

原儿茶酸促进人脂肪干细胞体外增殖的研究*

王 晗¹⁾ 刘天庆^{1)**} 朱艳霞¹⁾ 关 水¹⁾ 马学虎¹⁾ 崔占峰²⁾

(¹⁾大连理工大学干细胞与组织工程研发中心, 大连 116024; (²⁾Department of Engineering Science, Oxford University, Oxford OX1 3PJ, UK)

摘要 为了寻找能够促进干细胞增殖的药物, 观察了中药益智仁(*Alpinia oxyphylla*)中提取的原儿茶酸对人脂肪干细胞体外增殖的影响, 并对其作用机制进行了初步的探讨. 人脂肪干细胞能在体外分化为神经元样细胞, 并对凋亡的 PC-12 细胞起到保护作用. 原儿茶酸能够促进人脂肪干细胞的增殖, 且呈现明显的剂量依赖性和时间依赖性. 流式细胞术检测细胞 DNA 含量的结果显示, 原儿茶酸处理组细胞 S 期所占比例明显增加, 其中, 1.5 mmol/L 原儿茶酸处理组细胞 S 期所占比例与对照组相比增加 2 倍以上. 同时, 该组细胞 G2/M 期所占比例明显增加, G0/G1 期所占比例明显下降. 蛋白质免疫印迹结果显示, 1.5 mmol/L 原儿茶酸处理组细胞周期素 D1(cyclin D1)的表达明显升高. cyclin D1-siRNA 转染显著抑制了原儿茶酸对人脂肪干细胞体外增殖的促进作用. 流式细胞术检测细胞表面标志物, 成骨诱导和脂肪诱导的结果显示, 原儿茶酸处理后, 人脂肪干细胞仍保持间充质干细胞多分化潜能特性. 上述结果提示, 原儿茶酸有可能在人脂肪干细胞介导的干细胞移植治疗中发挥作用.

关键词 原儿茶酸, 脂肪干细胞, 增殖, 细胞周期, 细胞周期素 D1(cyclin D1)

学科分类号 Q253, R961

脂肪干细胞是脂肪组织中一类多能干细胞, 其在体内外特定的条件下, 可分化形成多种细胞类型, 如脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞、神经细胞、肌肉细胞等^[1]. 由于脂肪干细胞易于分离, 且可以在体外条件下大量扩增和长期稳定培养^[1, 2], 因此, 可以作为组织再生工程理想的细胞源.

在细胞移植组织重建的过程中, 需要为新组织的形成提供足够的细胞来源. 但是, 多数情况下, 移植的细胞不能很好地存活和增殖^[3, 4], 因此, 找到合适的药物或生长因子等来促进移植的干细胞增殖对于提高干细胞移植治疗的效果至关重要.

研究发现, 一些生长因子(如表皮生长因子 EGF, 碱性成纤维细胞生长因子 bFGF)^[5~7], Wnt 相关分子^[8, 9]和神经递质如 γ -氨基丁酸(GABA)、谷氨酸(glutamate)^[10, 11]等可以诱导干细胞增殖. 中药龟板(tortoise shell), 三七总皂甙(total saponin from *Panax notoginseng*)和中药丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge)中分离提取的有效单体丹参酮 II A (Tan II A)^[12~14]也能有效促进干/祖细胞的增殖, 提示中药可以作为促进干细胞增殖药物的重要来源.

原儿茶酸(protocatechuic acid, PCA)是中药丹

参、芙蓉(*Hibiscus sabdariffa* L.)、益智仁(*Alpinia oxyphylla*)中的有效活性成分, 具有抗氧化、抑制肿瘤细胞生长和诱导 HL60 白血病细胞、HepG2 肝癌细胞凋亡的作用^[15~19]. 但其对干细胞增殖的影响未见报道. 本研究观察了人脂肪干细胞体外条件下向神经细胞的诱导分化和对 PC-12 细胞的凋亡保护作用, 以及益智仁中提取的原儿茶酸对人脂肪干细胞体外增殖的影响, 并对原儿茶酸的作用机制进行了初步的探讨.

1 材料与方法

1.1 试剂

原儿茶酸提取自益智仁^[15, 20], 经高压液相色谱分析纯度大于 98%. 细胞计数试剂盒(CCK-8)购自日本株式会社同仁化学研究所. 碘化丙锭(PI)和 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自 Biovision 公司. RNA 酶购自宝生物工程有限公司. 抗人细胞

* 国家自然科学基金资助项目(30670525, 30700181).

** 通讯联系人.

Tel: 0411-84706360, E-mail: liutq@dlut.edu.cn

收稿日期: 2008-02-01, 接受日期: 2008-07-21

周期素 D1(cyclin D1)多克隆抗体, 抗人 β -actin 单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的第二抗体, FITC 标记的第二抗体购自博士得生物工程有限公司. 超敏 ECL 发光液购自普利莱基因技术有限公司. 抗 NSE 多克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司. 抗 GFAP 多克隆抗体, cyclin D1 siRNA (h)和 siRNA Reagent System 购自 Santa Cruz 公司. 荧光标记抗 CD34, CD13, CD29, CD44, CD45, HLADR 单克隆抗体购自 Becton Dickinson 和 Chemicon 公司.

