补肾益气方对正常早孕期人细胞滋养层细胞生物学行为的影响

王海燕[1] 归绥琪[1] 徐丛剑[1] 储以微[2]

摘要 **目的** 探讨补肾益气方对正常早孕期人细胞滋养层细胞增殖、侵袭、分化等生物学行为的影响。**方法** 体外培养正常早孕期人细胞滋养层细胞，分别设空白对照组、5%含药血清组、10%含药血清组、20%含药血清组，用扫描电镜、噻唑蓝(MTT)法、流式细胞仪、Transwell 侵袭实验检测含药血清作用 24h、48h、72h 后细胞的形态、增殖活性及侵袭力的变化。**结果** 含药血清培养 24h、48h、72h 后，细胞滋养层细胞微绒毛变丰富，伪足增多、延长，细胞在酶联免疫分析仪 490nm 波长的吸光度值增加($P<0.01$)；sub-G_1 期细胞减少($P<0.01$)，S 期细胞增加($P<0.01$)，G_2/M 期细胞明显减少($P<0.01$)；海视野穿过 PET 膜的细胞数明显增多($P<0.01$)。**结论** 补肾中药促进人细胞滋养层细胞增殖及侵袭力，并可能影响其分化能力。

关键词 补肾益气方；含药血清；细胞滋养层细胞；增殖；侵袭

Effect of Bushen Yiqi Recipe on Bioactivity Behavior of Human Cytotrophoblast of Early Pregnancy WANG Hai-yan, GUI Sui-qi, XU Cong-jian, et al *Department of Integrative Chinese and Western Medicine, Hospital of Obstetric and Gynecology, Fudan University, Shanghai* (*200011*)

Objective To investigate the effect of Chinese drugs for tonifying Shen on the bioactivity, cell proliferation, invasion and differentiation of human cytotrophoblast of early pregnancy. **Methods** The human early pregnant cytotrophoblast was cultured in vitro, and treated with saline (as blank control) and drug containing serum in different concentrations (5%, 10% and 20%) respectively. The changes of morphology, proliferation and invasive capacity of cells were examined by scanning electron microscopy, MTT method, flow cytometry, Transwell invassive assay at 24 hrs, 48 hrs and 72 hrs after treatment. **Results** After cells being cultured with drug containing serum, the cytotrophoblast became abundant in microvilli, with more and prolonged pseudopodia. The cell absorbency in 490nm wave length increased significantly ($P<0.01$), cells of sub-G_1 and G_2/M phase obviously decreased and that of S phase increased ($P<0.01$), and the cells penetrated through PET membrane in each visual field significantly increased ($P<0.01$). **Conclusion** Chinese herbs for tonifying Shen could promote the proliferation and invasive capacity of cytotrophoblast and might influence its differentiation.

Key words Chinese drugs for tonifying Shen; drug containing serum; cytotrophoblast; proliferation; invasion

人类胚泡植入过程中植入侧的滋养细胞分化为两层，外层融合分化为多核的合体滋养层，内层为细胞滋养层细胞。合体滋养层细胞是分化成熟的细胞，失去了增生分裂能力，更新须依靠内层的细胞滋养层细胞分化、融合。细胞滋养层细胞增殖性强，可分裂、分化、融合为合体滋养层细胞，是胎盘绒毛的干细胞，具有较强的侵袭力，可穿透合体滋养层，侵入到母体子宫内膜，使胚泡的植入更加深入和广泛，因此细胞滋养层细胞的增殖、融合及侵袭能力对维持胎盘功能和结构是必不可少的。补肾益气方是我院研制的保胎方，临床研究及动物实验显示保胎成功率达 90%左右[1,2]，为探讨补肾中药方是否可直接作用于人细胞滋养层细胞，本实验观察了该方含药血清对正常早孕期人细胞滋养层细胞增殖、侵袭、分化等生物学行为的影响。

材料与方法

1 动物 成年雌性 SD 大鼠 40 只，体重 200～

基金项目：上海市科学技术发展基金资助项目(No. 98－203)，上海市医学领先学科中西医结合妇科重点学科资助项目，复旦大学 985 工程资助项目

作者单位：1. 复旦大学附属妇产科医院中西医结合科(上海 200011)；2. 复旦大学上海医学院免疫教研室

通讯作者：归绥琪，Tel：021－63770161 转 420，E-mail：haiyanwang2002@yahoo.com.cn

万方数据

250g,10～12 周龄,由复旦大学上海医学院实验动物部提供。

2　中药制剂　我院治疗自然流产保胎的补肾益气方,由复旦大学上海医学院生药教研室制备。提取水溶性的部分,制成溶液,含生药 2.25g/ml,方剂主要组成:党参、炒白术、苏梗、菟丝子、白芍等。

