

· 基础研究 ·

巴戟天多糖含药血清对体外培养成骨细胞凋亡的保护作用观察

李楠¹, 王和鸣¹, 郭素华², 林旭³, 郑良朴⁴, 王力¹

(1. 福建中医学院骨伤系, 福建 福州 350108; 2. 福建中医学院药理学系; 3. 福建医科大学分子医学中心; 4. 福建中医学院中西医结合研究院)

【摘要】 目的: 通过体外培养成骨细胞(osteoblast, OB), 观察巴戟天多糖对细胞凋亡的保护作用, 探讨巴戟天促进成骨细胞活性的机制。方法: 取巴戟天多糖和巴戟天水提液制备含药血清, 用含药血清进行细胞培养。取 24 h 内新生 SD 大鼠头盖骨成骨细胞, 取 2 代培养的成骨细胞, 分为对照组(培养过程中仅加入大鼠血清)、诱导凋亡组(对照组中加入全反式维甲酸)、巴戟天水提物组(诱导凋亡组中加入巴戟天水提物药物血清)、巴戟天多糖组(诱导凋亡组中加入巴戟天多糖药物血清), 通过荧光显微镜观察, 流式细胞术检测细胞凋亡, RT-PCR 检测 Bcl-2/Bax 基因表达, 对巴戟天多糖在细胞凋亡过程中的作用进行评价。结果: 诱导凋亡组 12 h 诱导的 OB 出现凋亡, 细胞核或细胞质内可见致密的黄绿染色, 染色质形成明亮的凝聚块, 24 h 单个凋亡细胞与周围的细胞分离, 细胞皱缩呈圆形或卵圆形, 细胞变小, 胞浆致密, 细胞器相互靠近, 染色质浓缩, 形成不同形状和大小的块状。巴戟天水提物组、巴戟天多糖组凋亡率显著低于诱导凋亡组($P < 0.01$), 且巴戟天多糖组低于巴戟天水提物组($P < 0.05$)。凋亡细胞 Bcl-2 mRNA 表达水平: 对照组 > 巴戟天多糖组 > 巴戟天水提物组 > 诱导凋亡组。Bax mRNA 表达水平: 诱导凋亡组 > 巴戟天水提物组 > 对照组 > 巴戟天多糖组($P < 0.01$)。Bcl-2/Bax: 对照组 > 巴戟天多糖组 > 巴戟天水提物组 > 诱导凋亡组($P < 0.01$)。结论: 巴戟天在一定程度上可抑制全反式维甲酸诱导的成骨细胞凋亡, 且巴戟天多糖的这种作用显著优于巴戟天水提物, 说明巴戟天多糖是巴戟天抑制成骨细胞凋亡的主要成分之一。

【关键词】 巴戟天多糖; 成骨细胞; 细胞凋亡; Bcl-2; Bax

Protection of apoptosis of osteoblast cultured in vitro by Morinda Root Polysaccharide LI Nan*, WANG He-ming, GUO Su-hua, LIN Xu, ZHENG Liang-pu, WANG Li. *Department of Orthopaedics and Traumatology, Fujian College of TCM, Fuzhou 350108, Fujian, China

