

复方扶芳藤合剂含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞 Notch 信号通路的影响

张颖,周倍伊*

(广西中医药大学方剂教研室,南宁 530001)

[摘要] **目的:**观察复方扶芳藤合剂含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)Notch 信号通路的影响。**方法:**采用全骨髓贴壁法分离纯化培养大鼠骨髓间充质干细胞;制备复方扶芳藤合剂含药血清,将 30 只 SD 大鼠随机分为 2 组,每组随机 15 只,分别为 ig 复方扶芳藤合剂 $2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ig 的药物干预组和生理盐水 $2\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ig 的阴性对照组。取 10% 的含药血清及阴性对照组血清分别干预大鼠 BMSCs,采用 RT-PCR 方法检测 Notch1, Jagged1, Hes1 mRNA 表达变化;采用免疫细胞化学法检测 Notch1, Jagged1 表达变化。**结果:**RT-PCR 显示药物干预组 Notch1, Jagged1, Hes1 的 mRNA 表达水平均高于阴性对照组($P < 0.05$),免疫细胞化学显示药物干预组 Notch1, Jagged1 蛋白表达均高于阴性对照组($P < 0.05$),差异有统计学意义。**结论:**复方扶芳藤合剂含药血清可以引起大鼠 BMSCs Notch 信号通路上的关键基因和蛋白表达上调,激活 Notch 信号通路。

[关键词] 复方扶芳藤合剂;骨髓间充质干细胞;Notch 信号通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0206-05

[doi] 10.11653/syjf2013180206

Effect of Compound Fufangteng Mixture on Bone Marrow Hematopoietic Stem Cells Notch Signal Pathway in Rats

ZHANG Ying, ZHOU Bei-yi*

(Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of compound Fufangteng mixture medicated serum on bone marrow hematopoietic stem cells (BMSCs) Notch signal pathway in rats. **Method:** The whole bone marrow adherent method was used to isolate, culture and purify the BMSCs *in vitro*. A total of 30 rats was randomly divided into 2 groups, 15 each group, and compound Fufangteng mixture $2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ was given by gavage to the rats as drug intervention group, while physiological saline $2\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ was given as negative control group. The 10% medicine serum and negative control serum were intervene to BMSCs. Then RT-PCR was used to detect the mRNA expression of Notch1, Jagged1 and Hes1 after intervention. And the immunofluorescence cytochemical method was used to detect the protein expression of Notch1 and Jagged1 after the intervention. **Result:** RT-PCR results showed that the mRNA expression of Notch1, Jagged1 and Hes1 in drug intervention group was higher than negative control group ($P < 0.05$). Immunofluorescence cytochemical method indicated that the protein expression of Notch1 and Jagged1 in drug intervention group was higher than that in negative control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Compound Fufangteng mixture containing serum can upregulate key genes of Notch signal pathway and protein expression, and activate Notch signal pathway.

[Key words] compound Fufangteng mixture; bone marrow hematopoietic stem cells; Notch signal pathway

[收稿日期] 20130412(020)

[基金项目] 广西自然科学基金项目(桂科自 0728174);广西中管局科研项目资助(GZKZ09-42)

[第一作者] 张颖,硕士研究生,从事方剂学专业研究,Tel:14795502030,E-mail:261559591@qq.com

[通讯作者] *周倍伊,博士,从事中药复方抗衰老机制研究,Tel:0771-3088082,E-mail:zhoubeiyi2000@yahoo.com.cn

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种位于骨髓中具有自我更新、分化增殖和多向分化潜能的干细胞^[1],在特定的微环境和适宜的细胞因子作用下可分化为骨、软骨、肌腱、肌肉、脂肪及神经元等多种组织细胞。许多实验均证明,这些多功能性的干细胞,在体外能够分化成为人体多种器官与组织的细胞,对损伤组织具有修复作用^[2],这使 MSCs 在各种退行性疾病治疗及创伤修复、组织或器官功能重建及抗衰老中发挥重要作用。Notch 信号通路广泛存在于各种动物细胞中,其能调控干细胞的增殖、分化^[3]。作者在前期的研究发现,具有益气补血,健脾养心的复方扶芳藤合剂对小鼠外周血干细胞有动员作用^[4],能促进大鼠骨髓间充质干细胞的增殖。复方扶芳藤合剂对这些干细胞的作用机制尚不清楚。通过研究 Notch 信号通路的几个关键基因和蛋白的表达,观察复方扶芳藤合剂对大鼠骨髓间充质干细胞 Notch 信号通路的影响。

