

## 牛黄对小鼠口腔成纤维细胞功能的调节作用

代剑平, 陈钧, 韩邦兴, 贝宇飞, 周晓坤

江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013

**摘要:** 探讨牛黄对原代小鼠口腔成纤维细胞功能的影响, 揭示其在溃疡愈合过程中的作用及机制。本试验采用 MTT 法、氯胺-T 法、明胶酶谱分析和酶联免疫反应测定了牛黄对小鼠口腔成纤维细胞增殖、胶原沉积、金属蛋白酶-2、-9 活性和基质金属蛋白酶抑制因子-1 合成的影响。结果表明牛黄能显著抑制小鼠口腔成纤维细胞的增殖、胶原沉积和金属蛋白酶-2 活性, 同时也极显著 ( $P < 0.01$ ) 抑制基质金属蛋白酶抑制因子-1 的产生。结果提示牛黄在溃疡愈合过程中不具生肌作用, 可能通过抗炎促进溃疡愈合; 其抑制胶原合成的机制可能与极显著抑制基质金属蛋白酶抑制因子-1 有关。

**关键词:** 胶原合成, 小鼠口腔成纤维细胞, 金属蛋白酶-2, -9, 基质金属蛋白酶抑制因子-1

## Regulation of calculus bovis on the function of mice oral fibroblasts

Jianping Dai, Jun Chen, Bangxing Han, Yufei Bei, and Xiaokun Zhou

School of Food and Bioengineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

**Abstract:** To explore the influence of calculus bovis on the function of primary cultured mice oral fibroblasts, we determined the effects of calculus bovis on the fibroblast proliferation, collagen production, matrix metalloproteinases-2, -9 activities and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production by MTT assay, chloramine T method, gelatin zymography and enzyme-linked immunosorbent assays respectively. The results showed that calculus bovis could significantly inhibit the proliferation of fibroblasts and collagen synthesis in a concentration dependent manner, could significantly ( $P < 0.05$ ) suppress matrix metalloproteinases-2 activity and very significantly ( $P < 0.01$ ) inhibit the production of tissue inhibitor of metalloproteinase-1. In conclusion, the major function of calculus bovis in the process of ulcer healing is not to promote tissue regeneration, the mechanism that calculus bovis inhibits collagen synthesis may be partly due to its ability to very significantly ( $P < 0.01$ ) suppress the production of tissue inhibitor of metalloproteinase-1.

**Keywords:** collagen synthesis, mice oral fibroblast, matrix metalloproteinases-2, -9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1

牛黄为牛科动物牛 [*Bos Taurus domesticus* Gmelin (Bovidae) or *Bubalus bubalis* Linnaeus (Bovidae)] 的干燥胆结石。味甘, 性凉, 归心、肝经。功能清心、豁痰、开窍、凉肝、息风、解毒。主治热病神昏、中风痰迷、惊痫抽搐、咽喉肿痛、口舌生疮、痈肿疔疮。由牛黄遣方的珠黄散、牛黄生肌

散和锡类散等经典方可有效治疗口腔溃疡、烧伤和溃疡性结肠炎等<sup>[1-3]</sup>。牛黄具显著的抗氧化活性, 可明显减轻血吸虫病肝纤维化程度, 抗肝纤维化<sup>[4]</sup>, 其活性成分牛磺酸能促进 cAMP 生成, 显著抑制 3T3 细胞增殖、胶原和透明质酸合成<sup>[5]</sup>。但至今未见有关牛黄对原代培养的口腔成纤维细胞增殖及胶原

Received: September 23, 2008; Accepted: December 18, 2008

Corresponding author: Jun Chen. Tel: +86-511-88780196; E-mail: syxchenjun@126.com

合成影响的报道,更未见对胞外基质沉积起重要调节作用的基质金属蛋白酶(MMPs)和组织金属蛋白酶抑制因子(TIMPs)影响的报道。本试验建立原代小鼠口腔成纤维细胞体外培养模型,研究牛黄对原代小鼠口腔成纤维细胞增殖、胶原合成、基质金属蛋白酶-2、-9 (MMP-2、-9) 和组织金属蛋白酶抑制因子-1 (TIMP-1)的影响,揭示牛黄在溃疡愈合过程中的作用及机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