ABSTRACT Objective: To explore the protection on apoptosis and the mechanism of promoting the cytoactive of osteoblast by Morinda Root Polysaccharide through the observations of the cultured osteoblast in vitro. **Methods:** Prepared blood serum with Morinda Root Polysaccharide and Morinda Root aqueous extract and cultured Osteoblast in vitro with it. The second generation osteoblasts in vitro were separated from the cranium of 24-hours newborn SD rat, which were divided into control group (adding only rat serum during cultivation), induction apoptosis group (adding trans-retinoic acid in control group), Morinda Root aqueous extract group (adding serum prepared by Morinda Root aqueous extract in induction apoptosis group) and Morinda Root Polysaccharide group (adding serum prepared by Morinda Root Polysaccharide in induction apoptosis group). Adopting fluorescence microscope, apoptosis detected by flow cytometry and gene expression of Bcl-2 and Bax detected by RT-PCR, to evaluate the effect of Morinda Root Polysaccharide on the course of osteoblast apoptosis. **Results:** The apoptotic rate of Morinda Root aqueous extract group and Morinda Root Polysaccharide group were significantly lower than that of induction apoptosis group ($P < 0.01$). The apoptosis ratio of Morinda Root Polysaccharide group was lower than that of Morinda Root aqueous extract group ($P < 0.05$). Expression level of Bcl-2 mRNA of apoptosis cell: control group > Morinda Root Polysaccharide group > Morinda Root aqueous extract group > induction apoptosis group ($P < 0.01$). Expression level of Bax mRNA: induction apoptosis group > Morinda Root aqueous extract group > control group > Morinda Root Polysaccharide group ($P < 0.01$). Bcl-2/Bax: control group > Morinda Root Polysaccharide group > Morinda Root aqueous extract group > induction apoptosis group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Morinda Root can inhibit the apoptosis of osteoblast induced

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30271630)及福建省青年科技人才创新项目资助(编号: 2003J039)

通讯作者: 李楠 Tel: 0591-22861137 E-mail: MR.LINAN@126.com

by trans-retinoic acid in some extent. The above role of Morinda Root Polysaccharide is significant better than that of Morinda Root aqueous extract. It is indicated that Morinda Root Polysaccharide is one of the essential component of inhibiting osteoblast apoptosis.

Key word Morinda Root Polysaccharide; Osteoblast; Apoptosis; Bcl-2; Bax

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(1): 39- 41 www.zggszz.com

南药巴戟天(*Morinda officinalis how*)具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的作用,临床上以巴戟天为主药治疗肾阳不足、肝血亏虚型骨质疏松症效果明显,具有显著缓解临床症状和体征等功能。我们在体外实验中发现:巴戟天水提物可以促进体外培养成骨细胞增殖、分泌碱性磷酸酶和骨钙素,促进成骨细胞表达 β 转化生长因子 1,从而大量分泌 I 型胶原,以利于钙盐沉积^[1,2]。药理研究表明,巴戟天多糖有明显的免疫增强作用^[3],本研究旨在观察巴戟天多糖对成骨细胞凋亡的保护作用,进一步阐述巴戟天补肾阳、强筋骨的作用。

1 材料与方法

1.1 巴戟天多糖的提取^[4] 取巴戟天干制品(福建南靖科技局提供,5年生),粉碎,烘干后,称取 400 g,加入 10 倍的水,沸水浴 1 h,滤过,加 3 倍体积的 100%乙醇,静置过夜,收集沉淀、干燥,获得粗多糖(福建中医学院药系中药化学实验室提供)。将粗多糖复溶于适量的蒸馏水中,采用 Sevag 法(氯仿:正丁醇=4:1 混合摇匀)除蛋白(重复 3 次),加适量 100%乙醇使粗多糖溶液乙醇浓度为 80%,静置过夜,收集沉淀。无水乙醇、丙酮、乙醚脱水,干燥。取沉淀溶于蒸馏水,加乙醇至乙醇浓度达 70%,静置过夜,滤过,用 70%乙醇反复淋洗,沉淀干燥,得巴戟天多糖纯品。临用前用蒸馏水稀释成含巴戟天多糖 1 g/ml 水溶液。

1.2 巴戟天水提液制备 取巴戟天干制品(福建南靖科技局提供,5年生),粉碎,烘干后,称取 400 g,加入 10 倍的水浸泡 30 min,煎煮 1 h,过滤。药渣加入 10 倍的水煎煮 45 min,过滤。合并 2 次滤液,浓缩至 160 ml,常温冷却,置冰箱内过夜,离心,取上清,调整体积至 140 ml,用蒸馏水配成每 ml 含 1 g 生药,100 ml 血清瓶分装,100 °C 灭菌 30 min,2~8 °C 保存。