3　方法

3.1　药物血清制备　参照文献[3-5],将 40 只动物随机分为两组:空白血清对照组(等量生理盐水灌胃)、补肾中药组〔4.5g/(kg·d)〕,临床成人剂量的 24 倍,每组 20 只,每天给药 2 次,连续 3 天,末次给药前禁食不禁水 12h,末次给药 1h 后采血,常规制备不同浓度药物血清,包括 5% 含药血清组、10% 含药血清组、20% 含药血清组及空白血清组。

3.2　细胞滋养层细胞分离、培养和鉴定　参照文献[6]所用方法。

3.3　扫描电镜观察　人细胞滋养层细胞加不同浓度含药血清培养 48 及 72h 后,用 2.5% 戊二醛 4℃ 预固定 2h 后,1% 锇酸后固定 2h,梯度酒精脱水,样品干燥后入 IB-3 型离子溅射仪中喷金 3min,日立 S-520 型扫描电镜观察细胞形态。

3.4　细胞增殖活力检测　采用噻唑蓝(MTT)法。将原代培养的滋养层细胞以 1.5×10^6/ml 铺 96 孔板,100μl/孔,培养 4h 后去除培养液,洗两次,按照以上分组给药,分别培养 24、48 及 72h,加入工作浓度的 MTT,继续培养 4h,用酶联免疫分析仪在 390nm 波长处测光吸收值。

3.5　细胞周期分析　将原代培养细胞种植在 6 孔板内,加入不同浓度含药血清继续培养 24 及 48h 后,0.25% 胰蛋白酶消化,PBS 洗两次,70% 冷乙醇 4℃ 固定 12h,PBS 洗细胞,在含 1% RNA 酶的 Tris HCl 缓冲液(pH 7.4)中 37℃ 孵育 30min,PI 染色,流式细胞仪进行检测。

3.6　侵袭实验　方法参照文献[7,8]。将含有 8μm 微孔膜的 Transwell 细胞小室放入 24 孔板中,膜上面铺 10μl 纯 Matrigel,37℃ 孵育 30min,将 200μl 含 2.5×10^5 细胞的 DMEM 加入到膜上,孔周围加入 600μl 相同的 DMEM 培养液培养 72h,取出 Transwell 小室,用生理盐水棉签轻拭去上层的细胞,PBS 洗膜 3 次,4% PFA 固定,姬姆萨染液染色,倒置光镜下计数,每组随机记取 10 个高倍视野,取其均数。

