

甘草黄酮提取物对小肠上皮细胞 IEC-6 迁移及多胺的影响

李茹柳^{1*}, 陶玉珠¹, 温 鹏¹, 赵世清², 徐颂芬¹, 陈蔚文¹

1 广州中医药大学脾胃研究所, 广东 广州 510405

2 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

摘 要: 目的 观察甘草黄酮提取物对小肠隐窝上皮细胞 IEC-6 迁移及迁移过程细胞内多胺量的影响。方法 划痕法制备细胞迁移模型, 观察在多胺合成抑制剂二氟甲基鸟氨酸 (DFMO) 及钾通道抑制剂 4-氨基吡啶 (4-AP) 存在情况下, 甘草黄酮提取物对细胞迁移的影响; 柱前衍生-高效液相色谱法检测 IEC-6 细胞在正常及 DFMO 存在条件下, 给予甘草黄酮提取物 12、24 h 后细胞内多胺 (精胺) 的量。结果 甘草黄酮提取物可逆转 DFMO 或 4-AP 所致 IEC-6 细胞迁移抑制; 其给药 12、24 h 后可提高细胞内精胺的量, 并逆转 DFMO 对多胺合成的抑制。结论 甘草黄酮提取物促进细胞迁移的作用与影响细胞内多胺调控信号通路有关。

关键词: 甘草黄酮提取物; 小肠上皮 IEC-6 细胞; 细胞迁移; 多胺; 多胺调控信号通路

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)19-2722-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.19.017

Effect of flavonoid from *Glycyrrhizae Radix* on small intestine epithelium IEC-6 cell migration and intracellular polyamine content

LI Ru-liu¹, TAO Yu-zhu¹, WEN Peng¹, ZHAO Shi-qing², XU Song-fen¹, CHEN Wei-wen¹

1. Piwei Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

2. School of Chinese Pharmaceutical Science, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of flavonoid from *Glycyrrhizae Radix* (FGR) on the migration of small intestinal epithelial cells (IEC-6) and intracellular polyamines content. **Methods** The cell migration model was constructed by scratch method. Under the intervention of α -difluoromethylornithine (DFMO), the specific inhibitor of polyamine synthesis, or 4-aminopyridine (4-AP), the specific inhibitor of potassium channel, the effect of FGR on cell migration was observed. The intracellular polyamine content being cultured for 12 or 24 h in normal and DFMO intervention condition was detected by precolumn derivatization-HPLC. **Results** FGR could reverse the inhibitory effects of DFMO and 4-AP on cell migration, increase the intracellular content of polyamines after 12 or 24 h treatment, and reserve the decrease of polyamine content caused by DFMO. **Conclusion** FGR could affect the polyamine-dependent signaling pathway, which may be related to the mechanisms for FGR promoting cell migration.

Key words: flavonoid from *Glycyrrhizae Radix*; intestinal epithelial IEC-6 cells; cell migration; polyamine; polyamine-dependent signaling pathway

胃肠黏膜损伤是临床上常见的病理改变, 也是脾虚证的临床表现之一^[1-2]。胃肠黏膜损伤修复包括上皮细胞迁移、增殖和分化等过程, 多胺对此过程有重要作用^[3], 因此细胞迁移是修复胃肠黏膜损伤的重要步骤之一。胃肠黏膜保护是甘草等益气健脾中药的作用机制之一^[4-5]。前期研究表明, 甘草提取物能促进小肠隐窝上皮 IEC-6 细胞增殖^[6]; 甘草糖提取物能促进 IEC-6 细胞迁移, 逆转多胺合成抑制

剂二氟甲基鸟氨酸 (DFMO) 所致细胞迁移抑制和细胞迁移过程中细胞内多胺量的降低^[7]; 甘草黄酮提取物 (flavonoid from *Glycyrrhizae Radix*, FGR) 能促进 IEC-6 细胞迁移^[8]。本实验通过观察 IEC-6 细胞经甘草黄酮提取物处理后, 多胺调控细胞迁移信号通路^[9]部分指标的变化, 探讨甘草黄酮提取物促进 IEC-6 细胞迁移的作用机制, 为益气健脾中药对胃肠黏膜损伤的修复作用机制提供实验依据。

收稿日期: 2012-12-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30772753, 81173254); 广州中医药大学中医内科学特色重点学科建设项目