1.3 巴戟天多糖和巴戟天水提液药物血清制备 选择清洁级健康 3 月龄 SD 大鼠 60 只,体重(280±20) g,由上海中科院提供(实验动物质量合格证号:SYXK(沪)2003-0003)。饲养条件:适应室喂养 3 d。每日 2 次灌胃,20 只给予巴戟天多糖,20 只给予巴戟天水提液,20 只仅给予蒸馏水。用药剂量相当于临床等效剂量(根据“人和动物体表面积折算和等效剂量比率表^[5]”计算),每次灌胃 2.5 g/kg,连续 3 d 给药,第 4 天 1 次灌胃全天剂量。采血前禁食 12 h,末次给药 1 h 后采血。

1.4 成骨细胞的提取 取 24 h 内新生清洁级 SD 大鼠头盖骨,清除结缔组织,PBS 洗,0.25%胰蛋白酶 37 °C 预消化 20 min,移入 0.1% II 型胶原酶内,37 °C 振荡消化 60 min,1 000 r/min 离心 10 min,去上清液,用培养液制成细胞悬液,置 5%二氧化碳培养箱中培养。原代培养的成骨细胞(F0)经 2 次消化,取 2 代细胞(F2),细胞计数板计数,调整浓度为 5×10⁵ 个/ml,进行实验。

1.5 分组 F2 细胞培养瓶共分为 4 组。对照组:2 代成骨细胞正常体外培养。诱导凋亡组:在对照组正常培养 24 h 后,加

入 10⁻⁴ M 的全反式维甲酸 (all-trans retinoic acid, RA)100 μ l,诱导成骨细胞凋亡。巴戟天水提物组:在诱导凋亡组中 24 h 后加入巴戟天水提物药物血清 0.2 ml。巴戟天多糖组:在诱导凋亡组中 24 h 后加入巴戟天多糖药物血清 0.2 ml。

1.6 观察项目和方法

1.6.1 荧光显微镜观察 对照组、诱导凋亡组分别于 8、12、24 h 取长有成骨细胞的盖玻片,用吖啶(AO)染色,日产 Nikon 荧光显微镜下对比观察。

1.6.2 流式细胞仪检测 48 h 后将 4 组经胰酶消化,调整细胞浓度为 5×10⁶ 个/ml,4 °C 70%乙醇固定 1 h,离心 1 000 r/min,洗涤,每管内加入含 E.B 的 DNA 荧光染液 1 ml,在 4 °C 下染色 30 min。染过的细胞经过滤后,流式细胞仪测定,检测凋亡细胞的 G1 期细胞个数(G1 期为 DNA 和蛋白质合成的准备阶段,细胞进入 G1 期标志细胞已进入增殖过程)。

1.6.3 Bax 及 Bcl-2 的 mRNA 表达测定 48 h 后 PBS 1 ml 重新悬浮 4 组细胞,移至 1.5 ml Eppendorf 管,离心,去上清,按照试剂盒操作说明提取总 RNA。以 β -actin 为内参照,通过逆转录-聚合酶反应(RT-PCR)对比分析基因 Bax、Bcl-2 的 mRNA 表达量。Bax、Bcl-2、 β -actin 上下游引物序列分别为:

Bax:59 CACCAAGAAGCTGAGCGAGTG 276 TAGTCACAGG-GCCTTGAGC

Bcl-2:382 TCCTTCCAGCCTGAGAGCA 784 TGTGCAGATGCCGTTCA

β -actin:185 GAGGCATCCTGACCCTGAAG 459 CATCACAAT-GCCAGTGGTACG

1.7 统计学处理 计量资料采用 t 检验,数据以($\bar{x} \pm s$)表示, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光显微镜观察 对照组在 8、12、24 h 正常细胞核 DNA 均为黄色或黄绿色均匀荧光;诱导凋亡组 8 h 细胞核仍为黄色或黄绿色均匀荧光,12 h 诱导的 OB 出现凋亡,细胞核或细胞质内可见致密的黄绿染色,染色质形成明亮的凝聚块,24 h 单个凋亡细胞与周围的细胞分离,细胞皱缩呈圆形或卵圆形,细胞变小,胞浆致密,细胞器相互靠近,染色质浓缩,形成不同形状和大小的块状。

