

## · 基础研究 ·

## 鹿茸多肽抗鼠软骨细胞老化的机制初探

陈晓东<sup>1</sup>, 林建华<sup>2</sup>

(1.深圳平乐骨伤科医院, 广东 深圳 518010; 2.福建医科大学附属第一医院)

**【摘要】目的:**对体外传代培养的大鼠软骨细胞进行鹿茸多肽干预对照实验,检测老化相关因子,初步探讨鹿茸多肽抗软骨细胞复制性老化的机制。**方法:**进行大鼠软骨细胞取材及传代培养,对第4代软骨细胞进行鹿茸多肽干预,并与第2、3、4代软骨细胞进行对照实验,采用免疫细胞化学检测 p16、pRb、E2F、CyclinD、CDK4 等因子表达水平,TRAP-ELISA(telomerase repeat amplification protocol assay-enzyme linked immunosorbent assay)检测端粒酶活性,进而考察鹿茸多肽对软骨细胞老化过程中各因子的影响。**结果:**随着细胞复制性老化 p16、pRb、CyclinD 表达显著上升 ( $P<0.01$ ), E2F、CDK4、端粒酶表达显著下降 ( $P<0.01$ );鹿茸多肽干预后 p16、pRb、CyclinD 表达比第4代软骨细胞表达显著下降 ( $P<0.01$ ), E2F、CDK4、端粒酶表达显著上升 ( $P<0.01$ )。**结论:**鹿茸多肽可以逆向影响老化相关调控因子的表达来实现其抗软骨细胞退变老化的作用。

**【关键词】** 鹿茸多肽; 软骨细胞; 细胞衰老

**The initial mechanism's investigation of pilose antler polypeptides resisting replicative senescence of rat chondrocyte**

CHEN Xiao-dong\*, LIN Jian-hua. \*Shenzhen Pingle Hospital of Orthopedics and Traumatology, Shenzhen 518010, Guangdong, China

**ABSTRACT Objective:** To investigate the mechanism of pilose antler polypeptides(PAP) resisting replicative senescence of rat chondrocyte serially subcultivated in vitro by means of PAP interfering and controlled experiment. **Methods:** The successive tert-generation (2nd passage, 3rd passage, 4th passage) chondrocytes and the 4th passage cells intervened by PAP were studied for senescence mechanism. In this course, immunocytochemistry was applied for p16, pRb, E2F, CyclinD, CDK4 and TRAP-ELISA(telomerase repeat amplification protocol assay-enzyme linked immunosorbent assay) was applied for telomerase activation to observe targets' changing regarding to senescence and the function of PAP. **Results:** Along with cell's replicative senescence, p16, pRb and Cyclin D express significantly rised ( $P<0.01$ ), while E2F, CDK4 and telomerase express significantly lowerd ( $P<0.01$ ). Meanwhile, in PAP interfered group compared with which in 4th passage group, p16, pRb and Cyclin D express significantly lowerd ( $P<0.01$ ), while E2F, CDK4 and telomerase express significantly rised ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** PAP has function that it reversingly affect the express of factors which controlling cell life cycle and cell growth to postpone chondrocyte senescence.

**Key words** Pilose antler polypeptides; Chondrocytes; Cell aging

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(8):617-620 www.zggszz.com

软骨细胞属于终末分化细胞,其在体外的传代培养过程中出现增殖停滞,表型丧失,呈老化状态,这种老化属于复制性老化。细胞老化是细胞周期调控下多基因参与的复杂的生理病理过程,具有一定的可控性。细胞周期调控因子及老化相关调控因子 CyclinD、CDK、p16、pRb、E2F、端粒酶等相互作用导致细胞老化。有实验研究<sup>[1-2]</sup>显示,软骨细胞体外传代培养出现复制性老化发生在 P4 代(4th passage),本研究的细胞传代实验中发现大鼠软骨细胞在 P4 代出现老化改变<sup>[3]</sup>。在前期实验<sup>[4-5]</sup>中发现鹿茸多肽(Pilose Antler Polypeptides, PAP)具有显著促进骨髓间质干细胞的增殖、诱导软骨细胞分化和抑

