

文章编号:1009-038X(2005)01-0038-03

## 牛胎盘提取物促进成纤维细胞的增殖活性

生庆海, 房新平, 王玉良

(三鹿集团股份有限公司, 河北 石家庄 050071)

**摘要:** 探讨了牛胎盘中促进成纤维细胞增殖能力的活性成分的制备及其活性验证. 采用超滤法从牛胎盘中制备相对分子质量大于10 000的样品, 对其进行促进成纤维细胞的增殖实验, 证明其具有显著促进细胞增殖能力. 离子层析色谱分析可知, 此活性成分由4个组分组成, 分别验证促进成纤维细胞增殖活性, 其中组分二、三有显著促进细胞增殖能力.

**关键词:** 牛胎盘; 成纤维细胞增殖; 离子层析色谱; 超滤

**中图分类号:** Q 253

**文献标识码:** A

### Research on the Beef Placenta Extraction and the Stimulation of Fibroblast Proliferation Activity

SHENG Qing-hai, FANG Xin-ping, WANG Yu-liang

(SanLu Group Co., Ltd, Shijiazhuang 050071, China)

**Abstract:** The aim of this paper is to produce the active component from beef placenta and to determine its activity of stimulating fibroblast proliferation. The activity stimulating fibroblast proliferation in vitro was verified for the sample with molecular weight higher than 10 000 prepared by ultrafiltration. The results showed that active component significantly improved cell proliferation ability. Ionic chromatography was used to separate the sample into four fractions. The same method was used to determine the mechanism that, how the four fractions stimulate fibroblast proliferation. The results showed that fraction # 2 and fraction # 3 has the activity to improve cell proliferation ability.

**Key words:** beef placenta; fibroblast proliferation; ionic chromatography; ultrafilter

胎盘是哺乳类胎生动物在怀胎时为胎儿供应养分、让胚胎生长的特殊组织, 它在分娩时排出体外. 胎盘在我国入药已有几千年的历史. 现代医学研究发现, 哺乳动物胎盘含有丰富的酶类、多肽、生长因子和细胞因子等物质. 这些物质不仅为胎儿提供了生长所需的营养成分, 在胎儿降生后又成为医药、美容和食品等行业所需的高利用价值的原材

料. 然而, 关于胎盘产品中起延缓衰老、加速伤口愈合以及美白皮肤作用的成分的研究报道很少, 这已经成为医药和化妆品行业迫切需要解决的难题.

众所周知, 人皮肤是一个容易呈现老化的器官, 随着年龄的增长, 表皮细胞分化能力降低, 表皮恢复速率减慢, 角质功能衰退, 角质层变薄, 表皮萎缩产生皱纹. 真皮中胶质细胞总量减少, 一部分角

收稿日期: 2004-04-27; 修回日期: 2004-10-15.

基金项目: 国家“十五”重大科技专项基金(编号: 2002BA518A10)资助课题.

作者简介: 生庆海(1970-), 男, 山东平阴人, 高级工程师, 工学博士.

万方数据

质细胞又因过氧化脂质的作用,交联度增加,产生不溶性胶原,导致弹性降低.自然衰老的实质是细胞的增殖、分化与细胞的老化、死亡之间的平衡失调,因此,促进细胞分化、增殖,使新生/老化细胞的平衡恢复到正常,增加胶原和弹性细胞的合成,就能从根本上解决衰老问题.成纤维细胞作为真皮结缔组织的主要组成部分,在皮肤的衰老过程中扮演着重要的角色<sup>[1,2]</sup>.另外,成纤维细胞是主要的创伤修复细胞,由于成纤维细胞的增殖和胶原蛋白的合成,形成肉芽组织,填补了创面.创伤愈合是以成纤维细胞的增殖、迁移、肉芽组织的形成、胶原分泌、创口胶原化和瘢痕化影响创伤愈合<sup>[3,4]</sup>.

因此,利用成纤维细胞的培养来评价样品对细胞的生理作用,能够为样品应用于化妆品和创伤修复药品等方面提供理论依据.为此,作者采用这种方法,探讨了牛胎盘提取物对成纤维细胞的作用<sup>[5]</sup>.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

健康足月牛胎盘:无锡天资乳品厂提供;成纤维细胞(3T3):购于中科院上海细胞研究所;DMEM培养基:Gibco公司产品;溴化四唑蓝(MTT):Sigma公司产品;二甲基亚砜(DMSO):华美生物制品公司产品;Multiskan MK3:美国 Thermo 公司产品;CO<sub>2</sub>培养箱:美国 Thermo Forma 公司产品;超滤器:上海医药工业研究院;超滤膜(PS-10, M<sub>w</sub> 10 000):上海亚东核级树脂有限公司产品.

