

白术甲醇提取物对小肠上皮细胞增殖、迁移及磷脂酶 C- γ 1 表达的影响

宋厚盼^{1,2} 李茹柳¹ 王一寓¹ 涂小华¹ 邓 娇¹ 陈蔚文¹

摘要 目的 观察白术甲醇提取物(以下简称白术提取物)对小肠上皮细胞(IEC-6)增殖、迁移及磷脂酶 C- γ 1(PLC- γ 1)表达的影响,旨在探讨益气健脾中药白术促进胃肠黏膜损伤修复的作用机制。**方法** 细胞分为空白组,精脞(5 μ mol/L)组,白术提取物(50、100、200 mg/L)组;负荷实验设 α -二氟甲基鸟氨酸[(α -difluoromethylornithine, DFMO)多胺合成抑制剂]组,精脞 + DFMO 组,白术提取物(50、100、200 mg/L) + DFMO 组。细胞贴壁培养 24 h,给予受试药培养相应时间后,采用实时细胞分析仪(Real-time Cell Analyzer, RTCA)观察白术提取物对 IEC-6 细胞增殖的影响;划痕法检测白术提取物对 IEC-6 细胞迁移数目的影响;采用荧光定量 PCR 法和 Western blot 法检测 PLC- γ 1 mRNA 及其蛋白表达。**结果** 与空白组比较,白术提取物对细胞增殖无明显影响($P > 0.05$),精脞和白术提取物(100、200 mg/L)对细胞迁移均有促进作用($P < 0.01$),并能增加细胞迁移过程 PLC- γ 1 mRNA 和蛋白表达($P < 0.01$)。与 DFMO 组比较,精脞、白术提取物(100、200 mg/L)能逆转 DFMO 所致的细胞迁移抑制及 PLC- γ 1 mRNA 及其蛋白表达的抑制作用(均 $P < 0.01$)。**结论** 白术提取物可通过促进多胺介导的上皮细胞迁移发挥修复胃肠黏膜损伤作用,细胞增殖不是其主要药效作用。

关键词 白术甲醇提取物;小肠上皮细胞;细胞增殖;细胞迁移;磷脂酶 C- γ 1

Effects of Methanol Extracts from *Atractylodes macrocephalae* Rhizoma on Small Intestinal Epithelial Cell Proliferation and Migration, and Expression of Phospholipase C- γ 1 SONG Hou-pan^{1,2}, LI Ru-liu¹, WANG Yi-yu¹, TU Xiao-hua¹, DENG Jiao¹, and CHEN Wei-wen¹ 1 Institute of Spleen and Stomach, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510405); 2 Institute of TCM Diagnostics, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha (410007)

ABSTRACT Objective To observe the effects of methanol extracts from *Atractylodes macrocephalae* Rhizoma (AMR) on the proliferation and migration of IEC-6 cell (small intestinal epithelial cells) and the expression of phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1), and to explore the mechanism of AMR (a Chinese herb capable of invigorating Pi replenishing qi) for promoting repair of gastrointestinal mucosal injury. **Methods** IEC-6 cells were divided into the blank group, the positive control (spermidine, SPD; 5 μ mol/L) group, AMR extracts groups (50, 100, and 200 mg/L). The alpha-difluoromethylornithine (DFMO, polyamines synthesis inhibitor) group, the SPD + DFMO group, AMR extracts (50, 100, and 200 mg/L) + DFMO groups were set up in stress test. IEC-6 cells were cultured by adherence for 24 h, and then treated with AMR extracts for appropriate periods of time. Effects of IEC-6 cell proliferation after action of AMR extracts were detected by Real-time Cell Analyzer (RTCA). The effect of AMR extracts on IEC-6 cell migration number was detected using scratch method. mRNA and protein expressions of PLC- γ 1 levels were detected by fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blot respectively. **Results** Compared with the blank group, AMR extracts showed no obvious effect on IEC-6 cell proliferation ($P > 0.05$). But SPD and AMR extracts (100 and 200 mg/L) not only promoted IEC-6 cell

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81173254);中央财政支持地方高校发展专项资金项目“重大难治性脾胃病防治协同创新平台”(财教[2013]338号);广州中医药大学中医内科学特色重点学科建设项目(财教[2013]339号)

作者单位:1.广州中医药大学脾胃研究所(广东 510405);2.湖南中医药大学中医诊断研究所(湖南 410007)

