

鳢肠不同部位抗骨质疏松活性及化学成分比较研究

黄运喜¹, 易 骏², 吴建国¹, 郑淑霞¹, 吴锦忠¹, 吴岩斌^{1*}

¹福建中医药大学中西医结合研究院, 福州 350122; ²福建教育学院理科部, 福州 350001

摘要: 为了比较鳢肠不同部位提取物的抗骨质疏松活性及总皂苷、总黄酮含量, 采用 MTT 法和对硝基苯酚磷酸二钠法测定鳢肠不同部位乙醇提取物对 UMR106 细胞的增殖和碱性磷酸酶(ALP)活性; 采用紫外分光光度法测定鳢肠不同部位总皂苷和总黄酮含量。结果表明, 鳢肠根和叶提取物对 UMR106 细胞的增殖具有促进作用, 浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时促增殖作用最强, 增值率分别为 7.7% 和 16.9%, 茎提取物没有明显的作用; 鳢肠根、茎、叶提取物对 ALP 活性均有促进作用, 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时促增殖作用最强, 分别促进 18.9%、20.1% 和 17.0%; 鳢肠根、茎、叶中总皂苷含量分别为 3.6%、4.0% 和 2.2%, 总黄酮含量分别为 1.4%、1.4% 和 3.4%。这些结果表明; 鳢肠不同部位提取物均有抗骨质疏松活性, 其不同部位总皂苷和总黄酮的含量差异较大。

关键词: 墨旱莲; UMR106 细胞; 骨质疏松; 总皂苷; 总黄酮

中图分类号: R932

文献标识码: A

Comparative Study on Antiosteoporosis Activity and Chemical Composition from Different parts of *Eclipta prostrata* L.

HUANG Yun-xi¹, YI Jun², WU Jian-guo¹, ZHENG Shu-xia¹, WU Jin-zhong¹, WU Yan-bin^{1*}

¹Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China;

²Department of Chemistry and Life Science, Fujian institute of education, Fuzhou, Fujian 350001, China

Abstract: To Compare the anti-osteoporosis activity and the contents of total saponins and total flavonoids from different parts of *Eclipta prostrata* L. The effects of ethanol extracts from different parts of *E. prostrata* on the proliferation and differentiation of UMR106 cells were evaluated by the MTT method and measuring the activity of alkaline phosphatase (ALP) by p-nitrophenyl phosphate disodium method. The contents of total saponins and total flavonoid from different parts of *E. prostrata* were used to determine by Ultraviolet spectrophotometry method. The results show that the extracts of the root and leaf from *E. prostrata* stimulated UMR106 cells proliferations, the proliferation rate was 7.7% and 16.9% respectively at a concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, while the stem did not stimulate UMR106 cells proliferation. all of the extracts from root, stem and leaf of *E. prostrata* could increased the ALP activity respectively by 18.9%, 20.1%, and 17.0% at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The contents of total saponin and total flavonoids from the root, stem and leaf of *E. prostrata* were 3.6%, 4.0%, 2.2% and 1.4%, 1.4%, 3.4%, respectively. In Conclusion, all of the extracts from different parts of *E. Prostrata* have antiosteoporotic activity. The contents of total saponins and total flavonoids from different parts of *E. prostrata* have large difference.

Key words: *Eclipta prostrata* L.; UMR106 cells; osteoporosis; total saponins; total flavonoids

墨旱莲原名鳢肠,《本草图经》称为旱莲草,又称为金陵草、旱莲子等^[1]。2010年版《中国药典》记载中药墨旱莲为鳢肠 *Eclipta prostrata* L. 的干燥地上部分,具有滋补肝肾,凉血止血的功效,用于肝肾阴虚,牙齿松动,须发早白,眩晕耳鸣,腰膝酸软,阴虚

血热吐血、衄血、尿血、血痢、外伤出血^[2];1999年出版的《中华本草》记载墨旱莲来源为鳢肠属植物鳢肠 *Eclipta prostrata* (L.) L. [verbesina prostrata L.; *E. Alba* (L.) Hassk.] 的全草^[3]。现代化学和药理研究表明,墨旱莲主要黄酮类、噻吩类和香豆草醚类等化学成分,具有保肝、止血、抗炎、免疫调节、抗蛇毒、抗菌、抗氧化和抗骨质疏松等生物活性^[4-8]。

前人研究墨旱莲所选用材料为鳢肠全草而非干燥地上部分(墨旱莲)^[9,10],且在市场流通中的墨旱

收稿日期:2013-07-25 接受日期:2013-10-18

基金项目:福建省自然科学基金项目(2011J01214);福建省卫生厅青年科研项目(2011-1-39)

