闽产巴戟天中促进骨髓基质细胞增殖成分的初步研究

凌昆¹, 郭素华², 赵诣² (1. 福建中医学院, 福州 350108; 2. 福建中医学院药学院, 中药学福建省高等学校重点实验室, 福州 350108)

摘要:目的 初步研究巴戟天中促进骨髓基质细胞增殖的成分。方法 采用 MTT法检测, 从巴戟天中分离的各组分培养大鼠骨髓基质细胞 (BMSCs) 72 h后的 A值。结果 巴戟天中的蒽醌苷类成分无论极性大小, 对促进 BMSCs的增殖都有效, 且正丁醇中极性较大的蒽醌苷类成分效果更好一些。结论 巴戟天中含有能促进骨髓基质细胞增殖的成分, 值得进一步深入研究。

关键词: 巴戟天; 骨髓基质细胞; MTT法; 初步研究

中图分类号: R965.1; R931.7 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2008)04-0271-02

Preliminary Study on the Proliferating Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Constituents of Radix Morindae Officinalis Produced in Fujian Province

LING Kun¹, GUO Su-hua², ZHAO Yi² (1. Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China; 2. Pharmacy Department of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, The Laboratory Laboratory of Chinese Pharmacies for Fujian University of Traditional Chinese Medicine of Fujian Higher Education, Fuzhou 350108, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the constituents of radix morindae officinalis that can proliferate bone marrow mesenchymal stem cells, preliminarily. **METHODS** According to the MTT method, the OD values of rat bone marrow mesenchymal stem cells cultured by different constituents separated from radix morindae officinalis for 72 hours were detected. **RESULTS** Anthraquinone glycosides extracted from radix morindae officinalis can proliferate bone marrow mesenchymal stem cells. And anthraquinone glycosides extracted through n-butanol have better effect. **CONCLUSION** Radix morindae officinalis contain constituents that can proliferate bone marrow mesenchymal stem cells and worth farther research.

KEY WORDS: Radix Morindae officinalis; bone marrow mesenchymal stem cells; MTT method; preliminary study

巴戟天是茜草科植物巴戟天 (*Morinda officinalis* How) 的干燥根, 具有补肾阳, 强筋骨, 祛风湿的功效, 用于阳痿遗精, 宫冷不孕, 月经不调, 少腹冷痛, 风湿痹痛, 筋骨痠软。本研究采用 MTT法, 检测从巴戟天中分离的各组分对大鼠骨髓基质细胞 (BMSCs) 增殖的影响。

1 实验材料

巴戟天 (*Morinda officinalis* How) 药材, 购于福建省南靖县和溪镇, 经福建中医学院中药鉴定教研室车苏容鉴定为闽产南靖巴戟天。倒置相差显微镜 (日本 OLYMPUS)、CO₂ 培养箱 (德国 MEMMER)、酶标仪 (美国 BIO-TEK); α -MEM (HyClone)、新生牛血清 (NCS, HyClone)、青链霉素溶液 (HyClone)、HEPES (HyClone)、胰蛋白酶 (1:250, AMRESCO)、噻唑蓝 (MTT, AMRESCO)、二甲基亚砜 (DMSO, AMRESCO); 30 d龄雄性 SD大鼠。

2 实验方法和结果

2.1 巴戟天总蒽醌、总蒽醌苷、多糖类成分的提取及蒽醌苷类成分的初步分离

2.1.1 巴戟天总蒽醌、总蒽醌苷类成分的提取 将巴戟天粉碎 (过九号筛), 用 95% 的乙醇回流提取 3 次, 每次 1 h, 提取液减压回收乙醇至浸膏状, 以石油醚脱脂后, 用乙醚超声提取, 乙醚层中即为蒽醌类成分, 余下的残渣中为蒽醌苷类成分。上述成分分别除去有机溶剂后, 置 4℃ 中的冰箱中保存备用。

2.1.2 巴戟天多糖类成分的提取 醇提物余下的粉末加水回流提取 2 次, 每次 1 h, 提取液浓缩后, 加约三倍量的乙醇, 至含醇量为 75%, 静置过夜, 收集沉淀, 干燥得粗多糖。将得到的约一半的粗多糖以 sevag 法除蛋白, 得到脱蛋白后的巴戟天多糖。

2.1.3 巴戟天蒽醌苷类成分的初步分离 使用乙酸乙酯超声提取 “2.1.1” 中得到的巴戟天蒽醌苷类成分, 得到极性较小的蒽醌苷类成分。余下部分再用正丁醇超声提取, 正丁醇液中为极性较大的蒽醌苷类成分。上述成分分别除去有机溶剂后, 置 4℃ 中的冰箱中保存备用。

2.2 MTT法筛选能促进骨髓基质细胞 (BMSCs) 增殖的成

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (项目编号: 30572321); 2007 年度陈可冀中西医结合发展基金 (第三批) 中西医结合基础福建省重点实验室开放课题基金 (项目编号: CKJ2007021、ZXYJH200711)

作者简介: 凌昆, 男, 副教授 Tel: 13705092130 E-mail: guosuhua2005@126.com

分^[1-4]