*通信作者 李茹柳, 主要从事益气健脾中药作用机制研究。Tel: (020)36585444 E-mail: lrl@gzucm.edu.cn

1 材料

1.1 药品与试剂

甘草药材饮片购自广州杏园春药店,经广州中医药大学中药鉴定教研室童家赟讲师鉴定为豆科植物 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根茎。高糖 DMEM 完全培养基、胎牛血清 (FBS)、青霉素、链霉素、精脘、4-氨基吡啶 (4-AP), Sigma 公司; α -二氟甲基鸟氨酸盐酸盐 (DFMO), Calbiochem 公司; 胰蛋白酶 (1:250), Amresco 公司; EDTA 2Na·H₂O, 广州威佳科技科技有限公司进口分装。

1.2 细胞株

大鼠 IEC-6 细胞, 购自美国 Type Culture Collection。

1.3 仪器

AUM—120D 分析天平, 日本 Shimadzu 公司; IX—71 型荧光相差倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; 3111 型 CO₂ 培养箱, 美国 Thermo scientific 公司; Agilent1200 液相色谱系统, 美国 Agilent 科技有限公司; Hypersil ODS2 液相色谱柱, 大连依利特分析仪器有限公司。

2 方法

2.1 甘草黄酮提取物制备^[8]

甘草药材加石油醚回流提取 1 h, 滤过, 挥干溶剂, 药渣加 80%乙醇提取 2 次, 每次 1 h, 合并 2 次药液, 浓缩至生药 0.5 kg/L。取醇沉液, 置于 D101 大孔吸附树脂, 先以蒸馏水洗脱至洗脱液加 5 倍 95%乙醇不产生浑浊, 再分别以 50%、70%乙醇洗脱, 分别收集洗脱液, 浓缩干燥。70%乙醇洗脱部位即为黄酮提取物, 经分光光度计法测定甘草黄酮的质量分数 (以芦丁计) 为 50.98%。

2.2 细胞迁移模型制备、分组与给药^[10]

细胞以 4×10^5 /mL 接种于 6 孔板, 每孔 2 mL, 加入 DMEM 完全培养液 (含 10% FBS、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 U/mL), 于 5% CO₂、95%空气、饱和湿度、37 °C 下培养 24 h, 用刻刀沿培养孔底部中央轻轻划一直线划痕, 以细胞刮刀沿直线边缘将划痕一侧的细胞刮除干净, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗细胞表面 3 次。空白组每孔加 DMEM 完全培养基 2.5 mL, 模型组加入含 DFMO (2.5 mmol/L) 或 4-AP (40 μ mol/L) 的 DMEM 完全培养基 2.5 mL; 阳性对照组加入含精脘 (5 μ mol/L)、DFMO 或 4-AP 的 DMEM 完全培养基 2.5 mL; 给药组加入含甘草黄酮提取物 (50、100、200 mg/L)、DFMO 或 4-AP

的 DMEM 完全培养基 2.5 mL, 每组 3 个复孔。相同条件下培养 24 h 后于相差倒置显微镜下 ($\times 100$) 观察细胞迁移情况并拍照, 每孔沿划痕线从左至右随机观察 8 个视野, 观察每组 3 个复孔共 24 个视野的迁移细胞数。IPP 计数软件计算越过划痕的细胞数。

2.3 对细胞迁移过程中多胺量的影响

采用柱前衍生-高效液相色谱法测定细胞内多胺 (精脘) 的量^[11]。

2.3.1 细胞给药与处理 按“2.2”项下方法接种 IEC-6 细胞, 24 h 后吸弃培养液, 用 1 mL 移液器吸头沿孔中央轻轻做一直线划痕, PBS 冲洗细胞表面 3 次。空白组加 DMEM 完全培养基, 每孔 2.5 mL, 模型组加入含 DFMO (2.5 mmol/L) 的 DMEM 完全培养基 2.5 mL, 阳性对照组加入含精脘 (5 μ mol/L, 考察对 DFMO 的影响时同时加入 DFMO) 的 DMEM 完全培养基 2.5 mL, 给药组加入含甘草黄酮提取物 (50、100 mg/L, 考察对 DFMO 的影响时同时加入 DFMO) 的 DMEM 完全培养基 2.5 mL, 每组 6 个复孔, 合并 2 个复孔的细胞为 1 个样本, 即每组 3 个样本。在 5% CO₂、95%空气、饱和湿度、37 °C 下培养 12 h 或 24 h; 用胰酶消化液消化细胞, PBS 重悬, 3 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液后加入 5% 冷高氯酸 1.2 mL, 混匀, 4 °C、14 000 r/min 离心 10 min, 上清液备用。

