

- 及其制剂的研究进展 [J]. 河南中医学院学报, 2004, 19 (3): 84-86.
- [2] 刘芬, 刘洁, 陈霞, 等. 氧化苦参碱的抗炎作用及其机制 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2005, 31(5): 728-730.
- [3] 陈霞, 李英骥, 张文杰, 等. 氧化苦参碱对豚鼠心肌细胞钠电流的影响 [J]. 白求恩医科大学学报, 2001, 27(1): 41-43.
- [4] Hemmings H C J. Neuroprotection by Na^+ channel blockade [J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2004, 16(1): 100-101.
- [5] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [6] Miljkovic-Lolic M, Silbergleit R, Fiskum G, et al. Neuroprotective effects of hyperbaric oxygen treatment in experimental focal cerebral ischemia are associated with reduced brain leukocyte myeloperoxidase activity [J]. *Brain Res*, 2003, 971(1): 90-94.
- [7] Batone F C, Hillegass L M, Price W J, et al. Polymorphonuclear leukocyte infiltration into cerebral focal ischemic tissue: myeloperoxidase activity assay and histologic verification [J]. *J Neuros Res*, 1991, 29: 336-345.
- [8] Kinoshita Y, Ueyama T, Senba E T, et al. Expression of *c-fos*, heat shock protein 70, neurotrophins, and cyclooxygenase-2 mRNA in response to focal cerebral ischemia/reperfusion in rats and their modification by magnesium sulfate [J]. *Neurotrauma*, 2001, 18(4): 435-445.

桂皮醛对小鼠成纤维细胞瘤 NIH3T3 细胞碱性成纤维细胞生长因子及转化生长因子 β_1 表达的影响

赵京霞^{1,2}, 李萍^{1*}, 张玮^{1,2}, 黄启福², 刘欣¹, 盛巡¹

(1. 北京市中医研究所, 北京 100010; 2. 北京中医药大学 病理教研室, 北京 100029)

摘要:目的 研究桂皮醛刺激小鼠成纤维细胞瘤 NIH3T3 细胞后碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 及转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 蛋白在不同时相点表达的规律, 探讨桂皮醛促进成纤维细胞增殖及胶原合成的机制。方法 采用 MTT 法观察不同质量浓度桂皮醛对 NIH3T3 细胞增殖的影响; 利用羟脯氨酸 (Hyp) 测试法测定细胞上清中胶原水平; 利用免疫细胞化学技术检测桂皮醛对 NIH3T3 细胞 bFGF、TGF- β_1 蛋白表达的影响。结果 桂皮醛作用 NIH3T3 细胞 48 h 后, 细胞增殖速度和细胞上清中的胶原量均较对照组明显增加。桂皮醛刺激后, bFGF 和 TGF- β_1 蛋白表达增加, 其中 bFGF 蛋白表达高峰在 18 h, TGF- β_1 蛋白在刺激后 12 h 达到峰值。结论 桂皮醛可以上调内源性生长因子 bFGF、TGF- β_1 蛋白的表达, 这可能是桂皮醛体外促进 NIH3T3 细胞增殖及胶原合成, 以及在创伤愈合、组织修复方面发挥作用的分子生物学机制。

关键词: 桂皮醛; 创伤愈合; bFGF; TGF- β_1

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)04-0582-03

创伤修复的现代概念认为, 创伤修复是由多种细胞、生长因子和细胞外基质相互作用的动态过程^[1]。在创伤愈合过程中, 由修复细胞自分泌和旁分泌的多种生长因子起着重要的调控作用。创伤愈合的基本病理生理过程均是由生长因子参与和调控的。在慢性皮肤溃疡时, 成纤维细胞增殖障碍以及细胞外基质生长减少可能与生长因子及其相关因素发生异常改变 (或其本身的量、活性降低, 或其受体及所涉及的信号转导途径出现异常) 有关。桂皮醛是肉桂的主要有效成分, 肉桂是回阳生肌类中药的代表药, 其在治疗慢性皮肤溃疡愈合方面具有重要的作用。本实验以小鼠成纤维细胞瘤 NIH3T3 细胞为模型, 观察桂皮醛对 NIH3T3 细胞增殖及胶原合成的影响, 并采用免疫细胞化学技术探讨桂皮醛刺激

后 NIH3T3 细胞内源性生长因子碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 蛋白的表达规律, 进一步阐明桂皮醛促进成纤维细胞增殖及胶原合成的机制, 为中药促进创伤愈合的机制提供分子水平依据。