取 30 d 龄 SD 大鼠的股骨和胫骨, 去除附着的软组织, 切去骺软骨, 暴露髓腔, 注射器吸取含 10% NCS 的 α -MEM 培养液反复冲洗, 冲洗液移入离心管, $1\ 000\ r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min, 沉淀用 10% NCS 的 α -MEM 培养液反复吹打制成细胞悬液, 细胞计数板计数有核细胞数, 调整有核细胞数为 $2 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$, 接种于 50 mL 培养瓶中, 置 $37\ ^\circ\text{C}$, 5% CO_2 , 湿度为 95% 的二氧化碳培养箱中培养。接种 72 h 后半量换液, 以后每 2~3 d 换液一次, 至细胞会合成单层后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 按 1:3 的比例进行传代接种培养, 并标记为 F1, 传代培养过程中每 2~3 d 换液一次, 直至细胞彼此会合, 铺满整个培养瓶底。重复以上操作, 并标记为 F2, 调整有核细胞数为 $5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$, 进行实验。

将细胞浓度为 $5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 F2 代 BMSCs 以 0.25% 胰蛋白酶消化后, 以每孔 100 μL 接种于 96 孔培养板上, 常规培养 24 h 后, 给予以含 10% NCS 的 α -MEM 培养液配置的含上述提取成分的药液, 以不加上述成分的含 10% NCS 的 α -MEM 培养液为对照。培养 72 h 后, 每孔加入 0.1 mL 无血清培养液, 其中 $5\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTT 试剂 20 μL , 在 $37\ ^\circ\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养 4~6 h, 弃去培养板中的溶液, 随后加入 150 mL 的二甲基亚砷, 振荡混匀 10 min 后, 用酶联检测仪在 570 nm 波长下测定各孔的光吸收值 (A)。结果见表 1。

表 1 不同提取成分组 BMSCs 光吸收值 ($n=8$)

Tab1 A Value of Different Constituents ($n=8$)

组别	A 值
对照组	0.128 1 $\pm$ 0.020 2
葱醌组	0.152 7 $\pm$ 0.016 5
葱醌苷组	0.310 1 $\pm$ 0.054 3 ¹⁾
粗多糖组	0.155 7 $\pm$ 0.033 2
脱蛋白后的多糖组	0.152 7 $\pm$ 0.024 9

注: SPSS 13.0 单因素方差分析, ¹⁾ 表示与对照组相比 $P < 0.05$

Note: SPSS 13.0 One-Way ANOVA shows, ¹⁾ $P < 0.05$ vs control group

2.3 MTT 法筛选能促进骨髓基质细胞 (BMSCs) 增殖的葱醌苷类成分

采用“2.2”中所述方法进行试验, 结果见表 2。

表 2 不同极性葱醌苷组 BMSCs 光吸收值 ($n=8$)

Tab2 OD Value of Different Anthraquinone Glycosides ($n=8$)

组别	A 值
对照组	0.132 1 $\pm$ 0.009 5
乙酸乙酯组	0.204 4 $\pm$ 0.016 9 ¹⁾
正丁醇组	0.222 8 $\pm$ 0.015 6 ¹⁾

注: SPSS 13.0 单因素方差分析, ¹⁾ 表示与对照组相比 $P < 0.05$

Note: SPSS 13.0 One-Way ANOVA shows, ¹⁾ $P < 0.05$ vs control group

3 讨论

骨髓包括造血系统和基质系统, 骨髓组织除含有血系细胞外, 还含有骨髓基质细胞 (bone marrow stromal cells, BMSCs)。BMSCs 对骨髓血系细胞起支持诱导作用, 其所含的少量多能基质干细胞是多种细胞的前体细胞。BMSCs 在体外培养、扩增并诱导后有很强的成骨能力, 且容易分离, 来源广泛, 应用安全方便。所以, 作为骨组织工程中首选的种子细胞日益受到重视^[5]。但 BMSCs 的增殖、成骨分化及其成骨能力等的影响因素众多, 这些方面近年来有了较广泛的研究, 认识也更加深入, 但有关中药对其影响的研究报道却非常少。本研究实验结果提示: 巴戟天中的葱醌苷类成分对促进 BMSCs 的增殖有效, 而其他成分对促进 BMSCs 的增殖有一定影响, 但无统计学意义; 且巴戟天葱醌苷类成分无论极性大小, 对促进 BMSCs 的增殖都有效, 而正丁醇中极性较大的葱醌苷类成分效果更好一些。闽产南靖巴戟天中促进骨生长的有效成分值得进一步深入研究。

致谢: 本实验中涉及细胞培养部分由福建中医学院中西医结合研究院重点实验室提供场地。

REFERENCES

- [1] LI N, WANG H M, LIN X, *et al.* The experimental study on the effect of morinda officinalis on the biological characteristics of bone marrow stromal cell[J]. J Tradit Chin Med(中医杂志), 2004, 19(12): 726-728
- [2] WANG L, WANG H M, LI N. The foundation of serum pharmacology method on the effect of alcohol extract of morinda officinalis to the proliferation of bone marrow stromal cell[J]. J Jiangxi Coll Tradit Chin Med(江西中医学院学报), 2004, 16(6): 39-41.
- [3] WANG H M, WANG L, LI N. Study the influence of morinda officinalis how on the differentiation from marrow stroma cell to osteoblast[J]. J Fujian Coll Tradit Chin Med(福建中医学院学报), 2004, 14(3): 16-19
- [4] WANG H M, WANG L, LI N. Effect of morinda officinalis on the expression of Cbfa1 during the differentiation from BMSCs to the osteoblast[J]. Chin J Tradit Med Trumatol Orthop(中国中医骨伤科学), 2004, 12(6): 22-26
- [5] PITTINGER M F, MACKAY Am, BECK S C. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell[J]. Science, 1999, (5): 143-147.

收稿日期: 2007-11-27