

桑葚水提物抑制 H_2O_2 诱导 BMSCs 成脂分化的研究

靳俊峰¹, 刘银花², 欧小波¹, 阮媛¹, 王海青¹, 陈燕玲³, 吴秀香³, 易华⁴

摘要 目的 探讨桑葚水提物对 H_2O_2 诱导后大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)成脂分化的影响,并初步探讨其机制。方法 流式细胞术鉴定分离培养的大鼠 BMSCs;真空冷冻干燥法制备桑葚水提物,CCK-8 法检测桑葚水提物(15、30、60 mg/L)对 BMSCs 生长的影响;油红 O 染色显示桑葚水提物(15、30、60 mg/L)对 100 μ mol/L H_2O_2 诱导培养的 BMSCs 成脂分化的影响;免疫荧光、Western blot 检测 60 mg/L 桑葚水提物作用于 H_2O_2 诱导后 BMSCs 中过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)和 CCAAT/增强子结合蛋白 α (C/EBP α)表达的影响。结果 不同浓度桑葚水提物对 BMSCs 生长无影响,各组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。桑葚水提物可抑制 H_2O_2 诱导后 BMSCs 中脂滴生成,呈现一定的浓度依赖趋势,差异有统计学意义($P < 0.01$)。免疫荧光、Western blot 结果表明 60 mg/L 桑葚水提物可抑制 PPAR γ 和 C/EBP α 的表达,与模型组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 桑葚水提物可通过抑制 PPAR γ 和 C/EBP α 减少 H_2O_2 诱导的 BMSCs 成脂分化。

关键词 桑葚水提物; H_2O_2 ; BMSCs; 成脂分化; PPAR γ ; C/EBP α

中图分类号 R 285.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)07-1098-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.07.022

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)在适当的条件下可分化为骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等,参与组织的修复和再生^[1-2]。但机体衰老、氧化应激、雌激素缺乏可削弱 BMSCs 的定向分化能力,并促使其向脂肪细胞分化,体内脂肪累积则会引发代谢综合征^[3-4]。近年来研究表明天然药物小分子可抑制低浓度 H_2O_2 引

起的 BMSCs 成脂分化^[5-6]。从中医角度讲, BMSCs 属于“肾”,是补肾中药作用的一个重要的靶细胞。桑葚是一味重要的补肾中药^[7],但桑葚是否能抑制氧化损伤引起的 BMSCs 成脂分化并不清楚。该文研究了桑葚水提物对低浓度 H_2O_2 引起的 BMSCs 成脂分化的影响,将有助于从现代生物学角度阐释桑葚的补肾功效。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 4 周龄,体重 60~80 g,购自广州中医药大学实验动物中心,动物许可证号: SCXK(粤)2013-0034,质量合格证号: 44005900002468。室温饲养(22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 。所有动物实验程序符合《广州中医药大学实验动物伦理委员会章程》。

1.2 试剂与药物 DMEM 低糖培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、油红 O 工作液(美国 Abcam 公司); CCK-8 试剂盒(LG689)(上海东仁化学科技有限公司);抗 CD29-FITC、CD44-FITC、CD45-PE-Cy5.5 和 CD90-PE 流式抗体(美国 Abcam 公司);Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(杭州联科生物科技股份有限公司);桑葚(广州杏园春药房);Triton X-100(广州健阳生物科技有限公司);抗-过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptors, PPAR γ)(H-100)、抗-CCAAT/增强子结合蛋白 α (CCAAT enhancer binding proteins, C/EBP α)(D-5)(美国 Santa Cruz 公司);Alexa Fluor 555 标记驴抗兔 IgG、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.3 主要仪器 SHZ-D(III)循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);旋转蒸发器 RE52C(上海亚荣生化仪器厂);FD 系列冷冻干燥机 FD-1A-50(上海汉诺仪器有限公司);PerkinElmer EnSpire 多功能酶标仪(上海珀金埃尔默管理有限公司);流式细胞仪(BD Accuri C-5)。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 流式细胞术鉴定 BMSCs 颈椎脱位法处死大鼠,分离股骨,暴露骨髓腔,DMEM 低糖培养基吹

