CM 在一定浓度范围内,促巨核细胞增殖的作用呈先逐渐增强后逐渐递减的趋势,以 30% F-CM 促进巨核细胞的增殖作用最为显著。这与文献报道相一致^[7]。

目前,关于 PAIgG 与巨核细胞增殖方面的临床报道很多^[2,4]。本研究以 30% F-CM 作为促巨核细胞增殖的最佳浓度,观察不同稀释倍数的 PAIgG 对巨核细胞增殖的作用。试验结果表明:与 30% F-

CM 对照组相比较,50 倍、100 倍、200 倍稀释的 PAIgG 能够抑制巨核细胞的增殖,其中以 50 倍和 100 倍稀释的 PAIgG 组抑制巨核细胞的增殖最为显著 ($P < 0.05$)。现有研究表明,血小板外膜蛋白主要有 GP I a、GP I b、GP II a、GP II b、GP III a、GP III b^[8],而巨核细胞表面亦表达 GP II b/III a 和 GP I b, PAIgG 与巨核细胞上相应的抗原结合,从而干扰巨核细胞的成熟和血小板的产生。王同保报道^[9]表明:与正常儿童相比,ITP 患儿巨核细胞血小板膜糖蛋白(GP) II b/III a 含量降低。有报道^[10]表明用体外干细胞培养法研究发现,GP I b α 单抗轻度抑制巨核细胞克隆的形成,明显抑制血小板形成。

ITP 疾病长期公认的致病机理是 PAIgG 与血小板抗原特异性结合形成抗原抗体复合物,激活补体,破坏血小板,导致血小板减少。本研究结果揭示 PAIgG 还可以作用于骨髓巨核细胞,抑制巨核细胞的增殖,影响血小板的生成。本研究结果为升血小板药物的开发提供一种体外研究方法。

参考文献

- [1] 徐国良,肖兵华,陈奇,等. 肿节风及其分离部位对免疫性血小板减少性紫癜小鼠血小板的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, (11)4:33-36.
- [2] 王萍萍,卢香兰,李霞. 血小板相关抗体对原发性血小板减少性紫癜患者巨核细胞数量及成熟程度的影响[J]. 中国医科大学学报(医学版), 2003, 32 (4):348-352.
- [3] 范颖,王家辉,富琦,等. 血小板相关抗体与原发性血小板减少性紫癜关系的研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19 (6): 859-861.
- [4] 白松婷,盛光耀,赵晓明,等. 体外无血清培养骨髓巨核祖细胞对 ITP 早期分型的临床意义[J]. 新医学, 2007, 38 (4):234-235.
- [5] 徐国良,肖兵华,陈奇,等. 肿节风及其分离部位对免疫性血小板减少性紫癜小鼠血小板的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11 (4):33-36.
- [6] 黄艳红,周小莹,谭孟群,等. 骨髓成纤维细胞条件培养液对巨核系细胞体外增殖和血小板体内生成的影响[J]. 中南大学学报(医学版), 2005, 30 (6):726-728.
- [7] 周小莹,黄艳红,王绮如,等. 骨髓成纤维条件培养液对体外巨核系细胞生成的促进作用[J]. 2004, 29 (6):658-659.
- [8] 李振奇,马印图,王更银,等. 血小板膜抗原的提取及其免疫原性研究[J]. 华北国防医药, 2006, 18 (1):11-13.
- [9] 王同保,张欣欣,冯剑飞. 儿童特发性血小板减少性紫癜骨髓巨核细胞成熟状态[J]. 中华血液学杂志, 1995, 16 (3):127-129.
- [10] 芦璐,侯明. 特发性血小板减少性紫癜的体液免疫机制[J]. 中华内科杂志, 2003, 42 (10):742-743.

(收稿日期:2009-04-28)