制细胞凋亡的作用。随后,对 PAP 抑制软骨细胞老化的量效关系进行观察,本实验拟从细胞老化调控因子方面对体外传代培养的大鼠软骨细胞老化机制以及 PAP 抑制软骨细胞老化的可能机制进行观察和初步探讨。

**1 材料与方法**

**1.1 主要材料** 清洁级 SD 大鼠(福建医科大学实验动物中心提供,闽验证字 20050001,合格证号 2005C03,4 周龄,体重 180~200 g,雄性,共 8 只)。αMEM 培养基(Gibco 公司)、胎牛血清 FBS(HyClone 公司);胰蛋白酶 Trypsin1;250 (Amersco 公司)、PBS(Gibco 公司);二甲基亚砜 DMSO(Amersco 公司)。SABC 免疫细胞化学试剂盒(武汉博士德公司),鹿茸多肽粉针(长春中医学院附属医院新药研究中心),兔抗大鼠 p16、pRb、E2F、CyclinD、CDK4 抗体(武汉博士德公司),TRAP-

基金项目:福建省科技计划重大资助项目(编号:2004Y018)

通讯作者:陈晓东 Tel:0755-81192880 E-mail:exdf22@163.com

ELISA 试剂盒(Boehringer Mannheim 德国),抗地高辛过氧化物酶:0.5 U/ml(Boehringer Mannheim 德国),TMB 底物液:3,3',5,5'-四甲苯。

1.2 大鼠软骨细胞的取材、培养、分组 取 4 周龄体重 185~200 g 的 SD 大鼠,断颈处死,参考 Hu 等<sup>[6]</sup>软骨细胞分离培养方法进行实验,获取软骨细胞置于 5%CO<sub>2</sub> 混和气体环境中,37 °C 恒温箱内单层培养,隔 3 d 首次换液,8~10 d 达 85%融合后进行传代培养,具体细胞培养及传代方法见相关报道<sup>[7]</sup>。分组:按传代次数 (passage) 分为 P2 (2nd passage) 组、P3 (3rd passage) 组、P4 (4th passage) 组,鹿茸多肽干预组 (PAP 10 μg/ml 组);对 P3 代软骨细胞以含 PAP 浓度为 10 μg/ml 的培养液干预并使之传代进入 P4 代,实验中细胞接种密度为 0.5~1×10<sup>6</sup>,均接种 6 孔培养板。

1.3 观察项目与方法

1.3.1 免疫细胞化检测 p16 蛋白、E2F 蛋白、pRb 蛋白、CyclinD、CDK4 表达 采用链霉亲和素-生物素化过氧化物酶复合物(SABC)法:将不同组软骨细胞接种于 6 孔板,孔内均预置一块盖玻片,常规培养 48 h 后取出盖玻片,严格按说明书操作。用已知阳性切片作阳性对照,PBS 代替一抗作阴性对照。结果分析:光镜下每个标本随机选 5 个高倍视野计数细胞,求出阳性表达率 (%)。

1.3.2 端粒酶的活性检测 TRAP-ELISA 法检测端粒酶活性,将培养的活力良好的细胞用 0.25%的胰酶消化后,在计数板上精确计数 2×10<sup>6</sup> 个细胞,冷 PBS 洗 2 次,以下操作在冰上进行:加裂解液 200 μl,冰上反应 30 min,16 000×g 低温离心 20 min,取上清 5 μl 加入 TRAP 反应液 25 μl、DEPC 30 μl,进行 PCR 扩增,94 °C 30 s;50 °C 30 s;72 °C 90 s,循环 33 次。同时设阳性对照与阴性对照:阳性对照为人胚肾 293 细胞株(试剂盒提供),阴性对照为端粒酶提取物加 1 μg/μl RNaseA,37 °C 孵育 20 min;ELISA 反应检测端粒酶产物取 5 μl 扩增产物,