1 材料

1.1 动物 4 周龄 SPF 级 SD 雄性大鼠,体重 40 ~ 50 g,用于骨髓间充质干细胞原代培养;3 月龄 SD 雄性大鼠,体重约 250 g,用于含药血清的制备;所用大鼠均由广西医科大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(桂)2011-0003。

1.2 药物、试剂 复方扶芳藤合剂(成分扶芳藤、黄芪、红参,广西中医药大学制药厂提供,国药准字 Z45021781);DMEM/Low glucose 培养基(美国 Hyclone),胎牛血清杭州天杭生物科技有限公司),胰蛋白酶-EDTA 消化液(美国 Solarbio),总 RNA 提取试剂盒(中国 Tialgen),cDNA 第一链合成试剂盒(中国 Tiangen), $2 \times Taq$ PCR Master Mix 试剂盒(中国 Tiangen),Notch1, Jagged1, hes1 引物(上海生物工程公司),内参 β -actin(美国 Invitrogen 公司),Notch1 抗体(美国 Santa,批号 ZS-6014);Jagged1 抗体(中国 Bioss,批号 BS-1448R);二抗试剂盒,批号 SP-9001;DAB 显色试剂盒,批号 ZLI-9031(中国中杉金桥公司)。

1.3 仪器 超净工作台(江苏南京医疗设备公司);CO₂ 细胞培养恒温箱(美国 Forma Scientific 公司);CKC-TR-2W 型倒置相差显微镜(日本奥林巴斯公司);血细胞计数板(上海安信光学仪器公司),PCR 扩增仪(美国 PE 公司),DY-W2 型电泳仪(北京生化仪器厂),PROTEAN nxi 电泳槽(瑞典 Pharmacia 公司),多功能暗箱式紫外透射仪(上海

顾村光电仪器厂)。

2 方法

2.1 复方扶芳藤合剂含药血清的制备 取 30 只 3 月龄 SPF 级 SD 雄性大鼠,体重约 250 g,根据随机数字表随机分为药物干预组和阴性对照组,每组 15 只。给药剂量按药理实验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算^[5],药物干预组大鼠用复方扶芳藤合剂 $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ig(按等效剂量 10 倍)。阴性对照组大鼠用生理盐水 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ig。两组大鼠 ig 1 次/d,连续 7 d,末次给药 1 h 后,水合氯醛腹腔麻醉,腹主动脉采血,离心收集血清, $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 灭活 30 min,过滤除菌, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冻存备用。

2.2 骨髓间充质干细胞的分离、培养、纯化 采用全骨髓细胞贴壁法,分离培养纯化骨髓间充质干细胞。取 4 周龄 SPF 级 SD 雄性大鼠,体重约 50 g,颈椎脱臼处死,75% 的乙醇消毒 10 min,无菌条件下分离大鼠股骨及胫骨,PBS 清洗 3 次。剪掉股骨和胫骨的骨骺端,露出骨髓腔,用添加青、链霉素的 L-DMEM 培养基冲出骨髓,反复吹打;将冲出的骨髓制成单细胞悬液, $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清,重悬以 $1 \times 10^9/\text{L}$ 的细胞密度接种于 25 cm^2 培养瓶中,置 $37 \text{ }^\circ\text{C}$,5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。24 h 后半量换液,48 h 后全量换液,此后每 3 d 全量换液一次。当细胞长至 80% ~ 90% 融合后传代,传代用 1 mL 胰蛋白酶-EDTA 消化约 1 min,加培养基终止消化,离心弃液后加培养基将细胞重新制成单细胞悬液,按 1:2 接种于 25 cm^2 培养瓶中。传至 3 代后,可得到较纯化的大鼠骨髓间充质干细胞。