2020-04-01 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81403202);广东省医学科研基金项目(编号:A2012620)

作者单位:遵义医科大学珠海校区¹病理学教研室、²生物医药研发中心、³病理生理学教研室 珠海 519041

⁴广州中医药大学基础医学院病理学教研室,广州 510006

作者简介:靳俊峰,男,副教授,硕士;

易华,女,副教授,硕士生导师,责任作者;E-mail: yingying020@gzucm.edu.cn

打骨髓腔。1 000 r/min 离心骨髓冲洗液 8 min, 弃上清液, 重悬, 接种培养瓶, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 传代, P3 代 BMSCs 用于后续实验。常规消化、离心, 调整细胞密度为 1.0×10^6 , 分为空白对照组、同型对照组和实验组。吸细胞悬液 50 μ l 加 CD29-FITC、CD44-FITC、CD45-PE-Cy5. 5 和 CD90-PE 等 5 μ l。避光孵育 30 min, 洗 2 遍。离心弃上清液, 重悬, 检测。重复 3 次, Flow Jo 7.6 软件分析数据。

1.4.2 真空冷冻干燥法制备桑葚水提物 称桑葚 10.659 8 g, 加 200 ml 双蒸水, 煮沸 30 min。布氏漏斗减压抽滤, 旋转蒸发器将滤液分离。冷冻干燥机 -53.4 °C、-20 MPa 抽真空, 冷冻干燥, 称量。

1.4.3 CCK-8 检测桑葚水提物对 BMSCs 生长的影响 P3 代 BMSCs 以 1×10^4 /ml 接种于 96 孔板, 加 100 μ l BMSCs 悬液, 培养。24 h 弃培养基, 分组: 正常对照组 (DMEM 低糖培养基培养)、桑葚水提物 (15、30、60 mg/L)、空白对照组调零, 每组 5 个复孔。24 h 弃培养基, 加 CCK-8 工作液 10 μ l, 培养 1 h, 检测。

1.4.4 油红 O 染色检测及半定量分析 P3 代 BMSCs 以 1×10^4 /ml 接种于有无菌圆载玻片的 24 孔板, 培养。PBS 配 100 μ mol/L 的 H₂O₂ 诱导液, 作用 1 h。分为 H₂O₂ 模型组、桑葚水提物 (15、30、60 mg/L) 组, 正常培养的 BMSCs 为对照组。4% 多聚甲醛固定 30 min; 洗 3 次, 每孔加入 500 μ l 油红 O 工作液 25 min 后 60% 异丙醇洗 1 次, 双蒸水洗 3 次; 苏木精染色 15 s, 水洗 3 次, 封片。随机选取 5 个高倍视野, 计数阳性细胞, 统计学处理。

1.4.5 免疫荧光检测 PPAR γ 和 C/EBP α 的表达 P3 代 BMSCs 以 1×10^4 /ml 接种 100 μ l 于有无菌圆载玻片的 24 孔板, 分为对照组、H₂O₂ 模型组、桑葚水提物 (60 mg/L) 组。细胞接近长满 4% 多聚甲醛固定 30 min。PBS 洗 3 次。0.3% Triton X-100 室温 30 min, 洗 3 次。5% BSA 封闭 30 min, 弃封闭液, 加 I 抗 PPAR γ (1:100)、C/EBP α (1:100) 4 °C 孵育过夜, 洗 3 次 $\times$ 5 min/次, 加 II 抗 Alexa Fluor 555 标记的驴抗兔 IgG (1:200) 避光孵育 30 min, 洗 3 次, DAPI (1:1 000) 染 3 min。洗 3 次, 封片, PBS 替代 I 抗作为阴性对照。