2.3.2 衍生化处理 取“2.3.1”项下的上清液 1.0 mL, 分别加入 2 mol/L NaOH 溶液 1 mL 和苯甲酰氯 5 μ L, 涡旋混合后放置 20 min, 加入饱和氯化钠溶液 2 mL 和氯仿 2 mL, 涡旋混合 1 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 吸取下层 1.5 mL 有机相并氮气吹干。残渣用 0.5 mL 的流动相溶解在带有螺盖的玻璃管中, 分别在 50 °C 下放置 8 h, 所得溶液分别加入 2 mol/L NaOH 溶液 0.2 mL 及氯仿 2 mL, 涡旋混合 1 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 吸取下层 1.5 mL 有机相并氮气吹干, 残渣用 0.5 mL 流动相溶解。进样前过 0.22 μ m 有机微孔滤膜, 按色谱条件进样测定。色谱条件: 检测波长 234 nm, 柱温 25 °C, 流动相为甲醇-水 (55:45); 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 20 μ L。

2.4 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 统计软件进行分析, 数据先进行方差齐性检验, 然后方差分析, 采用 Dunnett 法进行组间比较。

3 结果

3.1 对 DFMO 所致 IEC-6 细胞迁移抑制的影响

与空白组相比, 模型组 IEC-6 细胞出现迁移抑制 ($P<0.05$)。与模型组相比, 甘草黄酮提取物 100、200 mg/L 组可显著逆转由 DFMO 所致细胞迁移抑制 ($P<0.05$)。结果见表 1、图 1。

3.2 对 4-AP 所致 IEC-6 细胞迁移抑制的影响

与空白组相比, 模型组 IEC-6 细胞出现迁移抑制 ($P<0.05$)。与模型组相比, 甘草黄酮提取物 50、100、200 mg/L 组可显著逆转 4-AP 所致 IEC-6 细胞迁移抑制 ($P<0.05$)。结果见表 2、图 2。

3.3 对细胞迁移过程细胞内精脞量的影响

3.3.1 对细胞迁移过程精脞量的影响 与空白组相

表 1 甘草黄酮提取物对 DFMO 所致 IEC-6 细胞迁移抑制的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of FGR on cell migration in DFMO intervention condition ($\bar{x} \pm s, n=3$)		
组 别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	迁移细胞数
空白	—	167.4±30.6
模型	—	68.1±23.9*
甘草黄酮提取物	50	137.5±35.9
	100	188.4±32.3 [△]
	200	216.8±46.1 [△]
精脞	5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	201.1±60.0 [△]

与空白组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [△] $P<0.05$, 表 2 和 4 同
* $P<0.05$ vs blank group; [△] $P<0.05$ vs model group, same as Tables 2 and 4