### 1.2 方 法

**1.2.1 样品制备** 新鲜牛胎盘洗净,剪切加 2 倍磷酸盐缓冲液,组织匀浆,静提 2 h, 12 000 r/min, 20 min 离心沉淀取上清液.将部分上清液冷冻干燥,得样品 1;将部分上清液进行超滤膜超滤,滤过液经冷冻干燥得样品 2,未滤过液经冷冻干燥得样品 3.

**1.2.2 样品 3 的离子交换层析** 采用 DEAE-Sephrose CL-6B 阴离子交换柱分离粗品.其中,柱体积为 2.6 cm×35 cm;体积流量为 1 mL/min;流动相为磷酸盐缓冲液;梯度洗脱液为 0~1 mol/L NaCl 的磷酸盐缓冲液. OD<sub>280 nm</sub> 检测吸光值可知,粗品由 4 个组分组成,分别收集各组分样品并在 4 ℃ 透析脱盐,冷冻干燥<sup>[6]</sup>.

## 2 细胞培养

### 2.1 成纤维细胞的制备

取培养的第 5 代成纤维细胞(3T3),胰蛋白酶万方数据

消化,完全 DMEM 培养液调细胞数至 4×10<sup>4</sup> 个/mL 备用.

### 2.2 实验安排

**2.2.1 检测样品促进 3T3 细胞增殖能力** 实验设对照组和实验组.实验组设定样品 1,2,3 的 3 个不同质量浓度,反应终止质量浓度分别为 250,100,50 μg/mL.

**2.2.2 检测离子交换各组分促进 3T3 细胞增殖能力** 实验设对照组和实验组.组分 1~组分 4 的反应终止质量浓度分别为 100,50 μg/mL.

### 2.3 实验过程

于 96 孔培养板中加入成纤维细胞悬液(4×10<sup>4</sup> 个/mL)100 μL,置体积分数 5% CO<sub>2</sub>,37 ℃ 培养箱中培养 24 h,促使成纤维细胞贴壁.在无菌条件下,对照组加入 PBS 100 μL,实验组各加 100 μL,各平行 5 次;置体积分数 5%CO<sub>2</sub>,37 ℃ 培养箱中培养 68 h.在无菌条件下向每孔加入 MTT 20 μL,轻轻混匀,继续培养 4 h.扣去板内液体并向每孔分别加入二甲基亚砜 100 μL,室温下放置 10 min,ELISA 570 nm 测每孔 OD 值.

### 2.4 数据处理

实验组促进成纤维细胞增殖率按下式计算:

$$\text{促进细胞增殖率} = \frac{A_{\text{实验}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{实验}}} \times 100\%$$

式中:A 为吸光值.

采用方差分析法计算实验组的 P 值,t 检验进行显著性分析.

## 3 结果与分析

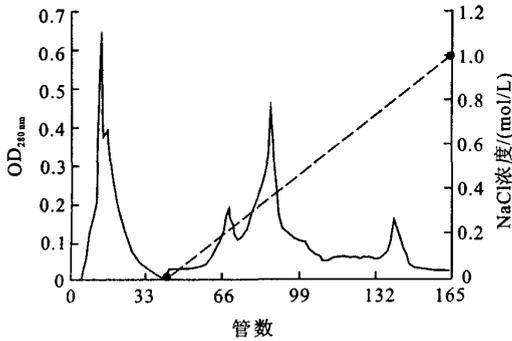
### 3.1 样品 3 的离子交换层析图谱

从层析图谱(见图 1)可以看出,样品主要由 4 个组分组成(从左至右为组分 1~4).在各组分的收集过程中,组分 1 主要由血红蛋白组成.根据离子交换层析图谱的峰面积可知,组分 1 在样品 3 中占有很大的比例.另外,离子交换层析达到了样品 3 中血红蛋白和其它蛋白的有效分离,为样品的后期应用解决了一定的难题.

### 3.2 样品不同剂量促进成纤维细胞增殖活性

从图 2 可以看出,样品 2 高质量浓度具有显著的促进成纤维细胞增殖能力,但随着质量浓度的降低,不再呈现促进作用;样品 1 作为粗品,其高质量浓度具有显著促进成纤维细胞增殖能力;经过超滤纯化的样品 3 具有显著促进成纤维细胞增殖活性,从而验证了粗品的活性.由此可知,参照资料报道的牛胎盘提取物促进细胞代谢活性物质提取方