1.2 脂肪干细胞的分离与培养

用于脂肪干细胞分离培养的脂肪组织经患者同意取自择期手术的患者皮下组织. 无钙镁磷酸盐缓冲液冲洗 2~3 次, 用眼科剪和眼科镊除去脂肪组织膜和血管并剪成 1 mm³ 大小的碎块, 0.1% I 型胶原酶和 0.25% 胰酶 37℃ 消化 40 min, 期间搅拌 4~5 次, 消化结束后加入完全培养基(含 10% 胎牛血清的 DMEM), 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清去除悬浮的脂肪细胞及脂滴, 细胞沉淀重悬于完全培养基, 接种于培养瓶中, 于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 24 h 后换培养液除去未贴壁细胞, 之后每 3 天换液, 细胞融合后用 0.25% 胰酶和 1 mmol/L EDTA 37℃ 消化 3~5 min, 含 10% 胎牛血清 DMEM 终止消化, 按 1:2 的比例传代. 第 10~15 代细胞用于以下实验.

1.3 脂肪干细胞向神经细胞诱导分化

脂肪干细胞接种于置有无菌圆形玻片的 24 孔板中, 长至 60%~70% 融合时, 取 SD 大鼠(80~100 g), 断颈处死, 无菌条件下取脑组织, 加入 10 ml 培养基(DMEM) 4℃ 2 h, 每隔 15 min 搅拌一次. 离心(15 000 g, 15 min, 4℃)收集上清, 0.22 μ m 滤膜滤过. 以大鼠脑组织上清孵育细胞 3 天后, 免疫荧光检测神经元特异性烯醇化酶(NSE)、神经胶质细胞特异性的胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达.

1.4 脂肪干细胞培养上清对去血清诱导的 PC-12 细胞凋亡的保护作用

人脂肪干细胞体外培养至 90% 融合, 去除含血清培养基, PBS 洗 3 次, 加入无血清 DMEM 继续培养 5 天, 收集培养上清. 以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养 PC-12 细胞(购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所)至 60%~70% 融合, 去除含血清培养基, PBS 洗 3 次, 分别加入收集的人脂肪干细胞培养上清或无血清 DMEM 培养基继续培养, 以正常培养的 PC-12 细胞作为对照组, 进行细

胞活力的检测和细胞凋亡的检测.

1.5 细胞计数

将人脂肪干细胞以 1.5×10^4 /cm² 的密度接种于 96 孔培养板, 培养于含 15 % 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 37℃, 5% CO₂ 培养 48 h 后, 更换培养基为 DMEM, 同时加入不同浓度的原儿茶酸并按照规定的时间培养(以不加原儿茶酸的细胞作为对照组). 培养结束后, 每孔加入细胞计数试剂盒中的 CCK-8 溶液 10 μ l, 在细胞培养箱内继续孵育 2 h 后, 分别用酶标仪(BioTek 公司)在 450 nm 测定吸光度. 每组实验重复 3 次.

1.6 细胞周期与细胞凋亡的检测

不同浓度原儿茶酸处理 48 h 的人脂肪干细胞和对照组细胞, 经胰酶消化收集, 分别用于细胞周期和细胞凋亡的检测.

细胞周期的检测: 收集的细胞经冷磷酸缓冲液洗涤, 重悬于 75% 乙醇, 然后于 -20℃ 过夜固定, 冷磷酸缓冲液再次洗涤, 含 50 mg/L RNA 酶的碘化丙锭染液(20 mg/L)重悬细胞沉淀, 37℃ 孵育 30 min. 流式细胞术检测 DNA 含量, ModFit LT 软件分析细胞周期.

细胞凋亡早期的检测: 收集的细胞经含血清的培养基洗涤后, 重悬于 500 μ l 结合缓冲液. 加入 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒中的 FITC 标记的 Annexin V 溶液 5 μ l 和碘化丙锭溶液 5 μ l 混匀, 避光放置 5 min 后流式细胞术检测.