1.4.6 Western blot 检测 PPAR γ 和 C/EBP α P3 代 BMSCs 以 1×10^4 /ml 接种 1 ml 于 6 孔板, 分对照组、H₂O₂ 模型组、桑葚水提物 (60 mg/L) 组。细胞接近长满后预冷 PBS 洗 2 遍, 加入裂解液 (RIPA:

PMSF = 100:1), 收集细胞, 冰上裂解 30 min, 超声 5 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, CA 蛋白定量将样品浓度调整一致后煮沸。蛋白 30~50 μ g 电泳; 转 PVDF 膜, 封闭 2.5 h, I 抗 4 °C 过夜; TBST 洗 6 次, II 抗孵育 1 h; TBST 洗 6 次, 曝光, Image J 软件分析, 统计学处理。

1.5 统计学处理 所有数据采用 SPSS 23.0 统计软件分析, 实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间差异采用 One-way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 形态学观察及鉴定 原代细胞 24 h 贴壁, 图 1A 显示, P1 代呈长梭形, 早期混杂有杂细胞, 换液、传代去除, 图 1B 显示 P3 代已较纯。流式细胞术图 1C 显示, 高表达 CD44 (99.20%)、CD29 (99.02%) 和 CD90 (99.94%), 低表达 CD45 (6.41%)。

2.2 桑葚水提物对正常 BMSCs 生长的影响 称量桑葚 10.659 8 g, 真空、低温、冷冻、干燥得桑葚水提物 6.262 6 g, 提取率 58.75%。高、中、低剂量 (15、30、60 mg/L) 作用于 BMSCs, 24 h 酶标仪检测, 统计学处理, 表 1 显示, 15、30、60 mg/L 桑葚水提物对 BMSCs 的生长与正常对照组 BMSCs 生长相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 桑葚水提物对大鼠 BMSCs 生长的影响 ($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/L)	吸光度值	F 值	P 值
正常对照	-	2.346 8 $\pm$ 0.143 0	0.612 0	0.617 0
桑葚水提物低剂量	15	2.280 0 $\pm$ 0.083 3		
桑葚水提物中剂量	30	2.344 0 $\pm$ 0.083 9		
桑葚水提物高剂量	60	2.287 6 $\pm$ 0.085 0		

2.3 桑葚水提物对 H₂O₂ 刺激后 BMSCs 成脂分化的影响 油红 O 染色将脂肪染成深红色。图 2 显示, 对照组染色阴性; 模型组较多深红色阳性产物; 15 mg/L 桑葚水提物组脂滴生成无影响; 30 mg/L 桑葚水提物组脂滴减少; 60 mg/L 桑葚水提物组抑制脂滴生成。

计数各组阳性细胞数, 图 3 统计学分析显示: 模型组与正常对照组差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 模型组与 15 mg/L 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 这两组与 30、60 mg/L 两组相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 30 mg/L 组与 60 mg/L 组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 60 mg/L 桑葚水提物

