

菟丝子含药血清对大鼠肢芽细胞、骨形成蛋白2及II型胶原表达的影响

刘星¹, 李啸红², 王燕¹, 邹聪聪²

(遵义医学院珠海校区 1. 生物化学与细胞分子生物学教研室; 2. 人体解剖与组织胚胎学教研室, 广东 珠海 519041)

摘要:目的 探讨菟丝子含药血清对SD大鼠胚胎肢芽细胞增殖与分化、细胞中骨形成蛋白2(BMP-2) mRNA表达、II型胶原 mRNA 和蛋白表达的影响。方法 采用中药血清药理学方法制备高、中、低剂量(40、20、10 g/kg)菟丝子含药血清和正常血清。取E15后肢芽制成细胞悬液,接种到细胞培养板中,分别加入高、中、低剂量菟丝子含药血清和正常血清,作为高、中、低剂量组和阴性对照组。体外培养72 h,MTT法检测肢芽细胞的增殖,阿利新蓝染色检测肢芽细胞的分化,RT-PCR法检测肢芽细胞中BMP-2、II型胶原 mRNA 的表达,Western blotting检测II型胶原蛋白的表达。结果 低、中剂量组细胞增殖较快,吸光度值高于阴性对照组($P < 0.05$);中剂量组软骨细胞集落数多于阴性对照组($P < 0.05$),高剂量组软骨细胞集落数低于阴性对照组($P < 0.05$);低、中剂量组BMP-2 mRNA表达水平高于阴性对照组($P < 0.05$),高剂量组BMP-2 mRNA 低于阴性对照组($P < 0.05$);各剂量组II型胶原 mRNA 和蛋白的表达水平均高于阴性对照组($P < 0.05$)。结论 不同剂量菟丝子含药血清均可促进肢芽细胞的增殖和II型胶原 mRNA 及蛋白的表达;高剂量菟丝子含药血清可下调BMP-2 mRNA 的表达水平,抑制肢芽细胞的分化。

关键词:菟丝子;含药血清;肢芽细胞;骨形成蛋白2;II型胶原

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

Effect of *Cuscuta chinensis* Lam medicated serum on rat embryo limb bud cells and expressions of BMP-2 and Collagen II

LIU Xing¹, LI Xiaohong², WANG Yan¹, ZOU Congcong²

(1. Department of Biochemistry and Cell Biology; 2. Department of Human Anatomy and Histo-Embryology, Zunyi Medical College Zhuhai Campus, Zhuhai 519041, Guangdong, China)

Abstract: Objective To explore the effect of *Cuscuta chinensis* Lam medicated serum on the proliferation and differentiation of limb bud cells, the mRNA expressions of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and Collagen II, and the protein expression of Collagen II. **Methods** Different doses of *Cuscuta chinensis* Lam medicated serum and normal serum were prepared by serological pharmacological method. The hindlimb buds were amputated from SD rat embryos on day 15, then were made into cell suspension. The cells were cultured by the normal serum and the high, middle and low doses of *Cuscuta Chinensis* Lam medicated serum *in vitro* for 72 h, and were divided into the negative control group and high, middle and low dose groups, respectively. Limb bud cells proliferation was evaluated by MTT. Cells differentiation was evaluated by the cartilage cell colony numbers, which were stained with alcian blue. The mRNA expressions of BMP-2 and Collagen II were analyzed by RT-PCR, and protein expression of Collagen II was analyzed by Western blotting. **Results** Compared with the negative control group, the cells differentiation in low and middle dose groups were faster ($P < 0.05$); the cartilage cell colony numbers in middle dose group were more, while those in high dose group were less (all $P < 0.05$); the expressions of BMP-2 mRNA in low and middle dose groups were higher and that in high dose group was lower (all $P < 0.05$); the expressions of Collagen II mRNA and protein in high, middle and low dose groups were higher ($P < 0.05$). **Conclusion** Different doses of *Cuscuta chinensis* Lam medicated

serum can promote cell proliferation and increase expressions of Collagen II mRNA and protein. High dose of *Cuscuta Chinensis* Lam medicated serum can inhibit limb bud cells differentiation by decreasing BMP-2 mRNA expression.