加 20 μl 变性液,室温反应 10 min,加杂交液 225 μl,充分混匀,将上述混合液体 100 μl 加入 MTP 包被的微量反应板中,300 r/min 摇床、37 °C 孵育 2 h 弃去杂交液,PBS 清洗 3 次,向每孔中加入 100 μl 抗地高辛过氧化物酶,300 r/min 摇床室温 30 min;弃去液体,清洗 5 次,加 100 μl TMB 底物液,室温下观察颜色反应。端粒酶阳性时,液体由无色透明逐渐变蓝,弃去 TMB 底物液后,加入终止液,颜色由蓝变黄。在加入终止液后 30 min 内,在酶标仪上测 A 值,波长为 450 nm(以 690 的波长为参考)根据  $\Delta A = A_{450} - A_{690}$  计算细胞端粒酶活性。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 11.0 统计软件进行分析。组间比较采用 t 检验,定量资料实验结果以均数±标准差表示,进行 One way ANOVA 检验, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 p16 蛋白免疫细胞化学检测结果 由图 1 可见,p16 蛋白阳性表达位于细胞核,其阳性染色为深褐色。图 1a 为 P2 组软骨细胞检测结果,图片中所见阳性染色极少,其阳性染色为 0.36%;图 1b 为 P3 组软骨细胞检测结果,可见部分阳染细胞,其阳染率为 14.6%;图 1c 为 P4 组软骨细胞检测结果,可见大量阳染细胞,染色较深,其阳染率为 30.67%;图 1d 为 PAP 10 μg/ml 组软骨细胞检测结果,可见部分阳染细胞,其阳染率为 11.25%。结果表明,P2、P3、P4 组软骨细胞随代次增加 p16 蛋白的阳性表达显著增加 (P<0.01);PAP10 μg/ml 干预组比 P4 组 p16 蛋白的阳性表达显著减少 (P<0.01)。

2.2 pRb 蛋白免疫细胞化学检测结果 由图 2 可见,pRb 蛋白阳性表达位于细胞核,其阳性染色为深褐色。其中图 2a 为 P2 组软骨细胞检测结果,可见极少阳性染色细胞,其阳性染色为 0.78%;图 2b 为 P3 组软骨细胞检测结果,可见部分阳染细胞,其阳染率为 20.5%;图 2c 为 P4 组软骨细胞检测结果,可见大量阳染细胞,染色较深,其阳染率为 23.94%;图 2d 为 PAP 10 μg/ml 组软骨细胞检测结果,可见部分阳染细胞,其

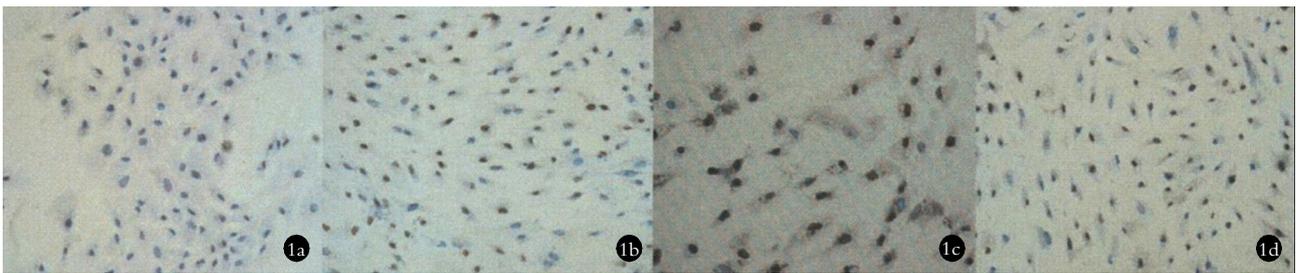


图 1 免疫细胞化学法检测 p16 蛋白表达 1a.P2×200 1b.P3×200 1c.P4×400 1d.PAP 10 μg/ml×200

Fig.1 Immunocytochemistry for p16's expression 1a.P2×200 1b.P3×200 1c.P4×400 1d.PAP 10 μg/ml×200

