

4 种中药提取物对大鼠小肠上皮细胞 IEG-6 增殖及其葡萄糖吸收的影响

宋小珍^{1,2}, 杨秀江², 王 恬^{1*}, 刘凤华^{3*}

(1. 南京农业大学动物科学技术学院, 江苏 南京 210095; 2. 江西农业大学动物科学技术学院, 江西 南昌 330045;
3. 北京农学院 动物科技系, 北京 102206)

摘要:目的 利用大鼠小肠上皮细胞系 (IEG-6), 研究单味中药提取物对小肠上皮细胞增殖和葡萄糖吸收转运功能的调控作用。方法 藿香、苍术、黄柏和石膏等 4 种中药被定向提取, MTT 细胞增殖试验筛选提取物的适宜作用质量浓度, 测定各处理组细胞的葡萄糖吸收率和 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性, 同时采用荧光定量 PCR 技术分析细胞中钠-葡萄糖共转运载体 (SGLT1)、葡萄糖转运载体 2 (GLUT2) 和 Na^+ , K^+ -ATP 酶的 mRNA 表达量。结果 各中药提取物对大鼠小肠上皮细胞增殖的影响与其作用质量浓度有关。50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苍术挥发油和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 黄柏生物碱可提高 IEG-6 细胞葡萄糖的吸收功能, 并显著上调了 SGLT1 和 Na^+ , K^+ -ATP 酶 mRNA 表达量; 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 藿香挥发油促进了细胞的葡萄糖吸收, 但仅对 GLUT2 的基因表达有上调效应 ($P < 0.05$); 而 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 石膏水提物对细胞葡萄糖的吸收无促进作用 ($P > 0.05$)。结论 苍术挥发油、藿香挥发油和黄柏生物碱对细胞增殖和葡萄糖吸收均有促进作用, 但其影响机制并不完全一样。

关键词: 藿香; 苍术; 黄柏; 石膏; IEG-6 细胞; 细胞增殖; 葡萄糖吸收; Na^+ , K^+ -ATP 酶

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)08-1263-04

Effects of four Chinese herb extracts on cell proliferation in IEG-6 cells of rats and their glucose absorption

SONG Xiao-zhen^{1,2}, YANG Xi-jiang², WANG Tian¹, LIU Feng-hua³

(1. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

3. College of Animal Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of Chinese herb extracts on cell proliferation and glucose absorption in intestinal epithelial cell line (IEG-6 cells) of rats. **Methods** The extracts of four Chinese herbs, including *Herba Agastaches* (HA), *Rhizoma Atractylodis* (RA), *Cortex Phellodendri* (CP), and *Gypsum Fibrosum* (GF), were made. Their suitable concentration on the cell proliferation in IEG-6 cells was determined by MTT method, and glucose absorption and the activity of Na^+ , K^+ -ATPase in IEG-6 cells were assayed. A method of real time PCR was applied to the determination of SGLT1 and GLUT2 mRNA expression in the cells. **Results** Chinese herb extracts treatment altered the cell proliferation in a dose-dependent manner. Moreover, RA volatile oil (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and CP alkaloid (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) treatment increased glucose absorption and the activity of Na^+ , K^+ -ATPase genes ($P < 0.05$). HA Volatile oil (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) treatment improved glucose absorption and up-regulated the gene expression of GLUT2. However, GF water extract (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) treatment did not affect the glucose absorption and transport in IEG-6 cells ($P > 0.05$). **Conclusion** The three extracts treatment, including RA volatile oil, CP alkaloid, and HA volatile oil, could increase glucose absorption and the expression of glucose transport carrier genes, but their regulative mechanism are not totally the same.

Key words: *Herba Agastaches*; *Rhizoma Atractylodis*; *Cortex Phellodendri*; *Gypsum Fibrosum*; intestinal epithelial cell line (IEG-6 cells); cell proliferation; glucose absorption; Na^+ , K^+ -ATPase

临床试验中, 各种应激因素所导致的胃肠功能紊乱性疾病较为常见, 且最易引起机体消化吸收能

* 收稿日期: 2009-01-15

基金项目: 国家“十一五”科技支撑项目 (2006BAD14B05); 国家自然科学基金资助项目 (30771566, 30771591); 北京市自然科学基金、北京市教委资助重点课题 (KZ200310020007)

作者简介: 宋小珍 (1974—), 女, 江西樟树人, 江西农业大学副教授, 博士, 研究方向为中药提取物添加剂研究及反刍动物营养调控。
Tel: (0791) 3813503 E-mail: songxz1234@163.com

