

龟板脂肪酸调控鼠骨髓间质干细胞增殖作用

Effect of Fatty Acids from Plastrum Testudinis on Proliferation of Rat Bone Mesenchymal Stem Cell

张越华¹, 曾和平^{2*}, 陈东风³

ZHANG Yue-Hua¹, ZENG He-Ping^{2*} and CHEN Dong-Feng³

1 广州城市职业学院, 广州 510405

2 华南理工大学化学科学学院功能分子研究所, 广州 510641

3 广州中医药大学, 广州 510405

1 Guangzhou City Polytechnic College, Guangzhou 510405, China

2 Institute of the Functional Molecule, Department of Chemistry, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China

3 Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

摘 要 为了解龟板浸膏中对鼠骨髓间质干细胞体外增殖起促进作用的化学成分, 用石油醚提取促进鼠骨髓间充质干细胞增殖的龟板有效部位, 用 MTT 比色法及流式细胞仪研究了提取物调控鼠骨髓间充质干细胞活性, 采用 GC-MS 技术研究了石油醚提取物的化学成分。初步结果表明, 石油醚提取物能明显促进干细胞增殖, 其主要成分是脂肪酸、甾醇和甾酮, 且十八烷酸、十六烷酸和甾酮能起调控鼠骨髓间充质干细胞活性。龟板浸膏中, 脂肪酸起调控鼠骨髓间充质干细胞增殖作用, 这为龟板浸膏促进鼠骨髓间充质干细胞增殖又不引起干细胞过度生长的分子机制提供实验依据, 也为中医药调控干细胞的研究提供重要的参考。

关键词 龟板, 干细胞, 增殖, 脂肪酸, GC-MS

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)06-1029-04

Abstract To investigate the components in Plastrum Testudinis which have effects on the proliferation of rat bone marrow mesenchymal stem cell (bMMSCs), the active parts of plastrum testudinis which can promote proliferation of rat mesenchymal stem cells were extracted by petroleum aether. The activities of inducing the proliferation of bMMSCs were studied by MTT assay and flow cytometry. The chemical components of extraction were analyzed by GC-MS. The results showed that the petroleum aether extraction can obviously promote the proliferation of the stem cells. The main components are long-chain fatty acids, cholesterol and cholest-4-en-3-one, and palmitic acid, stearic acid and cholest-4-en-3-one have effects on proliferation of bMMSCs. In plastrum testudinis, fatty acids can promote the proliferation of bMMSCs but not increase overly. This provide the experiment basis, and offer important reference for Traditional Chinese Medicine that researches stem cells.

Key words plastrum testudinis, stem cell, proliferation, fatty acid, GC-MS

有机小分子在促进干细胞增殖与分化方面的显著作用引起人们广泛关注^[1-4]。Coowar 等人首次报道合成的吲哚脂肪醇类化合物调控神经干细胞的分化作用显著^[2]; Peter G 等人报道了含氮杂环小分子

化合物能在体外定向诱导成体干细胞和胚胎干细胞向成骨方向和神经方向分化^[1]。

近几年来, 中医药在调控干细胞增殖与分化方面成为研究热点。三七总皂甙能促进离体胎鼠皮层

Received: February 13, 2007; Accepted: April 9, 2007.

This work was supported by the grant from the National Natural Science Foundation of China (Nos. 20471020, 30472272 and 30772861).

* Corresponding author. E-mail: zenghp@scau.edu.cn

国家自然科学基金资助 (Nos. 20471020, 30472272 和 30772861)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

神经干细胞存活、增殖、分化和自我更新^[5];补阳还五汤能促进大鼠局灶性脑缺血后内源性神经干细胞增殖^[6];人参二醇皂苷对鼠骨髓造血干细胞有明显的刺激增殖作用^[7];鹿茸多肽能促进胎鼠脑神经干细胞向神经元分化^[8];参芪液在体外可以诱导成人骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, bMMSCs)分化为神经元样细胞^[9];黄芪在体外可以诱导成人及大鼠 bMMSCs 分化为神经元样细胞^[10,11];黄体酮、黄连素、阿魏酸钠可体外定向诱导大鼠 bMMSCs 分化为神经元样细胞^[12,13];能促进干细胞增殖分化的中药还有龟板、丹参、黄芩苷等。