2.3 RT-PCR 法检测 Notch1, Jagged1, hes1 基因的表达 提取经血清干预后的细胞总 RNA。所用引物根据其基因 bank 上所查序列自行设计,由上海生物工程公司合成。Notch1 引物上游:5'-GCTGT-CATCTCCGACTTCATCTATC-3',下游:5'-GTCTTT-GTTGGCTCCGTTCTTC-3';Jagged1 引物上游:5'-GT-GGCTTGGGCTGTGCTTGG-3',下游:5'-CGCACAT-TGTTGGTGGTGTGTC-3';Hes1 引物上游:5'-GCCAGTGCATGAACGAGGTG-3',下游:5'-TC-CCGCTGTTGCTGGTGTAG-3'。PCR 反应条件设为 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 3 min, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 1 min,共 30 个循环, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 5 min。取 $10 \mu\text{L}$ 扩增产物加样至含 2% 的琼脂糖凝胶中, 100 mV ,电泳 60 min,置凝胶扫描成像系统下观测结果并照相。

2.4 免疫细胞化学法检测 Notch1, Jagged1, hes1 蛋

白表达 取干预后的细胞爬片, PBS 清洗标本 3 次, 4% 多聚甲醛室温固定 10 min, 空气干燥 5 min, PBS 漂洗, 3 min × 3 次; 滴加 0.1% Triton X-100, 4 °C 孵育 10 min, PBS 漂洗, 3 min × 3 次; 滴加 3% H₂O₂ 去离子水, 37 °C 孵育 10 min, PBS 漂洗, 3 min × 3 次; 滴加 10% 正常山羊封闭血清, 室温孵育 10 min。将 10% 正常山羊封闭血清倾去, 勿洗。滴加一抗(兔抗大鼠 Notch1, Jagged1 多克隆抗体, 分别按 1:50, 1:100 比例稀释), 滴加免疫前血清分别按同样比例, 4 °C 孵育过夜; PBS 漂洗, 5 min × 3 次; 滴加二抗, 37 °C 孵育 30 min; PBS 漂洗, 5 min × 3 次; 滴加试剂 C(辣根酶标记链霉卵白素工作液), 37 °C 孵育 30 min; PBS 漂洗, 5 min × 3 次; DAB 显色, 苏木精复染, 过梯度乙醇, 二甲苯。50% 甘油封片, 在显微镜下观察并照相。

2.5 统计分析 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行统计学处理。数据经单因素方差分析得出, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 Notch1, Jagged1, hes1 基因表达的影响

RT-PCR 结果表明, 复方扶芳藤合剂 10% 含药血清组与阴性对照 10% 血清组相比, 复方扶芳藤合剂能明显促进 Notch1, Jagged1, Hes1 基因的表达, 两组对比有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1~3。

3.2 免疫细胞化学法检测 Notch1, Jagged1 蛋白表达

在复方扶芳藤合剂血清的干预下, 细胞核周围呈棕褐色, 呈阳性表达, 而阴性对照 10% 血清的干预下, 细胞核周围呈弱表达; 通过数据统计两组之间有显著差异 ($P < 0.05$)。见表 1 及图 4。

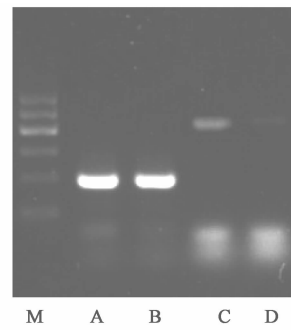


图 1 复方扶芳藤合剂 10% 含药血清对 BMSCs Notch1 表达的影响

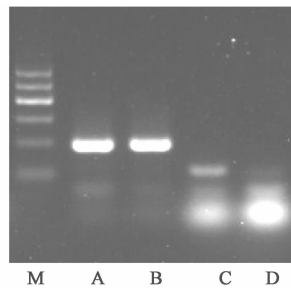


图 2 复方扶芳藤合剂 10% 含药血清对 BMSCs Jagged1 表达

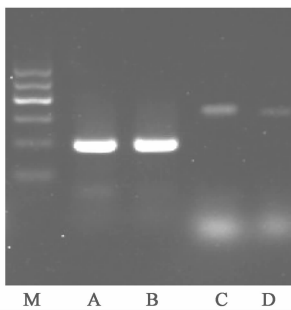


图 3 复方扶芳藤合剂 10% 含药血清对 BMSCs Hes1 的表达

表 1 复方扶芳藤合剂 10% 含药血清对 BMSCs Notch1, Jagged1, Hes1 基因及 Notch1, Jagged1 蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