通讯作者:李茹柳, Tel: 020-36585444, E-mail: lrl@gzucm.edu.cn

DOI: 10.7661/CJIM.2016.07.0861

migration ($P < 0.01$), but also improved mRNA and protein expressions of PLC- γ 1 in the process of cell migration ($P < 0.01$). Compared with the DFMO group, SPD and AMR extracts (100 and 200 mg/L) could reverse inhibitory effects of DFMO on cell migration, and mRNA and protein expressions of PLC- γ 1 (all $P < 0.01$). Conclusion AMR extracts played roles in repairing gastrointestinal mucosal injury possibly by promoting polyamine mediated intestinal epithelial cell migration, and its effect on intestinal epithelial cell proliferation was not main potency.

KEYWORDS methanol extracts of *Atractylodes macrocephalae* Rhizoma; small intestinal epithelial cell; cell proliferation; cell migration; phospholipase- γ 1

人体胃肠黏膜是机体的一道重要屏障,它可以阻止许多毒性物质和体内外抗原物质进入胃肠管腔。胃肠黏膜可在药物、酒精、外力和应激等因素刺激下引起损伤,胃肠黏膜损伤后的修复过程包括黏膜上皮细胞迁移、增殖和分化等环节。早期的黏膜损伤修复主要依赖上皮细胞迁移,其中多胺是上皮细胞迁移所必需的物质^[1]。多胺(包括腐胺、精脒和精胺)普遍存在于真核生物,它可调控细胞迁移等许多生理过程; α -二氟甲基鸟氨酸(α -difluoromethylornithine, DFMO)可抑制多胺合成的第一个限速酶—鸟氨酸脱羧酶的活性,从而抑制细胞内多胺合成^[1,2]。

小肠上皮细胞(IEC-6)来源于大鼠小肠隐窝,保持了肠上皮干细胞的特性,现普遍用作胃肠黏膜损伤的体外实验模型^[3]。在 IEC-6 细胞的研究发现,细胞质游离钙离子($[Ca^{2+}]_{cyt}$)是刺激细胞迁移的关键因素;磷脂酶 C- γ 1(PLC- γ 1)可催化三磷酸肌醇(IP₃)形成,IP₃通过调控内质网 Ca²⁺储存和 Ca²⁺内流而调控 $[Ca^{2+}]_{cyt}$;多胺则通过调节 PLC- γ 1 表达而调控 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 和上皮细胞迁移^[2,3]。

胃肠黏膜损伤是中医学脾气虚证的临床表现之一,研究发现益气健脾中药有胃肠黏膜损伤修复作用^[4,5]。本课题组前期研究表明,益气健脾中药黄芪、白术、党参和甘草的不同提取部位有促进 IEC-6 细胞迁移的作用,药理机制与其作用于多胺调控信号通路有关^[5-12]。白术是益气健脾代表方剂如四君子汤、补中益气汤、参苓白术散等的组成药物之一,其有健脾益气、燥湿利水、止汗、安胎等功效。本实验选择白术甲醇提取物(简称白术提取物,主要含白术内酯、挥发油等成分)作为受试药,观察其对 IEC-6 细胞增殖和细胞迁移的影响,并观察其对细胞迁移过程 PLC- γ 1 mRNA 和蛋白表达的影响,以探讨其修复胃肠黏膜损伤的药理作用机制。

材料与方法

1 细胞株 大鼠小肠隐窝(IEC-6)细胞株(13

代),购自 American Type Culture Collection(ATCC),批号:58541019。选择生长速度稳定、形态结构均匀饱满的 22~28 代细胞用于正式实验。

2 药物 白术药材来源于菊科植物白术(*Atractylodes macrocephalae* Rhizoma)的根茎(由广州中医药大学中药鉴定教研室童家赟老师鉴定),本实验所用白术药材为麸炒白术,购自广州同康药业有限公司(批号:120303)。药材的提取方法如下^[8]:精确称量 200 g 白术药材饮片,粉碎后加入 800 mL 90% 甲醇 35 ℃ 超声提取 30 min(100 W,40 kHz),重复提取 3 次后用 200 目纱布过滤所有药液,并采用 0.22 μ m 有机滤膜抽滤,收集滤液得白术甲醇提取液。用旋转蒸发器将上述所得白术甲醇提取液浓缩至约 200 mL,真空干燥箱 40 ℃ 干燥后得 21g 白术甲醇提取物(总得率 10.5%,以下简称白术提取物)。实验前以 PBS 配成所需浓度并 -20 ℃ 保存,实验剂量以白术提取物重量表示。