牛黄购自江苏存仁堂有限公司(批号 073),经江苏大学药学院韩邦兴博士鉴定且标本保存于本实验室。DMEM 培养基、胰蛋白酶、羟脯氨酸对照品、MTT 等购自美国 AMRSCO 公司,氯胺-T、SDS 等购自中国国药集团化学试剂有限公司,TIMP-1 ELISA 试剂盒购自中国武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.2 小鼠口腔原代成纤维细胞培养

BALB/c 小鼠 (20 g±2 g)购自江苏大学试验动物中心。小鼠脱颈处死,无菌条件下取口腔粘膜,采用组织块法培养小鼠口腔成纤维细胞<sup>[6]</sup>。

### 1.3 药物配制

牛黄先溶于 DMSO 中,以 10%胎牛血清 (FCS) 的 DMEM 培养基稀释成 31.25、62.5、125、250、500 μg/mL 系列浓度梯度,DMSO 终浓度小于 0.5% 并且预试验显示对细胞生长无影响。

### 1.4 细胞增殖试验

采用 MTT 法检测牛黄对口腔成纤维细胞增殖的影响<sup>[6]</sup>。含 10%胎牛血清 DMEM 培养基 (含 0.5% DMSO)作为空白对照。培养 48 h 后与空白对照相比出现显著性差异 ( $P < 0.05$ )的最小浓度作为最小有效浓度。

### 1.5 羟脯氨酸测定

采用氯胺-T 法检测牛黄对口腔成纤维细胞胶原合成的影响<sup>[7]</sup>。含 10%胎牛血清 DMEM 培养基 (含 0.5% DMSO)作为空白对照。试验结果以 106 个细胞产生的胶原量 (mg)表示,并假定胶原的羟脯氨酸含量为 13.5%。

### 1.6 明胶酶谱分析

成纤维细胞 ( $2 \times 10^5$ )接种于 6 孔板,加含牛黄

(31.25 μg/mL)的 10%胎牛血清 DMEM 培养基,以 10%胎牛血清 DMEM 培养基 (含 0.5% DMSO)为空白对照,以 1%胎牛血清 DMEM 培养基和含冰片 (18.75 μg/mL)10%胎牛血清 DMEM 培养基为阴性和阳性对照。培养 72 h,超声破碎细胞并收集裂解液,12 000 r/min 离心 30 min,贮藏于-70°C 冰箱。MMP-2、-9 活性用明胶酶谱试验测定并以电泳条带的面积及灰度值的乘积表示<sup>[8]</sup>。

### 1.7 TIMP-1ELISAs 测定

细胞裂解液如上试验 (1.6)收集,TIMP-1 测定根据 ELISAs 试剂盒操作指南进行。

### 1.8 统计学处理

以 SPSS13.0 统计软件对试验数据进行独立样本 *t* 检验或单因素方差检验,结果以平均数±标准差表示。

## 2 结果

### 2.1 原代细胞生长情况

培养 7 d 后,组织块周围开始长出成纤维细胞。培养 15 d 后,培养瓶 80%瓶底长满细胞,细胞呈长纺锤状 (图 1A)。传代并以差速贴壁法自然纯化,传至第 2 代细胞呈纺锤状或多边形 (图 1B)。传至第 3 代时,细胞多数呈纺锤状,少量细胞呈片状 (图 1C)。试验所用为 3~4 代的细胞。

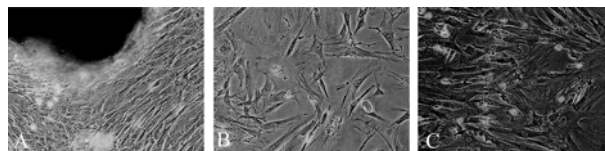


图 1 小鼠口腔成纤维细胞的形态特征  
Fig. 1 Morphological appearance of mice oral fibroblasts. (A) Primary cultured fibroblasts (15 d). (B) Subcultured fibroblasts (the 2nd generation); (C) Subcultured fibroblasts (the 3rd generation).