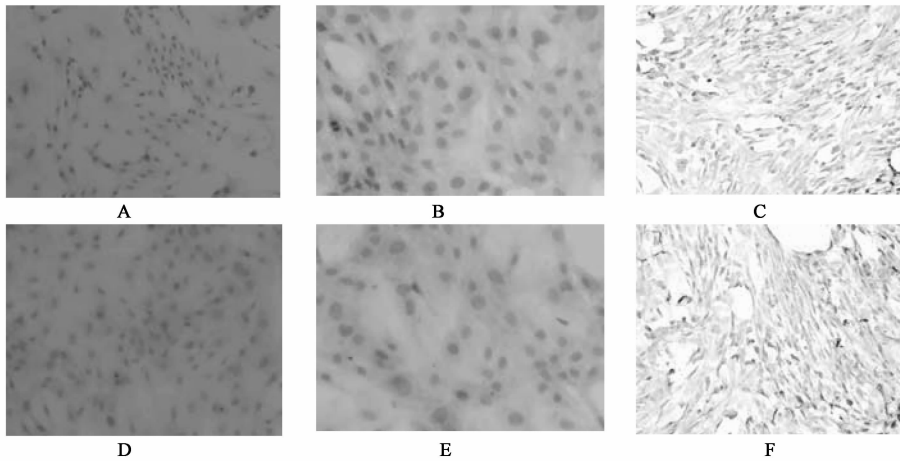
组别	基因相对表达			蛋白相对表达	
	Notch1	Jagged1	Hes1	Notch1	Jagged1
复方扶芳藤含药血清	2.382 ± 0.561 ¹⁾	5.995 ± 0.796 ¹⁾	6.104 ± 0.704 ¹⁾	0.2780 ± 0.009	0.286 ± 0.020
阴性血清	1.202 ± 0.889	2.050 ± 0.724	2.260 ± 0.968	0.111 ± 0.005	0.100 ± 0.016

注: 与阴性对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

Notch 信号通路广泛存在于脊椎和非脊椎动物中, 在进化上具有高度的保守性^[6]。Notch 受体通过与配体的相互作用传导细胞信号, 从而在细胞增殖发挥重要的调控作用^[7]。Notch 基因编码一种膜蛋白受体, 它的配体也是膜蛋白。已知哺乳动物有 4 种 Notch 受体 Notch1, Notch 2, Notch 3, Notch 4 和

5 种配体 Delta1, Delta3, Delta4, Jagged1, Jagged2, 但是有关 Delta-like3 与受体结合发挥功能的证据知之甚少。当 Notch 受体与邻近的细胞表面的配体 Delta1, Delta3, Jagged1, Jagged2, 相结合时, 通过“三步蛋白水解”^[8], 使其保内区被切割, 从细胞膜上脱离, 转运进入细胞核并与下游分子相互作用以传递 Notch 发挥生物学功能^[9]。Notch 信号通路进化保



A,D. 免疫前血清;B,E. 10% 阴性对照血清组;C,F. 复方扶芳藤合剂 10% 含药血清组

图4 复方扶芳藤合剂 10% 含药血清对 BMSCs Notch1 (A~C), Jagged1 (D~F) 蛋白表达的影响(免疫组化染色, ×400)

守而重要,一些复杂而高级程序如细胞的增殖、分化、存活和凋亡的正常运行正是基于正确的 Notch 信号转导,且其构成成分简单,可作为研究间充质干细胞作用机制的最佳出发点^[10-11]。Notch 下游的靶基因中,最具代表性的是 Hes 基因家族。Notch 信号通路的持续活化可上调 Hes1 基因的转录,从而抑制特异靶基因的转录^[12]。