3 主要试剂及仪器 pH 7.3 cDMEM(Invitrogen 公司,批号:8112156);PBS(Invitrogen 公司,批号:8112013);胎牛血清(fatal bovine serum, FBS) Invitrogen 公司,批号:1027805;Pen Strep(Invitrogen 公司,批号:1116265);TrypLE™ Express(Invitrogen 公司,批号:1045833);精脒(Sigma 公司,批号:BCBH7695V);DFMO(Sigma 公司,批号:039K4712V);表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF), PeprTech 公司产品,批号:3129CY10;荧光定量 PCR 反应试剂盒 SYBR Premix Ex Taq™ II(TAKARA 公司,批号:AK2901);RNA 提取试剂盒 RNAiso Plus reagent(TAKARA 公司,批号:A7603-1);逆转录试剂盒 PrimeScript™ RT Master Mix(TAKARA 公司,批号:AK2301);小鼠单克隆 β -actin 一抗(Abcam 公司,批号:GR111289-1);小鼠单克隆 PLC- γ 1 一抗(Abcam 公司,批号:489449);山羊抗小鼠 HRP 标记二抗(Abcam 公司,批号:GR101081-1);Preci-

sion Plus Protein™ Standards (Bio-Rad 公司, 批号: 161 - 0375); Clarity™ Western ECL substrate (Bio-Rad 公司, 批号: 170 - 5060); SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(碧云天生物技术公司, 批号: P5015); 凝胶配制试剂盒(碧云天生物技术公司, 批号: P0012A)。主要仪器 IX-71 型荧光相差倒置显微镜(日本奥林巴斯公司); 3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司); xCELLigence RTCA DP 实时细胞分析仪及 E-Plate 16 板(瑞士 Roche 公司); Power-Pac Universal™ 电泳系统(美国 Bio-Rad 公司); ChemiDoc™ XRS⁺ 成像系统(美国 Bio-Rad 公司); CFX-96 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

4 实验方法

4.1 细胞增殖情况检测 参照文献[13]方法, 实时细胞分析仪(Real-time Cell Analyzer, RTCA) 采用电子阻抗技术检测贴壁细胞黏附于 E-plate 板底部电阻值的变化, 并将变化的电阻值转换为细胞指数 [细胞指数 = $(Z_i - Z_0) / 15\Omega$], Z_i 表示 i 小时的电阻值, Z_0 表示起始电阻值]^[13], 从而反映细胞增殖等情况。将 IEC-6 细胞消化并配成 10^5 cells/mL 细胞悬液, 向 E-Plate 板各孔添加 100 μ L 培养液后置于 RTCA 中, 平衡 E-Plate 板各孔细胞指数。取下 E-plate 板, 往各孔加入 100 μ L 10^5 cells/mL 的细胞悬液, 室温静置 30 min 后将 E-Plate 板放置于 RTCA 中, 设置每次记录时间和次数分别为 30 min 和 200 次。培养 23 h 后, 暂停 RTCA, 取出 E-Plate 板, 从各孔吸弃 100 μ L 培养液, 空白组加入 100 μ L 培养液, 其余各组则分别加入含 50、100、200 mg/L 白术提取物及 30 ng/L EGF 的培养液各 100 μ L。将 E-Plate 板重新置于 RTCA 中, 观察 24 h 和 36 h 药物对细胞生长曲线的影响, 每组 3 个复孔, 重复 2 次实验。

4.2 划痕法检测细胞迁移能力 参照文献[8,9]方法, IEC-6 细胞以 1×10^6 cells/孔密度均匀地接种于 6 孔板, 每孔加入含 10% FBS 的 cDMEM 2.5 mL, 于 37 $^{\circ}$ C, 饱和湿度, 95% 空气 + 5% CO₂ 环境中培养 24 h 以使细胞均匀贴壁, 吸弃培养液, 用手术刀片在 6 孔板中央轻轻划一直线, 细胞刮刀刮除直线右侧细胞以建立 IEC-6 细胞迁移模型。首先进行白术提取物促进 IEC-6 细胞迁移剂量筛选实验, 以 5 μ mol/L 精脒为阳性对照药, 白术提取物配制成 12.5、25、50、100、150 mg/L 和 200 mg/L 6 个给药浓度, 结果发现 12.5、25、50 mg/L 剂量组无明显作用, 而 100、150、200 mg/L 剂量组可促进细胞迁移, 因此将 50、100、200 mg/L 三个剂量确定为后续实验