1.7 蛋白质免疫印迹

1.5 mmol/L 原儿茶酸处理 48 h 的人脂肪干细胞和对照组细胞经磷酸缓冲液洗涤, 加入裂解缓冲液(50 mmol/L Tris pH 7.4, 150 mmol/L 氯化钠, 1% NP-40, 0.5% 脱氧胆酸钠, 0.1% 十二烷基硫酸钠(SDS), 2 mg/L 亮抑酶肽(leupeptin), 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF))冰浴 30 min, 14 000 g 4℃ 离心 10 min, 上清加入 5 $\times$ SDS 上样缓冲液, 97℃ 5 min 变性蛋白质. 取 50 μ g 蛋白质样品上样到 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶加样孔内进行电泳, 电泳结束后将蛋白质电转移到硝酸纤维素(NC)膜上, 5% 脱脂奶粉(溶于 0.05% 吐温-20/磷酸缓冲液, PBS-T)室温封闭 1 h. PBS-T 洗膜, 第一抗体(抗 cyclin D1 多克隆抗体, 1:500; 抗 β -actin 单克隆抗体, 1:1 000) 4℃ 孵育过夜, PBS-T 洗膜, 辣根过氧化物酶标记的第二抗体室温孵育 1 h, PBS-T 洗膜, 加入超敏 ECL 发光液, 暗室中 X 光胶片上曝光, 显影.

1.8 cyclin D1 siRNA 转染人脂肪干细胞

细胞接种于培养板, 待细胞生长达到 60%~70%融合, 应用 siRNA Reagent System 进行转染. 转染过程按照试剂操作说明进行. siRNAs 终浓度为 50 nmol/L, 以非特异性 siRNA (control siRNA-A) 作为对照. 转染后 48 h 进行蛋白质免疫印迹分析 cyclin D1 蛋白表达水平, 并检测细胞增殖能力.

1.9 PCA 处理前后人脂肪干细胞的鉴定

流式细胞术检测细胞表面抗原标记时, 细胞经酶解制成单细胞悬液, 分别加入荧光标记抗 CD34, CD13, CD29, CD44, CD45 和 HLADR 单克隆抗体, 于 4℃ 避光孵育 30 min, 流式细胞仪检测.

成骨诱导^[21]: 细胞达 80%融合时更换培养基为成骨诱导培养基, 即含 10%胎牛血清、0.1 μmol/L 地塞米松、10 mmol/L β-甘油磷酸钠、50 μmol/L 抗坏血酸的 DMEM, 3~4 天换液一次, 4 周后行 von Kossa 染色^[22].

脂肪诱导^[21]: 细胞达 80%融合时更换培养基为脂肪诱导培养基, 即含 10%胎牛血清、0.1 μmol/L 地塞米松、10 μmol/L 胰岛素、200 μmol/L 吡哆美辛、0.5 mmol/L 异丁甲基黄嘌呤的 DMEM, 3~4 天换液一次, 2 周后行油红 O 染色.

1.10 统计学处理

所得数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 应用 SPSS11.5 统计软件包进行 *t* 检验, $P \leq 0.05$ 为有显著性差异.

2 结 果

2.1 脂肪干细胞分化为神经元样细胞

向神经细胞诱导分化后, 部分细胞的长梭形胞体收缩变圆, 细胞体积变小, 伸出细长的突起, 形成双极化细胞. 免疫组织化学显示, 双极化细胞表

达神经元特异性烯醇化酶(NSE)(图 1), 未检测到神经胶质细胞特异性的胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达.

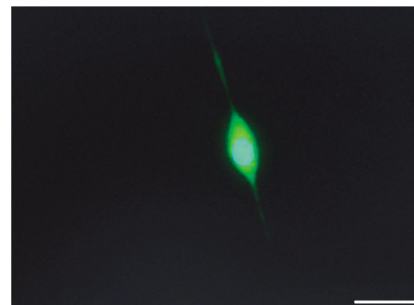


Fig. 1 Differentiation of hADSCs toward neuron-like cells induced by soluble factors from rat brain

Human ADSCs were incubated for 3 days in conditioned medium derived from rat brain and analyzed for NSE expression by immunofluorescence. The nuclei were stained with Hoechst 33342.

2.2 脂肪干细胞对去血清诱导的 PC-12 细胞凋亡具有保护作用

PC-12 细胞是大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤, 常作为研究神经细胞凋亡的细胞模型. 细胞活性的检测结果显示, 随着去血清处理时间的延长, PC-12 细胞的细胞活力与对照组相比逐渐降低. 去血清后第 3 天, PC-12 细胞的细胞活力下降至 49%, 而人脂肪干细胞培养上清处理 3 天能使 PC-12 细胞的细胞活力明显提高至 68%, 结果具有显著性差异(图 2a).

Annexin-V 与 PI 染色流式细胞术检测 PC-12 细胞凋亡的结果显示, 去血清处理后第 3 天, PC-12 细胞的早期凋亡细胞比例和晚期凋亡/坏死细胞比例明显升高, 分别为 25%和 17%, 明显高于对照组细胞, 人脂肪干细胞培养上清处理能够显著降低早期凋亡细胞比例(至 8%)和晚期凋亡/坏死细胞比例(至 7%), 提示人脂肪干细胞能够抑制去血清诱导的 PC-12 细胞的凋亡(图 2b).

