

龟板提取物对骨髓间充质干细胞中分化抑制蛋白 1 表达的影响

张海玲¹, 陈金锋¹, 陈东风^{2*}, 郑二来¹, 叶茂盛¹, 华子春³

1. 肇庆医学高等专科学校解剖教研室, 广东 肇庆 526020

2. 广州中医药大学, 广东 广州 510006

3. 南京大学医药生物国家重点实验室, 江苏 南京 210008

摘要: 目的 观察不同剂量的龟板提取物对骨髓间充质干细胞中分化抑制蛋白 1 (inhibitor of differentiation 1, Id1) 的作用。方法 将构建成功的 PGL3-Id1 启动子用磷酸钙共沉淀法转染大鼠骨髓间充质干细胞, 龟板提取物分别作用于转染后的骨髓间充质干细胞 12、24、36 h, 选取作用最为明显的 36 h, 每组分别加入 0、1、3、30、100 $\mu\text{g/mL}$ 龟板提取物, 药物作用 36 h 后收集细胞分别应用萤光素酶报告基因系统、RT-PCR 和 Western blotting 检测 Id1 的表达。结果 早期、小剂量龟板提取物对 Id1 的影响不大; 随着时间和剂量的增加, Id1 的表达水平也逐渐升高。结论 龟板提取物促进了骨髓间充质干细胞中 Id1 的表达, 剂量越大, 作用时间越长, 促进作用越明显。

关键词: 龟板提取物; 骨髓间充质干细胞; 分化抑制蛋白 1

中图分类号: R977 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2013)05-0346-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.05.006

Effect of *Plastrum Testudinis* extracts on expression of inhibitor of differentiation 1 in bone marrow derived mesenchymal stem cells

ZHANG Hai-ling¹, CHEN Jin-feng¹, CHEN Dong-feng², ZHENG Er-lai¹, YE Mao-sheng¹, HUA Zi-chun³

1. Department of Anatomy Embryo, Zhaoqing Medicine College, Zhaoqing 526020, China

2. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

3. State Key Laboratory of Medical Biology, Nanjing University, Nanjing 210008, China

Abstract: Objective To observe the effect of different dosages of *Plastrum Testudinis* extracts (PTE) on the expression of inhibitor of differentiation 1 (Id1) in bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs). **Methods** The PGL3-Id1 promoter was established and the MSCs were transfected with PGL3-Id1 promoter by calcium phosphate co-precipitation method. The transfected cells were treated with PTE for 12, 24, and 36 h, respectively. Different dosages (0, 1, 3, 30, and 100 $\mu\text{g/mL}$) of PTE were added into samples of 36 h group. After 36 h treatment, the cells were collected and luciferase activity measurement, RT-PCR, and Western blotting methods were used to detect the expression of Id1. **Results** The activity of short-term and low dose PTE was not substantial, along with the doses or time increasing, the expression of Id1 in bone marrow derived MSCs increased. **Conclusion** PTE increases the expression of Id1 in MSCs, and the activity is more significant with the dose and time increases.

Key words: *Plastrum Testudinis* extract; bone marrow derived mesenchymal stem cells; inhibitor of differentiation 1

分化抑制因子 1 (inhibitor of differentiation 1, Id1) 通过与碱性 HLH 蛋白结合而抑制 bHLH 与 DNA 及其他组织特异性 bHLH 转录因子结合, 抑制细胞分化, 故又称为 DNA 结合抑制因子 1^[1]。Id1 的表达受骨形态发生蛋白 4 (bone morphogenetic protein 4, BMP4) 的调控, 是 BMP4 的下游靶基因^[2]。

前期研究发现, 龟板有效成分通过抑制 BMP4 的表达促进骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 的增殖^[3], 本课题组在前期研究的基础上进一步证实龟板提取物通过调控 Id1 的表达促进 MSCs 的增殖, 为龟板提取物的进一步研究开发提供参考。

收稿日期: 2013-07-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30772861); 肇庆市科技创新计划项目 (2013E181)

