

黄芪多糖调控多胺介导的 Ca^{2+} -RhoA 通路促进小肠上皮细胞迁移研究

宋厚盼¹, 李如意^{1,2}, 魏艳霞¹, 余黄合², 李鑫¹, 李茹柳³, 袁振仪⁴, 秦裕辉⁴, 蔡雄^{1,4*}, 刘平安^{2*}, 黄惠勇¹

1. 湖南中医药大学 中医诊断学湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208

2. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

3. 广州中医药大学脾胃研究所, 广东 广州 510405

4. 湖南中医药大学 中医方证研究转化医学湖南省高校重点实验室, 湖南 长沙 410208

摘要: 目的 考察黄芪多糖对小肠上皮细胞 (IEC-6) 迁移及迁移过程细胞内多胺水平、细胞质游离钙离子 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$) 的量、细胞骨架蛋白 RhoA 表达的影响, 探讨黄芪修复胃肠黏膜损伤的疗效机制。方法 黄芪药材经水提醇沉、Sevage 法去蛋白后得到黄芪粗多糖, 运用 DEAE 纤维素柱分离得到黄芪多糖 I、II、III、IV, 黄芪多糖 I 以 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱得到黄芪多糖 V。Tips 划痕法建立 IEC-6 细胞损伤迁移模型, 柱前衍生高效液相色谱法测定多胺的量, 流式细胞仪检测 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ 水平, Western blotting 法检测 RhoA 蛋白表达。考察黄芪多糖对正常 IEC-6 细胞[未加 α -二氟甲基鸟氨酸 (DFMO)]和多胺耗竭 IEC-6 细胞 (加入 DFMO) 迁移、多胺水平、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ 的量及 RhoA 蛋白表达的影响。结果 黄芪粗多糖、黄芪多糖 I、黄芪多糖 V (50、100、200 mg/L) 均能促进 IEC-6 细胞迁移 ($P < 0.01$), 并且可逆转多胺合成抑制剂 DFMO 所致的细胞迁移抑制效果 ($P < 0.01$); 在正常 (未加 DFMO) 或多胺耗竭情况 (加 DFMO), 黄芪多糖 V 均可提高迁移过程细胞内多胺的量 ($P < 0.01$); 黄芪多糖 V 可提高细胞迁移过程 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ 水平 ($P < 0.01$), 并且可逆转 DFMO 所致的 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ 水平下降 ($P < 0.01$); 黄芪多糖 V (100、200 mg/L) 可明显提高 RhoA 蛋白表达, 同时可逆转 DFMO 所导致的 RhoA 蛋白表达抑制作用。结论 黄芪多糖可加速胃肠黏膜损伤早期修复过程, 其机制可能与增加黏膜上皮细胞多胺的量, 提升 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$, 从而提高 RhoA 蛋白表达, 进而促进胃肠黏膜上皮细胞迁移有关。

关键词: 黄芪多糖; 小肠上皮细胞; 细胞迁移; 细胞质游离钙离子; RhoA; 多胺

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)23-4224-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.23.018

Promotion of *Astragalus membranaceus* polysaccharides on intestinal epithelial cell migration via polyamine mediated Ca^{2+} -RhoA signaling pathway

SONG Hou-pan¹, LI Ru-yi^{1,2}, WEI Yan-xia¹, YU Huang-he², LI Xin¹, LI Ru-liu³, YUAN Zhen-yi⁴, QIN Yu-hui⁴, CAI Xiong^{1,4}, LIU Ping-an², HUANG Hui-yong¹

1. Hunan Provincial Key Laboratory of Diagnostic and Therapeutic Research in Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

3. Spleen and Stomach Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

4. Hunan Education Department Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To study the effect of *Astragalus membranaceus* polysaccharides (AMP) on migration, intracellular polyamines content, cytosolic free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$), and RhoA protein expression of intestinal epithelial (IEC-6) cells, so as to explore the repairing mechanism of *Astragalus membranaceus* (AM) on gastrointestinal injury. **Methods** AM was extracted by water and precipitated by ethanol, AM crude polysaccharides were obtained after removing protein. AMP I, II, III, and IV were obtained by