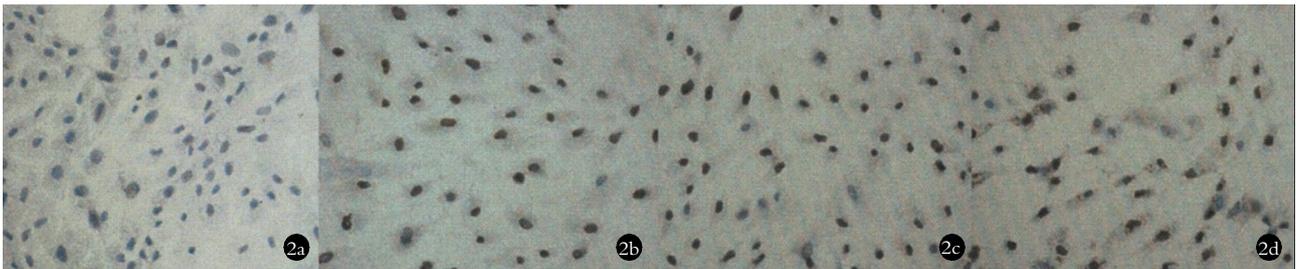


图 2 免疫细胞化学法检测 pRb 蛋白表达 2a.P2×400 2b.P3×400 2c.P4×400 2d.PAP 10 μg/ml×400

Fig.2 Immunocytochemistry for pRb's expression 2a.P2×400 2b.P3×400 2c.P4×400 2d.PAP 10 μg/ml×400

阳染率为 20.6%。结果表明, P2、P3、P4 组软骨细胞随代次增加 pRb 蛋白的阳性表达显著增加 ( $P<0.01$ ); PAP 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  干预组比 P4 组 pRb 蛋白的阳性表达显著减少 ( $P<0.01$ )。

**2.3 E2F 因子免疫细胞化学检测结果** 由图 3 可见, E2F 因子阳性表达位于细胞核, 其阳性染色为深褐色。其中图 3a 为 P2 组软骨细胞检测结果, 可见大量阳染细胞, 染色较深, 阳性染色为 44.83%; 图 3b 为 P3 组软骨细胞检测结果, 可见部分阳染细胞, 阳染率为 26%; 图 3c 为 P4 组软骨细胞检测结果, 可见很少阳染细胞, 阳染率为 26%; 图 3d 为 PAP 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  组软骨细胞检测结果, 可见部分阳染细胞, 阳染率为 26.6%。结果表明, P2、P3、P4 组软骨细胞随代次增加 E2F 因子的阳性表达显著减少 ( $P<0.01$ ); PAP 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  干预组比 P4 组 E2F 因子的阳性表达显著增加 ( $P<0.01$ )。

**2.4 CyclinD 免疫细胞化学检测结果** 由图 4 可见, CyclinD 阳性表达位于细胞核, 其阳性染色为深褐色。其中图 4a 为 P2 组软骨细胞检测结果, 图片中所见阳性染色较少, 其阳染率为 13.2%; 图 4b 为 P3 组软骨细胞检测结果, 可见部分阳染细胞, 其阳染率为 22.8%; 图 4c 为 P4 组软骨细胞检测结果, 可见较多阳染细胞, 染色较深, 其阳染率为 35.5%; 图 4d 为 PAP

10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  组软骨细胞检测结果, 可见部分阳染细胞, 其阳染率为 22.63%。结果表明, P2、P3、P4 组软骨细胞随代次增加 CyclinD 的阳性表达显著增加 ( $P<0.01$ ); PAP 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  干预组比 P4 组 pRb 蛋白的阳性表达显著减少 ( $P<0.01$ )。

**2.5 CDK4 免疫细胞化学检测结果** 由图 5 可见, CDK4 阳性表达位于细胞核, 其阳性染色为深褐色。其中图 5a 为 P2 组软骨细胞检测结果, 可见较多阳染细胞, 染色较深, 其阳染率为 38.6%; 图 5b 为 P3 组软骨细胞检测结果, 可见部分阳染细胞, 其阳染率为 27.2%; 图 5c 为 P4 组软骨细胞检测结果, 可见较少阳染细胞, 阳染率为 17.4%; 图 5d 为 PAP 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  组软骨细胞检测结果, 可见略多阳染细胞, 其阳染率为 27%。结果表明, P2、P3、P4 组软骨细胞随代次增加 CDK4 的阳性表达显著减少 ( $P<0.01$ ); PAP 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  干预组比 P4 组 E2F 因子的阳性表达显著增加 ( $P<0.01$ )。

