

## • 基础研究 •

MTT 法检测松果菊苷对 MPP<sup>+</sup> 损伤的 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

福建中医药大学中西医结合学院 (福州 350122) 范秋萍 吴睿婷 许茜 袁明洲 黄露芬 陈乃洁  
蔡晶 林瑶<sup>1</sup>

**【摘要】 目的** 探讨不同浓度松果菊苷 (ECH) 对 1-甲基-4-苯基-吡啶离子 (MPP<sup>+</sup>) 损伤的人神经母细胞瘤 (SH-SY5Y) 细胞存活率的影响。**方法** 体外培养 SH-SY5Y 细胞, 以不同浓度 (浓度分别为 10  $\mu\text{g/mL}$ 、20  $\mu\text{g/mL}$ 、40  $\mu\text{g/mL}$ 、80  $\mu\text{g/mL}$ ) 的松果菊苷与 1 mmol/L MPP<sup>+</sup> 共同孵育, 四甲基偶氮唑盐法测定 (MTT) 法检测各组细胞存活率。**结果** MPP<sup>+</sup> 可明显降低 SH-SY5Y 细胞存活率, 不同浓度的松果菊苷对 MPP<sup>+</sup> 损伤后的 SH-SY5Y 细胞存活率均有一定程度的提升, 以 40  $\mu\text{g/mL}$  和 80  $\mu\text{g/mL}$  组增加明显 ( $P < 0.05$ )。**结论** 松果菊苷对 MPP<sup>+</sup> 损伤的 SH-SY5Y 细胞有保护作用, 可考虑将 40  $\mu\text{g/mL}$  和 80  $\mu\text{g/mL}$  浓度松果菊苷作为后续实验浓度。

**【关键词】** 帕金森; 松果菊苷; SH-SY5Y 细胞; MTT

**【中图分类号】** R742; R965.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2020)03-0116-04

帕金森病 (parkinson's disease, PD) 作为全球第二大神经退行性疾病, 其主要的病理特征是中枢黑质多巴胺能神经元的大量丢失<sup>[1]</sup>。中医理论认为“肾虚髓空”是 PD 的发病机制, “补肾益髓”是治疗的关键。本课题组前期研究已表明补肾中药肉苁蓉能改善 PD 模型动物的行为学<sup>[2-4]</sup>, 增加 PD 模型大鼠脑内多巴胺的含量<sup>[5]</sup>, 对神经细胞具有保护作用; 但具体机制尚不明晰。松果菊苷 (echinacoside, ECH) 是肉苁蓉的主要成分, 具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等多种药物活性<sup>[6-7]</sup>, 对氧化损伤的肝细胞、心肌细胞均有保护作用<sup>[8-9]</sup>, 那么, 松果菊苷是否能够保护损伤的多巴胺能神经细胞, 其具体机制如何, 尚需实验证实。本实验拟通过探讨不同浓度松果菊苷对 1-甲基-4-苯基-吡啶离子 (MPP<sup>+</sup>) 损伤的人神经母细胞瘤 (SH-SY5Y) 细胞的存活率的影响, 为进一步的实验提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料:** 1) 实验细胞: SH-SY5Y 细胞 (购自中国科学院上海细胞库)。2) 药材试剂: 松果菊苷、MPP<sup>+</sup> (sigma 公司, 货号: 07668、D048), MTT (上海碧云天生物技术有限公司, 货号: ST316), DMSO、青/链霉素 (上海碧云天生物技术有限公司), 96 孔板、15 mL 离心管、10 cm 培

养皿 (Corning Incorporated 公司), 胰酶、PBS、胎牛血清、培养液 (Hyclone 公司)。3) 仪器: 超净工作台 (苏州净化设备有限公司, 型号: AIRTECH)、倒置显微镜 (日本尼康公司, 型号: TS100)、离心机 (长沙湘仪离心机仪器有限公司, 型号: TDZ4A-WS)、二氧化碳培养箱 (美国 Thermo, 型号: HF212UV)、电子天平 (奥豪斯仪器有限公司, 型号: CP214)、酶标仪 (美国宝特, 型号: Bio-TEK ELx 800)。