* 通讯作者 Tel:86-591-22861360; E-mail: wxsq1@163.com

莲药材,常混入鳢肠的根,而2010年版《中国药典》记载为墨旱莲为鳢肠干燥地上部位。因为对鳢肠全草或地上部分(墨旱莲)入药存在争议,因此比较鳢肠不同部位的生物活性及化学成分是否有差异来评价鳢肠根可否与地上部分(墨旱莲)同时入药,对指导中医临床用药具有重要的意义。本实验以成骨细胞增殖和分化以及墨旱莲中主要化学成分皂苷和黄酮的含量为评价指标,研究鳢肠不同部位抗骨质疏松作用和化学成分的差异,为墨旱莲在中医临床用药及其资源利用提供依据。

1 材料和仪器

1.1 材料

鳢肠 *E. prostrata* 采于福建省莆田市,由福建中医药大学药学院黄泽豪副教授鉴定。

大鼠骨肉瘤(UMR106)细胞由上海第二军医大学生药教研室赠送。DMEM高糖培养液,胎牛血清,胰蛋白酶(美国Hyclone公司),青霉素-链霉素双抗试剂(北京鼎国昌盛生物技术有限公司);MTT干粉(美国Sigma公司);其余所用药品和试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器和试剂

RE-2000旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);KQ-300DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);UV-1800紫外可见分光光度计(日本岛津公司);DLSB-5/20低温冷却循环泵(郑州长城科工贸有限公司);YXQ-LS-70A立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);移液器(德国Eppendorf);Anke TDL-50B离心机(上海安亭科学仪器厂);SW-CJ-1FDA超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);BCD-518WS A冰箱(海尔);5417R高速冷冻离心机(德国Eppendorf);HF212UV CO₂培养箱(Heal Force);TS100倒置生物显微镜(Nikon);ELX800酶标仪(biotek);DK-420型电热恒温水槽(上海精宏实验设备有限公司);AR233CN电子天平(奥豪斯仪器(上海)有限公司)。

2 方法

2.1 不同部位提取物的制备

分别称取鳢肠根,茎,叶按料液比为1:15用80%乙醇回流提取2次,每次2h,合并滤液得提取液。

2.2 细胞培养

UMR106细胞培养于含有10%新生胎牛血清、1%青霉素-链霉素双抗的DMEM高糖培养液中,置37℃含有5%CO₂的细胞培养箱中培养。当细胞生长达到对数生长期时,用0.05%含EDTA胰酶消化传代或接种。

2.3 UMR106细胞的增殖实验

将UMR106细胞用含10%新生胎牛血清的DMEM高糖培养液配制成密度为 5×10^4 /mL的细胞悬液,以100 μL每孔的体积接种于96孔培养板中,培养24h后,根、茎、叶三个部位提取物分别以50、25、12.5 μg/mL三个浓度给药,每个浓度5个复孔,继续放入培养箱培养48h,取出培养板,各孔加入100 μL四氮唑蓝(MTT,用PBS液配制1 mg/mL的MTT液),放入培养箱中孵育4h,取出培养板,在倒置相差显微镜下可见细胞内有条状黑色沉淀,弃去上清液,每孔加入DMSO(二甲基亚砜)100 μL,DMSO的颜色变成紫色,把96孔培养板放于酶标仪上震荡10 min后使沉淀完全溶解于DMSO,于490 nm处检测各孔A值。

2.4 UMR106细胞的ALP活性实验

将UMR106细胞用含10%新生胎牛血清的DMEM高糖培养液配成密度为 5×10^4 /mL的细胞悬液。以100 μL每孔的体积接种于96孔培养板中,培养24h后,根、茎、叶三个部位提取物分别以100、50、25 μg/mL三个浓度给药,每个浓度5个复孔,继续放入培养箱培养,以后每3天更换一次药。培养至第8d测定。弃去培养液,PBS冲洗2~3次,加50 mmol/L的二乙醇胺100 μL,2.5 mmol/L的对硝基苯酚磷酸二钠50 μL,37℃反应30 min,最后用0.3 mol/L的氢氧化钠100 μL终止反应,于405 nm处测A值^[8]。

2.5 皂苷及黄酮含量测定

2.5.1 标准品溶液的制备

精密称取5.1 mg旱莲苷A标准品,加甲醇定容至50 mL,配成0.102 mg/mL溶液,作为皂苷对照品溶液。

精密称木犀草素对照品20.1 mg,置于100 mL容量瓶中,加入60%乙醇适量溶解并稀释至刻度,摇匀,作为黄酮对照品溶液(即0.201 mg/mL)。

2.5.2 皂苷标准曲线绘制

精密吸取旱莲苷A对照品溶液0.1,0.2,0.4,0.8,1.0,1.2,1.4,1.6,1.8,2.0 mL分别置具塞试

管中,置水浴上挥去溶剂,加入新配制的1%香草醛-高氯酸溶液0.5 mL,60℃水浴中加热15 min,立即冰水冷却2 min,加77%硫酸溶液5.0 mL,摇匀,于550 nm处测定吸光度。以含量(C)与吸光度(A)进行直线回归,得回归方程 $A = 0.0336C + 0.0007$, $R^2 = 0.9994$ (图1),线性关系良好。