4　统计学分析　采用 SPSS10.0 软件系统,进

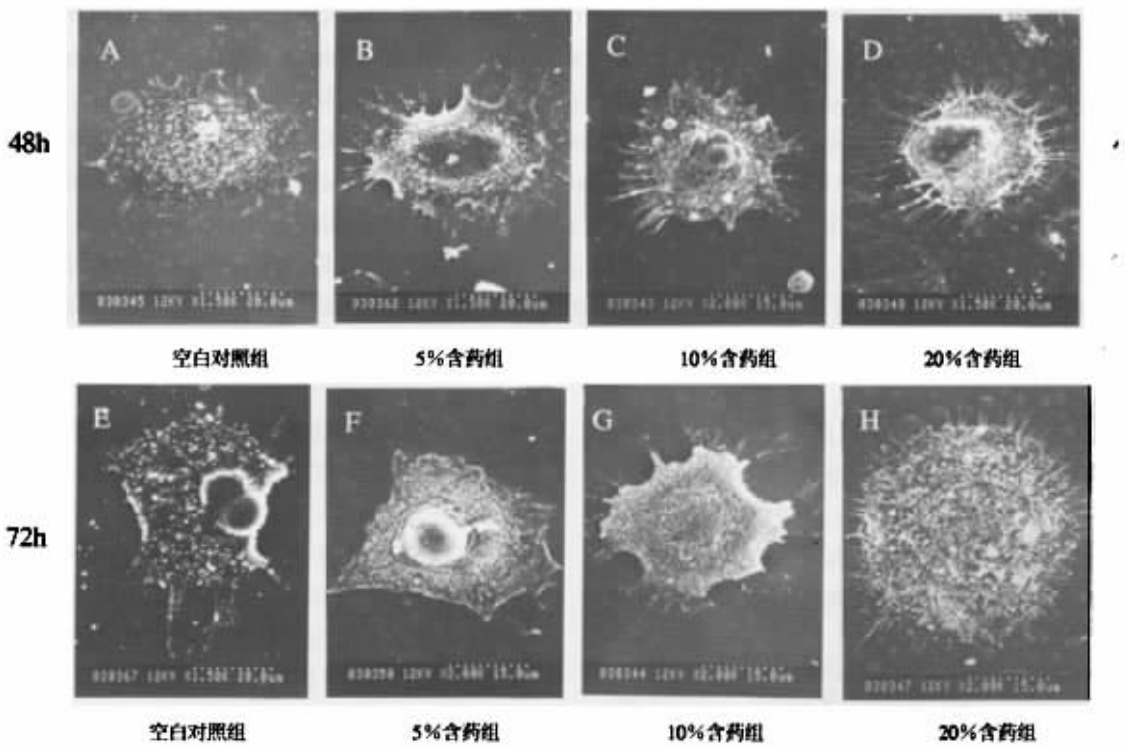


图 1　不同浓度含药血清对原代培养人细胞滋养层细胞细胞形态的影响

万方数据

行单因素方差分析。

结　果

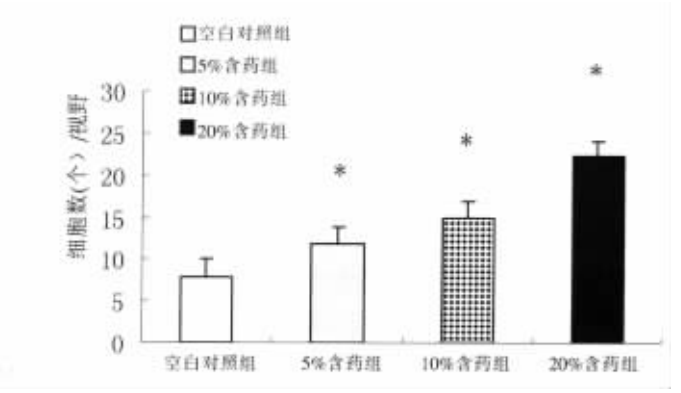
1　正常早孕期人细胞滋养层细胞的鉴定结果细胞滋养层细胞特异表达细胞角蛋白 7，不表达波形蛋白，而子宫内膜间质细胞及成纤维细胞表达波形蛋白，细胞培养 4h 后做免疫组化鉴定，细胞角蛋白 7 表达阳性率达 95% 以上，波形蛋白着色细胞数低于 5%。

2　扫描电镜观察结果　5%、10%、20% 含药血清培养细胞滋养层细胞 48h 后，含药血清作用的细胞与空白对照组比较，细胞伪足增多、延长，20% 含药血清作用的细胞变化更为明显（见图 1，A－D），72h 后发现含药血清组作用的细胞表面微绒毛突出物更加丰富（见图 1，E－H），提示补肾中药提高细胞滋养层细胞的增殖、分化及侵袭能力。

3　细胞滋养层细胞增殖活性的变化　不同浓度的含药血清培养细胞 24h 后，490nm 波长的吸光度（A）值由 0.16±0.01 增至 0.47±0.18；培养 48h 后 A 值从 0.18±0.02 增至 0.60±0.01；72h 后空白血清对照组光吸收值为 0.22±0.02；20% 含药血清作用的细胞光吸收值达 0.96±0.03，同一时间点各含药血清组与空白血清对照组比较，差异有显著性（$P<0.01$），显示细胞增殖活性随含药血清浓度升高而增加，呈明显的剂量依赖性。

4　细胞周期分布的变化　见表 1。分别用空白血清、5% 含药血清、10% 含药血清、20% 含药血清培养细胞 24h 后，即凋亡细胞（sub-G_1，%）减少，从 16.94±0.95 降至 11.51±0.50（$P<0.01$），S 期细胞从 10.51±0.83 增至 32.98±1.66（$P<0.01$），G_2/M 期细胞由 29.47±1.38 降至 19.29±1.91（$P<0.01$）；48h 的细胞周期分布变化趋势与 24h 一致，而且变化更加明显。