作者简介: 张海玲 (1982—), 女, 讲师, 研究方向为中药调控干细胞的研究。E-mail: hailing0322@sina.com

*通信作者 陈东风 E-mail: cdf27212@21cn.com

1 材料与方法

1.1 试剂和动物

本实验在广州中医药大学解剖实验室和南京大学医药生物国家重点实验室完成。Id1 启动子已由前期实验构建成功^[4]；龟板提取物的制备方法见参考文献[5]。Yeast Extract 为英国进口（批号 212750）；PEG8000（批号 0159）、LiCl、CaCl₂ 为 Amresco 进口分装；Hepes 为 Gibco 公司产品（批号 15630-106）；Dual-Luciferase Assay System 为 Promega 公司产品，柱离心式胶回收试剂盒购自上海申能博彩公司；NaCl、异丙醇、无水乙醇、氯仿等其他试剂都为国产分析纯。

实验动物：SD 大鼠，SPF 级，4 周龄，体质量 100~120 g，由南京军区总医院实验动物中心提供。许可证号为 SLXK（苏）2003-0004。

细胞培养试剂：MSCs 细胞由大鼠骨髓中提取、培养、纯化。DMEM 培养基为 Hyclone 公司产品（批号 SH30022.01B），胎牛血清为 Hyclone 公司产品（批号 SV30087.02）；L-谷氨酰胺、胰蛋白酶、青链霉素混合液购自南京基天公司。

1.2 MSCs 细胞的分离、扩增与鉴定^[4]

将大鼠股、胫骨骨髓冲出，重悬于 1.073 g/mL Percoll 液中，900 r/min 离心 30 min，计数细胞，按 $1 \times 10^6/\text{cm}^2$ 密度接种，37 °C、5%饱和湿度的 CO₂ 孵箱培养，培养液为含 10% FBS 的 L-DMEM。培养至 III 代 MSCs，做 Brdu、CD44 免疫组化及免疫双重染色鉴定 MSCs。将 MSCs 以 $1 \times 10^6/\text{cm}^2$ 密度接种至 24 孔板，做细胞转染。

1.3 磷酸钙共沉淀法转染 MSCs 细胞^[4]

III 代 MSCs 以 $1 \times 10^6/\text{cm}^2$ 密度接种于 24 孔板，培养 24~48 h 后磷酸钙共沉淀法进行转染。磷酸钙 DNA 沉淀复合物的制备：每孔总质粒 2 μg（质量浓度为 1 μg/μL），加入 2 mol/L CaCl₂ 6.25 μL，去离子水定容 50 μL，将制备好的上述溶液逐滴加至 50 mL HBS 离心管中，温育 15~30 min，把 DNA 复合物逐滴加到细胞上，加 0.5 mL 培液。转染 18~24 h 换液加药处理。转染质粒比例为：PGL3-basic（1.5 μg）+ pRL（0.5 μg）、PGL3-Id1（1.5 μg）+ pRL（0.5 μg）。

1.4 Id1 活性和 PTE 作用的检测

III 代 MSCs 细胞以 $1 \times 10^6/\text{cm}^2$ 密度接种于 24 孔板，分别转染 PGL3-basic（1.5 μg）+ pRL（0.5 μg）和 PGL3-Id1（1.5 μg）+ pRL（0.5 μg）。细胞转染后，Id1 组加入 30 μg/mL PTE 作用 36 h，其余各组

正常培养 36 h，每组设 3 个复孔，收集细胞，荧光素酶报告基因检测 Id1 启动子的活性。

1.5 确定药物有效作用时间

转染 Id1 的 MSCs 细胞，0、3、30 μg/mL PTE 分别作用于 MSCs 细胞 12、24、36 h，每组设 3 个复孔，收集细胞，荧光素酶报告基因检测 Id1 启动子的活性。

1.6 检测不同剂量 PTE 的作用

0、1、3、30、100 μg/mL PTE 分别作用于转染 Id1 的 MSCs 细胞 36 h，每组设 3 个复孔，药物作用 36 h 后，收集细胞分别用荧光素酶报告基因、Western blotting 和 RT-PCR 检测 Id1 的活性。

1.7 荧光素酶报告基因检测

参照 Promega 公司荧光素酶检测系统技术手册操作，技术手册号码：TB281（英文版）、CTB281（中文版）。

1.8 逆转录 PCR

扩增条件：95 °C 5 min，（94 °C 30 s，60 °C 50 s，72 °C 30 s）23 个循环，72 °C 3 min，4 °C 保持。扩增产物经过 1%琼脂糖凝胶电泳，结果应用 UV 成像系统拍照。