的低、中、高剂量。随后进行 DFMO 负荷下白术提取物对细胞迁移影响的实验: DFMO 组加入含 2.5 mmol/L 终浓度 DFMO 的 cDMEM, 其余各组则在 DFMO 负荷基础上分别加入 5 μ mol/L 精脒或高(200 mg/L)、中(100 mg/L)、低(50 mg/L)剂量的白术提取物, 即 DFMO + 精脒组、DFMO + 白术提取物组。培养 24 h 后, 于倒置显微镜下观察细胞迁移情况并每孔选取 8 个视野拍照, 以 Image-Pro Plus 软件统计越过划痕线的细胞数目(即细胞迁移数), 每组 3 个复孔, 重复 2 次实验。

4.3 荧光定量 PCR 检测 PLC- γ 1 mRNA 表达 细胞以 1×10^6 cells/孔的密度接种于六孔板, 培养 24 h 后, 用 1 mL 移液器吸头沿孔中央轻轻做一直线划痕建立 IEC-6 细胞损伤模型, 接着按实验方法“4.2”往各孔加入 2.5 mL 含受试药的 cDMEM; 培养 24 h 后用 RNA 提取试剂盒 RNAiso Plus reagent 提取各组细胞总 RNA, 并立即检测 RNA 纯度和完整性, 将总 RNA 保存于 -80 $^{\circ}$ C 低温冰箱。采用逆转录试剂盒 Prime-Script™ RT Master Mix 将各组 1 000 ng RNA 逆转录为 cDNA, 逆转录条件参照试剂盒说明书; 接着以荧光定量 PCR 反应试剂盒 SYBR Premix Ex Taq™ II, 25 μ L 体系对各组 cDNA 进行荧光定量 PCR 反应, 反应条件参照试剂盒说明书, 连续进行 40 个循环。荧光定量 PCR 反应的引物序列为 β -actin 上游: 5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3', 23 bp; β -actin 下游: 5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3', 24 bp; PLC- γ 1 上游: 5'-GAGGCC AACCCCTATGCAAC-3', 20 bp; PLC- γ 1 下游: 5'-GGATGATGGGGCTCTTGTTAA-3', 21 bp。以 β -actin 为内参对 PLC- γ 1 进行相对定量, PLC- γ 1 mRNA 表达分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算, 每组 3 个复孔, 重复 2 次实验。

4.4 Western blot 检测 PLC- γ 1 蛋白表达 按实验方法“4.3”分别加入 2.5 mL 含受试药的 cDMEM; 24 h 后用 RIPA 裂解液(强)提取各组细胞总蛋白, 采用 BCA 试剂盒对蛋白进行定量, 将总蛋白保存于 -80 $^{\circ}$ C 低温冰箱待用。加入溴酚蓝指示剂制备上样样品, 接着进行 SDS-PAGE 电泳; 电泳结束后, 参照 Marker 切取 PLC- γ 1 和 β -actin 分子量所在的凝胶制成“三明治”结构, 置于转膜液中 200 mA 恒流转膜 90 min; 剪取 PVDF 膜, TBS 清洗 3 遍后, 将其置于含 5% BSA 的 TBST 中封闭 1 h, 洗膜后分别用小鼠来源 β -actin 一抗和小鼠来源 PLC- γ 1 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗膜后加入山羊抗小鼠 HRP 标记二抗室温孵育 1.5 h, 洗膜后加入 ECL 发光液反应 5 min, X 光

片曝光条带并显影定影, ChemiDoc™ XRS⁺ 成像系统观察蛋白条带, 采用 Image Lab 软件统计分析条带灰度值。每组 3 个复孔, 重复 2 次实验。

5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据先进行方差齐性检验, 然后进行单因素方差分析, 采用 LSD 法进行组间比较。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 IEC-6 细胞增殖情况比较(表 1) 给药 24 h 或 36 h 后, 与空白组比较, EGF 组细胞指数升高 (P < 0.01), 50、100、200 mg/L 白术提取物组细胞指数比较, 差异均无统计学意义 (P > 0.05)。