* 通讯作者 王 恬 E-mail: tianwang@njau.edu.cn
刘凤华 Tel: (010) 8079914 E-mail: liufenghua1209@126.com

力下降^[1]。中医脾胃主运化功能,即包含现代医学之胃肠消化吸收的生理过程。随着中药对胃肠功能影响研究的深入,也已把一些具有“理气、消食、化湿”作用的中药称之为“胃肠动力中药”。先前的研究表明,藿香、苍术等中药可促进胃肠蠕动,可保护机体肠道功能^[2]。本实验室前期研究已经证实,由藿香、黄柏、苍术和石膏按一定比例组合而成的中药复方可显著改善猪和小鼠等热应激模型动物的生产性能,促进小肠对营养物质的消化吸收能力^[3,4],但对其药效机制尚未做进一步研究。

IEG-6 细胞来源于新生的正常大鼠小肠,在组织学和免疫学方面具有隐窝样上皮细胞的特征,其在一定条件下可分化为成熟的小肠上皮细胞,具有小肠上皮细胞的营养消化吸收功能。IEG-6 细胞系的建立对于研究小肠上皮细胞的生长、分化和代谢等功能具有重要意义^[5],目前已被利用为中药活性成分药效学研究的常用体外模型^[6]。本研究拟利用大鼠 IEG-6 细胞系,观察藿香、苍术、黄柏和石膏对小肠上皮细胞增殖和吸收功能的影响,探讨这些中药调节肠道吸收功能的作用机制。

1 材料

1.1 细胞:大鼠小肠上皮细胞 IEG-6 细胞株 (CRL21592) 购自中国协和医科大学细胞保藏室。

1.2 中药提取物:石膏水提取物(含硫酸钙 92%)、黄柏生物碱(含小檗碱 42.0%)、藿香挥发油包合物(含百秋里醇 30.47%)、苍术挥发油包合物(含 β -桉叶油醇 33.63%),均由本课题组制备和定量测定,临用前分别用 DMEM 基础培养基配制成 1 mg/mL 母液。

1.3 试剂:DMEM 培养液、超滤胎牛血清 (dFBS)、胰酶 EDTA 溶液、Dulbeccos 磷酸缓冲液 (DPBS)、硫酸庆大霉素和胰岛素购自 Gibco 公司 (Gaithersbury, MD),二甲基亚砜 (DMSO) 购自 Amresco 公司。MTT 干粉:购自 Amresco 公司;猪长效胰岛素购自中国农业大学动物医院;葡萄糖测定试剂盒和 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。

1.4 仪器设备:LRH-250A 型生化培养箱 (广东省医疗器械厂);台式离心机 (上海安亭科学仪器厂);Biofuge PrimerR 台式冷冻高速离心机 (德国 Heraeus 公司产品);超净工作台 (哈东联公司);CO₂ 细胞培养箱 (Thermo 公司);HZQ-C 型恒温振荡器 (哈尔滨东明仪器厂);倒置显微镜 (日本 Olympus);细胞计数器 (北京科昊泽生物制品有限公司)。

2 方法

2.1 中药提取物有效质量浓度的筛选:试验分 20 个处理组,每种中药提取物设 4 个质量浓度梯度 (200、100、50、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和对照组各 1 个。每组设 3 次重复,每重复 10 个孔。IEG-6 细胞消化后,调整细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,向 96 孔细胞培养板中加入 100 μL 细胞悬液,中药组分别加入 25 μL 不同质量浓度中药提取物工作液,对照组补加 25 μL DMEM 完全培养液。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中培养 68 h 后,每孔加入 10 μL 5 mg/mL 的 MTT 液,继续培养 4 h 后加入 100 μL DMSO 液混匀,于 570 nm 处检测吸光度 (A) 值。

2.2 IEG-6 细胞葡萄糖吸收与 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性的测定:试验分 5 个处理组,分别为对照组、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 藿香组、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苍术组、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 黄柏组、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 石膏组,每组设 4 个复孔,共 20 个孔。每孔中加 1 mL 细胞培养液 (其中对照组为 950 μL 细胞悬液+ 50 μL DMEM 完全培养液、藿香组为 950 μL 细胞悬液+ 50 μL 1 mg/mL 藿香挥发油、苍术组为 950 μL 细胞悬液+ 50 μL 1 mg/mL 苍术挥发油、黄柏组为 990 μL 细胞悬液+ 10 μL 1 mg/mL 黄柏生物碱+ 40 μL DMEM 完全培养液、石膏组为 950 μL 细胞悬液+ 50 μL 1 mg/mL 石膏水提取物)。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中培养 72 h 后,吸取细胞上清液,用葡萄糖测定试剂盒检测细胞上清中葡萄糖的量,计算葡萄糖吸收率。同时用 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性试剂盒测定细胞上清的 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性。