收稿日期: 2016-04-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81373540); 湖南省科技重大专项 (2014FJ1007); 湖南省教育厅优秀青年项目 (15B179); 湖南中医药大学博士科研启动项目 (1001-017); 湖南中医药大学中医诊断学国家重点学科开放基金项目 (2015ZYD19)

作者简介: 宋厚盼 (1988—), 男, 主要从事脾胃病证研究。Tel: (0731)85381146 E-mail: pansy-2008@163.com

***通信作者** 刘平安, 男, 硕士, 副教授, 主要从事中药药理学研究。Tel: (0731)85381149 E-mail: 1157626103@qq.com

蔡雄, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事风湿免疫疾病中医药转化医学研究。Tel: (0731)88459435 E-mail: caixiong@hncm.edu.cn

DEAE cellulose column chromatography. AMP V was further obtained by Sephadex LH-20 gel column chromatography from AMP I. Cell migration model was established by Tips scratch method; High performance liquid chromatography was used to determine the polyamines content; Flow cytometry was used to detect the $[Ca^{2+}]_{cyto}$; Western blotting analysis was used to detect RhoA protein expression. The improving effect of AMP on migration, $[Ca^{2+}]_{cyto}$, and RhoA protein expression of normal and polyamine-depleted IEC-6 cells was observed. **Results** AM crude polysaccharides, AMP I, and AMP V (100 mg/L or 200 mg/L) promoted cell migration and reversed the inhibition of cell migration induced by DFMO ($P < 0.01$); AMP V increased the intracellular polyamines content in normal and polyamine-deficient IEC-6 cells; AMP V also enhanced $[Ca^{2+}]_{cyto}$ in the process of IEC-6 cell migration and reversed the reduction of $[Ca^{2+}]_{cyto}$ induced by DFMO ($P < 0.01$); Further study suggested that AMP V increased RhoA protein expression in normal and polyamine-deficient IEC-6 cells ($P < 0.01$). **Conclusion** These results indicate that the repairing effect of AM on the gastrointestinal mucosa damage may be related to its role of increasing polyamines content, then improving $[Ca^{2+}]_{cyto}$ and RhoA protein expression and thereby promoting cell migration.

Key words: *Astragalus membranaceus* polysaccharides; intestinal epithelial cell; cell migration; cytosolic free Ca^{2+} ; RhoA; polyamine

胃肠黏膜损伤是临床常见的病理改变,是多种胃肠道疾病如萎缩性胃炎、胃十二指肠溃疡、炎症性肠病的发病基础和主要病理环节。近年来,通过对生理调控、信号通路、病理改变的深入和系统研究,胃肠黏膜损伤修复的机制获得了较大进展。胃肠黏膜损伤后的修复过程主要依赖于上皮细胞迁移、增殖和分化 3 个环节^[1],其中细胞迁移是黏膜损伤修复的第 1 个步骤,在黏膜损伤重建过程中具有至关重要的作用。

多胺是存在于人类细胞和体液中的天然成分,包括精脒、精胺及腐胺,二氟甲基鸟氨酸(DFMO)可特异性地阻断机体多胺合成^[2]。细胞质游离钙离子($[Ca^{2+}]_{cyto}$)是细胞迁移的主要刺激因素^[2]。研究表明,多胺量的增加使小肠黏膜上皮(IEC-6)细胞超极化,从而促进 Ca^{2+} 内流,提升 $[Ca^{2+}]_{cyto}$ 水平;增加的 $[Ca^{2+}]_{cyto}$ 进一步激活其下游细胞骨架蛋白 RhoA 表达,提高 IEC-6 细胞骨架中应力纤维的量,进而为细胞迁移提供动力,最终促进 IEC-6 细胞迁移^[3]。