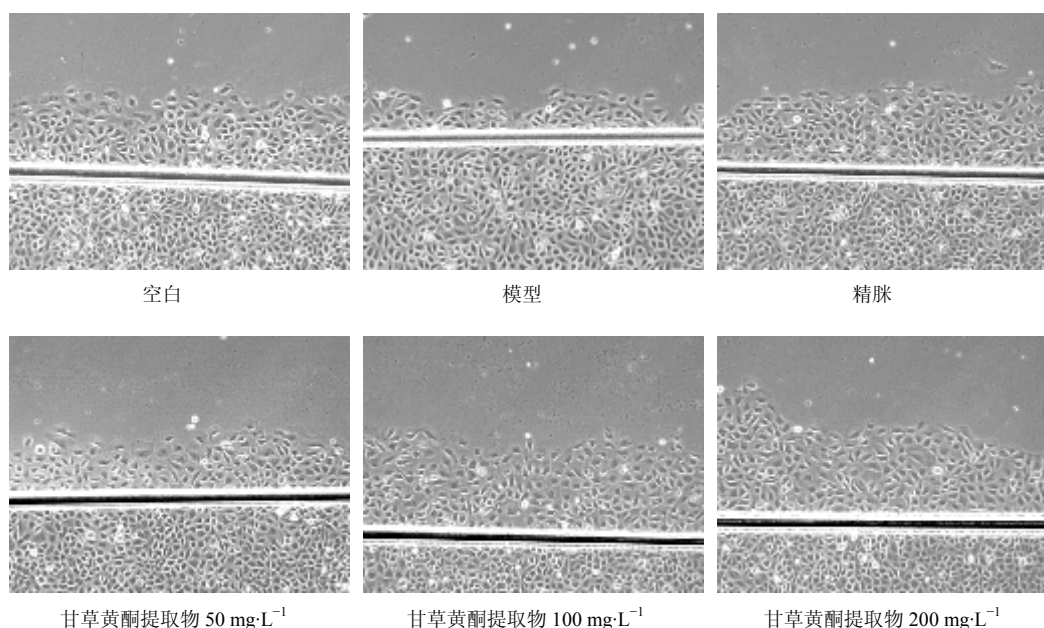


图 1 甘草黄酮提取物对 DFMO 所致 IEC-6 细胞迁移抑制的影响

Fig. 1 Effect of FGR on cell migration in DFMO intervention condition

表 2 甘草黄酮提取物对 4-AP 所致 IEC-6 细胞迁移抑制的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of FGR on cell migration in 4-AP intervention condition ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组 别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	迁移细胞数
空白	—	205.2±31.4
模型	—	76.8±16.5*
甘草黄酮提取物	50	174.8±33.3 [△]
	100	206.6±44.6 [△]
	200	222.1±42.9 [△]
精脞	5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	339.0±74.2 [△]

比, 给药后 12 h 或 24 h, 甘草黄酮提取物 50、100 mg/L 组可显著提高 IEC-6 细胞迁移过程精脞的量 ($P<0.05$)。结果见表 3。

3.3.2 在 DFMO 诱导 IEC-6 细胞迁移抑制下对精脞量的影响 与空白组相比, 模型组 IEC-6 细胞加入 DFMO 后 12 h 或 24 h, 精脞的量显著降低 ($P<0.05$)。与模型组相比, 甘草黄酮提取物 100 mg/L 可显著提高 DFMO 存在条件下细胞迁移过程精脞的量 ($P<0.05$)。结果见表 4 和图 3。

4 讨论

多胺包括腐胺、精脞和精胺等。多胺调控钾通

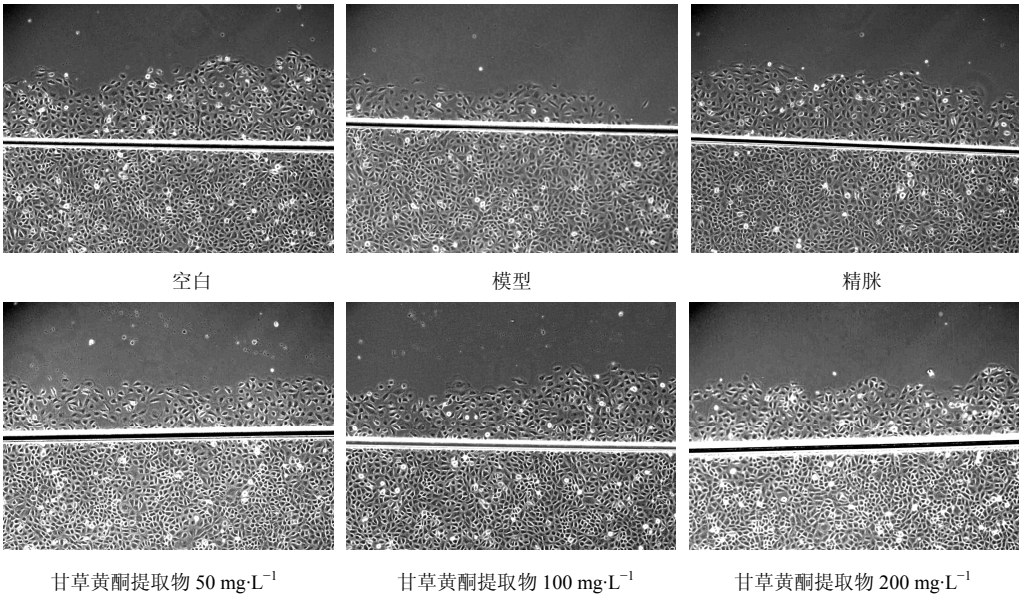


图 2 甘草黄酮提取物对 4-AP 所致 IEC-6 细胞迁移抑制的影响
Fig. 2 Effect of FGR on cell migration in 4-AP intervention condition