表 1 各组 IEC-6 细胞增殖情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞指数	
		24 h	36 h
空白	6	5.41 ± 1.09	6.18 ± 1.40
EGF	6	6.47 ± 0.37*	7.01 ± 0.35*
白术提取物 50 mg/L	6	5.80 ± 0.60	6.47 ± 0.78
白术提取物 100 mg/L	6	5.73 ± 0.26	6.38 ± 0.15
白术提取物 200 mg/L	6	5.13 ± 0.87	5.83 ± 0.96

注: 与空白组比较, *P < 0.01

2 各组不同情况下 IEC-6 细胞迁移数目比较

2.1 无 DFMO 负荷时各组 IEC-6 细胞迁移数目比较(表 2) 与空白组比较, 精脍组和白术提取物 100、150、200 mg/L 组细胞迁移数目均明显增加 (P < 0.01), 因此后续实验剂量选择为白术提取物 50、100 和 200 mg/L。

表 2 无 DFMO 负荷时各组细胞迁移数目比较(个, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞迁移数目
空白	6	259.29 ± 30.07
精脍	6	428.67 ± 39.20*
白术提取物 12.5 mg/L	6	261.86 ± 30.67
白术提取物 25 mg/L	6	251.26 ± 32.96
白术提取物 50 mg/L	6	258.25 ± 30.05
白术提取物 100 mg/L	6	413.50 ± 27.80*
白术提取物 150 mg/L	6	455.50 ± 50.07*
白术提取物 200 mg/L	6	507.68 ± 41.27*

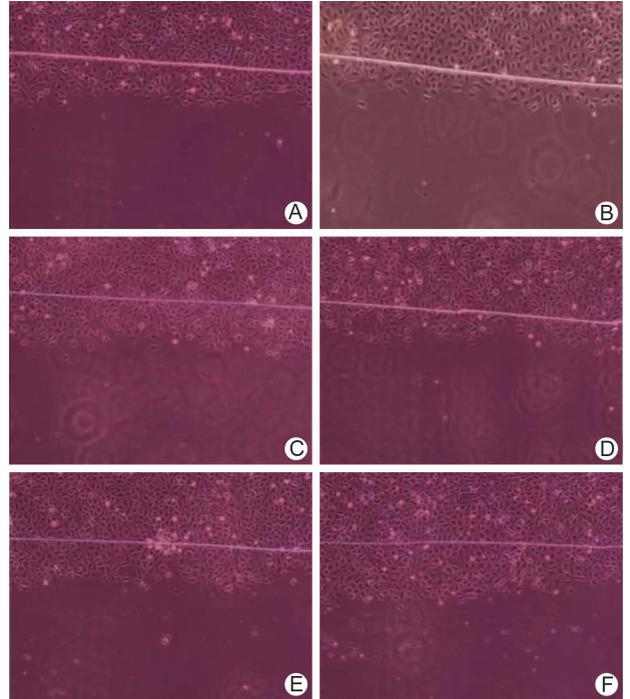
注: 与空白组比较, *P < 0.01

2.2 DFMO 负荷下各组 IEC-6 细胞迁移数目比较(表 3, 图 1) 与空白组比较, DFMO 组细胞迁移数减少 (P < 0.01); 与 DFMO 组比较, 精脍 + DFMO 组、100 mg/L 白术提取物 + DFMO 组、200 mg/L 白术提取物 + DFMO 组细胞迁移数均增加 (P < 0.01)。

表 3 DFMO 负荷下各组细胞迁移目比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞迁移数目
空白	6	252.7 ± 32.9
DFMO	6	153.8 ± 18.8*
精脍 + DFMO	6	260.6 ± 22.3 [△]
白术提取物 50 mg/L + DFMO	6	170.8 ± 22.3
白术提取物 100 mg/L + DFMO	6	213.8 ± 22.1 [△]
白术提取物 200 mg/L + DFMO	6	252.4 ± 27.8 [△]

注: 与空白组比较, *P < 0.01; 与 DFMO 组比较, [△]P < 0.01



注: A 为空白组; B 为 DFMO 组; C 为精脍 + DFMO 组; D 为白术提取物 50 mg/L + DFMO 组; E 为白术提取物 100 mg/L + DFMO 组; F 为白术提取物 200 mg/L + DFMO 组