Key words: *Cuscuta Chinensis* Lam; Medicated serum; Limb bud cell; Bone morphogenetic protein 2; Collagen II

菟丝子是传统医学中常用的保胎、安胎良药,其成分十分复杂,所含的黄酮类物质可表现出雌激素样活性^[1]。研究表明,某些植物中具有雌激素样作用的黄酮类物质,如染料木黄酮、茴香精油等,具有胚胎发育毒性^[2-3]。高剂量菟丝子含药血清对大鼠胚胎肢芽的软骨发育有一定抑制作用^[4]。

骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2) 是转化生长因子- β 超家族成员之一,可在胚胎发育期间促使四肢的形成,主要参与软骨和骨的发育,在促进骨形成和诱导成骨细胞分化中具有重要作用^[5]。II 型胶原是软骨细胞的特征性表型,由软骨细胞分泌合成,主要分布在软骨组织中,是软骨基质的主要成分,占细胞外基质干重的 90% 以上,它的出现和分布变化可真实反映软骨组织的形成过程^[6]。本研究通过对 BMP-2 mRNA、II 型胶原 mRNA 和蛋白的表达进行检测,以探讨菟丝子含药血清对肢芽细胞增殖与分化的影响机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 SD 大鼠,雌鼠体质量 (220 ± 20) g,雄鼠体质量 (240 ± 20) g,由广东省医学实验动物中心提供。实验动物许可证号:SCXK (粤)2008-0002。动物饲料为 SPF 级鼠灭菌饲料,购自广东省医学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂与仪器 菟丝子购自安徽维涛中药饮片科技有限公司(许可证编号:皖 20100146;国家 GMP 证书编号:皖 K0295);Ham's F12 培养基、0.25% 胰酶、MTT 均购自美国 Gibco 公司;内参蛋白(GAPDH)多克隆抗体购自杭州贤至生物有限公司;II 型胶原多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司;逆转录酶 M-MLV、DNA 酶购自宝生物工程(大连)有限公司;Trizol 购自美国 Invitrogen 公司;引物由上海生物工程有限公司合成。

冷冻离心机为德国 Eppendorf 产品;酶标仪为美国 Bio-TEK 公司产品;PCR 仪、凝胶成像仪为美国 Bio-Rad 公司产品;倒置显微镜为德国莱卡公司产品;电泳槽和电泳仪购自北京六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 菟丝子含药血清和肢芽细胞悬液的制备

1.2.1.1 菟丝子含药血清的制备 按照常规方

法^[4],将正常血清及高、中、低剂量(40、20、10 g/kg)菟丝子含药血清经 0.22 μm 滤膜过滤除菌, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.1.2 肢芽细胞悬液的制备 参照文献[7],取 E15 后肢芽, D-Hanks 液清洗数遍后充分剪碎, 0.25% 胰酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中消化 10 ~ 15 min, Ham's F12 全培养基终止消化, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入培养液吹打混匀制成肢芽细胞悬液, 200 目细胞筛过滤, 台盼蓝染色, 计数细胞存活率在 90% 以上, 调整细胞浓度至 2×10^7 个/mL 备用。

1.2.2 肢芽细胞增殖与分化实验

1.2.2.1 肢芽细胞增殖实验 参照文献[8], 取肢芽细胞悬液, 按 10 μL /孔加入到 96 孔培养板, 分别加入高、中、低剂量菟丝子含药血清和正常血清, 作为高、中、低剂量组和阴性对照组, 每组 10 个复孔。细胞贴壁后, 按组分别加入 0.2 mL 含有 10% 含药血清的 Ham's F12 全培养基。继续培养 72 h, 每孔加入新鲜配制的 MTT 液 (5 mg/mL) 20 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 4 h。弃尽培养液, 加入 0.15 mL DMSO, 振荡 10 ~ 15 min, 待细胞中蓝紫色结晶充分溶解后, 测吸光度 A_{490} 值。

1.2.2.2 肢芽细胞分化实验(微团培养) 取肢芽细胞悬液, 按 20 μL /孔加入到 24 孔培养板。分组同 1.2.2.1, 每组 6 个复孔。细胞贴壁后, 按组分别加入 0.5 mL 含有 10% 含药血清的 Ham's F12 全培养基。继续培养 72 h, 弃尽培养液, 2.5% 戊二醛固定 0.5 h, PBS 清洗, 0.5% 阿利新兰染液 0.5 mL 染色 4 h。蒸馏水清洗后自然风干, 计数每孔中软骨细胞集落数。