葡萄糖吸收率 = (1 mL 培养液中葡萄糖的质量分数 - 上清中葡萄糖质量分数) / 1 mL 培养液中葡萄糖质量分数

2.3 钠-葡萄糖共转运载体 1 (SGLT1)、葡萄糖转运载体 2 (GLUT2) 及 Na^+ , K^+ -ATP 酶 mRNA 的相对定量:将上述吸去上清液的细胞培养板用 PBS 清洗两次后,每孔加入 Trizol 裂解液 0.25 mL,采用 Trizol (Invitrogen, life technologies) 一步提取法提取总 RNA,用核酸蛋白仪 (Eppendorf Biophotometer) 测定总 RNA 浓度,1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定总 RNA 质量。而后用随机引物将各样品的总 RNA 反转录成 cDNA。2.0 μg 总 RNA 被加到 25 μL 反应体系中 (包括 0.5 μg Oligo-dT₁₈, 5 μL dNTPs, 1 μL RNasin inhibitor, 1 μL M-MLV transcriptase, 5 μL M-MLV RT 反应缓冲液和 proper Rnase-free water),按照 2 步反应法 (70 $^{\circ}\text{C}$, 5 min 1 个循环; 42 $^{\circ}\text{C}$, 2 h 1 个循环) 得到的 cDNA

保存于 -20°C 。

根据 GenBank 相应的 cDNA 序列 (BC081827, BC078875, NM_012504, AF541940), 进行 BLAST 分析后, 用 premier 5.0 软件设计目的基因 SGLT1, GLUT2, Na^{+} , K^{+} -ATPase 和内参照 β -actin 的引物, 由北京奥科合成。SGLT1 引物: 上游 5'-TTGCCTACGGAACTGGAAG-3', 下游 5'-TTGGTGAGGAGGGAGATGAG-3', 产物长度 136 bp; GLUT2 引物: 上游 5'-CCAGCACAATACGACACCAGA-3', 下游 5'-AAGAGGGCTCCAGTCAACG-3', 产物长度 203 bp; Na^{+} , K^{+} -ATP 酶引物: 上游 5'-CACAAAGAACCCAAACGCATG-3', 下游 5'-AAGACCCACGAAGCAGAGG-3', 产物长度 288 bp; β -actin 引物: 上游 5'-AGAAGAGCTATGAGCTCTGACG-3', 下游 5'-CACAAAGAAGCCAAACGCATG-3', 产物长度 236 bp。在荧光定量 PCR 仪 (Mx3000p, Stratagene) 上进行 PCR 扩增, 同时扩增看家基因 β -actin 校正加样误差。

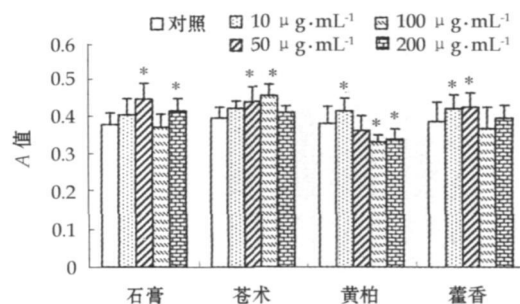
2.4 统计分析: 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.0 统计软件进行数据处理和差异显著性分析 (单因子方差分析 one way ANOVA, LSD)。实时荧光 PCR 结果采用 Stratagene's Mx3000P 荧光分析系统得出。

3 结果与分析

3.1 大鼠 IEG-6 细胞增殖的变化: 与对照组比较, 50、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 石膏组显著促进细胞增殖 ($P < 0.05$), 10、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 石膏组差异不显著 ($P > 0.05$); 50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苍术组的细胞增殖显著升高 ($P < 0.05$), 10、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苍术组差异不显著 ($P > 0.05$); 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 黄柏组显著促进细胞增殖 ($P < 0.05$), 100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 黄柏组显著抑制细胞增殖; 藿香在低质量浓度 (10、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 时显著促进细胞增殖, 而高质量浓度 (100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 时差异不显著。结果见图 1。