## 1.2 方法:

### 1.2.1 细胞培养:

**1.2.1.1 细胞复苏:** 将保存在 -80  $^{\circ}\text{C}$  中的细胞冻存管置于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中溶化, 转移到 15 mL 离心管中, 加入 10 mL 细胞培养液, 1 000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 加 4 mL 细胞培养液重悬细胞, 转移到培养瓶中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度条件下培养。

**1.2.1.2 细胞传代:** 取对数生长期的细胞, 用 2 mL PBS 洗 1 遍, 加 1 mL 胰酶消化 1 min 后, 加入 3 mL 细胞培养液, 轻轻吹打后, 将细胞培养液转移到 15 mL 离心管, 1 000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 加 8 mL 细胞培养液重悬细胞, 转移到 2 个培养瓶中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度条件下培养,

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81804156); 福建省自然科学基金资助项目 (2018J01882); 福建中医药大学 2017 年校管课题平台专项 (X2017007-平台); 2018 年福建省大学生创新创业训练计划项目 (201810393013)

<sup>1</sup> 通信作者, Email: 55380098@qq.com

用于后续实验。

1.2.1.3 含 MPP<sup>+</sup> 培养液的配制：取 10 mg 的 MPP<sup>+</sup> 粉末溶于 33.6  $\mu$ L 纯水配制成浓度为 1 mol/L 母液，4  $^{\circ}$ C 冰箱保存。实验时用 DMEM/F12 培养基稀释成含不同浓度 MPP<sup>+</sup> 的培养液（终浓度分别为 0.1、0.25、0.5、1、2 mmol/L），阴性对照为新鲜配制的培养液。

1.2.1.4 含松果菊苷培养液的制备：取 7.86 mg 的松果菊苷粉末溶于 1 mL 的纯水配制成浓度为 7.86 mg/mL 的松果菊苷母液，4  $^{\circ}$ C 冰箱保存。实验时用 DMEM/F12 培养基稀释成含不同浓度松果菊苷的培养液（终浓度分别为 0、10、20、40、80、160  $\mu$ g/mL），阴性对照为新鲜配制的培养液。

1.2.2 MTT 法测定细胞活性：取对数生长期的细胞，取  $5 \times 10^4$  的细胞接种至 96 孔板中，取 50 mg 的 MTT 粉末加 10 mL 的 PBS，终浓度为 5 mg/mL，每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20  $\mu$ L，避光培养 4 h，弃上清，每孔加入 150  $\mu$ L 的 DMSO 溶液，震荡 10 min，自动酶标读数仪比色（主波长 490 nm，次波长 630 nm），测定其吸光值，计算各组细胞的存活率。细胞存活率（%）= 实验组吸光值/阴性对照组吸光度均值  $\times 100\%$ 。

1.3 统计学分析：采用 SPSS 25.0 对实验数据进行分析，实验结果以均值  $\pm$  标准差的形式表示，各组间比较用单因素方差分析，组间两两比较，方差齐则采用 LSD 检验；方差不齐则采用 Games-Howell。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 不同浓度松果菊苷对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响：为了确定 ECH 的无毒剂量，将不同浓度 ECH 与 SH-SY5Y 细胞共同孵育 24 h，MTT 法检测细胞存活率，结果如表 1 所示：浓度为 10  $\mu$ g/mL、20  $\mu$ g/mL、40  $\mu$ g/mL、80  $\mu$ g/mL ECH 处理 24 h 后，和空白组比较，SH-SY5Y 细胞存活率差异无统计学意义；然而当 ECH 浓度增加到 160  $\mu$ g/mL 时，差异具有统计学意义（P < 0.05）。因此选用 10  $\mu$ g/mL、20  $\mu$ g/mL、40  $\mu$ g/mL、80  $\mu$ g/mL 的 ECH 作为后续实验浓度。