表 1 RT-PCR 引物序列及产物长度

Table 1 Primer sequences and product length for RT-PCR

基因	引物序列	产物长度/bp
GADPH	Forward: 5' AACGACCCCTTCATTGAC 3'	1 307
	Reverse: 5' TCCACGACATACTCAGCAC 3'	
Id1	Forward: 5' CAGGACGGCGGGCGAAGTGGTG 3'	924
	Reverse: 5' AAGATGCGGTCTGCTCGGTGGAACA 3'	

1.9 Western blotting

0、1、3、30、100 μg/mL PTE 分别作用于转染 Id1 的 MSCs 细胞 36 h，每组设 3 个复孔，药物作用 36 h 后，分别提取细胞蛋白，5% SDS-PAGE 变性电泳后，转移到 PVDF 膜，牛奶封闭 2 h，洗膜后加入兔抗 Id1 抗体（一抗，1：1 000 稀释），室温 37 °C 孵育 1 h，洗膜，加入 HRP 偶联的羊抗兔 IgG 抗体（二抗，1：5 000 稀释），37 °C 孵育 2 h 后洗膜，化学发光试剂盒显色。

2 结果

2.1 PTE 对 PGL3-Id1 启动子活性的影响。

PGL3-Id1 组 Id1 活性明显高于 PGL3-basic 组，PTE 组活性最高，见图 1。

2.2 不同剂量 PTE 分别作用不同时间对 PGL3-Id1 启动子活性的影响。

PTE 作用早期 (12、24 h), 不同剂量的 PTE 对 Id1 启动子的表达无明显的影响; 药物作用 36 h 时, 30、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PTE 对 Id1 启动子的表达有不同程度的促进作用, 呈现剂量相关性增高。见图 2。

2.3 荧光素酶报告基因检测不同剂量 PTE 作用 36 h 对 PGL3-Id1 启动子活性的影响。

随 PTE 剂量的增加, Id1 的表达水平逐渐增高。见图 3。

2.4 RT-PCR 检测不同剂量 PTE 作用 36 h 对 Id1 蛋白表达的影响。

随 PTE 剂量的增加, Id1 蛋白表达水平逐渐增强。见图 4。

2.5 Western blotting 检测不同剂量 PTE 作用 36 h 对 Id1 蛋白表达的影响。

随 PTE 剂量的增加, Id1 蛋白表达水平逐渐增强。见图 5。

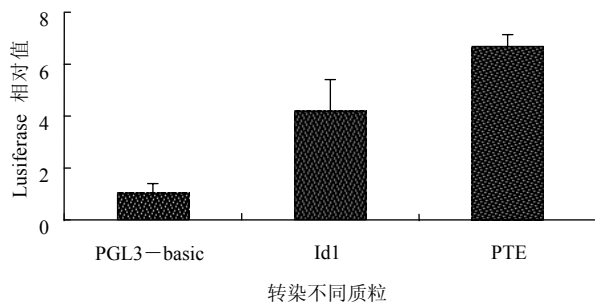


图 1 不同质粒转染 MSCs 细胞
Fig. 1 Different plasmids transfected MSCs

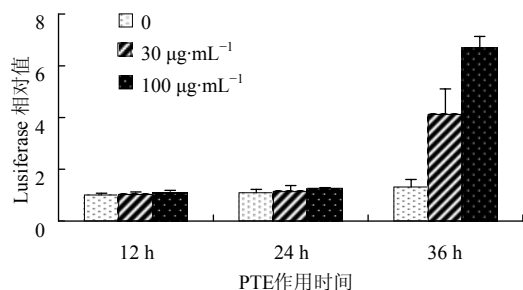


图 2 不同时间点 PTE 对 Id1 启动子活性的影响
Fig. 2 Effects of PTE on activity of Id1 promotor in different time points

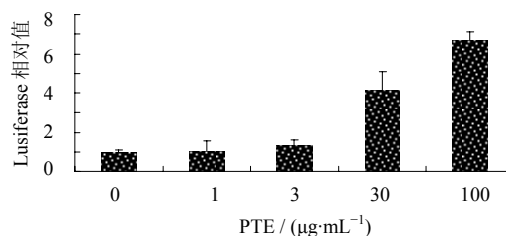


图 3 荧光素酶报告基因检测不同剂量的 PTE 对 Id1 活性的影响

Fig. 3 Effects of PTE with different doses on activity of Id1 by luciferase reporter gene