复方中药复方扶芳藤合剂中扶芳藤行气活血,舒筋活络,主一切血,一切气,一切冷,大主风血,与人参、黄芪合用,共奏益气补血,健脾养心之功。方中人参、黄芪皆为扶正补虚之要药,其中人参大补元气,补脾益肺,生津止渴,安神增智;黄芪则善补气升阳,又能补脾肺之气,还可益卫固表,托毒生肌,利水退肿,二药同用,可增强补气功效,气旺则血生,使有形之血生于无形之气,气血旺盛,脏腑得以充养,则可益气补血,健脾养心。复方扶芳藤合剂常作为抗衰老保健药品,以及在临床上大剂量化疗和(或)放疗前后,被患者用作血细胞减少的辅助治疗^[14-17]。有研究表明中药人参中的有效成分人参皂苷 Rg₁ 和黄芪的有效成分黄芪甲苷均可促进骨髓间充质干细胞的体外增殖。人参皂苷 Rg₁ 可促进大鼠 MSCs 增殖的机制可能是通过上调 GATA1 和 GATA2 的表达以及其与 DNA 的结合活性来实现的。而黄芪甲苷此作用可能与其诱导骨髓间充质干细胞分泌 SCF 有关^[18-19]。我们在前期的研究发现,具有益气补血,健脾养心的复方扶芳藤合剂对小鼠外周血干细胞有动员作用,而且能促进大鼠骨髓间充质干细胞的增殖,但是复方扶芳藤合剂对这些干细胞的作用机制尚不清楚。因此本实验观察了复方扶芳藤合剂对大鼠骨髓间充质干细胞 Notch 信号通路的影响,

实验结果表明,经复方扶芳藤合剂干预后的大鼠骨髓间充质干细胞 Notch 信号通路中的受体 Notch1 基因、配体 Jagged1 基因、靶基因 Hes1 与阴性对照组相比,其表达均明显上调;通过免疫细胞化学方法检测受体 Notch1、配体 Jagged1 蛋白的表达均呈阳性。说明在复方扶芳藤合剂含药血清的干预下,大鼠骨髓间充质干细胞 Notch 信号通路被激活,作者推测这可能与促进大鼠骨髓间充质干细胞的增殖有关。我们还需做进一步的研究证明处于激活状态下的 Notch 信号通路,对大鼠骨髓间充质干细胞的调控更多的是趋于增殖还是分化? 该研究结果为复方扶芳藤合剂作为抗衰老保健药品,以及化疗和(或)放疗前后血细胞减少的辅助治疗提供理论支持。

[参考文献]

- [1] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143.
- [2] Minguell J J, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells[J]. Exp Biol Med (Maywood, NJ), 2001, 226(6): 507.
- [3] Andrew A Wilson, Darrell N Kotton. Another notch in stem cell biology: Drosophila intestinal stem cells and the specification of cell fates[J]. Bio Essays, 2008, 30(2): 107.
- [4] 张雨, 常军英, 周倍伊, 等. 复方扶芳藤合剂对小鼠外周血干细胞动员作用的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 212.
- [5] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 1103.
- [6] Kojika S, Griffin J D. Notch receptors and hematopoiesis[J]. Exp Hematol, 2001, 29(9): 1041.

左、右归丸对大鼠骨髓间充质干细胞骨向分化中 TGF- β_1 mRNA 的影响

宋囡¹, 何文智², 王智民³, 任艳玲^{1*}

(1. 辽宁中医药大学基础医学院, 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学药学院, 沈阳 110847;
3. 辽宁中医药大学第一临床学院, 沈阳 110847)