图 1 DFMO 负荷下各组细胞迁移数目比较 (×100)

3 各组不同情况下 IEC-6 细胞迁移过程 PLC-γ1 mRNA 表达水平比较

3.1 无 DFMO 负荷时各组细胞 PLC-γ1 mRNA 表达比较(表 4) 与空白组比较, 精脍组、100 mg/L 白术提取物组和 200 mg/L 白术提取物组 PLC-γ1 mRNA 表达均增加 (P < 0.01)。

表 4 无 DFMO 负荷时各组细胞迁移过程 PLC-γ1 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PLC-γ1 mRNA 相对表达量
空白	6	1.32 ± 0.33
精脍	6	1.91 ± 0.20*
白术提取物 50 mg/L	6	1.36 ± 0.26
白术提取物 100 mg/L	6	2.29 ± 0.23*
白术提取物 200 mg/L	6	1.94 ± 0.24*

注: 与空白组比较, *P < 0.01

3.2 DFMO 负荷下各组细胞 PLC- γ 1 mRNA 表达比较(表 5) 与空白组比较,DFMO 组 PLC- γ 1 mRNA 表达降低($P < 0.01$);与 DFMO 组比较,精脞 + DFMO 组、白术提取物 100 mg/L + DFMO 组和白术提取物 200 mg/L + DFMO 组 PLC- γ 1 mRNA 表达均增加($P < 0.01$)。

表 5 DFMO 负荷下各组细胞迁移过程 PLC- γ 1 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PLC- γ 1 mRNA 相对表达量
空白	6	1.32 \pm 0.33
DFMO	6	0.63 \pm 0.18 *
精脞 + DFMO	6	1.26 \pm 0.26 Δ
白术提取物 50 mg/L + DFMO	6	0.74 \pm 0.22
白术提取物 100 mg/L + DFMO	6	1.44 \pm 0.46 Δ
白术提取物 200 mg/L + DFMO	6	1.27 \pm 0.53 Δ

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与 DFMO 组比较, $\Delta P < 0.01$

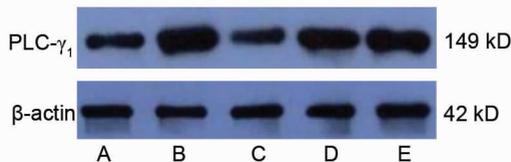
4 各组不同情况下 IEC-6 细胞迁移过程 PLC- γ 1 蛋白表达比较

4.1 无 DFMO 负荷各组细胞 PLC- γ 1 蛋白表达比较(表 6,图 2) 与空白组比较,精脞组、100 mg/L 白术提取物组和 200 mg/L 白术提取物组 PLC- γ 1 蛋白表达均升高($P < 0.01$)。

表 6 无 DFMO 负荷时各组细胞迁移过程 PLC- γ 1 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	光密度比值(PLC- γ 1/ β -actin)
空白	6	0.91 \pm 0.06
精脞	6	1.23 \pm 0.04 *
白术提取物 50 mg/L	6	0.89 \pm 0.05
白术提取物 100 mg/L	6	1.19 \pm 0.04 *
白术提取物 200 mg/L	6	1.22 \pm 0.07 *

注:与空白组比较,* $P < 0.01$



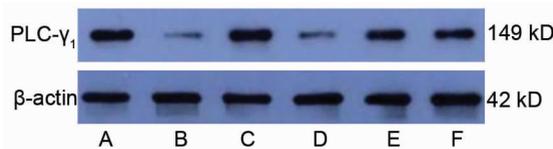
注:A 为空白组;B 为精脞组;C 为白术提取物 50 mg/L 组;D 为白术提取物 100 mg/L 组;E 为白术提取物 200 mg/L 组
图 2 无 DFMO 负荷时各组细胞 PLC- γ 1 蛋白表达电泳图

4.2 DFMO 负荷下各组细胞 PLC- γ 1 蛋白表达比较(表 7,图 3) 与空白组比较,DFMO 组 PLC- γ 1 蛋白表达降低($P < 0.01$);与 DFMO 组比较,精脞 + DFMO 组、白术提取物 100 mg/L + DFMO 组和白术提取物 200 mg/L + DFMO 组 PLC- γ 1 蛋白表达增加(均 $P < 0.01$)。