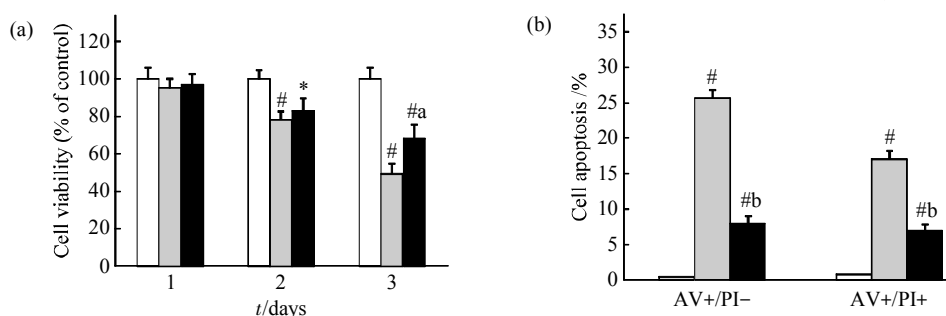


Fig. 2 Effect of hADSCs on cell viability and apoptosis of PC12 cells in serum free condition

Cell viability was quantified using cell counting kit-8 (a). Cell apoptosis was examined by FACS analysis after staining with Annexin V and propidium iodide (b). Data are expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$) and as a percentage of control. * indicates $P < 0.05$ compared with control cells. # indicates $P < 0.01$ compared with control cells. #a indicates $P < 0.05$ compared with serum-deprived cells. #b indicates $P < 0.01$ compared with serum-deprived cells. □: Control; ▤: Serum deprivation; ■: Conditioned medium.

2.3 原儿茶酸促进人脂肪干细胞增殖

原儿茶酸处理的细胞及对照组细胞计数结果显示, 0.5 mmol/L, 1.0 mmol/L 和 1.5 mmol/L 的原儿茶酸能够明显促进人脂肪干细胞的增殖, 与对照组相比细胞数分别提高 61%, 78%和 110%, 呈现明

显的剂量依赖性(图 3a). 1.5 mmol/L 原儿茶酸处理人脂肪干细胞后分别于不同的时间点(24 h, 48 h, 72 h)检测细胞数, 与对照组相比细胞数明显升高, 且呈明显的时间依赖性(图 3b).

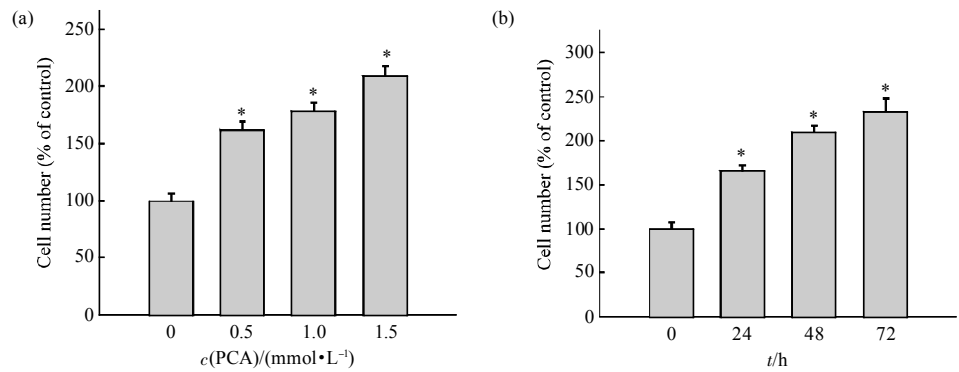


Fig. 3 Effects of PCA from *A. oxyphylla* on the cell growth of human adipose-derived stem cells (hADSCs)
Cell numbers were quantified using Cell Counting kit-8. (a) Treatment with 0.5 mmol/L, 1.0 mmol/L and 1.5 mmol/L PCA for 48 h significantly enhanced the cell growth of hADSCs in a dose-dependent manner. (b) Treatment with 1.5 mmol/L PCA for the indicated time significantly enhanced the cell growth of hADSCs in a time-dependent manner. Data are expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=4$) and as a percentage of control. * indicates $P < 0.05$ in comparison with control cells.

2.4 原儿茶酸促进细胞从 G1 向 S 期过渡

碘化丙锭染色流式细胞术检测细胞 DNA 含量的结果显示, 不同浓度的原儿茶酸处理人脂肪干细胞 48 h 后, 处于 S 期和 G2/M 期的细胞所占比例呈上升趋势, 同时, 处于 G0/G1 期的细胞所占比例呈下降趋势(表 1). 经 0.5 mmol/L, 1.0 mmol/L 和 1.5 mmol/L 原儿茶酸处理的人脂肪干细胞 S 期所占比例明显增加, 与对照组相比具有显著性差异. 其中, 1.5 mmol/L 原儿茶酸处理组细胞 S 期所占比例与对照组相比增加 2 倍以上. 同时, 该组细胞 G2/M 期所占比例明显增加, G0/G1 期所占比例明显下降, 与对照组相比均具有显著性差异(表 1). 各原儿茶酸处理组和对照组均未检测到 sub-G1 (DNA content < 2N) 所代表的凋亡峰. 流式细胞术检测凋亡早期的结果显示, 各原儿茶酸处理组与对照组相比, 凋亡早期细胞所占比例没有显著性差异.