1.2.3 RT-PCR 法检测肢芽细胞中 BMP-2 和 II 型胶原 mRNA 的表达 取肢芽细胞悬液, 按 0.5 mL/孔加入到 6 孔培养板, 分组同 1.2.2.1。CO₂ 培养箱中孵育 12 h 后, 弃培养液, 每孔重新加入 3 mL 含有 10% 含药血清的 Ham's F12 全培养基, 继续培养 72 h。每孔加入 0.8 mL Trizol 裂解肢芽细胞, 低温下提取总 RNA, 经浓度和纯度测定后, 取 $A_{260/280}$ 值为 1.8 ~ 2.0 的 RNA 样品, 进行琼脂糖凝胶电泳。取未降解的 RNA 样品按逆转录试剂盒说明书进行逆转录, 获得 cDNA。取适量 cDNA 模板, 按 20 μL 反应体系加入引物、Taq 酶等进行 PCR 扩增。引物序列见表 1。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 32 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 32 个

循环,72 °C 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后于凝胶成像仪中成像并分析,以各组对应的

β -actin 电泳条带为标准条带,计算目的基因的相对表达量。

表1 RT-PCR 引物序列

基因名称	上游引物(5'→3')	下游引物(3'→5')	产物长度(bp)
β -actin	AGCCATGTACGTAGCAGCCA	CTCTCAGCTGTGGTGGTGGT	228
BMP-2	TGGAAGTGGCCCATTTAGAG	TGACGCTTTTCTCGTTTGTG	432
Collagen II	GGCTCCCAGAACATCACCTA	CTTGCCCCACTTACCAGTGT	798

1.2.4 Western blotting 法检测各组肢芽细胞中 BMP-2 和 II 型胶原蛋白的表达 细胞前期处理同 1.2.3,加入蛋白抽提试剂低温提取总蛋白,BCA 法测定浓度后,加入 5 × SDS 上样缓冲液,混匀后 100 °C 变性 5 min。各样品按总蛋白含量 50 μ g 上样,10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白。电泳结束后,转移至 PVDF 膜上,用 0.5% BSA 封闭液室温封闭 1 h,4 °C 孵育一抗过夜, TBST 清洗数遍后孵育 HRP 标记的二抗,室温摇床孵育 2 h。TBST 清洗后加入 ECL 化学发光剂,入暗室曝光洗片。于凝胶成像系统下成像并分析,得出 GAPDH 和目的蛋白条带灰度值比。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 菟丝子含药血清对肢芽细胞增殖与分化的影响 见表 2。与阴性对照组相比,低、中剂量组 A_{490} 值较大,肢芽细胞增殖较快 ($P < 0.05$)。中剂量组所形成的软骨细胞集落最多,高剂量组所形成的集落数最少,与阴性对照组所形成的集落数相比,差异有统计学意义 (P 均 < 0.05)。

表2 菟丝子含药血清对肢芽细胞增殖与分化的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	A_{490} 值	集落数(个)
阴性对照组	0.215 \pm 0.031	171.33 \pm 21.42
高剂量组	0.220 \pm 0.031	137.67 \pm 12.04*
中剂量组	0.241 \pm 0.026*	227.17 \pm 41.37*
低剂量组	0.242 \pm 0.031*	176.83 \pm 21.91

* $P < 0.05$ vs 阴性对照组。

2.2 菟丝子含药血清对肢芽细胞中 BMP-2 mRNA 和蛋白表达的影响 见图 1。低、中剂量组 BMP-2 mRNA 的表达水平高于阴性对照组 ($P < 0.05$),而高剂量组 BMP-2 mRNA 的表达水平低于阴性对照组 ($P < 0.05$)。由于 BMP-2 蛋白分子量小,在肢芽细胞中含量较低,经多次实验未能检测到蛋白表达的清晰条带。

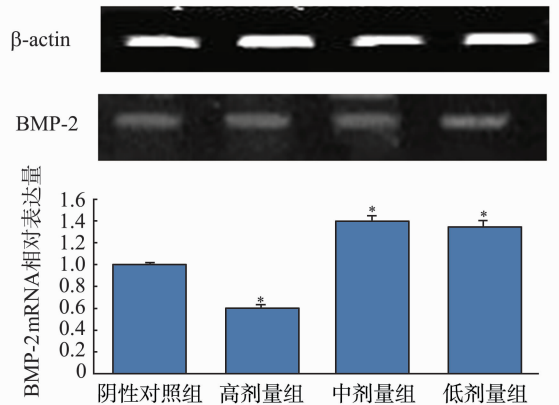


图1 菟丝子含药血清对 BMP-2 mRNA 表达的影响

* $P < 0.05$ vs 阴性对照组。

Fig.1 Effect of *Cuscuta chinensis* Lam medicated serum on the expression of BMP-2 mRNA

* $P < 0.05$ vs the negative control group.