表 7 DFMO 负荷下各组细胞迁移过程 PLC- γ 1 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	光密度比值(PLC- γ 1/ β -actin)
空白	6	0.91 \pm 0.05
DFMO	6	0.24 \pm 0.03 *
精脞 + DFMO	6	0.92 \pm 0.07 Δ
白术提取物 50 mg/L + DFMO	6	0.25 \pm 0.04
白术提取物 100 mg/L + DFMO	6	0.89 \pm 0.07 Δ
白术提取物 200 mg/L + DFMO	6	0.86 \pm 0.06 Δ

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与 DFMO 组比较, $\Delta P < 0.01$



注:A 为空白组;B 为 DFMO 组;C 为精脞 + DFMO 组;D 为白术提取物 50 mg/L + DFMO 组;E 为白术提取物 100 mg/L + DFMO 组;F 为白术提取物 200 mg/L + DFMO 组

图 3 DFMO 负荷下各组细胞 PLC- γ 1 蛋白表达电泳图

讨论

胃肠黏膜损伤是急慢性胃炎、萎缩性胃炎、胃和十二指肠溃疡、炎症性肠病等胃肠疾病的主要病理环节之一。脾气虚证是慢性浅表性胃炎、萎缩性胃炎和消化性溃疡等病常见的中医证型,胃肠黏膜损伤因素与中医学脾气虚病机和证候密切相关^[14]。

本研究在前期工作基础上,主要考察白术甲醇提取物对小肠上皮细胞增殖、迁移及磷脂酶 C- γ 1 表达的影响。白术的化学成分主要为挥发油、内酯类、苷类、多糖等;挥发油在白术根茎约含 1.4%,挥发油主要包括苍术酮、苍术醇等;内酯类化合物包括白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III 等^[15]。本实验受试药白术甲醇提取物经高效液相色谱仪检测发现含有白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III 等成分^[8];实时细胞分析仪的检测结果显示,50、100、200 mg/L 的白术提取物均不能提高细胞生长过程的细胞指数,提示其主要药理作用并非促进 IEC-6 细胞增殖;研究白术提取物对 IEC-6 细胞迁移的影响,剂量筛选实验结果表明,当剂量低于 50 mg/L 时,白术提取物对细胞迁移的影响不明显,而剂量高于 50 mg/L 时,白术提取物表现出促进细胞迁移的作用,且随剂量提高而药效增加;多胺合成抑制剂 DFMO 可抑制 IEC-6 细胞迁移,但 100、200 mg/L 的白术提取物可逆转 DFMO 对细胞迁移的抑制,使细胞迁移数恢复至正常水平。

在 IEC-6 细胞, $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 是刺激细胞迁移的主要因素, 而 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的增加主要源于经细胞膜钙离子通道的钙离子内流和细胞内钙储存(如内质网和肌浆网)的释放^[16], 本课题组另一项研究表明, 白术甲醇提取物其能增加 IEC-6 细胞迁移过程多胺含量, 提高钾通道蛋白 Kv1.1 mRNA 和蛋白表达, 增加膜电位和 $[Ca^{2+}]_{cyt}$, 提高钙通道蛋白 TRPC1 mRNA 和蛋白表达; 逆转 DFMO 对上述指标的抑制作用^[8,9]。本实验进一步观察白术提取物对细胞迁移多胺调控信号通路中与 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 调控有关的另一个指标——PLC- γ 1 表达的影响。PLC- γ 1 可催化三磷酸肌醇(IP₃)形成, IP₃ 通过调制内质网 Ca²⁺ 储存动员和 Ca²⁺ 内流而调控 $[Ca^{2+}]_{cyt}$; 多胺通过提高 PLC- γ 1 表达而提高 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 和促进细胞迁移^[2,3]。本研究结果显示, 加入 DFMO 减少细胞内多胺后, IEC-6 细胞迁移被抑制, PLC- γ 1 mRNA 和蛋白表达也被抑制; 而在 DFMO 负荷下加入 100、200 mg/L 的白术提取物后, 可逆转 DFMO 所致的细胞迁移抑制和 PLC- γ 1 mRNA 和蛋白表达抑制; 这与本受试药对细胞迁移多胺调控信号通路其它指标的研究结果相吻合, 表明对该信号通路中 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的调控是白术提取物促进细胞迁移的重要作用机制。