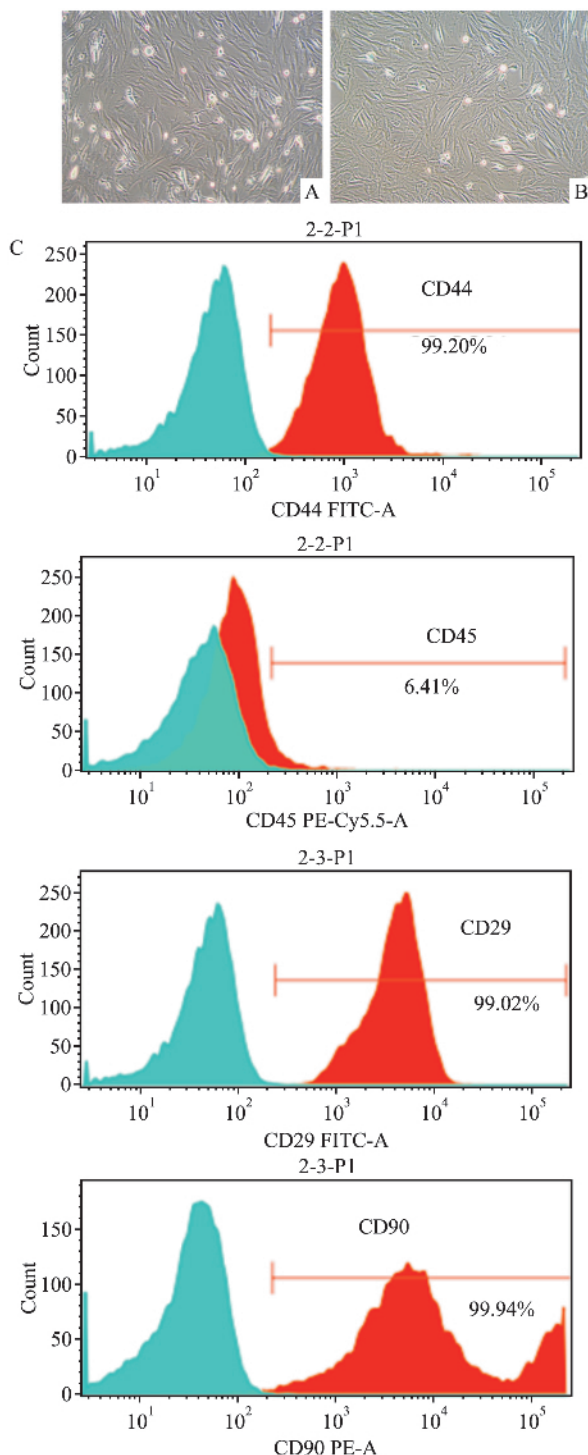


图1 大鼠BMSCs的培养和鉴定 ×200

A: 原代培养大鼠BMSCs; B: P3代大鼠BMSCs; C: 流式细胞术鉴定P3代细胞

对成脂分化抑制作用最大,后续实验均采用此浓度。

2.4 桑葚水提取物对 H_2O_2 刺激后 BMSCs 胞质内 $PPAR\gamma$ 和 $C/EBP\alpha$ 表达的影响 图4显示 $PPAR\gamma$ 和 $C/EBP\alpha$ 阳性产物呈红色,对照组 $PPAR\gamma$ 和 $C/EBP\alpha$ 无表达,模型组表达,60 mg/L桑葚水提取物组