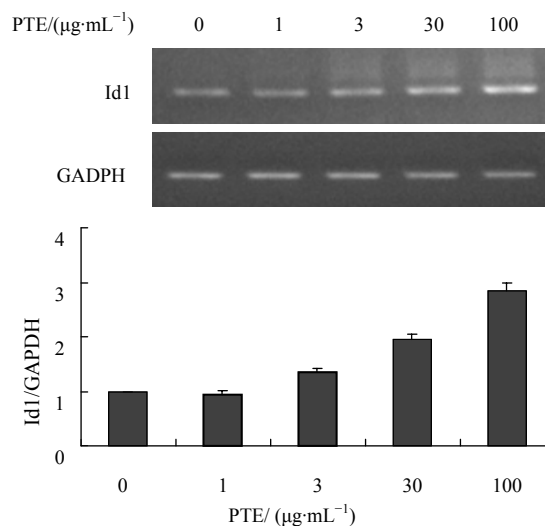


图 4 RT-PCR 检测不同剂量的 PTE 对 Id1 活性的影响
Fig. 4 Effects of PTE with different doses on activity of Id1 by RT-PCR

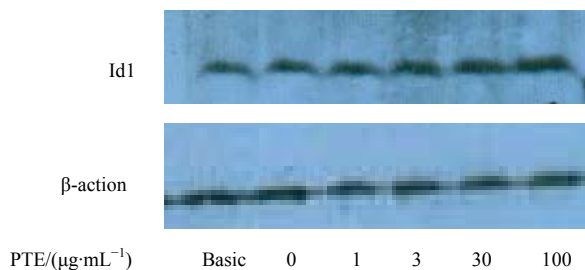


图 5 Western blotting 检测不同剂量 PTE 对 Id1 活性的影响

Fig. 5 Effects of PTE with different doses on activity of Id1 by Western blotting

3 讨论

中医学认为, 肾为“先天之本”、“主发育, 主骨, 生髓”, 直接关系着机体的强弱, 并调控机体的生长、发育和生殖。因此, 人体的生长发育和肾在生理和病理上都有密切关系, 临床上广泛应用补肾方药来治疗一切先天和后天不足的相关疾病。

龟板是龟的腹甲, 《中药学》记载其性甘、咸、寒, 归肝、肾、心经, 有滋阴潜阳、益肾健骨、固经止血、养血补心之功效, 在补肾中药中应用广泛。《日用本草》讲其“治腰膝酸软, 不能久立”, 《本草蒙筌》言其“专补阴衰, 善滋肾损”^[6]。

MSCs 是 Friendenstein 等^[7]在骨髓贴壁细胞中发现的, 能产生表现型和基因型与自己完全相同的子细胞, 在一定的诱导条件下可以向多种不同类型的细胞转化, 因而具有广泛的应用前景。但 MSCs 在骨髓中数量较少, 传代培养时易衰老和凋亡, 其应用受到了一定的限制。

本课题组在对龟板和 MSCs 的研究中发现, 龟板能促进移植入脊髓损伤模型大鼠体内的 MSCs 的存活和增殖^[8], 龟板含药血清和龟板组分及配伍可以浓度相关地促进 MSCs 的增殖^[9-10], 龟板成分脂肪酸和脂肪酸甲酯对 MSCs 有增殖作用^[11-12]。进一步的研究发现, 龟板提取物通过 BMP4 信号通路抑制 MSCs 的分化^[13]。

目前认为, 真核生物细胞分化都与降低其细胞增殖相关联。Id1 蛋白作为分化抑制蛋白不仅抑制细胞分化, 还参与到细胞周期的调控中, 促进细胞增殖。有研究表明, Id1 基因表达受 BMP-2/4/7 等多种信号传导途径调控^[2, 14]。

本实验在前期实验的基础上, 研究龟板提取物对 Id1 蛋白的影响, 从而推断龟板提取物促 MSCs 增殖的调控机制。实验结果表明, 转染 Id1 启动子的 MSCs 中 Id1 高表达, 加入龟板提取物后, Id1 的表达进一步增高(图 1), 说明龟板提取物促进了骨髓间充质干细胞中 Id1 的表达。为了进一步确定龟板提取物对 Id1 的影响作用, 选取了早期(12 h)、中期(24 h)、晚期(36 h) 3 个时间点, 发现龟板早期对 Id1 的影响作用较小, 作用时间越长, 龟板对 Id1 的影响作用越明显(图 2)。作为调控增殖分化的蛋白, Id1 的表达增强, 反映了细胞的增殖, 这也与本课题组的早期研究相呼应^[9-13]。选取 36 h 时间点, 荧光素酶报告基因系统、RT-PCR 和 Western blotting 均显示: 小剂量时, 龟板提取物对 Id1 的表