本实验结果还表明, 白术提取物可促进 IEC-6 细胞迁移, 但对 IEC-6 细胞增殖无明显影响。本研究团队以往的研究发现, 益气健脾中药的不同提取部位, 对 IEC-6 细胞的作用可能不同, 以细胞增殖为例, 有的促进细胞增殖, 有的抑制细胞增殖, 有的无明显影响^[17]; 同一提取部位也有强弱不同的作用效应, 如白术糖提取物促进 IEC-6 细胞迁移的作用较明显^[6], 而对 IEC-6 细胞增殖的影响则较弱^[18]。提示益气健脾中药化学成分复杂, 不同提取物的作用效应有差异; 即使是同一提取物, 药效也有强弱不同的作用方向。因此针对不同提取物的不同药效作用, 分别研究其药理作用机制, 可更准确地阐释益气健脾中药的作用机制及药效物质基础。

参 考 文 献

[1] Gao JH, Guo LJ, Huang ZY, et al. Roles of cellular polyamines in mucosal healing in the gastrointestinal tract [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2013, 64(6): 681-693.

[2] Rao JN, Liu L, Zou T, et al. Polyamines are required for phospholipase C-gamma1 expression promoting intestinal epithelial restitution after wounding [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver*

Physiol, 2007, 292(1): G335-G343.

[3] Rao JN, Rathor N, Zhuang R, et al. Polyamines regulate intestinal epithelial restitution through TRPC1-mediated Ca²⁺ signaling by differentially modulating STIM1 and STIM2 [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012, 303(3): C308-C317.

[4] 叶富强, 陈蔚文. 四君子汤对胃肠道作用的药理研究 [J]. *时珍国医国药*, 2005, 16(1): 73-74.

[5] 李茹柳, 年立全, 赵世清, 等. 党参对应激性溃疡和细胞迁移及多胺的影响 [J]. *广州中医药大学学报*, 2013, 30(4): 519-524.

[6] 胡灿, 李茹柳, 王静, 等. 黄芪和白术提取物对 IEC-6 细胞迁移的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2011, 22(1): 60-65.

[7] 温鹏, 随晶晶, 李茹柳, 等. 甘草糖提取物对小肠上皮细胞迁移及多胺含量影响的研究 [J]. *中药材*, 2012, 35(7): 1112-1116.

[8] Song HP, Li RL, Chen X, et al. *Atractylodes macrocephala* Koidz promotes intestinal epithelial restitution via the polyamine-voltage-gated K⁺ channel pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 152(1): 163-172.

[9] 宋厚盼, 李茹柳, 王一寓, 等. 白术提取物对 IEC-6 细胞迁移过程多胺信号通路钙离子调控的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(5): 1361-1367.

[10] 赵世清, 温鹏, 李茹柳. 党参、甘草皂苷和黄酮部位对 IEC-6 细胞迁移的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2012, 28(2): 78-81.

[11] 李茹柳, 陶玉珠, 温鹏, 等. 甘草黄酮提取物对小肠上皮 IEC-6 细胞迁移及多胺的影响 [J]. *中草药*, 2013, 44(19): 2722-2726.

[12] 李茹柳, 曾丹, 温鹏, 等. 党参黄酮提取物对小肠上皮细胞迁移及多胺的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2014, 25(5): 523-526.

[13] Rakers S, Imse F, Gebert M. Real-time cell analysis: sensitivity of different vertebrate cell cultures to copper sulfate measured by xCELLigence® [J]. *Ecotoxicology*, 2014, 23(8): 1582-1591.

[14] 施甜, 朱方石, 徐婷婷. 脾虚与胃黏膜损伤相关性的理论探讨 [J]. *医学与哲学*, 2011, 32(12): 59-60.

[15] 李伟, 文红梅, 崔小兵, 等. 白术的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2007, 38(10): 1460-1462.

[16] Rao JN, Platoshyn O, Golovina VA, et al. TRPC1 functions as a store-operated Ca²⁺ channel in intestinal epithelial cells and regulates early mucosal restitution after wounding [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 290(4): G782-G792.

[17] 张子理, 陈蔚文. 党参、黄芪、白术、甘草提取部位对小肠上皮细胞增殖的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2002, 18(1): 10-12.

[18] 胡灿, 李茹柳, 莫全毅, 等. 白术和黄芪不同提取部位对小肠上皮细胞增殖的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2010, 21(2): 156-160.