2.5 原儿茶酸上调 cyclin D1 的蛋白表达

细胞从 G1 期向 S 期的过渡开始于 Cdk4/6-cyclin D 复合物的形成和激活以及随后的 Cdk2-cyclin E 的激活. 蛋白质免疫印迹检测细胞周期素 D1(cyclin D1)表达的结果显示, 1.5 mmol/L原儿茶酸处理人脂肪干细胞 48 h 后, cyclin D1 的表达与对照组相比明显升高(图 4), 提示原儿茶酸促进人脂肪干细胞细胞周期从 G1 期向 S 期的过渡可能与 cyclin D1 的上调有关.

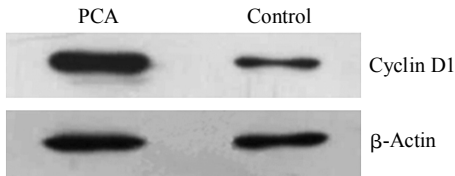


Fig. 4 Effects of PCA from *A. oxyphylla* on cyclin D1 protein expression in hADSCs
Cells were treated with 1.5 mmol/L PCA or left untreated for 48 h. Western blot analysis showed that cyclin D1 protein level increased in cells treated with PCA. Representative data from three independent experiments are shown.

Table 1 Cell cycle distribution analyzed by flow cytometric analysis indicating promotion of the G0/G1 to S phase transition of hADSCs by PCA			
c(PCA)/(mmol·L ⁻¹)	G0/G1/%	S/%	G2/M/%
0	89.71±0.55	0.97±0.16	9.32±0.48
0.5	87.99±1.27	2.29±0.24*	9.72±1.51
1.0	86.75±2.43	2.47±0.12*	10.78±2.39
1.5	81.68±1.31*	3.01±0.18*	15.31±1.37*

* Significantly different from the control ($P < 0.05$).

2.6 cyclin D1-siRNA 转染对原儿茶酸促进人脂肪干细胞体外增殖的影响

蛋白质免疫印迹结果显示, cyclin D1-siRNA 转染后, cyclin D1 的蛋白质表达水平显著降低, 与对照组相比下降至 46%(图 5). 在体外增殖试验

中, cyclin D1-siRNA 转染后人脂肪干细胞的体外增殖与对照组相比下降 26%, 在 PCA(1.5 mmol/L) 处理组, 抑制作用更为显著, 细胞增殖下降 45% (图 6), 提示 cyclin D1-siRNA 显著抑制了原儿茶酸对人脂肪干细胞体外增殖的促进作用。

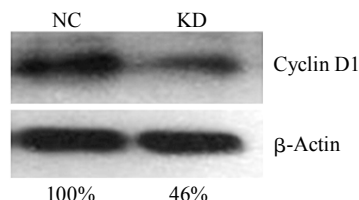


Fig. 5 siRNA-mediated knockdown of cyclin D1 in hADSCs on protein level

hADSCs transfected with siRNAs targeting the gene expression of cyclin D1 (KD) and transfected with non-target-directed control siRNA (NC) were cultivated for 48 h and analyzed by Western blot. For densitometric quantification, the expression of cyclin D1 in the cells transfected with control siRNA (NC) was set as 100%.

2.7 原儿茶酸处理前后人脂肪干细胞的鉴定

流式细胞术检测结果显示, 原儿茶酸处理前后, 人脂肪干细胞均表达细胞表面标记 CD13, CD29 和 CD44, 不表达 CD34, CD45 和 HLADR (图 7a). 向成骨诱导后, 细胞变成多角形、不规则形, 局部重叠生长, Von Kossa 染色可见黑色结节

(图 7b), 表明细胞可以矿化细胞外基质而形成钙盐沉积. 脂肪诱导后, 可见部分细胞变圆, 显微镜下见胞浆内脂滴形成, 油红 O 染色呈桔红色(图 7b). 结果提示, 原儿茶酸处理后人脂肪干细胞仍保持间充质干细胞多分化潜能特性。

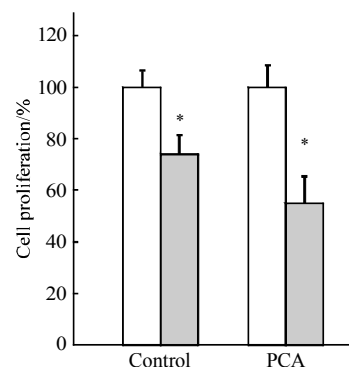


Fig. 6 Alteration in cell proliferation after treatment with PCA and transfection with Cyclin D1-siRNA

A significant reduction in cell proliferation by 26% was observed as a consequence of the knockdown of cyclin D1 compared with nc-siRNA transfected hADSCs (set as 100%). This effect was even more pronounced upon treatment of 1.5 mmol/L PCA (45%). Data are expressed as $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments. * indicates $P < 0.05$ compared with nc-siRNA-treated cells. The incubation time for all the cell groups was 48 h. □: nc-siRNA; ▒: Cyclin D1-siRNA.

