

鹿衔草挥发油的化学成分及其对成骨细胞增殖的影响

吴银生¹ 李超雄² 林煜² 黄云梅¹ 黄美雅¹ 林燕萍¹ 叶蕪芝¹

【摘要】 目的 分析鹿衔草挥发油的化学成分,研究其对体外培养成骨细胞增殖的影响。方法 采用水蒸气蒸馏法提取鹿衔草挥发油,GC-MS 检测化学成分;鹿衔草挥发油干预成骨细胞系 ROS17/2.8 后,采用 MTT 法检测成骨细胞增殖,流式细胞术检测成骨细胞增殖周期,实时荧光定量 PCR 检测成骨细胞 PCNA mRNA 表达。结果 一定浓度的鹿衔草挥发油能促进体外培养成骨细胞增殖,处于增殖周期的成骨细胞比例明显增加,且成骨细胞的增殖细胞核抗原(Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA) mRNA 表达显著提高。结论 鹿衔草挥发油通过上调 PCNA 表达,加速成骨细胞增殖周期进程,从而促进成骨细胞增殖。

【关键词】 鹿衔草挥发油;气相色谱-质谱;成骨细胞;细胞增殖周期;增殖细胞核抗原

【中图分类号】R285 **【文献标识码】**A

Chemical Composition of Chinese Pyrola Herb Volatile and the Effects on the Osteoblast Proliferation

WU Yin-sheng¹, LI Chao-xiong², LIN Yu², HUANG Yun-mei¹, HUANG Mei-ya¹, LIN Yan-ping¹, YE Hong-zhi¹

(1. Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou Fujian 350122; 2. Fuzhou Second Affiliated Hospital of Xiamen University, Fuzhou Fujian 350007)

【Abstract】 Objective To analyze the chemical composition of Chinese pyrola herb volatile and study its effects on the in vitro cultured osteoblast proliferation. **Methods** The water vapor distillation was used to extract Chinese pyrola herb volatile and GC-MS was to determine the chemical composition. After intervention of Chinese pyrola herb volatile on ROS17/2.8, MTT method was adopted to determine the osteoblast proliferation, the flow cytometry was to determine the osteoblast proliferating cycle and RT-PCR was to determine the expression of PCNA mRNA. **Results** Chinese pyrola herb volatile of a certain of concentration promoted the proliferation of in vitro cultured osteoblast cells. The percentage of osteoblast cells in the proliferation cycle was increased apparently and the expression of PCNA mRNA was improved significantly. **Conclusion** Chinese pyrola herb volatile accelerates the progression of osteoblast proliferating cycle through up-regulating PCNA expression so as to accelerate osteoblast proliferation.

【Key words】 Chinese Pyrola Herb Volatile; GC-MS; Osteoblast Cell; Osteoblast Proliferating Cycle; PCNA

骨质疏松是一种多因素的骨骼疾患^[1],其特征是骨强度下降导致骨折危险性升高。通常认为,骨质疏松是骨吸收明显大于骨形成的结果,骨吸收和骨形成的失衡导致净骨量的丢失^[2]。因此,不论是刺激成骨细胞骨形成还是抑制破骨细胞骨吸收,对

骨质疏松的治疗都是有显著意义的^[3]。

骨质疏松症属中医学“骨痿”“骨痹”范畴,对其发病病机,历代医家多持“肾虚论”,亦多从肾论治。《中药大辞典》记载:鹿衔草性味甘、苦、平,归肝、肾经,功能补肾强骨,主治肾虚腰痛,筋骨痿软等,为中医临床治疗骨质疏松症的常用中药^[4-6]。临床和实验研究显示鹿衔草单用或复方对骨质疏松患者和实验大鼠模型有一定的疗效^[4-10]。本研究鉴定了鹿衔草挥发油的主要成分,考察鹿衔草挥发油对成骨细胞样细胞 ROS17/2.8 增殖的影响,并从成骨细胞增殖方面探讨其作用机制。

DOI: 10.13935/j.cnki.sjzx.160415

基金项目:国家自然科学基金(81473706);福州市卫生系统科技计划项目(2013-S-wq10);福建省中医药科研项目(wzgs201307)

作者单位:1. 福建中医药大学,福建 福州 350122; 2. 厦门大学附属福州第二医院,福建 福州 350007

通讯作者:林燕萍,Email: lyp66@126.com

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞 大鼠成骨样细胞 ROS17/2.8 购自上海复祥生物科技有限公司。