龟板是传统中药,始载于《神农本草经》,列为中品。具有补心肾、滋阴降火、潜阳退虚热等功效。近年来,将龟板提取后,找到了促进干细胞增殖的龟板有效部位(简称龟板浸膏)。龟板浸膏能促进鼠 bMMSCs 的体外增殖^[14],促进大鼠骨髓损伤后及局灶性脑缺血后神经干细胞增殖^[15-17],增强 bMMSCs 移植后分化为神经元;也可以在体外诱导成年大鼠 bMMSCs 分化为神经元样细胞^[18],经过较长时间诱导后 bMMSCs 还可能向成骨方向分化。

龟板浸膏促进 bMMSCs 增殖又不引起 bMMSCs 过度生长的分子机制极具研究价值。它不仅有利于在体外对干细胞的扩增进行时间和程度的控制,获得足够量的组织工程种子细胞或在体移植,而且还可能调控干细胞同步进入细胞周期以提高基因转染效率,甚至可能调节体内干细胞或其他具有增殖潜力的细胞完成损伤组织的修复,有望为人类进一步战胜顽疾、保障健康、延续生命开辟新的途径。

龟板浸膏促进鼠 bMMSCs 的体外增殖的化学成份是什么,成为我们感兴趣的研究目标。龟板浸膏用石油醚提取后,用 MTT 比色法和流式细胞仪研究了提取物调控大鼠 bMMSCs 活性,采用 GC-MS 技术研究了石油醚提取物的化学成分。初步结果表明,石油醚提取物能明显促进干细胞增殖,其主要成分是脂肪酸、甾醇和甾酮,且十八烷酸、十六烷酸能起调控鼠骨髓间充质干细胞活性。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

Trace DSQ 型气相色谱-质谱联用仪(美国 Finnigan INC 公司生产),EPICS XL-MCL 型流式细胞分析仪(美国 COULTER 公司生产),十八烷酸、十六烷酸、胆甾醇、甾酮均为色谱纯,购于日本东京 TCI 公司,其它试剂均为分析纯。龟板浸膏由广东中医药大学提供。

1.2 样品的制备

称取龟板浸膏 2g,用 250mL 石油醚加热回流

24h 后,分出提取物,自然挥发干后,分别称取 30mg 提取物提供做促进鼠 bMMSCs 的体外增殖的实验,称取 10mg 用二氯甲烷定容后提供做 GC-MS 分析。

1.3 MTT 法测 bMMSCs 增殖

用 MTT 法测 bMMSCs 增殖,所得数据用均数 ± 标准差($\bar{X} \pm S$)表示,采用 SPSS 统计软件进行统计分析。实验对象为取自大鼠的 bMMSCs,样品用 DMSO 作溶剂,实验分为对照组(加 DMSO 溶剂和细胞)和样品组(加样品的 DMSO 溶液及细胞)。将骨髓间充质干细胞以(1×10^5) / L 密度接种于用 96 孔培养板中,37℃、5% CO₂ 孵箱中培养至细胞贴壁,加入各实验组,每一浓度重复 5 孔。37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 72h,每孔加入 MTT 20μL,继续培养 4h。吸弃培养基,加入 DMSO 150μL。用酶标仪检测各组细胞的 490nm 吸光值,以 490nm 的吸光值代表细胞活力,并以 0μg/μL 药物(加 DMSO 溶剂和细胞)作为对照组。

1.4 用流式细胞仪测 bMMSCs 活性

将 bMMSCs 用 PBS(磷酸盐缓冲盐水)清洗 2 遍,样品加胰蛋白酶,用甲醇固定 5 min,离心过滤,再用 PBS 洗涤。每毫升的 PBS 加入中和液(含 RNase) 40μg,轻轻混匀,室温放置 10 min,每毫升加碘化丙锭染料 40μg,轻轻混匀,于 37℃ 下孵化 30min,上机应用 EPICS XL-MCL 流式细胞仪进行检测,激发光为 490nm。细胞增殖指数 PI 代表了细胞群体中增殖期细胞的数量,在一定程度上可反映细胞的增殖状态。

1.5 GC-MS 实验条件

色谱条件:DB-5 石英毛细管柱(30m × 0.25mm),载气为氦气,柱前压 50kPa,进样口温度为 280℃。升温程序:60℃(不保留),以 8℃/min 升至 280℃,保留 20min。质谱条件:EI 源,离子源温度 250℃,轰击电子能量 70eV,电子倍增器电压 1.7kV,质量扫描范围 28 ~ 500amu。联结:直接式。