2.2 不同浓度 MPP<sup>+</sup> 对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响：将 0.1 mmol/L、0.25 mmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L、2 mmol/L MPP<sup>+</sup> 与 SH-SY5Y 细胞共同孵育 24 h，与空白组比较，不同浓度的 MPP<sup>+</sup> 对 SH-SY5Y 细胞存活率有抑制作用（P < 0.01），且随着 MPP<sup>+</sup> 浓度的升高，抑制作用更明显。当

MPP<sup>+</sup> 浓度为 1 mmol/L 时，细胞存活率大约降为正常的一半，故选用 1 mmol/L MPP<sup>+</sup> 为细胞损伤浓度。见表 2。

表 1 不同浓度松果菊苷对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	A 值	细胞存活率/%
空白组	0.39 $\pm$ 0.04	100
10 $\mu$ g/mL ECH 组	0.38 $\pm$ 0.03	97.19 $\pm$ 8.24
20 $\mu$ g/mL ECH 组	0.43 $\pm$ 0.05	110.27 $\pm$ 15.30
40 $\mu$ g/mL ECH 组	0.44 $\pm$ 0.06	112.43 $\pm$ 16.03
80 $\mu$ g/mL ECH 组	0.44 $\pm$ 0.03	113.55 $\pm$ 7.78
160 $\mu$ g/mL ECH 组	0.48 $\pm$ 0.05	122.71 $\pm$ 13.30*

注：与空白组比较，\* P < 0.05。

表 2 不同浓度 MPP<sup>+</sup> 对细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	A 值	细胞存活率/%
空白组	0.61 $\pm$ 0.02	100
0.1 mmol/L MPP <sup>+</sup> 组	0.43 $\pm$ 0.04	70.40 $\pm$ 7.23*
0.25 mmol/L MPP <sup>+</sup> 组	0.41 $\pm$ 0.04	67.20 $\pm$ 8.17*
0.5 mmol/L MPP <sup>+</sup> 组	0.36 $\pm$ 0.05	60.00 $\pm$ 8.37*
1 mmol/L MPP <sup>+</sup> 组	0.33 $\pm$ 0.05	53.40 $\pm$ 8.68*
2 mmol/L MPP <sup>+</sup> 组	0.25 $\pm$ 0.04	42.20 $\pm$ 7.86*

注：与空白组比较，\* P < 0.01。

2.3 不同浓度的松果菊苷对 MPP<sup>+</sup> 作用的 SH-SY5Y 细胞存活率的影响：为了检测不同浓度的 ECH 对 MPP<sup>+</sup> 损伤的 SH-SY5Y 细胞存活率的影响，将 10、20、40、80  $\mu$ g/mL 的 ECH 与 SH-SY5Y 细胞共同孵育 24 h 后再用 1 mmol/L MPP<sup>+</sup> 处理 24 h，MTT 法检测各组细胞活性。与空白组比较，MPP<sup>+</sup> 处理后细胞存活率较正常组降低（P < 0.05）；与模型组比较，不同浓度 ECH 处理后细胞存活率均有所增加，其中 40  $\mu$ g/mL 和 80  $\mu$ g/mL ECH 组增加明显（P < 0.05）。

表 3 不同浓度 ECH 对 MPP<sup>+</sup> 作用的 SH-SY5Y 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	A 值	细胞存活率/%
空白组	0.47 $\pm$ 0.04	100
模型组	0.32 $\pm$ 0.02	69.65 $\pm$ 2.38*
10 $\mu$ g/mL ECH 组	0.40 $\pm$ 0.10	85.47 $\pm$ 21.55
20 $\mu$ g/mL ECH 组	0.39 $\pm$ 0.06	83.06 $\pm$ 11.91
40 $\mu$ g/mL ECH 组	0.45 $\pm$ 0.07	95.92 $\pm$ 14.81#
80 $\mu$ g/mL ECH 组	0.44 $\pm$ 0.04	93.67 $\pm$ 8.63#