1.1.2 药材与试剂 鹿衔草购自江西省樟树天齐堂中药饮片有限公司(批号:1202001),由福建中医药大学中西医结合研究院叶蕪芝教授鉴定。0.25% 胰蛋白酶、低糖 DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)(新西兰 Hyclone 公司);噻唑蓝(MTT, Sigma); CycleTEST™ Plus DNA Reagent Kit(美国 Becton Dickinson 公司);TRIZOL(MBI Fermentas 公司);PCR 引物(上海生工生物技术有限公司);逆转录试剂盒、Real time-PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司);其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器 挥发油提取器、气相色谱-质谱联用仪(GC-MS, 6890-5975, Agilent);二氧化碳恒温培养箱(BB16/BB5060 型,德国 Heraeus 公司);AIR TECH 无菌操作台(苏净集团安泰公司);Olympus 倒置相差显微镜(日本 TKO 光学仪器株式会社);Du650 紫外分光光度计(美国 Beckman 公司);FAC-SCalibur 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司);旋转蒸发器 RE-52(上海亚荣生化仪器厂);DHS16-A 红外水分仪(上海精密科学仪器有限公司);9600 DNA 扩增仪(美国 PE 生物系统公司);7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

1.2 方法

1.2.1 鹿衔草挥发油的提取 水蒸气蒸馏法提取鹿衔草挥发油。称取 200 g 鹿衔草饮片,用 3000 ml 双蒸水室温下浸泡 1 h 后,在挥发油提取器提取 8 h,所获取的挥发油用无水硫酸钠干燥,4 °C 保存备用。实验前用 DMSO 溶解,培养液稀释,DMSO 终浓度为 0.1%。

1.2.2 鹿衔草挥发油 GC-MS 化学成分分析 GC-MS 检测鹿衔草挥发油化学成分。GC-MS 分析条件:色谱柱为 SE-30 弹性石英毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm),柱温 50 °C,气化室温度 250 °C,柱前压 15 psi。载气为 He,载气流量 1 ml/min,进样口温度选择为 260 °C,进样量 1 μl,分流比为 50:1。程序升温条件为初始柱温选在 50 °C,保持 3 min,然后以 1.5 °C/min 的速率升至 160 °C,再以 3 °C/min 的速率升至 280 °C,保持 40 min。离子源为 EI 源,电子能量 70 eV,离子源温度 230 °C,倍增电

压 1388 V,四级杆温度 150 °C,传输线温度 280 °C,扫描范围是 30~500 amu。定性分析:经由 GC-MS 分析测定得到总离子流色谱图,用计算机检索色谱图中各色谱峰的质谱图,并与 NIST 标准质谱数据库中的标准谱图比对定性。定量分析:通过计算机计算,得到各挥发性成分在挥发油中的相对质量百分含量(即检测而得的化合物的峰面积与总峰面积的百分比)。

1.2.3 细胞培养 大鼠成骨样细胞 ROS17/2.8 用含体积分数为 10% FBS 的高糖 DMEM 培养液贴壁培养。待细胞生长达到 70%~80% 汇合时,按 1:3 的比例传代培养。

1.2.4 MTT 法检测成骨细胞增殖 ROS17/2.8 细胞以 1×10^5 cells/ml 密度接种于 96 孔板,每孔 100 μl。接种 24 h 后,分别用鹿衔草挥发油终浓度为 3.44 ng/ml、6.88 ng/ml、13.75 ng/ml、27.5 ng/ml、55 ng/ml、110 ng/ml、220 ng/ml 和 440 ng/ml 含 10% FBS 的 DMEM 培养液干预,以 10% FBS 的 DMEM 培养液为空白对照,每组设 8 个复孔。药物干预 48 h 后弃培养基,每孔加入 100 μl 0.05% MTT 溶液,37 °C 温育 4 h,弃除 MTT 溶液,加入 DMSO 100 μl,振荡 10 min 充分溶解。酶标仪 570 nm 波长检测各孔的吸光度值,取 8 孔平均值进行比较。