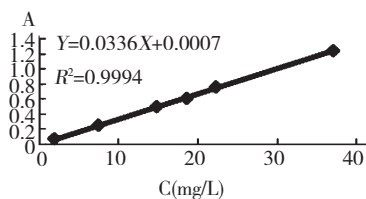


图1 旱莲苷A标准曲线

Fig. 1 The standard curve of ecliptasaponin A

2.5.3 黄酮标准曲线绘制

分别吸取标准应用液1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0 mL于25 mL容量瓶中,用60%乙醇定容至10 mL,先加5%的亚硝酸钠溶液1 mL,摇匀,放置6 min;再加10%的硝酸铝溶液1 mL,摇匀,放置6 min;再加4%的氢氧化钠溶液10 mL,用60%甲醇稀释至刻度,放置10 min,在波长512 nm处测定吸光度^[11],以含量(C)与吸光度(A)进行直线回归,得回归方程 $A = 0.0221C - 0.007$, $R^2 = 0.9992$ (图2),线性关系良好。

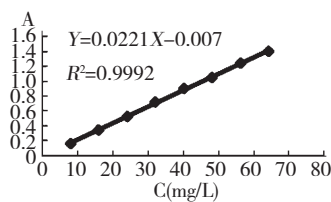


图2 木犀草素标准曲线

Fig. 2 The standard curve of luteolin

2.5.4 样品的皂苷及黄酮含量测定

精密吸取供试品溶液0.1 mL置具塞试管中,水浴上挥去溶剂,按2.5.2项下操作,相应试剂随行空白对照,于550 nm处测定吸光度,计算皂苷的含量。

精密吸取供试品溶液1.0 mL于25 mL容量瓶中,按2.5.3项下操作,在波长512 nm处测定吸光度,计算黄酮含量。

2.6 统计学处理

采用SPSS 18.0软件进行统计分析,组间采用单因素方差分析(ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 鳢肠不同部位对UMR106细胞增殖的影响

鳢肠根、叶的80%乙醇提取物对UMR106细胞均具有增殖作用,浓度为50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时作用最强,增殖率分别为7.7% ($P < 0.01$),16.9% ($P < 0.001$)(图3),其中叶的提取物增殖对UMR106细胞的增殖能力最强,且 $P < 0.001$ 具有显著性差异。

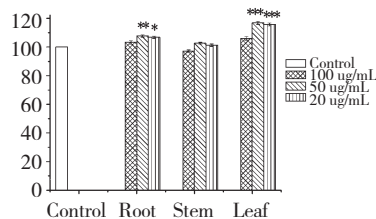


图3 鳢肠不同部位提取物对UMR106细胞增殖的影响

Fig. 3 Effect of the extracts from different parts of *E. prostrata* on UMR-106 cell proliferation.

与空白组比较($n = 5$): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control($n = 5$)

3.2 鳢肠不同部位对UMR106细胞ALP活性的影响

鳢肠根、茎、叶的80%乙醇提取物对UMR106细胞的ALP活性均具有促进作用,浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时作用最强,分别促进18.9% ($P < 0.001$),20.1% ($P < 0.01$),17.0% ($P < 0.001$)(图4)。

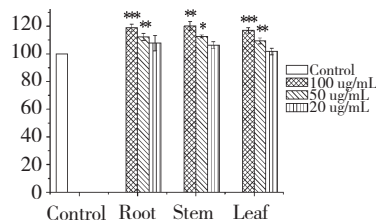


图4 鳢肠不同部位提取物对UMR106细胞ALP活性的影响

Fig. 4 Effect of the extracts from different parts of *E. prostrata* on UMR-106 cell ALP activity

与空白组比较($n = 5$): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control($n = 5$)

3.3 鳢肠不同部位总皂苷和总黄酮含量

鳢肠根、茎、叶中皂苷含量分别为3.6%,4.0%,2.2%;黄酮含量分别为1.4%,1.4%,3.4%(图5)。其中鳢肠茎中的皂苷含量最高,而黄酮含量最低;叶中的皂苷含量最低,而黄酮含量最高,根的皂苷、黄酮含量居中。

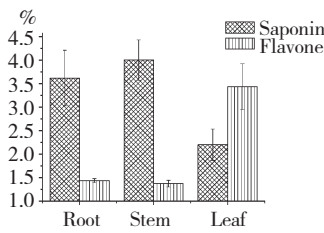


图5 鳢肠不同部位总皂苷和总黄酮含量

Fig. 5 The contents of total saponins and total flavonoids from different parts of *E. Prostrata*