注：与空白组比较，\* P < 0.01；与模型组比较，# P < 0.05。

### 3 讨论

目前帕金森病主要是以西药左旋多巴替代疗法为主,但长期使用会出现疗效减退以及剂末现象、开关现象等并发症<sup>[10]</sup>。中药在改善 PD 症状,缓解并发症上具有一定优势<sup>[11]</sup>。中医理论认为“肾主骨生髓通于脑”,而帕金森病的发病之本为“肾虚髓空”,若能使“肾藏精生髓,肾精充沛,滋养补充脑髓,则髓海充盈,脑之功能正常”,故“补肾益髓”是治疗帕金森病的重要思路<sup>[12]</sup>。肉苁蓉是常见的补肾中药,为肉苁蓉属植物干燥带鳞叶的肉质茎,具有补肾阳、益精血、润肠通便的功效<sup>[13]</sup>。本课题组前期在动物实验中发现肉苁蓉能改善 PD 模型大鼠行为学,增加 PD 模型大鼠脑内多巴胺的含量,对神经细胞起到保护作用。但由于中药成分多样,具体是肉苁蓉中的哪种成分起作用以及具体机制如何,尚需进一步的细胞实验证实。

松果菊苷是肉苁蓉中提取的有效单体,是肉苁蓉最主要的有效成分。已有研究表明松果菊苷对氧化损伤的肝细胞、心肌细胞均有保护作用。本实验采用的 MPP<sup>+</sup> 复制 PD 细胞模型的造模方法是一种常用的 PD 造模方法。MPTP 具有高度脂溶性,易通过血脑屏障,在单胺氧化酶的作用下转化为离子化的 1-甲基-4-苯基吡啶 (MPP<sup>+</sup>),由 DA 转运体转入 DA 神经元内造成神经细胞的毒性损伤,同时 MPP<sup>+</sup> 能产生明显的 DA 能通路病理及生化损伤,能复制出大部分 PD 病理及生理损害特征,在临床前评价药效方面具有一定的优势。因此 MPP<sup>+</sup> 常被用于实验室复制 PD 细胞模型<sup>[14]</sup>。神经母细胞瘤 (NB) 是一种分化程度低且具有恶性度的实体瘤, NB 常见的细胞是 SH-SY5Y 细胞,因其具有独特的自行消退逆转的生物学特性和多巴胺能神经元的特性,被广泛用来建立 PD 细胞模型<sup>[15]</sup>。MTT 法是经典的检测细胞存活和生长的方法,其原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶可将黄绿色的 MTT 降解为不溶于水的蓝紫色结晶甲瓖并沉积在细胞中, DMSO 进一步将甲瓖溶解成溶液,通过自动酶标读数仪比色 (主波长 490 nm, 次波长 630 nm),测定其吸光值,从而间接检测活细胞数量。死细胞则无此功能。在一定细胞数范围内, MTT 结晶形成的量与细胞数成正比。因其操作简单,灵敏度高,被广泛应用于细胞活力的检测<sup>[16]</sup>。本实验体外培养 SH-SY5Y 细胞,采用 MPP<sup>+</sup> 复制 PD 细胞模型,通过 MTT 法检测不同浓度松果菊苷干预后各组细胞的存活率,结果发现松果菊苷能增加

MPP<sup>+</sup> 损伤后 SH-SY5Y 细胞的存活率,以 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组最明显,对 SH-SY5Y 细胞具有保护作用。本研究为进一步探讨补肾中药肉苁蓉治疗帕金森病的机制提供了一定的实验依据。