表 3 甘草黄酮提取物对 IEC-6 细胞迁移过程中精脒量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of FGR on spermidine content in IEC-6 cell migration ($\bar{x} \pm s, n = 3$)			
组 别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	精脒 / ($\times 10^{-8} \text{mol} \cdot 10^{-6}$ 细胞)	
		给药后 12 h	给药后 24 h
空白	—	1.16 ± 0.39	0.36 ± 0.05
甘草黄酮 提取物	50	$2.53 \pm 0.35^*$	1.07 ± 0.43
	100	$3.35 \pm 0.54^*$	$2.24 \pm 0.17^*$
精脒	$5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$4.35 \pm 0.58^*$	$0.83 \pm 0.08^*$

与空白组比较: $^*P < 0.05$
 $^*P < 0.05$ vs blank group

表 4 在 DFMO 诱导 IEC-6 细胞迁移抑制下甘草黄酮提取物对精脒量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of FGR on spermidine content in IEC-6 cell migration in DFMO intervention condition ($\bar{x} \pm s, n = 3$)			
组 别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	精脒 / ($\times 10^{-8} \text{mol} \cdot 10^{-6}$ 细胞)	
		给药后 12 h	给药后 24 h
空白	—	3.10 ± 0.33	2.96 ± 0.09
模型	—	$0.68 \pm 0.12^*$	$0.60 \pm 0.09^*$
甘草黄酮 提取物	50	4.42 ± 1.00	0.73 ± 0.14
	100	$5.41 \pm 0.23^\Delta$	$1.73 \pm 0.83^\Delta$
精脒	$5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$2.94 \pm 0.19^\Delta$	$2.75 \pm 0.13^\Delta$

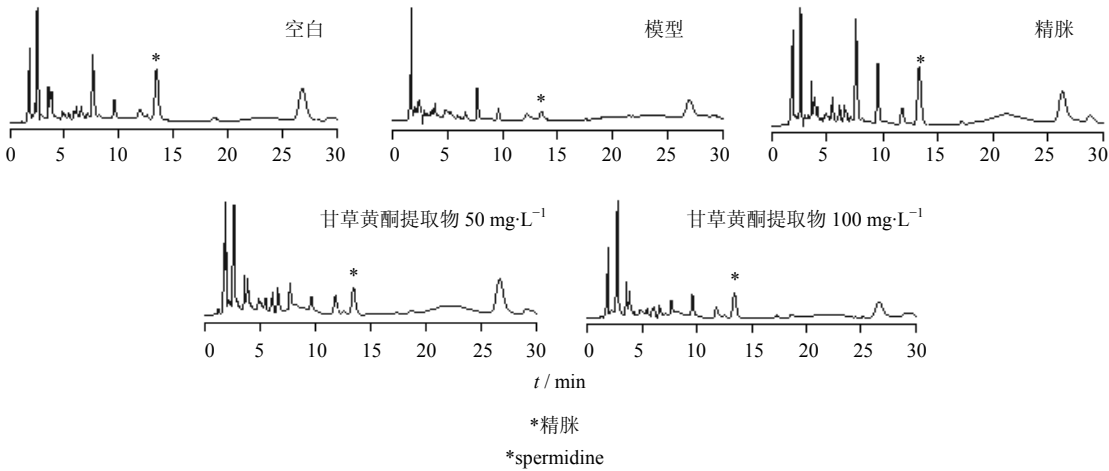


图 3 在 DFMO 诱导 IEC-6 细胞迁移抑制下各组 HPLC 图
Fig. 3 HPLC chromatograms of each group in IEC-6 cell migration in DFMO intervention condition

道激活信号通路在细胞迁移中起关键作用。多胺调控了电压门控钾通道(Kv)蛋白表达和细胞内游离 Ca^{2+} 浓度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)；Kv通道在上皮细胞中对调控静息膜电位(E_m)起重要作用，上皮细胞中 E_m 通过控制 Ca^{2+} 内流驱动力来调控 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ， $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 在损伤后刺激细胞迁移中起关键作用^[9]。鸟氨酸脱羧酶(ODC)是多胺合成的限速酶，DFMO是ODC的特异性抑制剂，可抑制细胞内多胺合成，进而导致细胞迁移的抑制和黏膜修复的延迟^[9]； K^+ 通道抑制剂4-AP则明显抑制损伤后细胞迁移^[12]。