5　细胞侵袭力的变化　5%、10%、20% 含药血清处理72h后穿过8μm微孔膜的细胞明显高于空白对照组（见图2），每视野细胞数（个）分别为11.9±2.0、15.0±1.8、22.3±1.8，与对照组（7.8±2.3）比较，差异有显著性（$P<0.01$）。



注：与空白对照组比较，*$P<0.01$

图 2　补肾中药对正常早孕期人细胞滋养层细胞侵袭能力的影响

讨　论

1　补肾中药保胎方参与妊娠期生殖－内分泌－免疫网络调节　既往我院临床研究发现自然流产患者经补肾中药治疗，保胎成功者血清孕酮、催乳素、β-hCG 水平升高[2]，给 SD 孕鼠注射溴隐亭诱发流产，建立流产模型，用补肾中药后，孕鼠血 PRL、P 等激素水平升高，蜕膜孕酮受体、催乳素受体水平上调，Th1/Th2 平衡向 Th2 偏移[7]，表明补肾中药通过宏观调控生殖－内分泌－免疫网络起到维持妊娠的作用。细胞滋养层细胞是形成胎盘绒毛的干细胞，反复自然流产等不明原因的妊娠失败表现有细胞滋养层细胞增殖及侵袭能力下降，凋亡细胞增多[8]。中药保胎方具有多靶效应，因此我们推测补肾中药可能直接调节细胞滋养层细胞的分化及功能。

2　补肾中药提高正常早孕期人细胞滋养细胞增殖及侵袭能力　胎盘作为妊娠期特殊的内分泌器官，在维持妊娠中起关键作用，细胞滋养层细胞在胎盘结构的建立和功能的正常行使过程中起着非常重要的作用。本实验用扫描电镜观察了含药血清对细胞滋养层细胞表面形态的影响，发现随着含药血清浓度增加，细胞滋养层细胞伪足增加、变长，这与细胞滋养层细胞的

表 1　补肾中药作用 24h 及 48h 后正常早孕期人细胞滋养细胞的周期分布　（%，$\bar{x}\pm s$）

	组别	sub-G_1	G_1/G_0	S	G_2/M
24h	空白对照	16.94±0.95	59.90±0.85	10.51±0.83	29.47±1.38
	5%含药	15.32±0.53*	62.05±1.96	11.93±0.69*	25.90±1.46*
	10%含药	12.26±0.41*	52.23±1.18	24.33±1.12*	23.45±1.92*
	20%含药	11.51±0.50*	47.73±0.32	32.98±1.66*	19.29±1.91*
48h	空白对照	18.02±0.10	58.26±1.27	7.50±0.81	34.92±0.88
	5%含药	14.47±0.34*	55.68±1.08	18.22±1.03*	26.10±1.56*
	10%含药	9.52±0.72*	49.22±1.19	29.87±1.27*	20.92±1.78*
	20%含药	7.50±0.81*	49.41±1.17	33.65±1.12*	16.98±0.74*

注：与空白对照组比较，*$P<0.01$

万方数据

运动、迁移能力有关；当培养时间延长时，滋养细胞表面微绒毛更加丰富，提示中药可能影响细胞滋养层细胞的分化能力，我们在光镜下观察细胞形态时，也发现含药血清作用 72h 后，与空白对照组相比，单核的滋养层细胞与多核巨细胞均明显增多，提示补肾中药有可能促进细胞滋养层细胞融合为合体滋养层细胞，这有利于胎盘结构的建立和功能的发挥。

MTT 分析了不同浓度含药血清对细胞滋养层细胞活力的影响，发现含药血清培养的细胞在 490nm 处的光吸收值明显高于空白对照组，且随着给药浓度增加，给药时间延长，这种作用更加 明显，提示补肾中药增强生长中的正常早孕期人细胞滋养层细胞的细胞活力。流式细胞仪检测 DNA 二倍体细胞，分析不同血药浓度作用后细胞处在各种细胞周期的比例，发现含药血清培养细胞后，处于 S 期的细胞明显增多，阻滞在 G_2-M 期细胞减少，处于亚二倍体阶段的细胞明显下降，表明补肾中药可诱导细胞处于 DNA 合成期及有丝分裂期，促进细胞增殖，降低细胞凋亡的发生率，含药血清能降低生长中的细胞滋养层细胞凋亡率的机制还不清楚，可能有以下几种：(1)诱导细胞滋养层细胞向合体滋养层细胞分化，致使膜/核比下降，导致 TNFα、FasL 受体接触率下降；(2)诱导信号传导效率下降包括 FLICE 抑制因子上调；(3)诱导细胞滋养细胞表达保护性细胞因子和生长因子如 EGF、IGF、FGF 等水平增加，这些已经被证实可保护滋养细胞不凋亡[9]；(4)诱导 Bcl-2 家族表达水平升高。