1 材料

1.1 主要试剂和仪器: DMEM 培养基 (Gibco); 胎牛血清 (天津 TBD); 胰蛋白酶 (北京中杉金桥生物技术有限公司); 磷酸盐缓冲液 (福州迈新生物技术开发有限公司); MTT (Sigma); 羟脯氨酸 (Hyp) 测试盒 (南京建成生物工程研究所); 甲醇、丙酮 (分析纯, 北京化学试剂公司); Triton X-100 (Sigma); 兔抗碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 多克隆抗体、兔抗转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 多克隆抗体

收稿日期: 2007-06-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30472258)

作者简介: 赵京霞 (1981—), 女, 硕士, 研究实习员, 主要从事中医药治疗皮外科常见病的机制研究。

* 通讯作者 李萍 Tel: (010) 52176679 E-mail: liping411@yahoo.com.cn

(北京中杉金桥生物技术有限公司);即用型快速免疫组化 Max Vision™ 试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司);DAB 显色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司);SA1000 酶标仪为奥地利 Digiscan;紫外分光光度计(美国 Beckman);BX51 多功能显微镜(Olympus);Image-pro plus 5.0 图像分析软件。

1.2 药物:桂皮醛对照品由中国药品生物制品检定所提供。

1.3 细胞:小鼠成纤维细胞瘤细胞株 NIH3T3 购于中国协和医科大学细胞中心。

2 方法

2.1 细胞增殖的检测:将 NIH3T3 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养基调整细胞浓度至 2×10^4 /mL,接种至 96 孔培养板,每孔 100 μ L。5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中培养 24 h 后,加入无血清 DMEM 稀释的桂皮醛,桂皮醛终质量浓度为 5 600、1 400、350、88、22、5.5、1.4、0.35、0.088 ng/mL,每个质量浓度设 5 个复孔,培养 24 h 后,加入 MTT,每孔 20 μ L。在 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中继续培养 4 h 后,加入 100 μ L DMSO,轻轻振荡 10 min 后,用酶标仪在 570 nm 波长下,测吸光度(A)值。实验重复 3 次。

2.2 细胞胶原合成的测定:将 NIH3T3 细胞以 1×10^4 /mL 接种于 24 孔培养板内,每孔 1 mL。接种 24 h 后更换培养基,对照组培养液更换为无血清 DMEM,桂皮醛组加入无血清 DMEM 稀释的桂皮醛,终质量浓度同 2.1 项。每个质量浓度设 5 个复孔,实验重复 2 次。加药 48 h 后,每孔吸取 0.5 mL 细胞上清液,按细胞培养上清液 Hyp 测试盒的检测步骤进行操作(以 5 g/mL Hyp 液作为标准管,以蒸馏水作为空白管),取 1 cm 光径在 550 nm 处,测得各管液体 A 值。计算 Hyp 及胶原质量浓度[各管中 Hyp 质量浓度(g/mL)=(测定管 A 值-空白管 A 值)/(标准管 A 值-空白管 A 值)×标准管质量浓度(5 g/mL)×稀释倍数;各管中胶原质量浓度(g/mL)=Hyp 质量浓度×7.46×稀释倍数(7.46 是从 HyP 换算为胶原时的计算常数)]。

2.3 细胞中 bFGF、TGF- β_1 免疫细胞化学检测:实验前 NIH3T3 细胞用 0.125% 胰蛋白酶消化,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基吹打成细胞悬液,以 5×10^4 个/孔的密度接种于预先放有消毒盖玻片的 12 孔培养板内,置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中孵育 24 h 后,换用无血清 DMEM 培养基继续培养

24 h。桂皮醛组加入无血清培养基稀释的药物(增殖筛选的有效质量浓度为 5.5 ng/mL),细胞对照组为相应的无血清 DMEM 培养基。分别在加药后 0、6、12、18、24 h 固定细胞以检测药物对 bFGF 表达的影响,在加药后 0、6、12、18 h 固定细胞检测对 TGF- β_1 表达的影响。实验设立阴性对照,不加一抗。免疫组化玻片采用 IPP 图像分析系统进行半定量分析,每组 5 张玻片,每张玻片上随机选取 3 个视野,各指标以平均吸光度(A)表示。