1.2.5 流式细胞术检测成骨细胞周期 ROS17/2.8 细胞以 1×10^5 cells/ml 密度接种于 6 孔板,每孔 1 ml。接种 24 h 后,分别用含 10% FBS 的 DMEM 培养液及 27.5 ng/ml 浓度鹿衔草挥发油干预(后者为 MTT 检测结果发现的对 ROS17/2.8 细胞增殖有促进作用鹿衔草挥发油浓度)48 h 后收集细胞检测。上机前处理,上流式细胞仪检测,ModFit 软件分析 DNA 数据,读取 G0/G1 期、S 期、G2/M 期细胞数,计算细胞增殖指数(Proliferation Index, PI)。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 检测成骨细胞 PCNA mRNA 表达采用 Trizol 法提取成骨细胞总 RNA,根据试剂盒说明书提供的步骤进行逆转录。合成 PCNA 扩增引物:上游 5'-CCCTCAAAGACCTCATCAA-3',下游 5'-TGGGATTCCA AGTTGCTC-3';内参 β-actin 引物上游 5'-CGGTC AGGTC ATCAC TATCG-3',下游 5'-AGGAG CCAGG GCAGT AATCT-3'采用两步法标准 Real Time PCR 扩增程序进行扩增,用参照基因 β-actin 对所有样品进行校正,7500 型实时定量 PCR 仪软件分析时,以模型血清组中某一样本 mRNA 的表达量作为“1”,计算出各组其他样本的相对表达量(即 RQ 值),利用各

组样本的 RQ 值进行统计,比较组间 mRNA 相对含量。

1.3 统计学处理

实验数据运用 SPSS 15.0 软件包进行处理分析,实验数据采用均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 鹿衔草挥发油化学成分分析

用毛细管色谱法对鹿衔草挥发油化学成分进行分析,经气相色谱数据处理机用面积归一化法测得各组分的相对百分含量,并用气相色谱-质谱联用技术做挥发油的 GC-MS 总离子流色谱检测,所得总离子流质谱图(TIC)见图 1。分析鉴定鹿衔草挥发油中的主要化学成分及含量,结果见表 1。

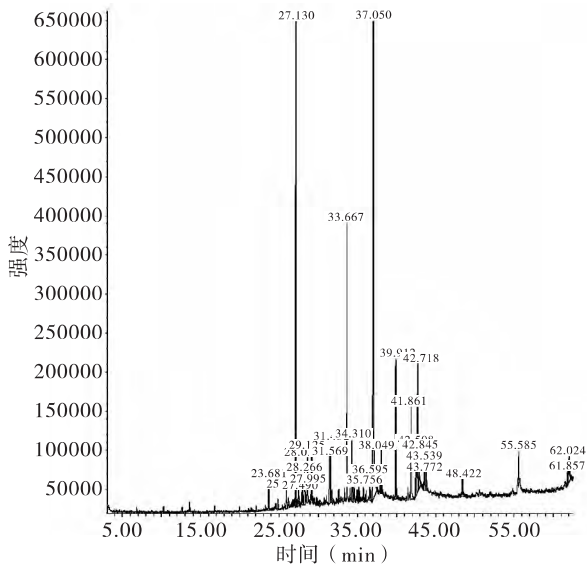


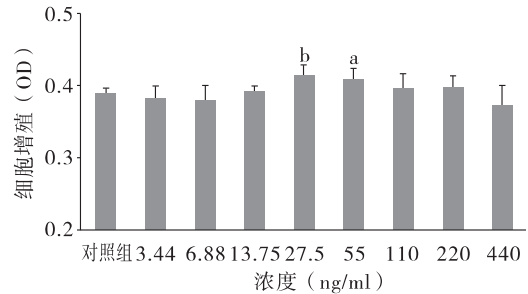
图 1 鹿衔草挥发油 GC-MS 检测的总离子流图

表 1 鹿衔草挥发油的主要化学成分及百分含量(%)

峰号	保留时间 (min)	相对含量 (%)	化合物	相似度 (%)
1	23.684	1.13	4-己基-2,5-二氢-2,5-二氧-3-咪唑乙酸	94
3	27.133	15.25	柏木脑	98
8	29.187	1.31	1,6-二甲基-4-(1-甲基乙基)-萘	98
9	31.439	2.10	肉豆蔻酸	98
11	33.670	8.57	植酮	99
12	34.308	2.01	邻苯二甲酸二异丁酯	64
16	36.595	1.14	异植物醇	64
17	37.049	26.60	棕榈酸	99
19	38.047	1.70	十六酸乙酯	78
21	41.865	4.22	植物醇	96
23	42.715	7.35	油酸	96
29	55.584	1.52	11-十二烷基-二十一烷	70