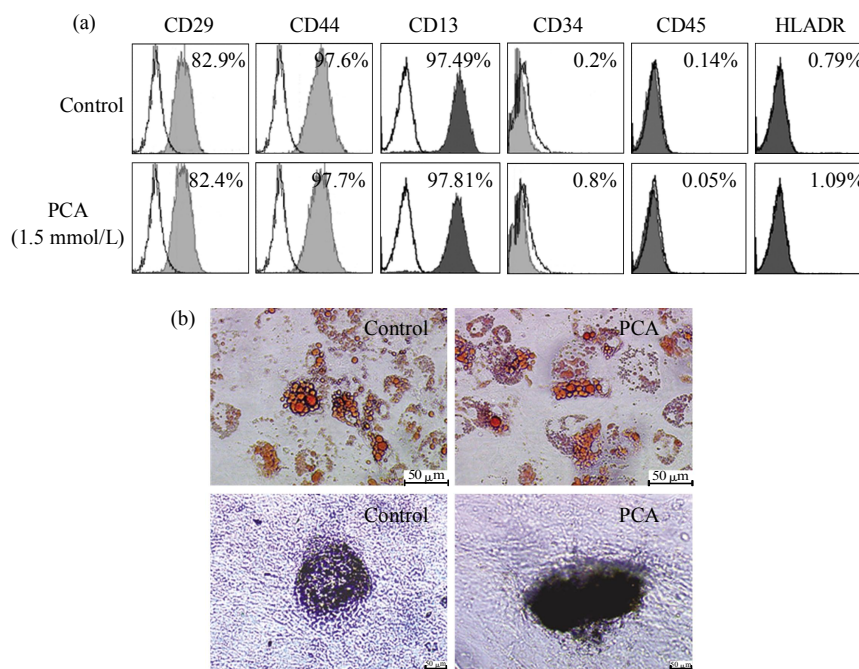


Fig. 7 Characterization of pre/post PCA treated-hADSCs

(a) Flow cytometric analysis of cell surface antigens by hADSCs. Both control cells (upper panel) and PCA-treated cells (lower panel) are positive for CD13, CD29 and CD44, and negative for CD34, CD45 and HLADR. (b) Differentiation of hADSCs into adipocytes and osteoblasts *in vitro*. Oil Red staining of hADSCs cultured for 2 weeks in adipogenic medium, shows the accumulation of lipid in the vacuoles (Upper panel). Von Kossa staining of hADSCs maintained in osteogenic media for 4 weeks. Dark staining of the nodules demonstrates the deposition of mineralized characteristic matrix of bone formation (Lower panel). Scale bar = 50 μ m.

3 讨 论

对于神经系统退行性疾病的治疗一直不够理想, 既往的神经细胞移植方法是利用胚胎神经细胞来替代病损的神经细胞, 虽然取得了一定的疗效, 但是仍存在许多缺陷, 如供体细胞的来源问题. 干细胞具有自我更新和多向分化潜能, 细胞容易获得, 体外培养后能够迅速增殖, 并且在移植之后能与宿主脑内结构相整合, 因此在神经退行性疾病的治疗领域中潜力巨大. 但是, 移植到神经退行性疾病患者脑内的干细胞不能够很好地存活^[9], 因此, 找到合适的药物促进干细胞的增殖, 有可能为新组织的形成提供足够的细胞来源, 从而有可能提高干细胞移植治疗的效果.

脂肪干细胞易于获取和分离, 且可以在体外条件下大量扩增和长期稳定培养, 是干细胞移植治疗理想的细胞源. 但是, 脂肪干细胞在治疗神经退行性疾病及与神经类药物的协同作用方面都有待进一步的实验验证. 本实验发现, 人脂肪干细胞能够在体外条件下分化为神经元样细胞, 并且其分泌的活性物质对 PC-12 细胞具有凋亡保护作用. 此外, 益智仁中提取的原儿茶酸能够促进人脂肪干细胞的增殖, 同时仍保持间充质干细胞多分化潜能的特性. 结合前人的研究结果: 益智仁中提取的原儿茶酸能够抑制细胞凋亡、提高细胞活力, 有可能对氧化应激相关的神经退行性疾病具有治疗效果^[15], 以及脂肪干细胞在体外诱导条件下和移植入体内均可分化为神经细胞^[23~25], 提示原儿茶酸有可能与人脂肪干细胞移植联合用于治疗神经退行性疾病. 对于有可能进行脂肪干细胞移植治疗的神经退行性疾病的患者, 原儿茶酸的应用不仅对凋亡的神经细胞起到保护作用, 而且可以促进脂肪干细胞的增殖, 为新组织的形成提供更多的细胞来源, 从而有利于神经退行性疾病的治疗.

