

其中 PN 能抑制多种肿瘤细胞 DNA 合成和细胞增殖,提示 PN 可能具有抗癌作用^[7]。研究表明 PN 对多种恶性细胞的抗肿瘤效应与其细胞毒作用和细胞增殖抑制效应有关。报道 FeverfewTM 提取物和纯 PN 对体外小鼠纤维肉瘤细胞株 (MN-11) 和人淋巴瘤细胞株 (TK6) 有细胞生长抑制作用。然而,有关 SLs 对人鼻咽癌细胞的作用国内外尚未见报道。本研究通过系统地检测 PN 诱导的 CNE1 细胞毒性和细胞凋亡:首先,阐明了 PN 具有有效的细胞毒效应,表现在 PN 暴露的早期 (6 h) 即出现 LDH 漏出率显著增加,呈时间效应和剂量效应关系,在作用的后期 (24 h) 甚至低浓度 PN (10 $\mu\text{mol/L}$) 也可导致 LDH 漏出增高;其次,细胞增殖功能检测显示在 PN 作用的中期 (12 h),较低浓度 (25 $\mu\text{mol/L}$) 作用已显著抑制肿瘤细胞的增殖,并随时间和剂量呈明显增加,12 和 24 h 的 IC_{50} 分别为 42.35 和 29.56 $\mu\text{mol/L}$;第三,凋亡指标和特征性凋亡细胞形态学改变等检测,证实 PN 作用可明显诱导 CNE1 细胞凋亡并存在时间和剂量-效应关系,在 PN 作用的后期 (24 h) 和晚期 (36 h),中、高剂量组 (> 50 $\mu\text{mol/L}$) TUNEL 阳性细胞、失贴壁细胞百分比和细胞周期 SubG1 亚群均显著增加,结果表明凋亡是 PN 作用引起肿瘤细胞死亡的主要形式。

综上所述,一方面,人鼻咽癌细胞株 CNE1 对

草本植物菊花等的倍半萜烯内酯类化合物的主要活性成分 PN 的细胞毒效应敏感,并发现 PN 诱导 CNE1 细胞凋亡;另一方面,上述结果存在时间循序性改变和剂量效应关系,PN 在一定剂量范围内 (10~100 $\mu\text{mol/L}$) 诱导的细胞膜完整性的破坏以及由此引发的细胞增殖抑制出现早,提示 PN 诱导的细胞凋亡与介导细胞毒效应有关。对临床应用倍半萜烯内酯衍生物和开发中草药植物新药进行鼻咽癌的化学预防提供有用的信息。

参考文献:

- [1] Berry M I. Feverfew faces the future [J]. J Pharmaceutical, 1984, 19: 611-614.
- [2] Brucker D, Lorenzen L H. Therapeutic nasal spray administered composition containing feverfew [P]. United States Patent: No. 6, 103, 218, Date Aug. 15, 2000
- [3] Patel N M, Nozaki S, Shortle N H. *et al.* Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells with constitutively active NF- κ B is enhanced by κ B alpha superrepressor and parthenolide [J]. Oncogene, 2000, 19(36): 4159-4169.
- [4] Shen H M, Yang C F, Ong C N. Sodium selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells [J]. Int J Cancer, 1999, 81: 820-928.
- [5] 林忠宁,董胜璋,董书芸,等. MTT 法检测 T 淋巴细胞增殖功能的方法学探讨与应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2000, 10(1): 8-10.
- [6] Hwang D H, Fischer N H. Use of sesquiterpene lactones for treatment of severe inflammatory disorders [P]. United States Patent: No. 5, 905, 089, Date May. 18, 1999
- [7] Ross J J, Arnason J T, Birnboim H C. Low concentrations of the feverfew component parthenolide inhibit *in vitro* growth of the tumor lines in a cytostatic fashion [J]. Planta Med, 1999, 65(2): 126-129.