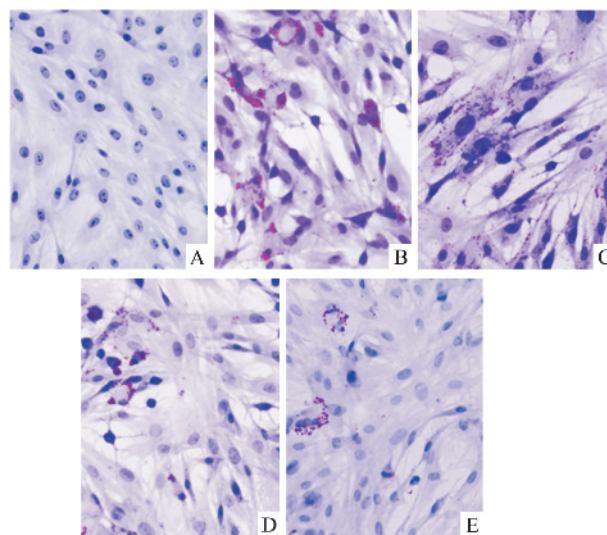


图2 桑葚水提取物抑制 H_2O_2 刺激后

BMSCs 成脂分化油红 O 染色 ×400

A: 正常对照组; B: 模型组; C: 15 mg/L 组; D: 30 mg/L 组; E: 60 mg/L 组

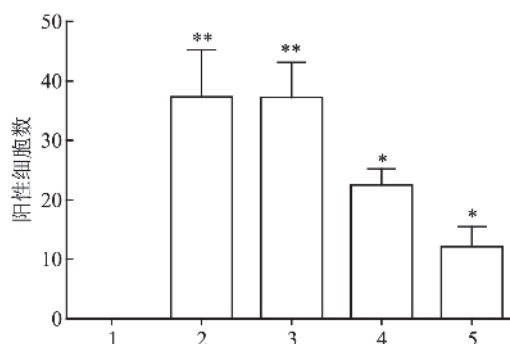


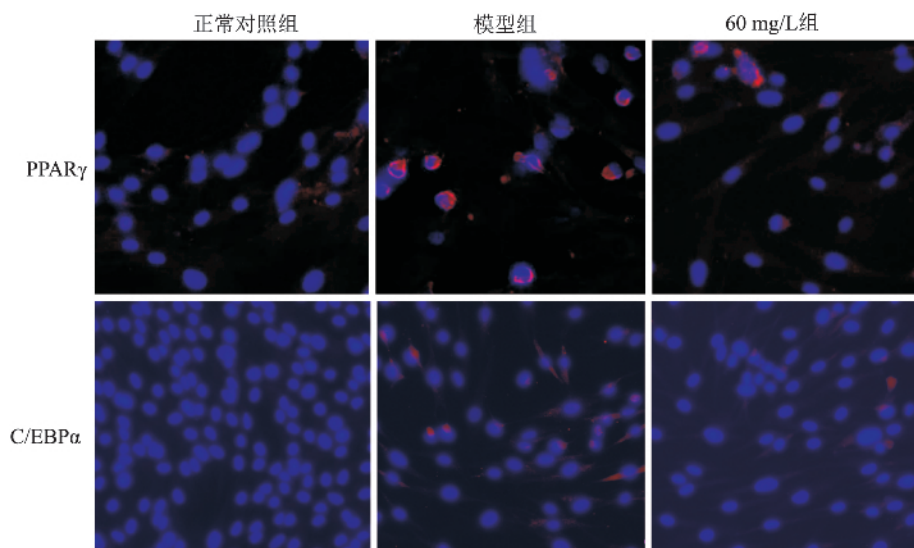
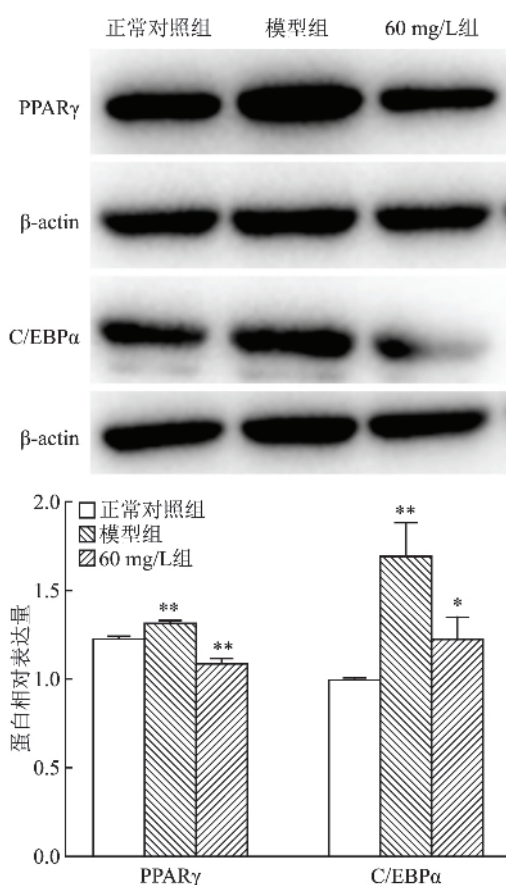
图3 桑葚水提取物减少 H_2O_2 刺激后 BMSCs 成脂分化细胞数

1: 正常对照组; 2: 模型组; 3: 15 mg/L 组; 4: 30 mg/L 组; 5: 60 mg/L 组; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表达减少。图5显示,Western blot 结果与上述结果具有一致性。模型组与60 mg/L桑葚水提取物组相比, $PPAR\gamma$ 和 $C/EBP\alpha$ 表达差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