细胞周期能否启动而进行细胞增殖, 主要的调控点在 G1 期的限制点. 生长因子或 Wnt 信号分子等有丝分裂信号, 可以通过数种信号转导途径, 启动多种基因, 如 cyclin D(D1, D2, D3)、cyclin E、Cdk2、Cdk4 等的转录. 首先是 cyclin D 的表达增加, 与 CDK4/6 结合形成具有蛋白激酶活性的 Cyclin D-Cdk4/6 复合物, 使 Rb 蛋白高磷酸化而失活, 释放大量转录因子(特别是 E2F), 引起一系列下游基因的激活, 其中 cyclin E 表达升高, 与 Cdk2 结合, 形成具有蛋白激酶活性的 cyclin E-

Cdk2 复合物, 进一步使 Rb 蛋白进入高磷酸化, 而使转录相关基因继续表达, 产生或激活多种细胞周期相关蛋白, 使细胞通过限制点, 进入 S 期. 通过限制点之后, 即使缺乏生长因子等的刺激, 细胞也能依次通过 S 期, G2 期和 M 期而完成细胞分裂. 本实验发现, 原儿茶酸能够促进人脂肪干细胞的增殖, 促进其从 G1 期向 S 期的过渡, 同时上调了 cyclin D1 的表达, cyclin D1-siRNA 转染显著抑制了原儿茶酸对人脂肪干细胞体外增殖的促进作用. 提示原儿茶酸有可能通过促进生长因子或 Wnt 信号分子等的分泌或调节其信号转导过程, 增加 cyclin D1 的表达, 而提高人脂肪干细胞的增殖能力.

参 考 文 献

- 1 Zuk P A, Zhu M, Mizuno H, *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 2001, **7**(2): 211~228
- 2 Dicker A, Le Blanc K, Astrom G, *et al.* Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res*, 2005, **308** (2): 283~290
- 3 Einstein O, Ben-Menachem-Tzidon O, Mizrahi-Kol R, *et al.* Survival of neural precursor cells in growth factor-poor environment: implications for transplantation in chronic disease. *Glia*, 2006, **53** (4): 449~455
- 4 Geng Y J. Molecular mechanisms for cardiovascular stem cell apoptosis and growth in the hearts with atherosclerotic coronary disease and ischemic heart failure. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, **1010**: 687~697
- 5 Bartlett P F, Richards L R, Kilpatrick T J, *et al.* Factors regulating the differentiation of neural precursors in the forebrain. *Ciba Found Symp*, 1995, **193**: 85~99
- 6 Johe K K, Hazel T G, Muller T, *et al.* Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev*, 1996, **10** (24): 3129~3140
- 7 Weiss S, Reynolds B A, Vescovi A L, *et al.* Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain?. *Trends Neurosci*, 1996, **19** (9): 387~393
- 8 Dickinson M E, Krumlauf R, McMahon A P. Evidence for a mitogenic effect of Wnt-1 in the developing mammalian central nervous system. *Development*, 1994, **120** (6): 1453~1471
- 9 Neth P, Ciccarella M, Egea V, *et al.* Wnt signaling regulates the invasion capacity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2006, **24** (8): 1892~1903
- 10 Antonopoulos J, Pappas I S, Parnavelas J G. Activation of the GABAA receptor inhibits the proliferative effects of bFGF in cortical progenitor cells. *Eur J Neurosci*, 1997, **9** (2): 291~298
- 11 LoTurco J J, Owens D F, Heath M J, *et al.* GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron*, 1995, **15** (6): 1287~1298
- 12 陈东风, 杜少辉, 李伊为, 等. 电板对局灶性脑缺血再灌注后 Nestin 表达的影响. *解剖学杂志*, 2002, **25** (4): 315~318
Chen D F, Du S H, Li Y W, *et al.* *Chin J Anatomy*, 2002, **25**(4): 315~318