### 2.2 牛黄对成纤维细胞增殖的影响

如图 2 所示,牛黄在 31.25~500 μg/mL 浓度下可浓度依赖性地抑制成纤维细胞生长。在 31.25 μg/mL 浓度下,培养 48 h 后,牛黄可显著 ( $P < 0.05$ )抑制成纤维细胞生长;培养 72 h 可达到极显著性水平 ( $P < 0.01$ )。

### 2.3 牛黄对成纤维细胞胶原合成的影响

如图 3 所示,牛黄在 31.25~500 μg/mL 浓度下可浓度依赖性地抑制成纤维细胞胶原的合成,在

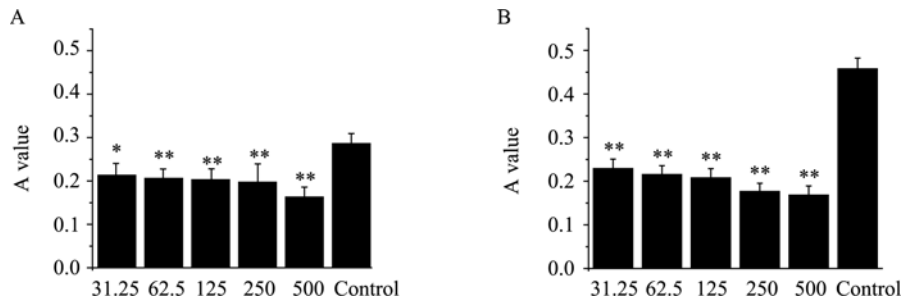


图2 牛黄对成纤维细胞增殖的影响(μg/mL)

Fig. 2 Effect of calculus bovis on fibroblast proliferation (μg/mL). (A) After 48 h. (B) After 72 h.  $n=5$ ; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

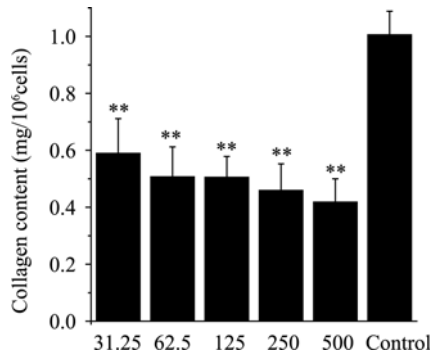


图3 牛黄对成纤维细胞胶原合成的影响

Fig. 3 Effect of calculus bovis on the collagen production.  $n=5$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

31.25 μg/mL 浓度下, 培养 72 h 后可达到极显著性水平 ( $P < 0.01$ ).

#### 2.4 牛黄对成纤维细胞 MMP-2、-9 活性的影响

如图 4 所示, 牛黄在 31.25 μg/mL 浓度下可显著 ( $P < 0.05$ ) 抑制成纤维细胞 MMP-2 的活性, 对 MMP-9 活性没影响。

#### 2.5 牛黄对成纤维细胞 TIMP-1 合成的影响

如图 5 所示, 牛黄在 31.25~125 μg/mL 浓度下可

极显著 ( $P < 0.01$ ) 抑制成纤维细胞 TIMP-1 合成。

### 3 讨论

中医外科对溃疡治疗常采用祛腐生肌药, 以达祛腐、解毒、生肌、收敛之功。现代医学认为溃疡愈合可分炎症反应期、肉芽组织形成期 (主要为成纤维细胞和内皮细胞游动、增殖) 和组织改建期 3 个阶段。本研究显示牛黄能显著抑制小鼠口腔成纤维细胞增殖和胶原合成, 故推测其在溃疡愈合中的主要作用不是生肌, 由于牛黄有很强的抗炎作用, 因此推测其在溃疡愈合中的主要作用可能是解毒。