### 参考文献

- [1] Miller K M, Ozinga S J, Rosenfeldt A B, et al. Quantifying turning behavior and gait in Parkinson's disease using mobile technology [J]. IBRO reports, 2018, 5 (5): 10-16.
- [2] 林瑶, 杨莎莎, 刘婷, 等. 肉苁蓉对帕金森病模型大鼠 PI3K、Akt、Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响 [J]. 江西中医药大学学报, 2019, 31 (1): 83-86.
- [3] 刘婷, 杨莎莎, 钟佳男, 等. 苁蓉精对帕金森病模型大鼠纹状体 PI3K/AKT 通路的影响 [J]. 海峡药学, 2019, 31 (3): 8-11.
- [4] 杨莎莎, 覃威, 陈诗雅, 等. 肉苁蓉对帕金森病模型大鼠行为学及海马组织干细胞增殖相关蛋白表达的影响 [J]. 康复学报, 2016, 26 (6): 24-27, 33.
- [5] 田允, 宋文婷, 徐立, 等. 补肾中药对帕金森病模型小鼠黑质纹状体多巴胺的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (1): 134-137, 141.
- [6] Cheng W L, Tzu Y L, Shu K H, et al. Echinacoside Inhibits Glutamate Release by Suppressing Voltage-Dependent Ca<sup>2+</sup> Entry and Protein Kinase C in Rat Cerebrocortical Nerve Terminals [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17 (7): 1006.
- [7] Dong L, Wang H, Niu J, et al. Echinacoside induces apoptotic cancer cell death by inhibiting the nucleotide pool sanitizing enzyme MTH1 [J]. OncoTargets and Therapy, 2015, 2015 (Issue 1): 3649-3664.
- [8] You S P, Ma L, Zhao J, et al. Phenylethanol glycosides from cistanche tubulosa suppress hepatic stellate cell activation and block the conduction of signaling pathways in TGF- $\beta$ 1/smad as potential anti-hepatic fibrosis agents [J]. Molecules, 2016, 21 (1): 102.
- [9] Chen M, Wang X D, Hu B, et al. Protective effects of echinacoside against anoxia/reperfusion injury in H9c2 cells via up-regulating p-AKT and SLC8A3 [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 104 (104): 52-59.
- [10] Camille B C, Richard K H W. Simvastatin as a Potential Disease-Modifying Therapy for Patients with Parkinson's Disease: Rationale for Clinical Trial, and Current Progress [J]. J Parkinsons Dis, 2017, 7 (4): 545-568.
- [11] 黄少东, 梁健芬, 陈月桥. 中药复方辨证治疗帕金森病的临床和实验研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37 (5): 1147-1150.
- [12] 蔡晶, 陈立典. 杜建教授治疗帕金森病经验 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25 (11): 1803-1805.
- [13] 杨峻山. 沙漠人参——肉苁蓉 [J]. 中国药理学杂志, 2011, 46 (12): 881.
- [14] 解洪荣, 张玉花, 李雪松, 等. MPTP/MPP<sup>+</sup> 诱导的帕金森病实验模型的研究进展 [J]. 医学综述, 2011, 17 (5): 669-672.

[15] 范振群, 刘树民, 周世慧, 等. 帕金森病体外细胞模型的研究进展 [J]. 实验动物与比较医学, 2013, 33 (1): 74-78.

[16] 田林奇, 韩颖, 魏聪, 等. 两种不同细胞毒性检测方法的比较 [J]. 中国医疗器械信息, 2019, 25 (1): 23-24, 39.

## • 基础研究 •

# 白花蛇舌草抗骨肉瘤的有效部位筛选及对 Bcl-2 和 Bax 细胞因子表达的影响

厦门大学附属福州第二医院骨科研究所 (福州 350007) 刘楠楠 伍林招 张 韬<sup>1</sup>

**【摘要】 目的** 考察白花蛇舌草提取物对骨肉瘤细胞生长及 Bcl-2 和 Bax 细胞因子的影响。**方法** 对白花蛇舌草进行不同部位的分离提取, 提取物分为 A、B、C、D 4 组, 采用 MTT 法检测各组对 MG63 细胞活性的影响; 同时用不同部位提取物喂养裸鼠 (骨肉瘤胫骨原位移植瘤模型), 采用 RT-PCR 和 Western blot 分别检测移植瘤细胞中 Bcl-2 和 Bax 因子 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** 白花蛇舌草的多部分提取物均能显著抑制 MG63 骨肉瘤细胞的生长 ( $P < 0.05$ ), 促进肉瘤裸鼠模型瘤细胞中促凋亡蛋白 Bax 因子 mRNA 和蛋白的表达 ( $P < 0.05$ ), 抑制凋亡蛋白 Bcl-2 因子 mRNA 和蛋白的表达 ( $P < 0.05$ ), 其中 C 组的效果最明显, 与其他组比较有显著改变 ( $P < 0.05$ ), A、B、D 组间无显著变化 ( $P > 0.05$ )。**结论** 白花蛇舌草提取物具有抑制 MG-63 细胞生长, 促进 Bax 因子、抑制 Bcl-2 因子表达的作用。