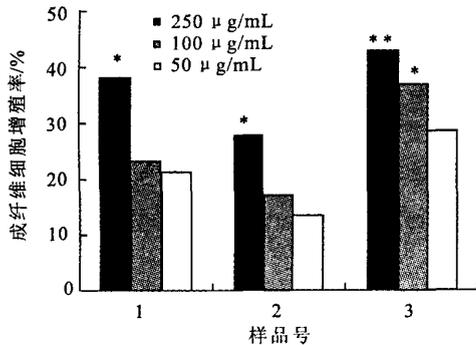
法制备的牛胎盘提取物,也具有显著促进成纤维细胞增殖的能力<sup>[7~9]</sup>,有必要进一步分离纯化粗品,得到纯的活性成分。



柱体积:2.6 cm × 35 cm; 体积流量:1 mL/min; 梯度洗脱液: 0~1 mol/L NaCl

图1 样品3经DEAE-Sepharose CL-6B层析图谱

Fig. 1 DEAE-Sepharose CL-6B chromatogram of Sample #3



1. 粗品; 2. 10 000 超滤滤过液; 3. 10 000 超滤未滤过液  
\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$

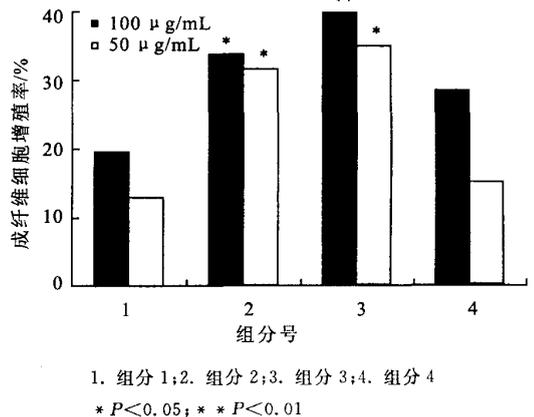
图2 样品各剂量促进成纤维细胞增殖能力

Fig. 2 The effects of different dose of samples on fibroblast proliferation

### 3.3 样品3离子交换各组分不同剂量促进成纤维细胞增殖活性

从图3可以看出,样品3经DEAE-Sepharose CL-6B阴离子层析柱分离后得到4个组分:组分1和组分4分别高、低质量浓度促进成纤维细胞增殖能力均不显著;组分2各质量浓度均具有显著地促进成纤维细胞增殖活性;组分3反应终止质量浓度

为100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,具有极显著地促进成纤维细胞增殖能力,反应终止质量浓度为50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,也有显著促进成纤维细胞增殖活性。由DEAE-Sepharose CL-6B阴离子层析柱分离牛胎盘样品3可知,样品3作为多个蛋白组分组成的混合物,不同的蛋白质组分呈现有区别的促进成纤维细胞增殖能力。因此,经过分离纯化得到的促进成纤维细胞增殖组分,其中起促进作用的作用物明确,因而对研究活性成分的作用机理提供了便利。



1. 组分1; 2. 组分2; 3. 组分3; 4. 组分4

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$

图3 样品3 DEAE-Sepharose CL-6B 离子层析各组分促进成纤维细胞增殖能力

Fig. 3 The effects of the fractions of sample #3 by DEAE-Sepharose CL-6B on fibroblast proliferation

目前对胎盘提取物的活性研究仍主要集中在功能及应用方面,对其主要活性成分的分离纯化、结构的研究报道较少。本实验只对牛胎盘促进成纤维细胞增殖的活性成分进行了初步的分离纯化,随着研究的深入,牛胎盘中具有促进成纤维细胞增殖能力的活性成分将得到进一步纯化和鉴定,为牛胎盘的充分应用打下基础<sup>[9,10]</sup>。另外,近年来国内外相继出现了动物胎盘水解液和胎盘浸提液2种产品形式,其中胎盘水解液中富含大量低分子肽和氨基酸易为人体吸收,还能起到降低血液中的胆固醇、减少体内脂肪、预防和治疗高血压等作用。因此,将本研究中提取促进成纤维细胞增殖活性成分后的胎盘废料,通过酶的水解作用,可以制备出营养价值高的低分子肽和氨基酸物质,提高了原料的利用率<sup>[11]</sup>。

## 参考文献:

- [1] 符移才,金锡鹏. 皮肤自然衰老的分子生物学机制[J]. 国外医学皮肤病学分册, 1999, 25(3): 151-154.
- [2] 李小迪. 皮肤老化与抗衰老化妆品[J]. 香精香料化妆品, 2001, 6(3): 23.
- [3] 秦全红. 成纤维细胞在皮肤创伤愈合中的作用及其调控[J]. 国外医学·创伤与外科基本问题分册, 2002, 21(1): 33-38.