黄芪注射液和白术提取部位对小肠上皮细胞移行的影响

张子理¹, 陈蔚文^{2*}

(1. 深圳市第二人民医院, 广东 深圳 518035; 2. 广州中医药大学脾胃研究所, 广东 广州 510405)

摘要:目的 观察黄芪注射液 (Hi) 及白术提取部位 (B1、B4、B9、B13) 对小肠上皮细胞 (IEC-6) 移行的影响, 探讨其粘膜修复的机制。方法 IEC-6 接种于 6 孔培养板, 72 h 后损伤细胞, 并加入不同剂量的 Hi、B1、B4、B9 和 B13 溶液 100 μL , 空白组加等量 D-PBS, 阳性对照组加表皮生长因子 (EGF), 加药后 24、48 和 72 h 观察细胞移行。结果 B4、B9、B13 和 EGF 均明显促进细胞移行, 与对照组比较 24、48 和 72 h 均具有显著性差异 ($P < 0.01$), 但 B4、B9、B13 作用不如 EGF 强。B1 和 Hi 对细胞移行无明显促进作用, 与 EGF 比较 24、48 和 72 h 均具有显著性差异 ($P < 0.01$)。B13 和 Hi 配伍应用后, 对 IEC-6 细胞移行具有协同促进作用, 与对照组、Hi 和 B13 组比较 24、48 和 72 h 均具有明显差异 ($P < 0.05 \sim 0.01$)。结论 B4、B9、B13 通过促进细胞移行在小肠粘膜损伤修复过程中发挥作用, 可能是白术粘膜保护和修复作用的物质基础。B13 和 Hi 配伍应用对细胞移行具有协同促进作用。

关键词: IEC-6 细胞株; 移行; 黄芪注射液; 白术提取物

中图分类号: R 285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002)10-0912-04

* 收稿日期: 2002-04-22

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 39970906); 国家重大基础研究计划 (973) (NO. G 19990544); 广东省自然科学基金 (No. 990354) 及广东省千百十人才工程基金项目 (No. 9953)

作者简介: 张子理 (1963-), 男, 甘肃人, 教授, 主任医师, 1986 年 7 月毕业于兰州医学院医疗专业, 2002 年 7 月获广州中医药大学中西医结合临床专业博士学位, 主要从事中西医结合临床、教学及科研工作, 出版学术著作 3 部, 发表论文 40 余篇。

* 通讯作者: E-mail: pwxh@gzht.cm.edu.cn.

Effects of *Astragali* Injection and extracts from *Atractylodes macrocephala* on IEC-6 cell migration

ZHANG Zi-li, CHEN Wei-wen

(1. Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518035, China;

2. Piwei Institute, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

Abstract: **Object** To observe the effects of *Astragali* Injection (Hi) and extracts from *Atractylodes macrocephala* Koidz. (B1, B4, B9, B13) on the migration of rat small intestinal crypt-like cells line (IEC-6). **Methods** IEC-6 cells were inoculated in 6-well microplates and injured in 72 h, and added with Hi, B1, B4, B9, B13. Then D-PBS to negative control in the same amount and EGF to positived control, the cell migration was observed in 24, 48 and 72 h after treatment. **Results** B4、B9、B13 and EGF significantly promoted the migration of wounded IEC-6 cells ($P < 0.01$ vs the control). B1 and Hi had no effects on IEC-6 cell migration. Combined administration of B13 and Hi stimulated cell migration in a synergistic manner ($P < 0.05-0.01$ vs the control). **Conclusion** B4, B9, and B13 play an important role in mucosa repair of small intestine by promoting IEC-6 cell migration, which may constitute the material basis of the protective and repairing agents induced by *A. macrocephala* on gastrointestinal mucosa. Compatible application of B13 and Hi shows the synergism on IEC-6 cell migration.