2 结果与讨论

2.1 MTT 法测 bMMSCs 活性

用 MTT 法测定 bMMSCs 增殖活性(OD 值)见图 1,两个浓度的 OD 值与对照组之间比较均有统计学意义($P < 0.05$)。样品组低、高浓度分别为 0.75 μg/μL、4.5μg/μL。结果显示对照组 OD 值为 0.172 ± 0.032 ;对于石油醚提取物样品组,0.75μg/μL 样品组 OD 值为 0.542 ± 0.052 ,4.5μg/μL 样品组 OD 值为 0.345 ± 0.066 ,如图 1 所示,样品组在 0.75μg/μL 浓度时 bMMSCs 增殖效果佳于 4.5μg/μL 浓度时,表明样品组调控 bMMSCs 增殖与浓度并不呈依赖关系。

2.2 流式细胞仪测 bMMSCs 活性

为了证实 MTT 结果的准确性,我们又采用流式细胞仪检测。经流式细胞仪分析测试的对照组及样品组 bMMSCs 活性见图 2,分析结果见表 1。BFGF 阳性对照组浓度为 20ng/mL,样品组浓度为 90 μg/mL。由表 1 可见,与空白对照组及 bFGF 阳性对照组相比,样品组 G0/G1 期比例降低,S 期比例增高,这表明在该浓度时样品组促进 bMMSCs 增殖效果显著。与 MTT 比色法的结果一致。

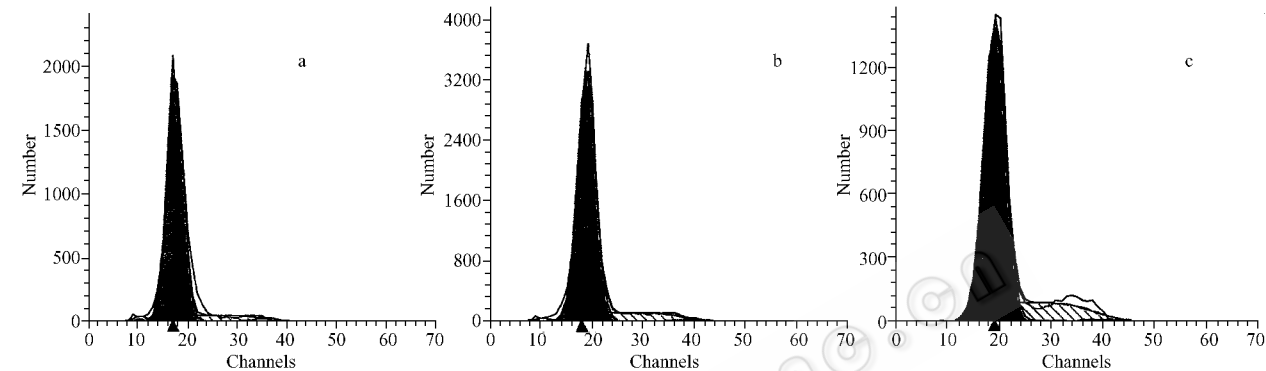


图 2 流式细胞法测 bMMSCs 活性实验数据图

Fig. 2 MSCs activity by flow cytometry
a : control group ; b : bFGF group ; c : sample group.

表 1 对照组及样品组 bMMSCs 活性(%)
Table 1 bMMSCs activity of control group and sample group(%)

Groups	G0/G1	G2/M	S
Control	90.68	0	9.32
bFGF	87.56	0	12.44
Sample	81.43	0	18.57

2.3 化学组分与调控 bMMSCs 增殖的关系

龟板提取物化学成分除了含有胶质、钙盐、脂肪、角蛋白及磷酸化合物,还有一些其他的化学物质。通过对龟板的乙醇浸出物和水浸出物进行游离氨基酸和水解后氨基酸及微量元素等化学成分分析,发现龟板含十七种氨基酸及锌铁等人体必需微量元素。孙苏亚等人研究了从黄喉拟水龟龟板中分离出的三种甾类化合物胆甾醇、十二烯酸胆甾醇酯和甾醇-4-烯-3-酮^[19];他们还用 GC-MS 法研究了龟板中的脂肪酸类化合物^[20];姜大成等人从龟甲滋阴活性方面入手,用柱色谱和气相色谱分离并鉴定出具有滋阴活性的成分是十六烷酸胆甾醇酯和胆甾醇^[21]。龟板浸膏提取物中究竟是哪些物质起到促进 bMMSCs 增殖作用,至今未见报道。龟板浸膏用石油醚提取,采用 MTT 法和流式细胞仪研究了龟板浸膏石油醚提取物调控 bMMSCs 增殖作用,用 GC-MS 技术研究提取物的化学成分。