2.3 菟丝子含药血清对肢芽细胞中 II 型胶原 mRNA 和蛋白表达的影响 见图 2。低剂量组 II 型胶原 mRNA 和蛋白表达水平最高,中、高剂量组的 II 型胶原 mRNA 和蛋白表达水平较高,各组与阴性对照组比较差异有统计学意义 (P 均 < 0.05)。

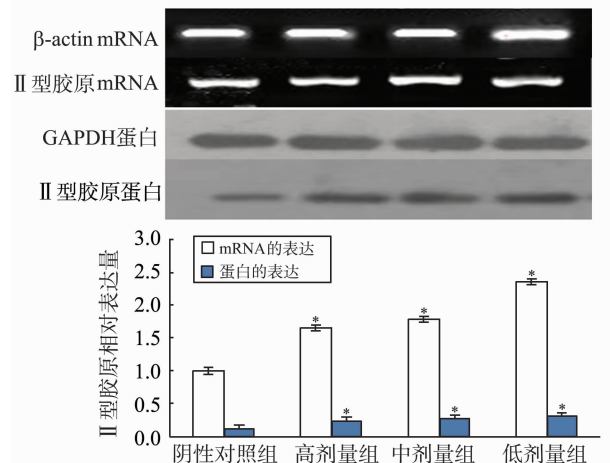


图2 菟丝子含药血清对 II 型胶原 mRNA 和蛋白表达的影响

* $P < 0.05$ vs 阴性对照组。

Fig.2 Effect of *Cuscuta chinensis* Lam medicated serum on expressions of Collagen II mRNA and protein

* $P < 0.05$ vs the negative control group.

3 讨论

中药在临床上大多以复方的形式进行配药,其

化学成分十分复杂,在体内的药理作用具有多靶点、多层次的特点,同时干扰因素也较多。以含药血清代替中药粗提物进行实验,不但可反映原药或代谢产物的药理作用,还能反映药物通过诱导机体内源性成分而产生其他活性成分的药理作用,更真实地模拟药物与机体之间的相互作用^[9]。本研究采用菟丝子含药血清作为受试物加入到离体反应系统中,模拟体内菟丝子及代谢产物等的活性成分与细胞之间相互作用的微环境,从而客观反映菟丝子的药效。

菟丝子含药血清对骨髓间充质干细胞和成骨细胞的增殖有一定促进作用,可明显上调骨髓间充质干细胞中 BMP-2 mRNA 的表达^[10-11]。本研究结果发现,各剂量菟丝子含药血清均促进了肢芽细胞的增殖,其中低、中剂量(分别相当于临床剂量的 33 倍和 66 倍)菟丝子含药血清可明显诱导肢芽细胞向软骨细胞分化,并上调 BMP-2 mRNA 的表达,说明菟丝子含药血清可表现出雌激素样活性。高剂量(相当于临床用药剂量 133 倍)却明显抑制肢芽细胞向软骨细胞分化,BMP-2 mRNA 的表达水平明显低于阴性对照组。这可能是导致前期实验结果中高剂量组前肢芽的软骨面积小、发育分化差的原因,提示高剂量菟丝子含药血清不但对肢芽整体的发育有影响,还对肢芽细胞的分化有一定抑制作用,与 BMP-2 mRNA 的表达水平下调密切相关。由此可知,高剂量菟丝子含药血清可表现出潜在的胚胎发育毒性作用。