达作用不明显; 随着剂量的增大, 对 Id1 的促进作用也越来越明显(图 3~5)。Id1 蛋白的表达, 促进了细胞的增殖^[15], 对维持骨髓间充质干细胞的活性起到了一定的作用。

中医中药是传承下来的优秀的文化遗产, 在某些疾病尤其是疑难杂症的诊疗中显示出了较显著的疗效。中医的诊疗体系不同于西医, 中医体系建立在整体观念和辨证论治基础上, 本身缺乏形态学的支撑, 加之其理论多以文言文的形式保存, 较为晦涩难懂, 其应用也因不同医者领悟不同而有所差异, 因此其发展受到了很大的限制^[16-17]。在新时代背景下如何与国际接轨也成为考验中医中药发展的重要问题。本实验在中医理论的指导下, 运用现代技术方法研究中药的药理作用, 为中医中药的发展提供新的理论支撑。

参考文献

- [1] Otoole P J, Inoue T, Emerson L, *et al.* Id proteins negatively regulate basic helix-loop-helix transcription factor function by disrupting subnuclear compartmentalization [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(46): 45770-45776.
- [2] Yokota Y, Mori S. Role of Id family proteins in growth control [J]. *J Cell Physiol*, 2002, 190(1): 21-28.
- [3] Chen D F, Du S H, Zhang H L, *et al.* Autocrine BMP4 signaling involves effect of cholesterol myristate on proliferation of mesenchymal stem cells [J]. *Steroids*, 2009(12): 1066-1072.
- [4] 张海玲, 叶茂盛, 郑二来, 等. Id1 启动子的构建及其在不同细胞系中的表达 [J]. 解剖学研究, 2011, 33(4): 285-289.
- [5] 宋述财, 许 华, 周健洪, 等. 龟甲提取物对骨髓间充质干细胞增殖过程中核受体的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2006, 23(2): 95-99.
- [6] 高学敏. 中药学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2011: 480-481.
- [7] Friedenstein A J, Chailakhyan R K, Gerasimov U V. Bone marrow osteogenic stem cells: *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers [J]. *Cell Tissue Kinet*, 1987, 20(3): 263-267.
- [8] 陈东风, 黎 晖, 杜少辉, 等. 龟板对植入大鼠损伤脊髓内骨髓间充质干细胞分化为神经元的影响 [J]. 神经解剖学杂志, 2006, 22(2): 233-237.
- [9] 周健洪, 陈东风, 黎 晖, 等. 龟板含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞体外增殖的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2005, 22(1): 35-38.
- [10] 周健洪, 曾和平, 陈东风, 等. 龟板组份及配伍对体外培养骨髓间充质干细胞增殖的影响 [J]. 中药材, 2006,

- 29(3): 452-455.
- [11] 张越华, 曾和平, 陈东风. 龟板脂肪酸调控鼠骨髓间充质干细胞增殖作用 [J]. 生物工程学报, 2007, 6(4): 1029-1032.
- [12] 张越华, 曾和平, 陈东风. 脂肪酸甲酯调控骨髓间充质干细胞增殖作用的研究 [J]. 分析化学, 2007, 10(5): 1400-1404.
- [13] Chen D F, Du S H, Zhang H L, *et al.* Autocrine BMP4 signaling involves effect of cholesterol myristate on proliferation of mesenchymal stem cells [J]. *Steroids*, 2009, 74: 1066-1072.
- [14] Kee B L, Rivera R R, Murre C. Id3 inhibits B lymphocyte progenitor growth and survival in response to TGF [J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(3): 242-247.
- [15] Chen D F, Zhang H L, Du S H, *et al.* Cholesterol myristate suppresses the apoptosis of mesenchymal stem cells via upregulation of inhibitor of differentiation [J]. *Steroids*, 2010, 75: 1119-1126.
- [16] 钱学森. 论人体科学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 1988.
- [17] 李政重. 中医形上之思 [J]. 中医药通报, 2006, 5(5): 1-5.