4 讨论

成骨细胞在骨形成过程中主要经历成骨细胞增殖、细胞外基质成熟、矿化和成骨细胞凋亡四个阶段^[12]。其中,成骨细胞增殖期成骨细胞数量增加,形成多层细胞,并合成、分泌I型胶原以便最终可以矿化形成骨结节;在增殖晚期,成骨细胞增殖速度减慢,由增殖期进入分化期;在分化早期主要是ALP表达,ALP是成骨细胞所分泌的一种同源二聚体糖蛋白,其表达的强度是识别和评价成骨细胞分化程度的早期特异性标志,而且表达随着细胞分化的发展而增强。因此,ALP被认为是细胞外基质早期和中期分化的标志^[13]。骨代谢中,骨生成与成骨细胞的增殖与ALP活性相关^[14]。

墨旱莲是滋补肝肾的常用中药,含有多种黄酮和皂苷类成分,其所含的黄酮类成分木犀草素、芹菜素、槲皮素、Dismetin、3'-hydroxybiochanin A和3'-O-methylrobohol等^[7,15,16]均具有一定的抗骨质疏松作用。研究结果显示鳢肠不同部位乙醇提取物对UMR106成骨细胞增殖和ALP活性有不同程度的促进作用,其中鳢肠根对成骨细胞增殖和ALP活性均有显著的促进作用,对ALP活性的促进作用与茎和叶的差异并不大。化学成分分析结果显示,鳢肠不同部位总皂苷和总黄酮的含量差异较大,其中根与茎的总皂苷和总黄酮含量差异并不大。

墨旱莲为鳢肠地上干燥部分,实验表明,鳢肠的根与鳢肠地上部分有相似的生物活性,这可能也是文献记载墨旱莲为鳢肠全草入药的原因^[3]。因此,我们认为,市场流通中的墨旱莲药材中混有少量的鳢肠根并不会影响到墨旱莲药材的整体质量。另外,虽然已有许多墨旱莲皂苷和黄酮化学成分的研究^[6,10,17],但至今其质量标准中仍未有该项目的检测,因此建立墨旱莲总皂苷和总黄酮的测定方法为

其药材质量标准的研究提供依据。

参考文献

- Li CY(李春洋), Bai XZ(白秀珍), Cheng J(程静), et al. Hepatoprotective effects of the different ethyl acetate extract of *Eclipta Alba*. *J Math Med* (数理医药学杂志), 2005, 18: 586-587.
- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 351-352.
- The State Administration of Traditional Chinese Medicine "Chinese Materia Medica" Editorial Board(国家中医药管理局《中华本草》编委会). Chinese Materia Medica(中华本草). Shanghai: The Shanghai Science and Technology Publishing House, 1999. Vol II X I: 818-821.
- Cheng M(程敏), Hu ZH(胡正海). Advances in studies on biology and chemical constituents in dried aerial part of *Eclipta prostrata*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2010, 41: 2116-2118.
- Shi YY(施嫣嫣), Yao WF(姚卫峰), Zhang L(张丽), et al. Antioxidant activity in vitro of different extracts of *Eclipta prostrata* L. *J Shaanxi Coll Tradit Chin Med*, 2011, 34(3): 69-70.
- Lin XH(林雄浩), Wu JZ(吴锦忠). Research progress of Chinese herbal compound Erzhi pills in chemical constituents and anti-osteoporosis. *Pharm J Chin People's Liberation Army* (解放军药学报), 2009, 25: 421-424.
- Mi Kyeong Lee, Na Ry Ha, Hyekyung Yang, et al. Stimulatory constituents of *Eclipta prostrata* on mouse osteoblast differentiation. *Phytotherapy Res*, 2009, 23: 129-131.
- Lin XH, Wu YB, Lin S, et al. Effects of volatile components and ethanolic extract from *Eclipta prostrata* on proliferation and differentiation of primary osteoblasts. *Molecules*. 2010, 15: 241-250.
- Han Y(韩英), Xia C(夏超), Chen XG(陈小硅), et al. The preliminary research on the chemical components and pharmacological activities of *Eclipta prostrata*. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1998, 23: 680-682.
- Wang ZJ(王自军), Xie M(薛梅), Bian L(边丽). Ultrasonic extraction and determination of total flavonoids and tannin in *Eclipta prostrata* (L.). *Lishizhen Med Mat Med Res* (时珍国医国药), 2005, 16: 759-760.
- Zhang C(张超), Yin ZG(尹礼国), Xu Z(徐洲), et al. Study on extraction of flavonoids from Fern(*Pteridium aquilinum* L.). *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 33: 28-32.