(下转第58页)

- ol Macromol**, 1982, (4): 186—190.
- [31] Haney P J, Badger J H, Buldak G L, *et al.* Thermal adaptation analyzed by comparison of protein sequences from mesophilic and extremely thermophilic *Methanococcus* species [J]. **Pro Natl Acad Sci USA**, 1999, 96: 3578—3583.
- [32] Ikai A. Thermostability and aliphatic index of globular proteins[J]. **J Biochem (Tokyo)**, 1980, 88: 1895—1898.
- [33] Knechtel R M, Wind R D, Rozeboom H J, *et al.* Crystal structure at 2.3 resolution and revised nucleotide sequence of the thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermonaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 [J]. **J Mol Biol**, 1996, 256: 611—622.
- [34] Oobatake M, Ooi T. An analysis of non-bonded energy of proteins[J]. **J Theor Biol**, 1977, 67: 567—584.
- [35] Aguilar C F, Sanderson I, Moracci M, *et al.* Crystal structure of the beta-glycosidase from the hyperthermophilic archeon *Sulfolobus solfataricus*: resilience as a key factor in thermostability[J]. **J Mol Biol**, 1997, 271: 789—802.
- [36] Petrescu I, Lamotte-Brasseur J, Chessa J P, *et al.* Xylanase from the psychrophilic yeast *Cryptococcus adeliae* [J]. **Extremophiles**, 2000, 4: 137—144.
- [37] Nemeth A, Kamondi S, Szilagyi A, *et al.* Increasing the thermal stability of cellulase using rules learned from thermophilic proteins: a pilot study [J]. **Biophys Chem**, 2002, 132: 229—241.
- [38] Gubitz G M, Haltrich D, Latal B, *et al.* Mode of depolymerisation of hemicellulose by various mannanases and xylanases in relation to their ability to bleach softwood pulp[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1997, 47: 658—662.
- [39] Richardson J S, Richardson D C. Amino acid preferences for specific locations at the ends of alpha helices[J]. **Science**, 1988, 240: 1648—1652.
- [40] Watanabe K, Suzuki Y. Protein thermostability by proline substitutions [J]. **J Mol Catal B-Enzym**, 1998, (4): 167—180.
- [41] Georis J, de Lemos Esteves F, Lamotte-Brasseur J, *et al.* An additional aromatic interaction improves the thermostability and thermophilicity of a mesophilic family 11 xylanase: structural basis and molecular study [J]. **Protein Sci**, 2000, 9: 466—475.
- [42] Pace C N, Horn G, Hebert E J, *et al.* Tyrosine hydrogen bonds make a large contribution to protein stability[J]. **J Mol Biol**, 2001, 312: 393—404.
- [43] Hol W G, Halie L M, Sander C. Dipoles of the alpha-helix and beta-sheet: their role in protein folding[J]. **Nature**, 1981, 294: 532—536.
- [44] Martin A, Sieber B, Schmid F X. In-vitro selection of highly stabilized protein variants with optimized surface [J]. **J Mol Biol**, 2001, 307: 726.

(责任编辑:杨萌)

(上接第40页)

- [4] 王益民, 韦福康, 刘敏. 成纤维细胞与创伤修复的研究进展[J]. **Chinese J Reparative and Reconstructive Surgery**, 2000, 14(2): 126—128.
- [5] 王亮. 新生小鼠表皮细胞的培养-人胎盘组织提取液对细胞生理作用的评价[J]. **日用化学工业**, 2001, 31(1): 61—64.
- [6] 安藤义隆, 安藤裕. 牛胎盘抽出细胞代谢活性物质[P]. 日本专利, 5-71600, 1993-10-07.
- [7] Graeme I Howling, Peter W Dettmar, Paul A Goddard, *et al.* The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro[J]. **Biomaterials**, 2001, 22: 2959—2960.
- [8] Michael R Schaffer, Udaya Tantry. Stimulation of fibroblast proliferation and matrix contraction by wound fluid[J]. **Int J Biochem Cell Biol**, 1997, 24(12): 231—239.
- [9] 王波涛, 陈璧, 胡大海, 等. 烫伤皮肤创面炎性细胞合成 CGRP, SP 对 3T3 细胞的增殖作用[J]. **第四军医大学学报**, 1999, 20(5): 409—411.
- [10] 翁梁, 周秋丽, 王丽娟, 等. 鹿茸多肽促进表皮和成纤维细胞增殖及皮肤创伤愈合[J]. **药理学报**, 2001, 36(11): 817—820.
- [11] 董泉洲, 尚尔和, 王小惠, 等. 羊胎盘营养液的制备及其在化妆品中的应用[J]. **日用化学工业**, 1998, (1): 12—13.

(责任编辑:杨勇)