Key words: IEC-6 cell line; migration; *Astragali* Injection; extract from *Atractylodes macrocephala* Koidz

胃肠粘膜修复机制一直是国际研究热点之一,近年来取得了较大进展。研究表明胃肠道粘膜各种类型损伤后,几乎在 24 h 内完全修复^[1,2]。至少两种完全不同性质的过程即上皮细胞的移行和隐窝细胞的增殖参与了粘膜的修复^[3,4]。其中细胞移行发生在粘膜损伤后的早期,是胃肠道糜烂粘膜恢复早期的主要动力^[5,6]。粘膜修复的机制非常复杂,受胃泌素,表皮生长因子,转化生长因子等的调控。目前尚未见到有关中药对其调节作用的报道。黄芪和白术是最常用的益气健脾中药之一。药理学研究表明黄芪和白术等益气健脾药物对各种原因引起的胃肠粘膜损伤具有防治作用^[7-10],但其确切细胞分子生物学机制目前还未阐明。McCormack 等^[11,12]用大鼠小肠隐窝细胞株(IEC-6)建立了培养中胃肠道细胞移行的模型。本文观察了黄芪注射液(Hi)和白术提取部位(B1、B4、B9、B13)对 IEC-6 细胞移行的影响,探讨其粘膜修复作用的机制。

1 材料与方法

1.1 材料:黄芪注射液(Hi):成都地奥九泓制药厂,批号 00050403,每支注射液 10 mL 含生药 20 g,临床静脉滴注一次用注射液 10~20 mL,每日一次。白术提取部位:B1、B4、B9、B13 为用化学溶剂分离方法从白术提取而获得的有效部位。主要成分为 L-rhamnose,含量 500~750 g/L。

IEC-6 细胞株:购自美国 ATCC 公司,批号: CRL-1592。

细胞培养液 DMEM,超滤胎牛血清(dFBS),

磷酸缓冲液(D-PBS),胰岛素,庆大霉素和 500 mg/L 胰酶 200 mg/L EDTA 溶液,表皮生长因子(EGF)均为 Gibco 公司产品。

培养瓶、培养板购自丹麦 Nunclon 公司,CO₂培养箱为美国 ESPEC 产品。

1.2 溶液配制:完全培养液(cDMEM):由 95% DMEM,5% dFBS,10 mg/L 胰岛素和 50 mg/L 庆大霉素组成。

实验药物配制:精确取实验药物 Hi、B1、B4、B9、B13 适量,分别用 D-PBS 配制成 62.5,125,250,500,1 000,2 000 mg/L 的溶液。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养:IEC-6 细胞立即复苏。将细胞冻存管在 37℃ 水浴中轻轻摇动,细胞解冻后,迅速从水浴取出,70% 酒精消毒,将细胞转入含 cDMEM 且预先孵育了 15 min 的 25 cm² 的组织培养瓶中,在 CO₂培养箱中,37℃,90% 空气,10% CO₂ 的潮湿环境中孵育。5 d 传代 1 次,每周换液 3 次。传代 5 次后的细胞用于实验。

1.3.2 药物对 IEC-6 细胞移行的影响:对数生长期细胞每孔 1×10^6 /mL 的密度接种于 6 孔培养板,接种后 72 h,用 18 mm 长的单面刀片轻刮单细胞层,产生约 18 mm × 8~10 mm 的损伤区,立即更换培养液,并加入不同受试药物,Hi+ B13 配伍组加等量 Hi 和 B13,空白组加 D-PBS,阳性对照组为 EGF。每组设 3 个复孔。加药后 24,48 和 72 h 倒置显微镜下放大 100 倍,检测移行到损伤部位的细胞

数。从刮出细胞的标志线起,肉眼观察每 1 mm² 范围内细胞数量,观察相邻的 6 个部位。

1.3.3 统计学处理:所有资料表示为 $\bar{x} \pm s$,用社会科学统计软件包(SPSS)进行独立 *t* 检验。

2 结果

2.1 Hi、B13 及 Hi+ B13 对 IEC-6 细胞移行的影响:表 1 表示药物作用后 24、48 和 72 h IEC-6 细胞的移行数量。结果显示 IEC-6 细胞损伤后出现细胞移行,24 h 细胞移行数量最多,48 和 72 h 移行数量