3.2 大鼠 IEG-6 细胞葡萄糖吸收及 Na^{+} , K^{+} -ATP 酶活性的变化: 由表 1 可知, 与对照组相比, 添加藿香挥发油、苍术挥发油和黄柏生物碱后显著提高了大鼠 IEG-6 细胞对葡萄糖的吸收率 ($P < 0.05$), 石膏水提物组的葡萄糖吸收率显著下降 ($P < 0.05$)。在对 Na^{+} , K^{+} -ATP 酶活性影响上看, 苍术挥发油和黄柏生物碱组的 Na^{+} , K^{+} -ATP 酶活性均显著高于对照组 ($P < 0.05$); 藿香挥发油、石膏水提物与对照组差异不显著 ($P > 0.05$)。

3.3 IEG-6 细胞 SGLT1、GLUT2、 Na^{+} , K^{+} -ATP



与对照组比较 * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

图 1 中药提取物对 IEC-6 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 1 Effect of Chinese herb extracts on cell proliferation in IEC-6 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

表 1 中药提取物对 IEC-6 细胞葡萄糖吸收及 Na^{+} , K^{+} -ATP 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Table 1 Effect of Chinese herb extracts on glucose absorption and Na^{+} , K^{+} -ATPase activity in IEC-6 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	$\rho/$ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	葡萄糖吸收率/ %	Na^{+} , K^{+} -ATP 酶活性/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)
对照	-	67.59 $\pm$ 1.81	0.582 $\pm$ 0.036
藿香	50	71.45 $\pm$ 2.67*	0.555 $\pm$ 0.028
苍术	50	73.90 $\pm$ 2.25*	0.679 $\pm$ 0.045*
黄柏	10	70.55 $\pm$ 1.86*	0.646 $\pm$ 0.086*
石膏	50	58.64 $\pm$ 1.56*	0.565 $\pm$ 0.103

与对照组比较: * $P < 0.05$

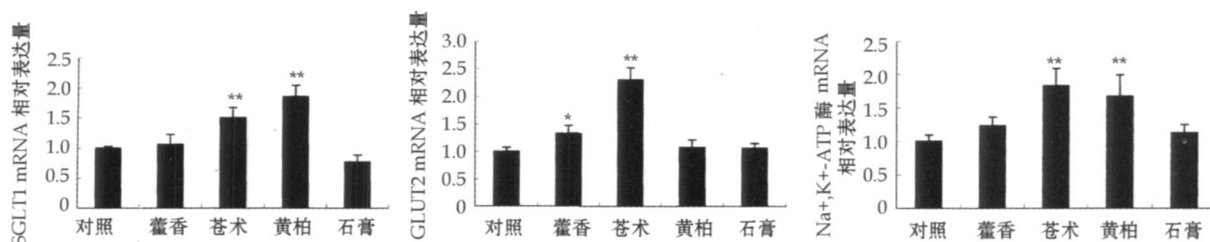
* $P < 0.05$ vs control group

酶 mRNA 表达量的变化: 由图 2 可知, 藿香组细胞的 GLUT2 mRNA 表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 但 SGLT1、 Na^{+} , K^{+} -ATP 酶 mRNA 表达量无显著变化 ($P > 0.05$); 苍术组细胞的 SGLT1 mRNA 相对表达量是对照组的 1.50 倍 ($P < 0.05$), GLUT2、 Na^{+} , K^{+} -ATP 酶 mRNA 相对表达量分别是对照组的 2.30、1.82 倍 ($P < 0.01$); 黄柏组细胞 SGLT1、 Na^{+} , K^{+} -ATP 酶 mRNA 相对表达量比对照组显著上升 ($P < 0.01$), GLUT2 mRNA 与对照组无差异 ($P > 0.05$); 石膏组细胞的 SGLT1、GLUT2、 Na^{+} , K^{+} -ATP 酶 mRNA 相对表达量与对照组均无显著差异 ($P > 0.05$)。

4 讨论

本研究结果显示, 藿香、苍术、石膏和黄柏提取物在一定质量浓度范围内对大鼠 IEG-6 细胞增殖均具有显著促进作用。这表明藿香挥发油等中药提取物均可促进大鼠小肠上皮细胞的增殖, 但其促增殖能力与提取物添加剂量有关。

IEG-6 细胞分化后具有小肠上皮细胞的营养消



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图 2 中药提取物对 IEC-6 细胞 SGLT1、GLUT2 和 Na^+ , K^+ -ATP 酶 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Fig. 2 Effect of Chinese herb extracts on mRNA expression of SGLT1, GLUT2, and Na^+ , K^+ -ATPase in IEC-6 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