**2.6 端粒酶 TRAP-ELISA 检测结果** 见表 1。由表 1 可见, 阴性对照组端粒酶表达检测平均 A 值为 0.028, 阳性对照组 (U293 细胞) 平均 A 值为 1.627, P2、P3、P4、PAP 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  组端粒酶的表达均呈非阳性表达, P2、P3、P4 组细胞随代次增加端粒酶表达 A 值逐代减少, PAP 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  组较 P4 组显著增

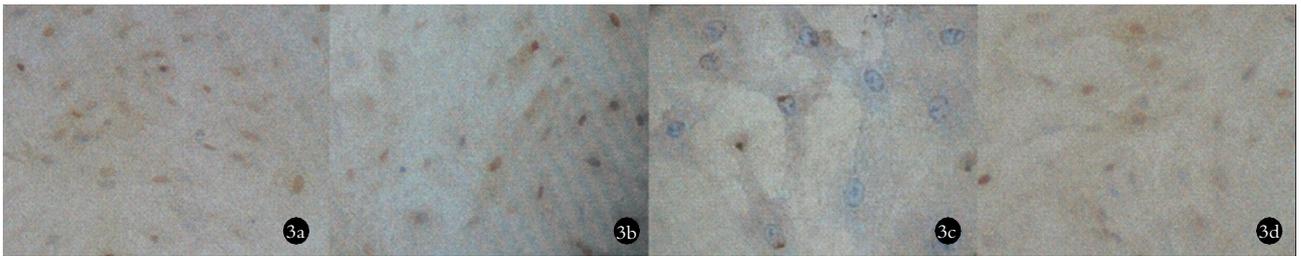


图 3 免疫细胞化学法检测 E2F 因子表达 3a.P2×400 3b.P3×400 3c.P4×600 3d.PAP 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ×400

Fig.3 Immunocytochemistry for E2F's expression 3a.P2×400 3b.P3×400 3c.P4×600 3d.PAP 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ×400

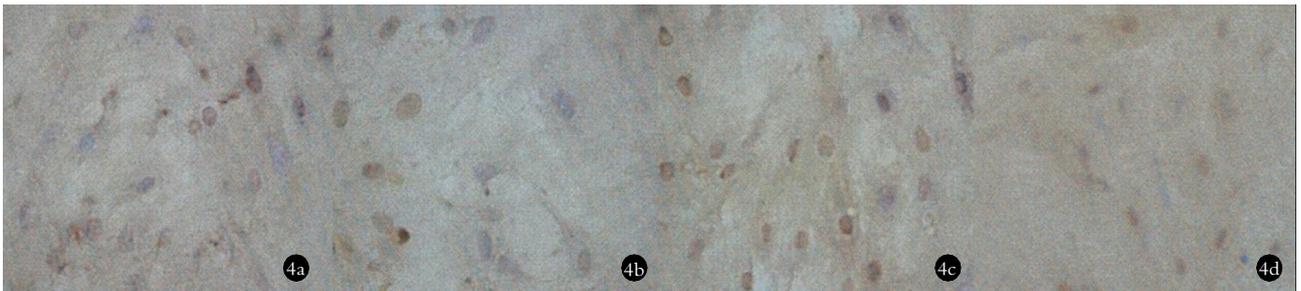


图 4 免疫细胞化学检测 CyclinD 表达 4a.P2×400 4b.P3×400 4c.P4×400 4d.PAP 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ×400

Fig.4 Immunocytochemistry for CyclinD's expression 4a.P2×400 4b.P3×400 4c.P4×400 4d.PAP 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ×400