表 1 Hi、B13 及配伍对 IEC-6 细胞移行作用的时间和剂量反应(细胞数, $\bar{x} \pm s$)

时 间 (h)	组 别	剂 量 (mg/L)					空白组	EGF (5 μg/L)
		62.5	125	250	500	1 000		
24	Hi	41.5±1.9	40.8±3.2	44.2±3.6	44.8±2.3	47.2±3.5	46.0±4.5	100.3±7.3**
	B13	42.5±2.4	48.3±1.9	54.2±2.8*	58.3±2.8**	62.5±2.7**		
	Hi+ B13	52.8±2.8*	58.2±1.9**	61.2±1.5**	62.7±1.8**	68.0±2.1**		
48	Hi	55.0±2.4	54.7±3.9	58.5±4.1	61.8±4.6	64.0±4.6	60.7±5.6	132.7±7.7**
	B13	56.5±3.0	64.3±2.7	73.2±2.8*	77.7±3.9**	83.3±3.7**		
	Hi+ B13	70.7±3.4*	77.3±2.2**	81.7±2.1**	83.3±2.3**	90.5±2.9**		
72	Hi	68.7±2.8	68.3±4.8	73.0±4.9	77.0±5.8	80.0±5.4	76.0±6.9	164.5±9.9**
	B13	104.0±4.5**	97.0±4.7**	91.5±3.3*	80.7±3.4	70.7±3.7		
	Hi+ B13	88.7±4.0**	97.2±2.8**	101.8±2.3**	104.3±3.1**	112.8±3.7**		

与对照组比较: * *P* < 0.05 ** *P* < 0.01; 与 EGF 比较: *P* < 0.05 *P* < 0.01

可见,IEC-6 细胞损伤后出现细胞移行,损伤后 24 h 细胞移行数量最多。EGF、B4 和 B9 明显促进细胞移行,与对照组比较 24、48 和 72 h 均具有显著性差异(*P* < 0.01)。其中 EGF 作用最强,与 B4 和 B9 比较也具有显著性差异(*P* < 0.01)。B1 对 IEC-6 细胞移行无明显影响,与对照组比较无显著性差异(*P* > 0.05)。

表 2 B1、B4、B9 对 IEC-6 细胞移行的影响

组别	剂量 (mg/L)	移行细胞数		
		24 h	48 h	72 h
对照	—	46.0±4.5	60.7±5.6	76.0±6.9
EGF	0.005	100.3±7.3*	132.7±7.7*	164.5±9.9*
B1	2 000	45.5±4.8	60.5±6.3	75.5±7.7
B4	2 000	57.7±5.0*	79.0±2.8*	98.5±3.6*
B9	2 000	79.3±1.9*	106.2±2.9*	132.5±4.0*

与对照组比较: * *P* < 0.01; 与 EGF 比较: *P* < 0.01

3 讨论

胃肠粘膜屏障具有保护胃肠粘膜免受酸、碱、酶、细菌和毒素等胃肠道内容物损伤的作用。炎症性肠病、慢性腹泻、消化性溃疡和应激性溃疡等疾病状态下,常出现胃肠粘膜屏障损伤。隐窝细胞增殖、分化和移行是胃肠粘膜病理性损伤后修复,从而重建上皮完整性和维护粘膜屏障的关键^[13]。小肠粘膜上皮细胞的快速修复能力即隐窝细胞移行,是维持其完整性的重要因素,是小肠粘膜重要的自身防御机制。由于小肠粘膜上皮的完整性可能是粘膜屏障