真空冷冻干燥是利用升华的原理使物质脱水的一种干燥技术,该方法所得的活性成分含量与新鲜样品最接近^[8]。本研究将桑葚水提取物进行真空冷冻干燥,最大程度的保留了桑葚的有效成分,提取率较高。本课题组前期使用高效液相色谱分析表明,桑葚水提取物中含有5种黄酮类化合物(桑色素、芦丁、紫云英苷、异槲皮素、木犀草素)和2种非黄酮类化合物(绿原酸、桑橙素),这7个化合物分子骨

图4 免疫荧光检测各组 PPAR γ 和 C/EBP α 的表达 $\times 400$ 图5 Western blot 法检测各组 PPAR γ 和 C/EBP α 的表达水平
与正常对照比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

架不尽相同,但都含有酚羟基,其中,芦丁、紫云英苷、异槲皮素、木犀草素、绿原酸、桑橙素含有强抗氧化活性的邻二酚羟基结构,而邻二酚羟基被认为是细胞保护作用的重要来源^[9],本结果说明上述桑葚水提物中的主要有效成分协同发挥调节作用,实现

对 $\cdot OH$ 损伤的间充质干细胞保护作用,这与本课题组前期的研究^[10]结果是一致的。

氧化应激可使细胞产生大量的自由基,过量自由基会导致细胞衰老、癌变或功能异常。本实验中使用的细胞是全骨髓法获取的 BMSCs, P3 代细胞经流式细胞术检测显示,已经较为纯化,可用于后续实验,与文献^[11]报道相一致。本项目组前期发现 $100 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 氧化损伤 BMSCs 后对细胞生长无抑制,但可促进细胞成脂分化^[12],本实验继续采用这种低浓度 H_2O_2 诱导的细胞模型进行实验。油红 O 具有很强的染脂质作用,可以将细胞或组织内的脂质染成红色。本实验结果显示,随着桑葚水提物浓度的增加,其对 H_2O_2 诱导后的 BMSCs 脂滴生成抑制作用增强,具有量效关系,可见,桑葚水提物对氧化损伤的 BMSCs 有保护作用,有助于维持 BMSCs 的干细胞状态。

PPAR γ 和 C/EBP α 是细胞成脂分化的两个关键转录因子,目前的研究^[13-14]显示,PPAR γ 和 C/EBP α 可通过协同作用来影响 3T3-L1 前脂肪细胞向脂肪细胞的分化,有报道^[6-7]显示,芥子碱、白术内酯Ⅲ、穿心莲内酯等中药有效成分可通过抑制 PPAR γ 和 C/EBP α 的表达抑制 H_2O_2 诱导后 BMSCs 中脂滴形成。本研究结果显示,正常 BMSCs 中 PPAR γ 和 C/EBP α 无表达, H_2O_2 刺激后 BMSCs 中 PPAR γ 和 C/EBP α 的表达均增加,60 mg/L 桑葚水提物则可抑制模型细胞中 PPAR γ 和 C/EBP α 的表达,与文献报道具有一致性,提示桑葚水提物可通过抑制 PPAR γ 和 C/EBP α 的协同表达抑制 H_2O_2 诱导

后 BMSCs 成脂分化。

综上所述,桑葚水提物对正常的 BMSCs 生长并无影响,对 H_2O_2 损伤的 BMSCs 有保护作用,可通过抑制 PPAR γ 和 C/EBP α 的表达而减少 H_2O_2 诱导后 BMSCs 内脂滴的生成,有助于维持 BMSCs 的干细胞特性,本研究结果从现代生物学的角度阐释了补肾中药桑葚对其靶细胞 BMSCs 的调控。