2.2 不同浓度鹿衔草挥发油干预后成骨细胞增殖情况

MTT 检测显示,27.5 ng/ml、55 ng/ml 浓度的鹿衔草挥发油干预能明显促进成骨细胞增殖,与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),并以 27.5 ng/ml 浓度干预时成骨细胞增殖速度最快。结果见图 2。



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

图 2 不同浓度鹿衔草挥发油对成骨细胞增殖的影响(OD 值)

2.3 鹿衔草挥发油干预对成骨细胞增殖周期的影响

以 27.5 ng/ml 浓度的鹿衔草挥发油干预成骨细胞 48 h 后,流式细胞术检测成骨细胞增殖周期,与对照组比较,鹿衔草挥发油组成骨细胞 G0/G1 期比例明显降低 ($P < 0.01$),而处于增殖周期的成骨细胞比例及增殖指数则明显高于对照组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结果见表 2。

表 2 两组成骨细胞周期分布比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	G0/G1 期	S 期	G2/M 期	增殖指数(PI)
对照组	85.635 ± 0.738 3	10.193 ± 0.290 3	4.172 ± 0.585 3	14.365 ± 0.738 3
鹿衔草挥发油组	83.657 ± 0.532 0 ^b	10.800 ± 0.596 7 ^a	5.535 ± 0.926 9 ^b	16.347 ± 0.535 4 ^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

2.4 鹿衔草挥发油干预对成骨细胞 PCNA mRNA 表达的影响

鹿衔草挥发油作用于成骨细胞 48 h 后,荧光实时定量 PCR 检测结果表明,鹿衔草挥发油干预后的成骨细胞增殖细胞核抗原 PCNA mRNA 表达量达到对照组的 1.5 ~ 2.35 倍,提示鹿衔草挥发油干预能提高成骨细胞 PCNA mRNA 表达。结果见图 3、表 3。

3 讨论

骨质疏松是骨吸收和骨形成的失衡所致,而骨形成和骨吸收的速度主要决定于成熟骨再生的基本多细胞单位中骨形成细胞和骨吸收细胞的数量^[11]和功能活性。成骨细胞是能调节骨新陈代谢的

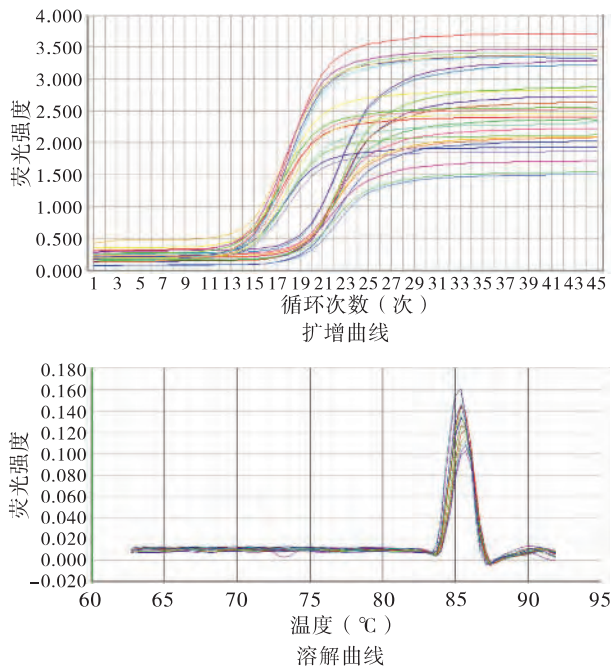


图 3 PCNA 扩增曲线与溶解曲线

表 3 两组成骨细胞 PCNA mRNA 表达

组别	平均 Δ CT	Δ CT	表达量差异 $2^{-\Delta\Delta CT}$
对照组	4.50 ± 0.44	-	-
鹿衔草挥发油组	3.59 ± 0.33	0.91 ± 0.33	1.5 ~ 2.35

一种骨形成细胞,其功能障碍在骨质疏松发病机理中发挥核心作用。因此,刺激成骨细胞骨形成可能是防治 OP 的一种很有希望的方案,而促进成骨细胞增殖是增加成骨细胞骨形成的途径之一。