逐渐减少。EGF 明显促进细胞移行,与对照组比较 24、48 和 72 h 均具有明显差异(*P* < 0.01)。Hi 对细胞移行无明显促进作用,与对照组和 EGF 比较 24、48 和 72 h 均具有显著性差异(*P* < 0.01)。B13 明显促进损伤的细胞移行,具有剂量依赖关系(24 和 48 h)。二者配伍应用后,对 IEC-6 细胞移行具有协同促进作用,与对照组、Hi 和 B13 组比较 24、48 和 72 h 均具有明显差异(*P* < 0.05~0.01)。

2.2 B1、B4、B9 对 IEC-6 细胞移行的影响:由表 2

的形态学基础,因此这种快速修复机制在胃肠粘膜的损伤防御中意义重大。中医临床应用黄芪、白术以益气健脾,又认为“脾主运化水谷精微”、“脾旺四季不受邪”,即“脾”的生理与胃肠运动、消化、吸收及粘膜屏障等功能相关,因此黄芪、白术益气健脾的作用可能与其维护粘膜完整及其屏障功能有关。临床研究证明黄芪^[9,10]、白术^[14,15]等益气健脾类药对粘膜病理损伤具有治疗作用。药理学研究也表明黄芪、白术等益气健脾药具有明显的胃肠粘膜保护作用,能防治粘膜损伤^[7~10]。但能否通过促进粘膜修复机制起作用,目前了解尚不多。黄芪具有明显的提高机体免疫和促进胃肠运动的作用^[16~18],但其在防治粘膜损伤中的作用,目前了解尚不多。本实验结果表明,Hi 和 B1 对细胞移行无明显促进作用,B4、B9、B13 明显促进损伤的细胞移行。Hi 和 B13 配伍应用后,促进其分化,对细胞移行无影响。B13 促进细胞分化和移行,而对细胞增殖无作用(另文报道),表明二者在粘膜修复的早期发挥作用,从细胞分子药理水平阐明了黄芪、白术益气健脾,修复粘膜的作用机制。也说明益气健脾药物在胃肠粘膜修复过程中具有协同调节作用。

参考文献:

- [1] Wang J Y, Johnson L R. Induction of gastric and duodenal mucosal ornithine decarboxylase during stress [J]. Am J Physiol, 1989, 257(2 Pt 1): G259-265.
- [2] Mechem R P. Receptors for laminin on mammalian cell [J].

- FASEB J, 1991, 5(11): 2538-2546.
- [3] Rutten M J, Ito S. Morphology and electrophysiology of guinea pig gastric mucosal repair *in vitro* [J]. Am J Physiol, 1983, 244(2): G171-182.
- [4] Silen W, Ito S. Mechanisms for rapid re-epithelialization of the gastric mucosal surface [J]. Annu Rev Physiol, 1985, 47: 217-229.
- [5] Wang J Y, Johnson L R, Tsai Y H, *et al.* Mucosal ornithine decarboxylase, polyamine, and hyperplasia in infected intestine [J]. Am J Physiol, 1991, 260 (Gastrointest. Liver. Physiol. 23): G45-51.
- [6] Goke M, Zuk A, Podolsky D K. Regulation and function of extracellular matrix intestinal epithelial restitution *in vitro* [J]. Am J Physiol, 1996, 271 (5 Pt 1): G729-740.
- [7] 李育浩. 白术对胃肠功能的影响[J]. 中药材, 1991, 14(9): 38-39.
- [8] 彭成, 雷载权. 四君子汤抗脾虚动物胃肠粘膜损伤的研究[J]. 中药药理与临床, 1995, 11(6): 7-10.
- [9] 殷静先. 黄芪药理研究与临床应用[J]. 时珍国药研究, 1998, 9(3): 230.
- [10] 贾淑琴. 黄芪的化学成分、药理和临床研究[J]. 天津药学, 1994, 6(4): 24-27.
- [11] Kaur P, Potten C S. Cell migration velocities in the crypt of the small intestine after cytotoxic insult are not dependent on mitotic activity [J]. Cell Tissue Kinet, 1986, 19: 601-610.
- [12] Wang J Y, Viar M J, Li J, *et al.* Polyamine are necessary for normal expression of the transforming growth factor- β gene during cell migration [J]. Am J Physiol, 1997, 272 (Gastrointest. Liver. Physiol. 35): G713-720.
- [13] Hiroshi Mashimo, Wu D C, Daniel K, *et al.* Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor [J]. Science, 1996, 274: 262-265.
- [14] 危北海, 张占海, 杨丽彩, 等. 胃安素治疗慢性萎缩性胃炎的临床与实验研究[J]. 华人消化杂志, 1998, 6(2): 114-117.
- [15] 胡定政, 荣进刚. 除幽汤治疗幽门螺旋杆菌感染的临床研究[J]. 时珍国药研究, 1998, 9(1): 15.
- [16] 徐毅, 王守富, 张英, 等. 黄芪注射液对体液免疫功能的影响[J]. 临床医学, 1998, 18(1): 17-18.
- [17] 徐峻, 戴慧芬, 叶武, 等. 黄芪注射液对 COPD 患者 IL-8 的影响[J]. 浙江中医学院学报, 1999, 23(4): 61.
- [18] 郑天珍, 李伟, 瞿颂义, 等. 黄芪对大鼠离体胃平滑肌条运动的影响[J]. 中药药理与临床, 1999, 15(2): 22-24.