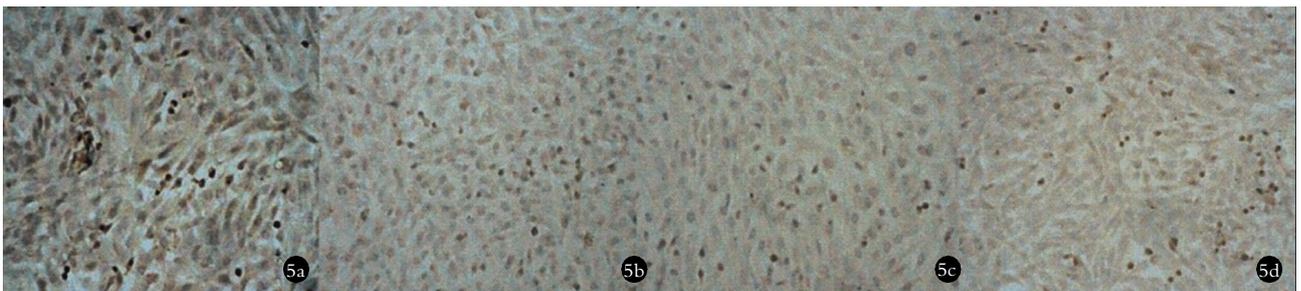


图 5 免疫细胞化学检测 CDK4 表达 5a.P2×200 5b.P3×200 5c.P4×200 5d.PAP 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ×200

Fig.5 Immunocytochemistry for CDK4's expression 5a.P2×200 5b.P3×200 5c.P4×200 5d.PAP 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ×200

加( $P<0.01$ )。

表 1 TRAP-ELISA 检测端粒酶的表达( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Tab.1 TRAP-ELISA for telomerase's expression( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	A 值
P2	0.063 0±0.007 0*
P3	0.054 0±0.005 3*
P4	0.042 0±0.002 5*
PAP 10 μg/ml	0.066 0±0.001 5 <sup>△</sup>
Negative control	0.028 0±0.002 6
Positive control	1.627 0±0.256 5

注:组间比较,\* $P<0.01$ ;与 P4 组比较,<sup>△</sup> $P<0.01$

Note:Compared intergroups,\* $P<0.01$ ;Compared with P4 group,<sup>△</sup> $P<0.01$

### 3 讨论

细胞老化是正常细胞生命过程,在此过程中,细胞周期调控因子和衰老调控因子起着重要作用,其中,Cycline D(细胞周期素 D)为细胞从 G1 期进入 S 期的一个重要调控因子,通过结合 CDK4(周期素依赖激酶 4)形成复合体,促进 DAN 合成,加速细胞增殖。p16 属于 CKI(细胞周期依赖激酶抑制剂)家族,通过抑制 CDK 4 的活性,致使有活性的 Rb 蛋白(视网膜神经母细胞瘤蛋白)不能或较少磷酸化,低磷酸化的 pRb 能够与 E2F 结合时,导致与 Rb 蛋白结合的转录活化因子 E2F 不能释放,不能发挥转录因子的作用,E2F 活性受到抑制,引起细胞生长阻滞于 G1 期,从而诱发细胞衰老的特征性改变。端粒酶(Telomerase)是 RNA 依赖的 DNA 多聚酶,其功能主要在于合成染色体末端的重复序列,以维持端粒的长度和稳定性。本实验观察到,在 P2、P3、P4 代软骨细胞,随着培养代次增加,p16、pRb、CyclinD 的表达呈现显著上升趋势,E2F、CDK4、端粒酶的表达呈现显著下降趋势,这说明软骨细胞衰老与 p16、pRb、CyclinD 呈正相关关系,与 E2F、CDK4、端粒酶呈负相关关系。

细胞老化、凋亡是软骨细胞生命周期中的必然过程,抑制细胞老化和凋亡可以有效防止软骨退变减缓骨关节炎的发展过程,在中医药理论中,关节软骨属“筋”的范畴,肝肾亏虚导致“关节不利”,许多学者运用现代科技手段探索传统中药理论,探讨中药抗软骨退变老化的机制,郭礼跃等<sup>[8]</sup>运用古方稀益丸对家兔关节软骨退变进行研究显示该方可以通过抑制 IL-1、TNF-α 表达起到防止关节软骨退变作用。本实验使用鹿茸多肽进行干预,鹿茸具有很强的壮肾阳,益精血、强筋骨的作用,鹿茸多肽是从鲜梅花鹿茸中分离得到具有很强的促进骨、软骨细胞增殖的生物活性多肽,鹿茸多肽为鹿茸主要活性成分,本研究在细胞传代培养实验<sup>[3]</sup>中观察到细胞老化的关键时期在 P4 代,本实验以 PAP 10 μg/ml 浓度剂量对 P4 代