鹿衔草作为中医临床治疗骨质疏松症的常用中药,目前尚未见报道研究鹿衔草挥发油对成骨细胞及骨质疏松的作用。本实验提取鹿衔草挥发油干预大鼠成骨样细胞 ROS17/2.8,结果显示,一定浓度的鹿衔草挥发油能明显促进 ROS17/2.8 细胞增殖,提示鹿衔草挥发油可能是鹿衔草治疗骨质疏松的有效成分之一。进一步采用流式细胞术检测鹿衔草挥发油对成骨细胞增殖周期的影响,发现鹿衔草挥发油干预后,从静止期进入 S 期、G2/M 期的成骨细胞明显增多,提示其通过推进成骨细胞的增殖周期进程,从而促进成骨细胞增殖。增殖细胞核抗原与真核细胞的细胞周期蛋白相互作用^[12],参与细胞增殖周期的调节,且与细胞 DNA 合成关系密切,其表达反映了细胞的增殖活性,是细胞增殖的标志

物^[13]。本研究表明,鹿衔草挥发油能通过上调成骨细胞 PCNA mRNA 表达,参与成骨细胞增殖周期的调节,提高成骨细胞的增殖活性。

综上所述,本研究表明鹿衔草挥发油能通过上调 PCNA 表达,加速成骨细胞增殖周期进程,从而促进成骨细胞增殖,这可能是鹿衔草有效防治骨质疏松的机制之一。

参 考 文 献

[1] Nancy E. Lane. Epidemiology ,etiology ,and diagnosis of osteoporosis [J]. Am J Obstet Gynecol ,2006 ,194: S3 - S11.

[2] W Zhang ,M Kanehara ,Y Zhang. A Trial Study of Propranolol and Zhigancao Decoction on the Central Depressant and Anti - osteoporotic Action in Ovariectomized Rats [J]. J Tradit Chin Med ,2008 ,28 (1) : 64 - 70.

[3] X Lin ,Y Wu ,S Lin ,et al. Effects of Volatile Components and Ethanolic Extract from Eclipta prostrata on Proliferation and Differentiation of Primary Osteoblasts [J]. Molecules ,2010 ,15 (1) : 241 - 250.

[4] 叶祖明. 骨质疏松症的中药治疗临床进展 [J]. 医学综述 ,2006 ,12 (21) : 1334 - 1336.

[5] 蔡水奇,徐水军. 骨质增生汤治疗原发性骨质疏松症疗效观察 [J]. 浙江中西医结合杂志 ,2002 ,12 (2) : 52 - 53.

[6] 孙博,李治罡. 应用刘柏龄教授经验方治疗骨质疏松症 [J]. 中国社区医师 ,2007 ,9 (19) : 112.

[7] 李艳. 续断、鹿衔草、锁阳对去卵巢大鼠骨质疏松症的治疗作用及机理探讨 [D]. 北京: 中国中医科学院 ,2011.

[8] 赵虹,赵悦,闻辉. 健骨胶囊对去卵巢骨质疏松模型大鼠骨密度和骨矿含量及骨重系数的影响 [J]. 中医正骨 ,2004 ,16 (5) : 12 - 14.

[9] 潘贵超,王辉奇,张治国. 补肾健脾活血方对大鼠骨质疏松骨折愈合的作用及其机理探讨 [J]. 中国中医基础医学杂志 ,2011 ,11 (19) : 4648 - 4649.

[10] 王振全,潘贵超,鞠大宏. 补肾健脾活血方对原发性骨质疏松症相关实验室指标的影响 [J]. 吉林中医药 ,2011 ,31 (7) : 652 - 653.

[11] Morales O ,Samuelsson MK ,Lindgren U ,et al. Effects of 1 ,25 - Dihydroxyvitamin D3 and Growth [J]. Endocrinology ,2004 ,145 (1) : 87 - 94.

[12] Giovanni Maga and Ulrich Hübscher. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) : a dancer with many partners [J]. Journal of Cell Science ,2003 ,116 (15) : 3051 - 3060.

[13] 杨慧,王德生,李续领,等. 复智散对阿尔茨海默病大鼠海马内源性神经干细胞增殖的影响 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志 ,2009 ,16 (6) : 393 - 396.

(收稿日期: 2016 - 03 - 02)