基质金属蛋白酶主要包括胶原酶 (MMP-1、MMP-8、MMP-13 等)、明胶酶 (MMP-2、MMP-9 等) 和基质溶素等。明胶酶主要有明胶酶 A (MMP-2) 和明胶酶 B (MMP-9), 作用底物为明胶、胶原 I、IV、V 型及弹性蛋白。TIMPs 是 MMPs 的内源性特异性抑制因子, 维持胞外基质正常代谢的关键在于 MMPs 与 TIMPs 之间的动态平衡<sup>[9]</sup>。TIMPs 有 TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3 和 TIMP-4 四种类型, 而

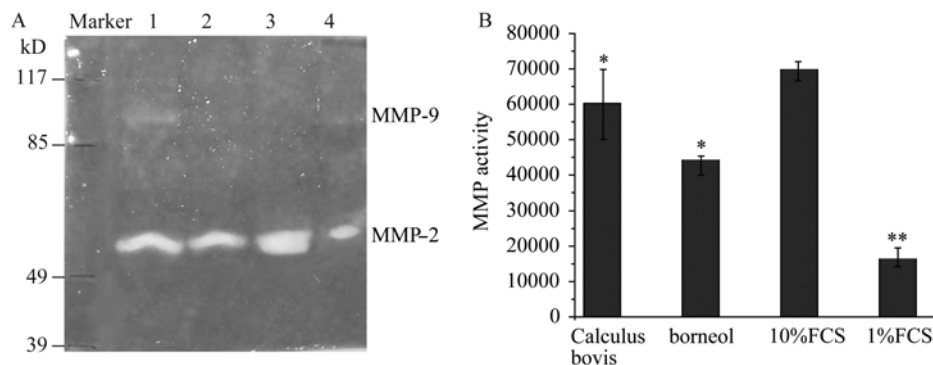


图4 牛黄对成纤维细胞金属蛋白酶-2、-9 活性的影响

Fig. 4 Effect of calculus bovis on MMP-2, -9 activities. (A) Results of gelatin zymography. 1: calculus bovis (31.25 μg/mL); 2: borneol (18.75 μg/mL); 3: 10% FCS control; 4: 1% FCS control. (B) Activity of MMP-2 quantified by scanning densitometry.  $n=3$ ; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

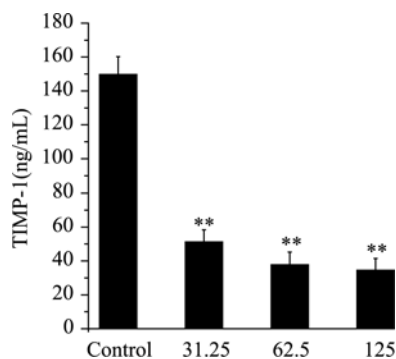


图 5 牛黄对成纤维细胞金属蛋白酶抑制因子-1 的影响 (ng/mL)

Fig. 5 Effect of calculus bovis on the production of TIMP-1 (ng/mL).  $n = 3$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

研究最多的是 TIMP-1 和 TIMP-2。TIMPs 可与 MMPs 非共价结合而抑制大多数 MMPs 活性。本试验考察了牛黄对小鼠口腔成纤维细胞 MMPs 和 TIMPs 的影响。

本试验显示牛黄能显著 ( $P < 0.05$ ) 抑制 MMP-2 活性, 同时极显著 ( $P < 0.01$ ) 抑制 TIMP-1 的产生。由于 TIMP-1 能与 MMPs 结合而抑制 MMPs 活性, 因此 MMP-2 和 TIMP-1 活性同时被抑制的现象似不合理。然而大量文献资料显示 MMP-2 和 TIMP-1 活性可同时被显著抑制或促进<sup>[10-13]</sup>, 这一现象可能与 TIMPs 特异性有关: TIMP-1 对 MMP-1、-3 和 -9 有较高的亲和力<sup>[14,15]</sup>, 而 TIMP-2 对 MMP-2 有较高的亲和力<sup>[16,17]</sup>。本研究中牛黄极显著抑制 TIMP-1 合成可能会相对增加胶原酶(MMP-1)活性, 故胶原沉积被显著抑制。另外 MMP-2 活性下降也可能与 TIMP-2 合成有关。