本实验为证实补肾益气方对正常早孕期人细胞滋养层细胞的侵袭能力具有调节作用，用 Transwell 分析了补肾中药作用后细胞侵袭力的变化，结果表明中药组穿过 8μm 微孔滤膜的细胞明显多于对照组，且有明显的剂量依赖关系，提示补肾中药具有提高细胞滋养层细胞侵袭力的功能。

反复自然流产发病机理复杂，补肾益气方不但能宏观调节生殖－内分泌－免疫网络的平衡，而且能直接作用于正常早孕期人细胞滋养层细胞，对其生长、运动、迁移能力起良性的调节作用，因此在临床上具有良好的应用前景。

参 考 文 献

1 归绥琪，曹玲仙，毛秋芝，等. 补肾益气清热法治疗先兆流产对小儿的影响. 上海中医药杂志 1995；(3)：12－13.
Gui SQ, Cao LX, Mao QZ, et al. The effect of "Bushenyiqi Qingre" method on baby in treatment of threatened abortion. Shanghai J Tradit Chin Med 1995；(3)：12－13.

2 归绥琪，许 钧，俞而慨，等. 中药治疗自然流产对封闭抗体、β-hCG、孕酮、雌二醇的影响. 中国中西医结合杂志 1997；17(11)：645－648.
Gui SQ, Xu J, Yu EK, et al. The effect of Chinese medicine on β-hCG, blocking antibody, progesterone, estradiol in recurrent spontaneous abortion. Chin J Integr Tradit West Med 1997；17(11)：645－648.

3 王宁生，雷 燕，刘 平，等. 关于血清药理学的若干思考. 中国中西医结合杂志 1999；19(5)：263－266.
Wang NS, Lei Y, Liu P, et al. Some considerations on serum pharmacology. Chin J Integr Tradit West Med 1999；19(5)：263－266.

4 李仪奎. 中药血清药理学实验方法的若干问题. 中药新药与临床药理 1999；10(2)：95.
Li YK. Some problems in experimental methods of Chinese herbs seropharmacology. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol 1999；10(2)：95.

5 董 莉，李 斌，章 云，等. 生肌化瘀方及其拆方对大鼠创面成纤维细胞Ⅰ、Ⅲ型胶原合成的影响. 中国中西医结合杂志 2002；22(3)：200－202.
Dong L, Li B, Zhang Y, et al. Effect of Shengji Huayu recipe and its disassembled formation on type Ⅰ and Ⅲ collagen synthesis in wound healing fibroblasts. Chin J Integr Tradit West Med 2002；22(3)：200－202.

6 Tarrade A, Kuen RL, Malassine A, et al. Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. Lab Invest 2001；81(9)：1199－1211.

7 Genbacev O, Joslin R, Damsky C, et al. Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models and placental defects that occur in preeclampsia. J Clin Invest 1996；97(2)：540－550.

8 Isakaa K, Usuda S, Ito H, et al. Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts. Placenta 2003；24(1)：53－64.

9 蒋立辉，归绥琪，李昆明，等. 中药对溴隐亭致流产大鼠保胎机理的实验研究. 中国免疫学杂志 2002；18(10)：704－707.
Jiang LH, Gui SQ, Li KM, et al. Effect and mechanism study of Chinese herbs in the model of bromocriptine induced aborting rats. Chin J Immunol 2002；18(10)：704－707.

10 Vadillo Ortega F, Avila Vergara MA, Hernandez Guerrero C, et al. Apoptosis in trophoblast of patients with recurrent spontaneous abortion of unidentified cause. Gynecol Obstet Mex 2000；68(1)：122－131.

11 Smitha S, Francisa R, Guilbertb L, et al. Growth factor rescue of cytokine mediated trophoblast apoptosis. Placenta 2002；23(2)：322－330.

(收稿：2003－09－25 修回：2004－03－15)

万方数据