2.2 流式细胞仪检测结果 见表 1。表 1 中的 G1 为 DNA 和蛋白质合成的准备阶段,细胞进入 G1 期标志细胞已进入增殖过程;S 期即 DNA 合成期,DNA 复制和组蛋白的合成在此阶段完成;G2 期为发生在 DNA 合成后和本次细胞分裂期之前。本实验流式细胞分析显示,经 RA 处理的诱导凋亡组细胞大量停留于 G1 期的增多,S 期明显减少,与对照组相比差异有统计学意义(P<0.01),凋亡细胞大量出现,说明全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, RA)可以使大量细胞停留在 G1 期,从而阻滞细胞进入 S 期,使 DNA 合成受阻,抑制细胞有丝

表 1 各组 OB 细胞周期的细胞数和凋亡率比较($\bar{x}\pm s$)
Tab.1 Comparison of cell quantity of cell cycle and apoptotic rate in different groups($\bar{x}\pm s$)

组别	G1	G2	S	凋亡率(%)
对照组	569.5±24.7	133.2±31.1	301.1±21.5	0
诱导凋亡组	809.1±43.6**	111.7±59.7	82.6±13.1**	39.02±2.78
巴戟天水提物组	700.2±30.5***	193.1±62.0	108.7±23.3***	16.8±3.21#
巴戟天多糖组	622.6±65.9***▲	203.0±67.6▲	175.1±35.6***▲	9.69±4.60#▲

注:与对照组相比较, ** $P<0.01$; 与诱导凋亡组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; 与巴戟天水提物组比较, ▲ $P<0.05$

Note: Compared with the control group, ** $P<0.01$. Compared with the apoptosis group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$. Compared with the Morinda Root group, ▲ $P<0.05$

分裂,诱导细胞发生凋亡。对照组流式细胞仪检测无 G1 期,巴戟天水提物组与巴戟天多糖组的 G1 期低于诱导凋亡组。

表 1 显示:G1 期,诱导凋亡组、巴戟天水提物组、巴戟天多糖组与对照组相比差异有统计学意义($P<0.01$);巴戟天水提物组、巴戟天多糖组低于诱导凋亡组,差异有统计学意义($P<0.01$);巴戟天多糖组低于巴戟天水提物组,差异有统计学意义($P<0.05$)。S 期,诱导凋亡组、巴戟天水提物组、巴戟天多糖组与对照组相比下降明显,差异有统计学意义($P<0.01$);巴戟天水提物组、巴戟天多糖组高于诱导凋亡组,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 <0.01),其中巴戟天多糖组高于巴戟天水提物组,差异有统计学意义($P<0.01$)。

凋亡率:巴戟天水提物组、巴戟天多糖组低于诱导凋亡组,差异有统计学意义($P<0.01$),其中巴戟天多糖组低于巴戟天水提物组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 Bax、Bcl-2 的 mRNA 表达测定 见表 2。

表 2 各组经诱导 24 h 后 OB 内 Bax、Bcl-2mRNA 的相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	Bcl-2	Bax
对照组	0.238 6±0.029 1	0.097 8±0.008 2
诱导凋亡组	0.074 4±0.032 7**	0.661 4±0.030 9**
巴戟天水提物组	0.177 3±0.048 5***	0.459 7±0.043 0***
巴戟天多糖组	0.191 6±0.156 8***	0.380 6±0.058 2***▲

注:与对照组相比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与诱导凋亡组比较, ## $P<0.01$; 与巴戟天水提物组比较, ▲ $P<0.05$

Note: Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the apoptosis group, ## $P<0.01$. Compared with the Morinda Root group, ▲ $P<0.05$