地黄对缺氧大鼠心脑肾线粒体呼吸功能的保护作用

汤依群¹, 戴德哉¹, 黄宝^{2*}

(1. 中国药科大学 药理研究室, 江苏 南京 210009; 2. 杭州娃哈哈集团, 浙江 杭州 310009)

摘要:目的 研究地黄抗缺氧的机制。方法 大鼠处死放置 15 min, 造缺氧模型, 用氧电极法测定大鼠心室肌、大脑和肾线粒体呼吸功能参数, 观察地黄浸膏预防给药 2 h 对线粒体的保护作用。并以苈普地尔 5 mg/kg ip 给药作阳性对照。结果 地黄浸膏 2.4 g/kg 给药, 对大鼠缺氧心、脑、肾线粒体有明显的保护作用, 用药后 ST₃, RCI 值较模型组提高并呈剂量依从关系, 地黄对肾脏的保护作用相对心、脑强。结论 地黄预防性给药, 可有效保护心、脑、肾组织线粒体的呼吸产能功能, 对肾脏的保护作用最显著。

关键词: 线粒体; 缺氧; 苈普地尔; 地黄; 呼吸功能

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002)10-0915-03

Protective effects of plant of rehmannia root extract on mitochondrial respiratory function of heart, brain and kidney in hypoxia rat

TANG Yi-qun¹, DAI De-zai¹, HUANG Bao²

(1. Research Division of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

2. Hangzhou WAHAHA Group, Hangzhou 310009, China)

Abstract: **Object** To observe the protective effects of rehmannia root extract (Reh) on mitochondrial respiratory function in hypoxia rat. **Methods** Rat was killed rapidly and the body was put at room temperature for global ischemia of 15 min. Treatment of *po* Reh 2 and 4 g/kg was started 2 h before hypoxia. The mitochondrial respiratory parameter of myocardium, brain and kidney was measured by oxygen electrode method. The protective effect of Reh on mitochondrion was observed in 2h *po*. Bepridil (Bep), an Ca²⁺ channel blocker, ip 5 mg/kg 30 min prior to hypoxia served as positive control. **Results** In myocardium and kidney, hypoxia injury was showed similar, ST₃ and RCI value was increased as compared with the control group in a dose dependent manner, showing a selective stronger protection on renal mitochondrial than that on heart and brain. **Conclusion** Reh is effective in protecting metochondrial respirato-

* 收稿日期: 2002-03-15

作者简介: 汤依群(1966-), 女, 广西南宁人, 讲师, 硕士毕业, 博士在读, 研究方向为心血管药理学, 主要从事药理学、病理生理学的教学及科研工作。 Tel: 025-3271453 E-mail: Tangyiqu0130@sina.com