2.4 统计学处理:所得数据均采用 SPSS 10.0 软件进行单因素方差分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 桂皮醛对 NIH3T3 细胞增殖的作用:见表 1。桂皮醛质量浓度大于 350 ng/mL 时对 NIH3T3 细胞的生长具有一定的抑制作用;在 88~0.088 ng/mL 对 NIH3T3 细胞具有促增殖作用,与细胞对照组比较差异显著($P < 0.05, 0.01$)。其中桂皮醛终质量浓度为 5.5 ng/mL 时,促增殖作用最显著。

表 1 桂皮醛对 NIH3T3 细胞增殖和胶原合成的影响
($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Effects of cinnamyl aldehyde on proliferation and collagen synthesis of NIH3T3 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	ρ /(ng·mL ⁻¹)	细胞增殖(A值)	胶原水平/(g·mL ⁻¹)
对照	0	0.611 3±0.011 7	5.985 0±0.563 3
桂皮醛	5 600	0.459 4±0.012 4**	2.983 0±0.213 5**
	1 400	0.548 2±0.016 5*	4.193 0±0.264 2**
	350	0.629 2±0.011 5	5.744 0±0.322 8
	88	0.655 8±0.021 1	6.946 0±0.212 4*
	22	0.691 4±0.012 4*	7.362 0±0.225 4**
	5.5	0.704 0±0.016 0**	7.422 0±0.161 9*
	1.4	0.676 8±0.039 4**	6.944 0±0.175 6**
	0.35	0.656 2±0.038 8*	7.123 0±0.163 8*
	0.088	0.664 8±0.032 6*	6.239 0±0.448 7

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3.2 桂皮醛对 NIH3T3 细胞胶原合成的影响:见表 1。桂皮醛质量浓度大于 350 ng/mL 时对 NIH3T3 细胞的胶原合成功能有抑制作用;在 88~0.088 ng/mL 可以促进 NIH3T3 细胞合成胶原的能力。其中桂皮醛终质量浓度为 22、5.5 ng/mL 时,其促进胶原合成的作用最显著,两质量浓度相比无明显差异。

3.3 桂皮醛对 NIH3T3 细胞 bFGF、TGF- β_1 蛋白表达的影响:免疫细胞化学染色 bFGF 蛋白主要为胞浆表达,阳性细胞胞浆内有棕黄色颗粒,结果见表 2。NIH3T3 细胞经血清饥饿后,细胞中存在一定量 TGF- β_1 蛋白的表达,阳性信号主要分布在胞浆,呈

棕黄色,结果见表3。桂皮醛刺激后 bFGF、TGF- β_1 蛋白表达高峰分别在 18、12 h。

表2 桂皮醛对 NIH3T3 细胞 bFGF 蛋白表达的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 2 Effects of cinnamyl aldehyde on expression of bFGF protein of NIH3T3 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	bFGF 表达 (A) 值				
	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h
对照	0.155 $\pm$ 0.011	0.155 $\pm$ 0.012	0.161 $\pm$ 0.013	0.158 $\pm$ 0.014	0.158 $\pm$ 0.015
桂皮醛	0.154 $\pm$ 0.014	0.159 $\pm$ 0.013	0.206 $\pm$ 0.018**	0.262 $\pm$ 0.016**	0.170 $\pm$ 0.020*

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

表3 桂皮醛对 NIH3T3 细胞 TGF- β_1 蛋白表达的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 3 Effects of cinnamyl aldehyde on expression of TGF- β_1 protein of NIH3T3 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	TGF- β_1 表达 (A) 值			
	0 h	6 h	12 h	18 h
对照	0.180 $\pm$ 0.012	0.184 $\pm$ 0.013	0.185 $\pm$ 0.013	0.182 $\pm$ 0.011
桂皮醛	0.179 $\pm$ 0.011	0.188 $\pm$ 0.014	0.298 $\pm$ 0.017**	0.194 $\pm$ 0.016*

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

4 讨论

创面愈合的关键之一是修复细胞的增殖。细胞的增殖受多种环境因素的影响,其中最重要的已知因素为生长因子。生长因子调控细胞分裂增殖与细胞周期的 G₀期和 G₁期有关。

bFGF 属于感应态因子,其作用是刺激休止态细胞积累一定物质或能力,使细胞越过限制点而进入细胞周期^[2]。bFGF 是 FGFs 家族中最重要的成员,其受体是酪氨酸激酶型^[3]。bFGF 与其受体结合后,主要通过激发细胞内 cAMP-蛋白激酶 A 和/或二酰甘油-IP₃(1, 4, 5-三磷酸肌醇)-蛋白激酶-C 途径发挥其生物学效应^[4]。它可以刺激内皮细胞、平滑肌细胞及成纤维细胞增殖和移行,促进胶原等胞外基质合成,诱导血管新生和肉芽组织形成。