**【关键词】** 白花蛇舌草; 骨肉瘤; 细胞凋亡; 细胞周期

**【中图分类号】** R738.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2020)03-0119-03

骨肉瘤是青少年最常见的原发恶性骨肿瘤, 发病率约为 3/100 万<sup>[1]</sup>。该瘤恶性程度高, 预后差, 给家庭和社会带来极大负担。1970 年之前, 骨肉瘤的治疗采用高位截肢或关节夹层治疗, 给患者的身心造成了极大的创伤。随着新辅助化疗的广泛推广, 骨肉瘤的 5 年生存率达到 60%~80%。在过去的 30 年中, 骨肉瘤研究领域尚未有明确的新药, 治疗计划也无较大进展。手术是目前骨肉瘤最有效的治疗方法, 但患者心理、肉瘤位置、术后转移和经济负担会影响患者治疗效果, 因此寻找其他经济、安全的保肢治疗方案尤为重要。有临床报道证实, 中医也可为骨肉瘤治疗提供有效的方法<sup>[2]</sup>。如黄金昶等<sup>[3]</sup>采用自制骨瘤消胶囊结合中药汤剂治疗骨肉瘤 22 例, 取得了良好效果。本项目拟对白花蛇舌草不同部位作提取分离, 采用 MTT 法检测不同提取物对 MG63 细胞活性的影响, 同时用不同部位提取物喂养骨肉瘤胫骨原位移植瘤裸鼠, 采用 RT-PCR 和 Western blot 分别检测移植瘤细胞 Bcl-2 和 Bax 因子的 mRNA 和蛋白表达水平, 探讨不同提取物的抗肿瘤作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料: 人骨肉瘤 MG-63 细胞株 (南京科佰生

物科技有限公司), BALB/C 裸鼠 [体质量 (18±2) g, 吴氏实验动物中心, 生产许可证号: SCXK (闽) 2016-0003], 白花蛇舌草 (福建省医学科学院药物研究所), 胎牛血清 (FBS)、DMEM 培养基 (美国 Hyclone 公司), 噻唑蓝 (MTT, 美国 Sigma 公司), RIPA 裂解液、BCA 法蛋白定量试剂盒、UltraECL 底物化学发光检测试剂盒 (美国 Invitrogen 公司), 鼠抗人 Bcl-2、Bax 及内参 GAPDH 一抗、羊抗鼠辣根过氧化物酶 (HRP) 标记二抗 (英国 Abcam 公司)。

### 1.2 方法:

1.2.1 白花蛇舌草分离提取: 取 5 kg 白花蛇舌草, 粉碎, 5 倍 80%乙醇浸泡 24 h, 每次在乙醇综合提取器中提取 2 h, 共提取 2 次。将两次提取液合并混匀, 回收乙醇, 将得到的浸膏溶于水: 乙醇 (2:1) 混合液。采用如下方法作进一步分离提取: A 组: 石油醚萃取 5 次, 浓缩得石油醚提取部位; B 组: 三氯甲烷萃取 5 次, 浓缩得三氯甲烷提取部位; C 组: 乙酸乙酯萃取 5 次, 浓缩得乙酸乙酯提取部位; D 组: 正丁酸萃取 5 次, 浓缩得正丁酸提取部位。

基金项目: 福建省卫健委中医类科研项目 (2017FJZYZY208); 2017 年福建省临床重点专科建设项目 (骨科)

1 通信作者, 副研究员, Email: james155@foxmail.com; 研究方向: 肿瘤细胞与分子生物学