[摘要] 目的: 研究左、右归丸含药血清对骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)成骨分化的作用。方法: 将 28 只大鼠随机分为 4 组, 分别以左归丸(ZGW)、右归丸(YGW)、阳性对照药戊酸雌二醇片(estradiol valerate tablets, EVT)和蒸馏水给大鼠灌胃, 各组灌胃剂量分别为 18.9, 20.52 g·kg⁻¹, 0.36 mg·kg⁻¹, 1.0 mL·kg⁻¹, 日 2 次, 于第 4 天给药 2 h 后, 腹主动脉取血, 离心, 56 °C 水浴灭活 30 min 后, 大鼠含药血清制备完成。再配制 10% 各组含药血清的 α -MEM 分别加入诱导剂(YDJ)(10⁻⁷ mol·L⁻¹ 地塞米松、50 μ mol·L⁻¹ 维生素 C、10 mmol·L⁻¹ β -甘油磷酸钠)与单纯诱导剂组共 5 组对 BMSCs(1 × 10⁵/L)进行干预 9 d, 用 Western blot 法检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、I 型胶原(type I collagen, COL I)蛋白表达, 用 RT-PCR 法检测转化生长因子 β_1 (transforming growth factor beta 1, TGF- β_1) mRNA 表达。结果: Control 组比较: ZGW + YDJ 组、YGW + YDJ 组、EVT + YDJ 组均可促进 BMSCs 的 ALP, COL I 蛋白的表达, 上调 BMSCs TGF- β_1 mRNA 表达($P < 0.05$); 与 YDJ 组比较: ZGW + YDJ 组、YGW + YDJ 组可促进 BMSCs 的 ALP, COL I 蛋白的表达, 上调 BMSCs TGF- β_1 mRNA 表达($P < 0.05$); 且 ZGW + YDJ 组优于 YGW + YDJ 组($P < 0.05$)。结论: 左、右归丸含药血清能协同诱导剂促进 BMSCs 成骨分化, 且左归丸组更为有效, 表明中医“滋肾阴”对 BMSCs 的成骨诱导更为有效。

[关键词] 左归丸; 右归丸; 骨髓间充质干细胞; 碱性磷酸酶; I 型胶原; 转化生长因子 β_1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0210-05

[doi] 10.11653/syfy2013180210

[收稿日期] 20130131(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373527); 辽宁省教育厅创新团队项目(LT2010068); 辽宁省高等学校优秀人才支持计划(LR201025); 辽宁省科技厅自然科学基金项目计划(201102148)

[第一作者] 宋囡, 医师, 硕士, 在读博士, 从事中药理论及应用研究, Tel: 15104015589, E-mail: cpcool@126.com

[通讯作者] *任艳玲, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事方药配伍规律及作用机制的研究, Tel: 024-31207267, E-mail: yanlingren@tom.com

- [7] Artavanis-Tsakonas, Rand M D, Lake R J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development[J]. Science, 1999, 284(5415):770.
- [8] Weinmaster G. Notch signal transduction: a real Rip and more [J]. Pattern Formation and Developmental Mechanisms, 2000, 10(4):363.
- [9] Nam Y, Aster J C, Blacklow S C. Notch signaling as a therapeutic target[J]. Curr Opin Chem Biol, 2002, 6(4):501.
- [10] 陈晨, 张毅. Notch 信号通路与间充质干细胞分化[J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(2):510.
- [11] Han W, Yu Y, Liu X Y. Local signals in stem cell-based bone marrow regeneration [J]. Cell Res, 2006, 16(2):189.
- [12] Karlsson C, Jonsson M, Asp J, et al. Notch and HES5 are regulated during human cartilage differentiation[J]. Cell Tissue Res, 2007, 327(3):539.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部. [S]. 北京: 人民卫生出版社, 2005:530.
- [14] 陆桂祥, 黄新风, 齐幼龄. 百年乐对肺气虚病人免疫功能及血锌浓度的影响[J]. 广西中医药, 1993, 16(2):47.
- [15] 谢干琼, 杨品纯, 蒙关师, 等. 百年乐对果蝇衰老过程的影响[J]. 广西中医药, 1987, 10(6):31.
- [16] 陆桂祥, 黄新风. 百年乐对小鼠免疫功能的影响[J]. 广西中医药, 1988, 7(1):17.
- [17] 陈黎. 复方扶芳藤合剂抗大肠癌术后化疗白细胞减少疗效观察[J]. 广西中医药, 2001, 24(1):49.
- [18] 王力, 吴鑫, 卢新政, 等. 人参皂苷 Rg₁ 对培养大鼠骨髓间充质干细胞增殖影响的机制研究[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(11):1480.
- [19] 谭艳芳, 殷小成, 熊玉娟, 等. 黄芪甲甙对大鼠骨髓间充质干细胞多种造血相关因子表达的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(10):1817.

[责任编辑 聂淑琴]