化吸收功能,因而被国外学者广泛运用于小肠黏膜修复的细胞、分子和基因机制的研究^[8]。本研究测定了各中药提取物对细胞葡萄糖吸收转运相关载体基因表达水平的影响。结果显示, SGLT1、GLUT2 和 Na^+ , K^+ -ATP 酶的基因在大鼠 IEC-6 细胞上均有表达,这也进一步证实了大鼠 IEC-6 细胞在培养过程中发生了分化,具有成熟上皮细胞的营养吸收转运功能。

本研究结果显示,不同中药提取物对小肠上皮细胞葡萄糖吸收的影响并不完全一致,其中藿香挥发油、苍术挥发油、黄柏生物碱均可促进葡萄糖吸收,但石膏水提物对葡萄糖吸收无影响。葡萄糖被吸收进入小肠细胞主要是依靠定位于刷状缘、与 ATP 酶相偶联的主动转运体系;而胞内葡萄糖则是通过细胞基底膜的易化转运载体扩散进入血液或组织间液,这是一个不需能的被动转运过程^[9]。SGLT1 和 GLUT2 分别是肠道负责主动转运及易化扩散的两大主要载体。研究表明,机体对葡萄糖的吸收能力与小肠黏膜上这两种转运蛋白的表达量密切相关,也在一定程度上依赖着 Na^+ , K^+ -ATP 酶的活性^[9]。SGLT1、 Na^+ , K^+ -ATP 酶和 GLUT2 的活力决定了小肠转运葡萄糖的效率。其 mRNA 表达量则体现着它们转录水平的变化^[10]。本实验中苍术挥发油与黄柏生物碱可提高 Na^+ , K^+ -ATP 酶的活性,上调 SGLT1、GLUT2 和 Na^+ , K^+ -ATP 酶基因表达量;但藿香挥发油对提供细胞能量的 Na^+ , K^+ -ATP 酶的活性及其 mRNA 表达量并无明显影响。这些结果提示,藿香、苍术和黄柏 3 种提

取物对小肠葡萄糖吸收的影响机制是不一样的,藿香挥发油的作用可能是发生在葡萄糖由胞内过基底膜的易化转运过程,即影响其膜面转运载体,而不影响其腔面转运载体。而苍术和黄柏提取物则可能影响了小肠对葡萄糖的主动转运过程。

参考文献:

- [1] 曹曙光,夏宣平,王文星,等. 心理应激对小鼠小肠运动及血浆、小肠组织中生长抑素和 P 物质的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(8): 967-970
- [2] 李永渝,魏玉,李莉娟,等. 藿香、大黄等 CCB 中药影响胃肠运动功能的机制探讨 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 1997, 3(3): 187-190
- [3] 王自力,于同泉,朱晓宇,等. 中药添加剂对热应激下猪肠道组织 IL-2, IL-10 和黏液 IgA 含量影响 [J]. 中国兽医杂志, 2007, 43(9): 83-85.
- [4] 宋小珍,鲁琳,刘凤华,等. 高温应激对仔猪小肠上皮脂质过氧化的动态影响 [J]. 动物营养学报, 2008, 20(1): 75-79
- [5] 张子理,陈蔚文. 小肠隐窝细胞株 (IEC-6): 中药生物活性成分筛选的药理模型 [J]. 中药药理与临床, 2006, 22(3, 4): 180-182
- [6] Yula S, Ferruzza S, Ranaldi G, et al. Intestinal cell culture models: Applications in toxicology and pharmacology [J]. Cell Biol Toxicol, 2001, 17: 301-317
- [7] Kaeko M, Noriko M, Teruo K. Influence of fatty alcohol and other fatty acid derivatives on fatty acid uptake into rat intestinal epithelial cells [J]. Lipids, 2001, 36(1): 21-26
- [8] Meng Q, Choudry H A, Souba W W, et al. Regulation of amino acid arginine transport by lipopolysaccharide and nitric oxide in intestinal epithelial IEC-6 cells [J]. J Gastrointest Surg, 2005, 9(9): 1276-1285.
- [9] Breves G J, Schroder K B. Transport of nutrients and electrolytes across the intestinal wall in pigs [J]. Livestock Sci, 2007, (109): 4-13
- [10] Thwaites D T, Anderson C M H. H^+ -coupled nutrient, micronutrient and drug transporters in the mammalian small intestine [J]. Exp Physiol, 2007, 92(4): 603-619