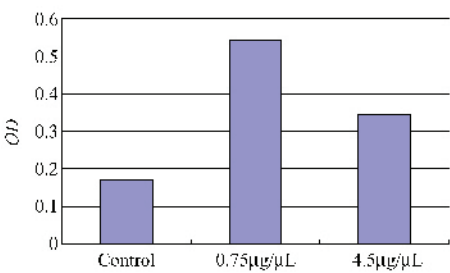


图 1 MTT 法测石油醚提取物 bMMSCs 活性
Fig. 1 bMMSCs activity of petroleum aether extraction by MTT

石油醚提取物样品组 GC-MS 分析初步结果见表 2。

表 2 石油醚提取物的化学组份
Table 2 Chemical components of petroleum aether extraction

Components	Molecular formula	Molecular weight	Content/ %
Tetradecanoic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228	1.24
n-Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	50.54
Octadecanoic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	16.54
Octadec-9-enoic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282	30.27
Cholesterol	C ₂₇ H ₄₆ O	386	0.43
Cholest-4-en-3-one	C ₂₇ H ₄₄ O	384	0.31

石油醚提取物化学成分主要是脂肪酸、胆甾醇和甾酮,含量最高的一种脂肪酸是十六烷酸(50.54%),含量较高的还有 9-十八碳烯酸(30.27%)、十八烷酸(16.54%)。

根据 GC-MS 的分析结果,买来九个物质作为标准品,其中包括十六烷酸(S-2)、十八烷酸(S-5)、胆甾醇(S-7)、甾酮(S-9)。通过 MTT 法对标准品的 bMMSCs 活性测试,结果见图 3,十六烷酸在 0.15 μg/μL 和 1.5 μg/μL 浓度时均能促进 bMMSCs 增殖,且增殖效果显著;十八烷酸和甾酮在 0.15 μg/μL 低浓度时也能明显促进 bMMSCs 增殖,在 1.5 μg/μL 浓度时反而不能促进 bMMSCs 增殖。这初步表明,脂肪酸和甾酮可能起到调控 bMMSCs 增殖的作用,而且

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

只有在浓度不太高时才会促进 bMMSCs 增殖, 浓度过高可能反而会抑制 bMMSCs 增殖。这一结果与龟板浸膏促进 bMMSCs 增殖又不引起 bMMSCs 过度生长的结论一致。

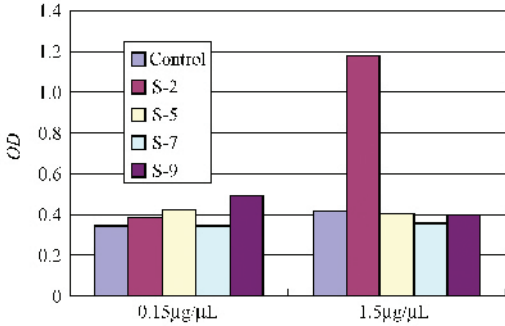


图3 MTT 法测标准品 bMMSCs 活性

Fig. 3 bMMSCs activity of criterion by MTT

3 结论

初步结果表明, 龟板浸膏中起到调控鼠 bMMSCs 增殖作用的物质可能是脂肪酸、甾酮等物质, 而且促进干细胞增殖不是单个分子的作用, 而是多个分子协同作用的结果。相同浓度下, 既有起促进增殖作用的物质, 也有起抑制作用的物质, 这为龟板浸膏促进 bMMSCs 增殖又不引起 bMMSCs 过度生长的分子机制提供实验依据, 也为中医药调控干细胞的研究提供重要的参考。

REFERENCES (参考文献)

[1] Wu X, Ding S, Ding Q, *et al.* Small molecules that induce cardiomyogenesis in embryonic stem cells. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**:1590 – 1591.

[2] Coowar D, Bouissac J, Hanbali M, *et al.* Effects of indole fatty alcohols on the differentiation of neural stem cell. *J Med Chem*, 2004 **47**:6270 – 6282.

[3] Ding S, Schultz PG. A role for chemistry in stem cell biology. *Nature Biotechnology*, 2004 **22**(7):833 – 840.

[4] Chen S, Zhang QS, Wu X, *et al* Dedifferentiation of lineage-committed cells by a small molecule. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**: 410 – 411.

[5] Si YC(司银楚), Cheng L(成龙), Hong QT(洪庆涛), *et al.* Effect of panax notoginseng saponins on ploliferation and differentiation of embryonic rat cortical neural stem cells *in vitro*. *Chinese Journal of Stereology and Image Analysis*(中国体视学与图像分析) 2004 **9**(2):78 – 83.