TGF- β 是经双硫键联结的具有多种生理功能的多肽,有 5 种异构体,哺乳动物只表达其中 3 种,即 TGF- β_1 、TGF- β_2 和 TGF- β_3 。它们的氨基酸序列高度保守,生物学活性相似,具有极高的同源性。TGF- β 能促进成纤维细胞合成和分泌胶原等 ECM 分子,加速创面的愈合^[5]。TGF- β_1 能促进上皮细胞分化增殖,刺激上皮细胞的运动,诱导纤维连结蛋白(FN)的产生。TGF- β 与受体结合后其信号通过丝氨酸-苏氨酸激酶途径传递^[6]。

本实验结果显示桂皮醛在 88~0.088 ng/mL 内对 NIH3T3 细胞增殖及胶原合成均具有促进作用。当桂皮醛质量浓度为 5.5 ng/mL 时,作用最显著。在此质量浓度下,应用桂皮醛刺激 NIH3T3 细胞后,bFGF、TGF- β_1 蛋白表达均显著增加,其中桂皮醛刺激 NIH3T3 细胞 bFGF 蛋白表达的高峰在 18 h,TGF- β_1 蛋白在刺激 12 h 时达峰值。实验中还发现,桂皮醛能上调 NIH3T3 细胞 C-Fos 的表达。C-Fos 激活后,可通过 C-Fos 与 C-Jun 的活化进一步上调 bFGF 与 TGF- β 基因,进而通过 bFGF 与 TGF- β 蛋白引起一系列修复效应^[7]。本实验中 bFGF、TGF- β_1 蛋白表达较 C-Fos 表达存在时间上的滞后,可能就是 C-Fos 表达的后继效应,或许 C-Fos 与 bFGF、TGF- β_1 蛋白的表达是源于不同的信号转导途径。

以上实验结果明确了桂皮醛对成纤维细胞增殖和胶原合成的正向调控作用。进一步研究发现在细胞增殖和胶原合成增加的同时,内源性生长因子 bFGF、TGF- β_1 的表达也同期增高,表明桂皮醛对成纤维细胞的作用是通过以上的生物学效应来实现的。这可能是肉桂促进慢性皮肤溃疡愈合的重要机制之一。但由于细胞生物信号转导的复杂性,桂皮醛通过何种信号途径来调控 bFGF、TGF- β_1 的表达、桂皮醛具体的作用靶点以及 bFGF、TGF- β_1 的表达后又通过何种机制来调控细胞增殖及胶原合成尚不清楚,需要进一步深入探讨。

参考文献:

- [1] 蒋伟,王正国,赖西南,等. 碱性成纤维细胞生长因子在 P 物质诱导肉芽组织成纤维细胞增殖中的作用 [J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(4): 283-286.
- [2] 王林扬,高尚璞,刘晓娟,等. 复黄生肌愈创油膏对大鼠慢性皮肤溃疡模型 bFGF、EGFmRNA 表达的影响 [J]. 中医药学刊, 2005, 23(3): 431-433.
- [3] Ford M D, Cauch J, Greferath U, et al. Expression of fibroblast growth factors and their receptors in rat glomeruli [J]. *Kidney Int*, 1997, 51(6): 1792.
- [4] Tang T L, Freeman R M J, O'Reilly A M, et al. The SH2-containing protein-tyrosine phosphatase SH-PTP2 is required upstream of MAP kinase for early Xenopus development [J]. *Cell*, 1995, 80(3): 473.
- [5] 武继祥,陈德英,吴宗耀. 增生性瘢痕中 TGF- β 和胶原酶、TIMP1mRNA 表达的定量研究 [J]. 中华整形外科杂志, 2000, 16(1): 34-36.
- [6] Dijke P, Miyazono K, Heldin C H. Signaling via heterooligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1996, 8(2): 139.
- [7] 付小兵,杨银辉,孙同柱,等. 两种原癌基因激活对肺内源性 bFGF 和 TGF- β 表达的影响以及肺损伤修复关系的研究 [J]. 创伤外科杂志, 2000, 2(2): 89-92.