有文献报道,弱雌激素金雀异黄素能刺激胚胎肢芽软骨细胞 II 型胶原 mRNA 表达,并随着金雀异黄素浓度的增加,软骨细胞胞浆 II 型胶原 mRNA 表达水平也随之提高^[12]。菟丝子含药血清具有雌激素样活性,因此,各剂量组菟丝子含药血清均明显提高了 II 型胶原 mRNA 和蛋白的表达水平。同时,BMP-2 可诱导软骨细胞分化,促使细胞外基质形成,并促进软骨细胞分泌合成 II 型胶原,可使体外培养的软骨细胞长期维持其表型,使已丢失软骨表型的反分化软骨细胞继续向软骨细胞表型方向分化^[13]。由此可知,低和中剂量组细胞分化较好及细胞中 II 型胶原 mRNA 和蛋白表达的提高,与其促进了 BMP-2 mRNA 的表达密切相关。高剂量明显抑制了 BMP-2 mRNA 的表达,而 II 型胶原 mRNA 和蛋白表达水平明显高于阴性对照组,这可能与其含有的多糖成分较多有关^[14]。

综上所述,低、中剂量菟丝子含药血清对胚胎肢芽细胞的增殖和分化具有一定的促进作用,与其能明显提高 BMP-2 mRNA、II 型胶原 mRNA 和蛋白

表达水平密切相关。而高剂量菟丝子含药血清可通过下调 BMP-2 mRNA 的表达水平来抑制肢芽细胞向软骨细胞方向分化,存在潜在的胚胎发育毒性。因此,在临床用药时应严格控制菟丝子含药血清剂量,以保证孕妇合理安全用药。

参考文献:

- [1] Umehara K, Nemoto K, Ohkubo T, et al. Isolation of a new 15-membered macrocyclic glycolipid lactone, Cuscutic Resinoside a from the seeds of *Cuscuta chinensis*; a stimulator of breast cancer cell proliferation [J]. *Planta Med*, 2004, 70(4):299-304.
- [2] 肖杨,刘然,邢丽娜,等. 采用微团培养模型探讨染料木黄酮的发育毒性[J]. *癌变·畸变·突变*, 2010, 22(4):271-275.
- [3] Ostad S N, Khakinegad B, Sabzevari O. Evaluation of the teratogenicity of fennel essential oil (FEO) on the rat embryo limb buds culture [J]. *Toxicol In Vitro*, 2004, 18(5):623-627.
- [4] 刘星,李啸红,袁新校,等. 菟丝子含药血清对大鼠肢芽软骨发育的影响[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2013(5):37-39.
- [5] Wu J B, Fu H Q, Huang L Z, et al. Effects of siRNA-targeting BMP-2 on the abilities of migration and invasion of human liver cancer SMMC7721 cells and its mechanism [J]. *Cancer Gene Ther*, 2011, 18(1):20-25.
- [6] 马春辉,阎作勤,郭常安,等. II 型胶原与 Bcl-2 在骨关节炎软骨细胞中的表达[J]. *中国矫形外科杂志*, 2012(19):1786-1789.
- [7] 曾怀才,贺庆芝,陈锋. 氯化三丁基锡对小鼠肢芽细胞遗传毒性的实验研究[J]. *实用预防医学*, 2010, 17(1):21-23.
- [8] 吴成秋,李纯颖,李梓民,等. 苯对小鼠胚胎肢芽和中脑细胞分化与增殖的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2009, 19(11):1640-1642.
- [9] 王洪武,倪青,林兰. 中药含药血清的研究进展及其在中医学中的应用[J]. *北京中医药*, 2008, 27(9):698-701.
- [10] 杜波,王婧. 菟丝子含药血清对成骨细胞代谢调控的影响[J]. *中医杂志*, 2011, 52(22):1951-1953.
- [11] 黄进,张进,徐志伟. 菟丝子含药血清促进骨髓间充质干细胞增殖的效应及机制[J]. *中华中医药杂志*, 2011, 26(4):818-822.
- [12] 涂国平,李云,张本. 金雀异黄素对肢芽软骨细胞的影响[J]. *中国公共卫生*, 2004, 20(10):1253-1254.
- [13] 王丽红,何英,赖国旗. Ad-hBMP-2 对促进软骨细胞分泌 II 型胶原影响的实验研究[J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30(18):2631-2634.
- [14] 胡晓梅,王俊锋,杨松涛,等. 菟丝子总多糖对家兔全层关节软骨缺损 II 型胶原表达的影响[J]. *实用医院临床杂志*, 2011, 8(1):23-25.