参考文献

- [1] 于丽娜,张文轩,于洋,等. 伴放线杆菌对人骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化的影响[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(17): 2813-6.
- [2] 郭子仪,王淑霞,吴梅,等. BMMSCs 与 DPCs 共培养体系在异位体内牙髓再生中的应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(2): 505-12.
- [3] Meyer M B, Benkuskus N A, Sen B, et al. Epigenetic plasticity drives adipogenic and osteogenic differentiation of marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(34): 17829-47.
- [4] Wang C, Meng H, Wang X, et al. Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in osteoblasts and adipocytes and its role in treatment of osteoporosis[J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 226-33.
- [5] 黄炜平,李可,刘爱军,等. 芥子碱对 H_2O_2 诱导 BMSCs 成脂分化的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(5): 918-24.
- [6] 李可,黄炜平,徐光镇,等. 白术内酯Ⅲ对大鼠骨髓间充质干细胞成脂分化的抑制作用[J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(3): 285-90.
- [7] 李吉莹,冯利. 桑葚的研究开发概况[J]. 湖北成人教育学院学报, 2016, 22(5): 33-5.
- [8] 郑艳萍,潘艳琼,秦昆明,等. 不同干燥方式对杜仲叶 4 种活性成分含量的影响[J]. 中国药房, 2017, 28(28): 3973-6.
- [9] Xie H, Li X, Ren Z, et al. Antioxidant and cytoprotective effects of tibetan tea and its phenolic components[J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 179.
- [10] Jiang Q, Li X, Tian Y, et al. Lyophilized aqueous extracts of mori fructus and mori ramulus protect mesenchymal stem cells from $\bullet OH$ -treated damage: Bioassay and antioxidant mechanism[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1): 242.
- [11] 周年,刘波,徐彭. 大鼠骨髓间充质干细胞的分离培养和分化能力鉴定[J]. 江西中医药, 2018, 49(425): 34-6, 52.
- [12] Huang W P, Li K, Liu A J, et al. miR-330-5p inhibits H_2O_2 -induced adipogenic differentiation of MSCs by regulating RXR γ [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(4): 2042-52.
- [13] Chen J, Bao C, Kim J T, et al. Sulforaphene inhibits adipogenesis via Hedgehog signaling in 3T3-L1 adipocytes[J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(45): 11926-34.
- [14] 李吉萍,张文友,孙婷婷,等. 板蓝根水提物对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖和分化的影响[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(8): 1159-64.

The aqueous extracts of mulberry inhibited adipogenic differentiation of BMSCs induced by H_2O_2

Jin Junfeng¹, Liu Yinhua², Ou Xiaobo¹, et al

(¹Dept of Pathology, ²Biological Medicine R&D Center, Zhuhai Campus, Zunyi Medical University, Zhuhai 519041)

Abstract Objective To investigate the effect of the aqueous extracts of mulberry on adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) stimulated by H_2O_2 . **Methods** BMSCs were isolated from the bone marrow of rats and identified by flow cytometry. The aqueous extracts of mulberry were prepared by vacuum freeze-drying. CCK-8 method was performed to detect the toxicity of mulberry aqueous extract (15, 30, 60 mg/L) to BMSCs. Oil red O staining was used to identify the lipid droplets. Immunofluorescence and Western blot were used to detect the expression of PPAR γ and C/EBP α in BMSCs treated by the aqueous extracts of mulberry (15, 30, 60 mg/L). **Results** CCK-8 assay showed that the aqueous extracts of mulberry did not affect the growth of BMSCs ($P > 0.05$). Oil red O staining showed that the aqueous extracts of mulberry inhibited the formation of lipid droplets in BMSCs induced by H_2O_2 , showing a dose-effect relationship ($P < 0.01$). The aqueous extracts of mulberry (60 mg/L) significantly inhibited the expression of PPAR γ and C/EBP α in BMSCs stimulated by H_2O_2 ($P < 0.05$). **Conclusion** The aqueous extracts of mulberry can inhibit the adipogenic differentiation of BMSCs induced by H_2O_2 through PPAR γ and C/EBP α signaling pathway.

Key words the aqueous extracts of mulberry; H_2O_2 ; BMSCs; adipogenic differentiation; PPAR γ ; C/EBP α