表 2 显示:RA 诱导 24 h 后, 诱导凋亡组 Bcl-2 mRNA 表

达下降,与对照组相比差异有统计学意义($P<0.01$);Bax mRNA 表达升高,与对照组相比差异有统计学意义($P<0.01$)。

诱导凋亡组 24 h 后加入巴戟天水提物(巴戟天水提物组),与诱导凋亡组相比 Bcl-2 mRNA 表达升高,差异有统计学意义($P<0.01$);Bax mRNA 表达下降,与诱导凋亡组相比差异有统计学意义($P<0.01$)。

诱导凋亡组 24 h 后加入巴戟天多糖(巴戟天多糖组),与诱导凋亡组相比 Bcl-2 mRNA 表达升高,差异有统计学意义($P<0.01$);Bax mRNA 表达下降,与诱导凋亡组相比差异有统计学意义($P<0.01$),与巴戟天水提物组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 巴戟天多糖对 OB 凋亡细胞周期的影响 流式细胞仪检测分析显示,经 RA 处理的凋亡细胞大量停留于 G1 期的增多,S 期明显减少,与对照组相比有差异,凋亡细胞大量出现,说明 RA 可以使大量细胞停留在 G1 期,从而阻滞细胞进入 S 期,使 DNA 合成受阻,抑制细胞有丝分裂,诱导细胞发生凋亡。加入 RA 24 h 后加入巴戟天水提物血清,则停留于 G1 期的 OB 较 RA 诱导组减少,S 期较 RA 诱导组增多,与 RA 诱导组相比具有显著的差异($P<0.01$)。加入 RA 24 h 后加入巴戟天多糖血清,则停留于 G1 期的细胞继续减少,S 期继续增多,与巴戟天水提物组相比有差异。可见巴戟天水提物可使凋亡细胞停滞于 G1 期减少,更多的进入 S 期,而巴戟天多糖则可使凋亡细胞 G1 期 MSC 进一步减少,提示巴戟天多糖可以保护细胞进入 S 期,促进 DNA 合成,从而促进细胞有丝分裂,抑制细胞凋亡,其作用优于巴戟天水提物。

3.2 巴戟天多糖对 OB 凋亡基因 Bcl-2 与 Bax 的影响 本研究结果显示,RA 诱导 OB 凋亡,Bcl-2 的表达下降,Bax 的表达上升,提示 Bcl-2 和 Bax 在 RA 诱导的 OB 凋亡中起着重要的作用。而在诱导凋亡 24 h 后加入巴戟天水提物或巴戟天多糖可非常显著抑制由 RA 诱导的 OB 凋亡中 Bcl-2 表达下降和 Bax 表达上升,且巴戟天多糖在抑制 Bax 表达上升方面优于巴戟天水提物,提示巴戟天可抑制 RA 诱导的 OB 凋亡,并且巴戟天多糖的这种作用优于巴戟天水提物。

综上所述,巴戟天可在一定程度上抑制 RA 诱导的 OB 凋亡,且巴戟天多糖的这种作用显著优于巴戟天水提物,说明巴戟天多糖是巴戟天抑制凋亡的主要成分之一。

参考文献

- 1 王和鸣,王力,李楠. 巴戟天对骨髓基质细胞向成骨细胞分化影响的实验研究. 福建中医学院学报,2004,14(3):16-19.
- 2 李楠,王和鸣,林旭,等. 巴戟天对成骨细胞生物学特性影响的实验研究. 中国医药学报,2004,19(12):726-728.
- 3 陈小娟,李爱华,陈再智. 巴戟多糖免疫药理研究. 实用医学杂志,1995,11(9):348-349.
- 4 郭素华,王和鸣,黄涛,等. 南靖巴戟天多糖的含量测定. 福建中医学院学报,2006,16(1):32-33.
- 5 李仪奎. 中药药理实验方法学(附录 3). 第 2 版. 上海:上海科学技术出版社,2006. 589.

(收稿日期:2007-07-16 本文编辑:王宏)