益气健脾中药对胃肠黏膜损伤修复的功效已得到临床和实验证实，但作用机制尚不明确。四君子汤总多糖、甘草多糖、党参多糖、白术和黄芪糖提取物、甘草黄酮等均能促进IEC-6细胞迁移^[8,13-15]。而黄芪和白术糖提取物促进IEC-6细胞迁移的作用与其影响多胺介导的钾通道激活信号通路有关^[16]。

甘草是常用的益气健脾中药，也是益气健脾经典方剂四君子汤的组成药物之一。黄酮类化合物是甘草中的主要有效组分之一，生物活性较强，具有抗氧化、抗肿瘤、抗HIV、抗溃疡、抗心律失常、保肝、解痉、镇痛等药理作用^[17]。甘草黄酮类化合物是较早被研究、开发的治疗胃肠病的中药有效成分，对消化性溃疡有较好疗效^[18-20]。本实验结果表明，甘草黄酮提取物能促进IEC-6细胞迁移，逆转由DFMO或4-AP所致的细胞迁移抑制，提高细胞迁移过程中细胞内精胺的量，逆转由DFMO所致精胺量的降低，提示益气健脾中药对胃肠黏膜损伤的修复作用机制与其促进上皮细胞迁移、调控多胺调控信号通路有关。近年研究表明Rho鸟苷三磷酸对细胞迁移中细胞骨架结构具有一定影响^[21-22]，因此益气健脾中药对胃肠黏膜损伤修复的确切机制还需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] 许长照, 张瑜瑶, 刘隆棣, 等. 脾虚证患者十二指肠的病理形态及组织化学研究 [J]. 中西医结合杂志, 1987, 7(12): 722-725.
- [2] 尹光耀, 张武宁, 何雪芬, 等. 脾虚证胃黏膜组织细胞病理学研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(11): 660-663.
- [3] 迟莉, 李茹柳, 陈蔚文. 鸟氨酸脱羧酶的生理病理特点及其药物研究概况 [J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(10): 979-984.
- [4] 曾星, 贺毅, 周丹, 等. 甘草对脾虚证消化道黏膜及细胞保护的分子药理机制研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(8): 2030-2031.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [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] 赵世清, 温鹏, 李茹柳, 等. 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.
- [9] Wang J Y. Cellular signaling in rapid intestinal epithelial restitution: implication of polyamines and K^+ channels [J]. *Acta Physiol Sin*, 2003, 55(4): 365-372.
- [10] Hu C, Li R L, Lu W B, *et al.* Studies on cell migration model in intestinal epithelial restitution for pharmacological research [J]. 中药材, 2011, 34(5): 738-746.
- [11] 随晶晶, 卢文彪, 李茹柳, 等. 高效液相色谱法检测小肠上皮细胞多胺含量 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(9): 1309-1312.
- [12] Wang J Y, Wang J, Golovina V A, *et al.* Role of K^+ channel expression in polyamine-dependent intestinal epithelial cell migration [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, 278: C303-C314.
- [13] 韩凌, 王培训, 刘良, 等. 四君子汤总多糖对大鼠小肠上皮细胞株IEC-6迁移的影响 [J]. 山东中医杂志, 2006, 25(8): 544-546.
- [14] 韩凌, 王培训, 危建安, 等. 四君子汤总多糖及单味药多糖对大鼠小肠上皮细胞株IEC-6细胞迁移作用的比较研究 [J]. 浙江中医杂志, 2006, 41(9): 523-525.
- [15] 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.
- [16] Li R L, Hu C, Sui J J, *et al.* Effects of Polysaccharides from *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae* and from *Radix Astragali* on Polyamine-Mediated K^+ Channels in the IEC-6 Migration [J]. *Cell Biol Inter*, 2010, 34(8): S2.
- [17] 季宇彬, 姜薇, 范玉玲, 等. 甘草黄酮的研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(9): 附5-附6.
- [18] 源福游. 甘酮胃片的临床疗效 [J]. 广州医药, 1987(2): 47-48.
- [19] 贾国惠, 贾世山. 甘草中黄酮的药理作用研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 1998, 33(9): 513-516.
- [20] 李红艳, 陈月莲. 安胃疡胶囊治疗消化性溃疡60例疗效观察 [J]. 医学文选, 2000, 19(4): 520.
- [21] Anne J R. Rho GTPases and cell migration [J]. *J Cell Sci*, 2011, 114(15): 2713-2722.
- [22] Ellen V S, Channing J D. Overview of Rho GTPase History [J]. *Sci Business Media*, 2010, 10(7): 3-27.