本试验证实牛黄可抑制小鼠口腔成纤维细胞增殖和胶原沉积, 其抑制胶原沉积的机制可能与极显著抑制 TIMP-1 有关。

## REFERENCES

- [1] Fukunaga K, Hida N, Ohnishi K, *et al.* A suppository chinese medicine (Xilei-san) for refractory ulcerative proctitis: A pilot clinical trial. *Digestion*, 2007, **75**(2-3): 146-147.
- [2] Pan XQ. A clinical observation on the treatment of recurrent aphtha with Zhu Huang San oral paste. *Chin JMAP*, 2001, **18**(5): 409-410.  
潘湘清. 珠黄散口腔糊剂治疗复发性口腔溃疡的临床观察. *中国现代应用药学*, 2001, **18**(5): 409-410.
- [3] Zhang YL, Wang JL, Li M, *et al.* Research of treating ROU of traditional Chinese medicine calculus bovis. *J Clin Stomatol*, 2002, **18**(3): 219-221.  
张延琳, 王嘉陵, 李明, 等. 体外培育牛黄糊剂治疗口疮类病损的临床疗效观察. *临床口腔医学杂志*, 2002, **18**(3): 219-221.
- [4] Liang ZP, Yang Z, Cai HJ, *et al.* The effects of *in vitro* cultivated calculus bovis compound preparation (ICCBco) on extracellular matrix in rabbit experimental liver fibrosis induced by with schistosomia japonicum. *Guangdong Med J*, 2005, **26**(8): 1044-1045.  
梁志鹏, 杨镇, 蔡红娇, 等. 体外培育牛黄制剂对实验性血吸虫病家兔肝纤维化组织细胞外基质的影响. *广东医学*, 2005, **26**(8): 1044-1045.
- [5] Chen YX, Li S, Kong XT. Effect of taurine on proliferation and function of fibroblasts. *Ti Erh Chun i Ta Hsueh Hsueh Pao*, 1996, **17**(6): 548-550.  
陈岳祥, 李石, 孔宪琦. 牛磺酸对成纤维细胞增殖及功能的影响. *第二军医大学学报*, 1996, **17**(6): 548-550.
- [6] O'leary R, Rerek M, Wood EJ. Fucoidan modulates the effect of transforming growth factor (TGF)-beta1 on fibroblast proliferation and wound repopulation *in vitro* models of dermal wound repair. *Biol Pharm Bull*, 2004, **27**(2): 266-270.
- [7] Edwards CA, O'brien WD. Modified assay for determination of hydroxyproline in a tissue hydrolyzate. *Clin Chim Acta*, 1980, **104**(2): 161-167.
- [8] Gibbs DF, Warner RL, Weiss SJ, *et al.* Characterization of matrix metalloproteinases produced by rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999, **20**(6): 1136-1344.
- [9] Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, *et al.* The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, **40**(6-7): 1362-1378.
- [10] He S, Prasanna G, Yorio T. Endothelin-1-mediated signaling in the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in astrocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, **48**(8): 3737-3745.
- [11] Brown RD, Jones GM, Laird RE, *et al.* Cytokines regulate matrix metalloproteinases and migration in cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **362**(1): 200-205.
- [12] Conley SM, Bruhn RL, Morgan PV, *et al.* Selenium's effects on MMP-2 and TIMP-1 secretion by human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, **45**(2): 473-479.
- [13] Kwak HJ, Park MJ, Cho H, *et al.* Transforming growth factor-beta1 induces tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression via activation of extracellular signal-regulated kinase and Sp1 in human fibrosarcoma cells. *Mol Cancer Res*, 2006, **4**(3): 209-220.
- [14] Van den Steen PE, Dubois B. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2002, **37**(6): 375-536.
- [15] Muller M, Trocme C. Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: The ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. *Diabet Med*, 2008, **25**(4): 419-426.
- [16] Cook TF, Burke JS. Cloning and regulation of rat tissue inhibitor of metalloproteinases-2 in osteoblastic cells. *Arch Biochem Biophys*, 1994, **311**(2): 313-320.
- [17] Aoki T, Kataoka H. Role of TIMP-1 and TIMP-2 in the progression of cerebral aneurysms. *Stroke*, 2007, **38**(8): 2337-2345.