- 13 陈晓锋, 唐礼江, 朱敏, 等. 丹参酮 II A 对外周血内皮祖细胞增殖、粘附和迁移功能的影响. 中国药理学通报, 2007, **23** (2): 274~275
Chen X F, Tang L J, Zhu M, *et al.* Chin Pharmacological Bull, 2007, **23** (2): 274~275
- 14 程龙, 朱培纯, 司银楚, 等. 三七总皂甙对去大脑皮层血管后成年大鼠前脑侧脑室室管膜下层 Nestin 和 bFGF 表达的作用. 北京中医药大学学报, 2003, **26** (3): 18~20
Cheng L, Zhu P C, Si Y C, *et al.* J Beijing Uni TCM, 2003, **26** (3): 18~20
- 15 Guan S, Bao Y M, Jiang B, *et al.* Protective effect of protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* on hydrogen peroxide-induced oxidative PC12 cell death. Eur J Pharmacol, 2006, **538** (1~3): 73~79
- 16 Tseng T H, Hsu J D, Lo M H, *et al.* Inhibitory effect of Hibiscus protocatechuic acid on tumor promotion in mouse skin. Cancer Lett, 1998, **126** (2): 199~207
- 17 Tseng T H, Kao T W, Chu C Y, *et al.* Induction of apoptosis by hibiscus protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of retinoblastoma (RB) phosphorylation and Bcl-2 expression. Biochem Pharmacol, 2000, **60** (3): 307~315
- 18 Tseng T H, Wang C J, Kao E S, *et al.* Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. Chem Biol Interact, 1996, **101** (2): 137~148
- 19 Yip E C, Chan A S, Pang H, *et al.* Protocatechuic acid induces cell death in HepG2 hepatocellular carcinoma cells through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. Cell Biol Toxicol, 2006, **22** (4): 293~302
- 20 An L J, Guan S, Shi G F, *et al.* Protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* against MPP⁺-induced neurotoxicity in PC12 cells. Food Chem Toxicol, 2006, **44** (3): 436~443
- 21 Digirolamo C M, Stokes D, Colter D, *et al.* Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. Br J Haematol, 1999, **107** (2): 275~281
- 22 Lennon D P, Edmison J M, Caplan A I. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on *in vitro* and *in vivo* osteochondrogenesis. J Cell Physiol, 2001, **187** (3): 345~355
- 23 Jun E S, Lee T H, Cho H H, *et al.* Expression of telomerase extends longevity and enhances differentiation in human adipose tissue-derived stromal cells. Cell Physiol Biochem, 2004, **14** (4~6): 261~268
- 24 Safford K M, Hicok K C, Safford S D, *et al.* Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. Biochem Biophys Res Commun, 2002, **294** (2): 371~379
- 25 杨立业, 刘相名, 孙兵, 等. 脂肪组织源性基质细胞表达神经元表型的实验研究. 中华神经医学杂志, 2002, **1** (1): 45~47
Yang L Y, Liu X M, Sun B, *et al.* Chin J Neuromedicine, 2002, **1** (1): 45~47

Proliferative Enhancement of Human Adipose Tissue-derived Stromal Cells by Protocatechuic Acid From *Alpinia oxyphylla* *In vitro**

WANG Han¹⁾, LIU Tian-Qing^{1)**}, ZHU Yan-Xia¹⁾, GUAN Shui¹⁾, MA Xue-Hu¹⁾, CUI Zhan-Feng²⁾

¹⁾Dalian R&D Center for Stem Cell and Tissue Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China;

²⁾Department of Engineering Science, Oxford University, Oxford OX1 3PJ, UK

Abstract In an effort to find drugs for facilitating proliferation of transplanted stem cells to provide adequate new tissue, the influence of PCA from *A. oxyphylla* on the proliferation capacity of hADSCs *in vitro* was examined. Human ADSCs could differentiate into neuron-like cells *in vitro*, and protect PC-12 cells from apoptosis induced by serum deprivation. Cell counts showed that treatment of hADSCs with 0.5 mmol/L, 1.0 mmol/L and 1.5 mmol/L of PCA for 48 h increased the cell numbers in a dose-dependent manner. In addition, the cell numbers of hADSCs at various time points after treatment of 1.5 mmol/L PCA were increased in a time-dependent manner. Flow cytometric analysis of DNA content demonstrated the cell cycle progress from G1 phase to S phase. The most pronounced effect was seen with 1.5 mmol/L PCA, where the fraction of cells in S phase increased more than 2 folds, accompanied by a significant increase in the fraction of cells in G2/M phase and a significant decrease in the fraction of cells in G0/G1 phase. Western blot analysis revealed the elevated expression of cyclin D1 in hADSCs induced by 1.5 mmol/L PCA treatment. Furthermore, cyclin D1-siRNA transfection significantly inhibited the promotion of cell proliferation by PCA. Flow cytometric analysis of the cell surface antigens, osteogenic induction and adipogenic induction demonstrated that after PCA treatment, hADSCs retained their morphological and functional characteristics of multipotential mesenchymal progenitors. The proliferative enhancement of PCA suggests the possibility that PCA may be useful in hADSCs-mediated therapy.

Key words protocatechuic acid, adipose tissue-derived stromal cells, proliferation, cell cycle, cyclin D1

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30670525, 30700181).

**Corresponding author. Tel: 86-411-84706360, E-mail: liutq@dlut.edu.cn

Received: February 1, 2008 Accepted: July 21, 2008