软骨细胞干预,其浓度剂量来源于前期实验观察到其最佳有效剂量为 10 μg/ml,对其抑制软骨细胞老化的机制考察也是建立在相关实验证明其具有抑制软骨细胞退变老化的作用,据此设计本实验。实验观察到,鹿茸多肽对老化相关因子及细胞周期调节因子的表达具有抑制作用,在其干预下 p16、pRb、CyclinD 的表达较 P4 代细胞表达显著下降,E2F、CDK 4、端粒酶的表达较 P4 代细胞表达显著上升,实验结果可以推测,鹿茸多肽抗软骨细胞老化的机制可能在于:鹿茸多肽降低了 p16 的表达,减少其与 CDK4 结合,使 CDK4 与 CyclinD 形成活性复合物,使 pRB 磷酸化,减少非磷酸化 RB 和 E2F 转录因子结合,使细胞顺利通过 G1 期,完成其周期使命。实验观察到软骨细胞作为终末分化细胞其端粒酶活性基本处于未激活状态,在鹿茸多肽的作用下,虽然端粒酶表达有所上升,但是仍未激活,这说明细胞老化是无法完全阻止的,同时说明鹿茸多肽无致瘤性,这一结果支持开发其在临床使用。本实验是对鹿茸多肽抗软骨细胞老化的初步探讨,实验中各因子的单一表达并不能反映其相互之间的作用关系,仅能从现有的理论来作推测,实验中有关机制尚待进一步研究,如:①软骨细胞老化和 p16 高表达之间的先后关系;②端粒酶活性处于未激活状态,其含量的下降有没有实际意义。因此,对软骨细胞老化的机制只能作出一个建立在前人工作基础上的初步理论推测。这一研究也为我们提出了新的研究点,即是否可以通过药物的干预改变调控因子的表达来改变软骨细胞的老化。

### 参考文献

- Loeser RF, Shanker G. Autocrine stimulation by insulin-like growth factor1 and insulin-like growth factor2 mediates chondrocytes survival in vitro. *Anthritis Rheum*, 2000, 43(7): 1552-1559.
- Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Early response genes induced in chondrocytes stimulated with the inflammatory cytokine interleukin-1 beta. *Arthritis Res*, 2001, 3(6): 381-388.
- 林建华,陈晓东,邓凌霄,等.大鼠软骨细胞复制性老化的体外观察. *中国修复重建外科杂志*, 2007, 21(11): 1155-1160.
- 林建华,修忠标,王日雄.鹿茸多肽对软骨表型化骨髓间充质干细胞凋亡的影响. *中国修复重建外科杂志*, 2006, 20(4): 427-430.
- 林建华,修忠标.鹿茸多肽对骨髓基质干细胞体外增殖的影响. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(7): 821-828.
- Hu DN, Yang PY, Ku MC, et al. Isolation and cultivation of human articular chondrocytes. *Kaohsiung J Med Sci*, 2002, 18(3): 113-120.
- 陈晓东,林建华.大鼠软骨细胞分离培养与鉴定. *福建中医学院学报*, 2006, 16(6): 27-29.
- 郭礼跃,胡慧华,米健国.古方稀益丸对膝骨性关节炎模型家兔关节液中 IL-1、TNF-α 含量及关节软骨细胞形态学的影响. *中国骨伤*, 2006, 19(6): 377-378.

(收稿日期: 2008-01-28 本文编辑: 王玉蔓)

### 更正启事

《中国骨伤》2008 年第 21 卷第 7 期(对中文目次 2)贵州同济堂制药有限公司的广审文号应为:黔药广审(文)第 2008040072 号。特此更正。