[6] Liu BY(刘柏炎), Cai GX(蔡光先), Lin L(林琳), *et al.* Prime study on the effect of buying huanwu tang on neural stem cells after focal cerebral ischemia in rats. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*(中国临床康复) 2004 **8**(22):4532 – 4533.

[7] Niu YF(牛决平), Chen XH(陈小红), Song BW(宋必卫), *et al.* Effect of PDS and PTS on the ploliferation of mouse haemopomietic stem/progenitar cells *in vitro*. *Chinese Pharmacological Bulletin*(中国药理学通报) 2004 **20**(11):1316 – 1317.

[8] Chen D(陈东), Meng XT(孟晓婷), Liu JM(刘佳梅), *et al.* Effect of velvet antlet polypeptide (VAP) on differentiation of rat brain-derived stem cells *in vitro*. *Acta Anatomica Sinica*(解剖学报) 2004 **35**(3):240 – 243.

[9] Yao XI(姚晓黎), Liu WB(刘卫彬), Liu TY(柳太云), *et al.* Human mesenchymal stem cells differentiate into neuron-like cells with shenqiye. *Chin J Nerv Ment Dis*(中国神经精神疾病杂志), 2004 **30**(3):211 – 212.

[10] Yu Q(余勤), Lou Y(罗依), Dong Q(董勤), *et al.* Experiment study on differentiation of adult human mesenchymal stem cells (MSC) into neuron like cells with astragale. *Chin J Emerg Med*(中华急诊医学杂志) 2004 **13**(12):826 – 829.

[11] Dong XX(董晓先), Liu JB(刘金保), Dong YX(董燕湘), *et al.* Mesenchymal stem cells induced with astragale differentiate into neuron-like cells. *China Journal of Modern Medicine*(中国现代医学杂志), 2004 **14**(19):19 – 22.

[12] Xiang P(项平), Li HB(李海标). Rat mesenchymal stem cells differentiate into neuron-like cells induced by berberine. *Chinese Journal of Pathophysiology*(中国病理生理杂志) 2004 **20**(1):51 – 53.

[13] Wang Y(汪决), Deng ZF(邓志锋), Lai XI(赖贤良), *et al.* Differentiation rat bone marrow mesenchymal stem cells into neurons induced by sodium fenulate. *Chinese Traditional And Herbal Drugs* (中草药) 2004 **35**(3):290 – 292.

[14] Zhou JH(周健洪), Chen DF(陈东风), Li H(黎晖), *et al.* Effects of surem containing carapax et plastrum testudinis on *in-vitro* ploliferation of rat mesenchymal stem cells. *Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine*(广州中医药大学学报) 2005, **22**(1):35 – 38.

[15] Chen DF(陈东风), Du SH(杜少辉), Li YW(李伊为), *et al.* Effect of tortoise shell on expression of nestin following focal cerebral ischemia reperfusion. *Chinese Journal of Anatomy*(解剖学杂志), 2002, **25**(4):315 – 318.

[16] Chen DF(陈东风), Du SH(杜少辉), Li YW(李伊为), *et al.* Effect of plastrum testudinis on neural stem cell after focal cerebral ischemia. *Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine*(广州中医药大学学报) 2001, **18**(4):328 – 331.

[17] Li YW(李伊为), Cui XJ(崔晓军), Chen DF(陈东风), *et al.* Effect of tortoises shell on neural stem cell following injured spinal cord. *Chinese Journal of Neuroanatomy*(神经解剖学杂志) 2003, **19**(3):321 – 324.

[18] Chen DF(陈东风), Du SH(杜少辉), Li YW(李伊为), *et al.* *In-vitro* induction of mesenchymal stem cells differentiation into neurons in adult rats by surem containing carapax et plastrum testudinis. *Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine*(广州中医药大学学报) 2003, **20**(3):224 – 226.

[19] Sun SY(孙苏亚), Li FM(李发美). solation and identification of three steroid compounds from mauremys mutics plastron. *China Journal of Chinese Materia Medica* (中国中药杂志), 2000, **25**(3):165 – 166.

[20] Sun SY(孙苏亚), Li FM(李发美). The analysis of fatty acids in tortoise plastron by GC-MS. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*(药物分析杂志) ,1999, **19**(6):406 – 409.

[21] Jiang DC(姜大成), Wang YS(王永生), Xu YM(许彦梅). The studies on the chemical components of trutleback. *China Journal of Chinese Materia Medica*(中国中药杂志), 2002, **27**(6):435 –