中医脾胃虚弱与胃肠黏膜损伤在病因学和发病机制方面存在相关性,脾胃虚弱是胃肠黏膜损伤相关疾病的病理基础,健脾益气法是治疗胃肠黏膜损伤相关疾病的主要治法之一^[4]。本研究考察临床常用益气健脾中药黄芪的多糖成分对 IEC-6 细胞迁移的影响,并检测黄芪多糖对迁移过程细胞内多胺的量、 $[Ca^{2+}]_{cyto}$ 水平和 RhoA 蛋白表达的影响,旨在探讨黄芪修复胃肠黏膜损伤的作用机制。

1 材料

1.1 药物与试剂

黄芪饮片购于湖南中医药大学第一附属医院,经湖南中医药大学中药鉴定教研室刘塔斯教授鉴定为膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch)

Bge. 的干燥根;完全培养基(cDMEM,批号 8112580)、胎牛血清(FBS,批号 1036087)、青霉素和链霉素组成的双抗(Pen Strep,批号 1202398)、Trypsin-EDTA (TrypLE,批号 526A986)均购于 Invitrogen 公司; α -二氟甲基鸟氨酸(DFMO,相对分子质量 218.63,批号 039K4963V)购于德国 Merck 公司;5 mL 聚苯乙烯圆底管为 Becton Dickinson 公司产品;Fluo-3 AM ester (相对分子质量 1 129.85,批号 10F0402)、腐胺(相对分子质量 88.15,批号 BCBH3167V),均为 Sigma 公司产品;鼠抗 β -actin 单克隆抗体(批号 GR111289-1)、兔抗 RhoA 多克隆抗体(批号 GR503-6)、羊抗兔 IgG 多克隆二抗(批号 GR1010882-1)、羊抗鼠 IgG 多克隆二抗(批号 GR1010881-1)均购自 Abcam 公司。

1.2 细胞株

大鼠小肠隐窝细胞(IEC-6),购于 ATCC, Catalog No. CRL-1592, Lot No. 58541019。经形态学和免疫学鉴定,该细胞株保持了非致瘤及未分化的特性,培养 21~28 代细胞用于实验。

1.3 主要仪器

IX-71 型倒置荧光显微镜,日本 Olympus 公司;Forma 310 型 CO_2 培养箱,德国 Thermo scientific 公司;Agilent 1200 高效液相色谱系统,美国安捷伦公司;FACS Aria II 型流式细胞仪,美国 Becton Dickinson 公司;AUM-120D 分析天平,日本 SHIMADZU 公司;SDS-PAGE 电泳系统、ChemiDoc XRS 成像系统,美国 Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 黄芪多糖的制备

称取黄芪药材饮片 400 g,以 95%乙醇 60 °C 超声(350 kHz)提取(料液质量比为 1:5)3 次,每

次1 h, 弃上清。残渣以蒸馏水于60℃超声提取(料液质量比为1:5)3次, 每次1 h, 合并水提液, 减压浓缩至1 mg/mL。调整浓缩液使其含醇量为80%, 4℃静置过夜, 滤取沉淀, 浓缩得黄芪多糖干浸膏45.32 g。蒸馏水溶解黄芪多糖干浸膏, Seavage法去蛋白, 浓缩干燥得黄芪粗多糖27.19 g。取黄芪粗多糖1.0 g, DEAE-纤维素柱(3.0 cm×35.0 cm)色谱初步分离, 依次用蒸馏水及0.01、0.1、1 mol/L氯化钠溶液洗脱(体积流量5 mL/min), 分步收集各部分洗脱液, 冷冻干燥得到4个黄芪多糖样品, 黄芪多糖I 612.31 mg, 黄芪多糖II 40.82 mg, 黄芪多糖III 19.35 mg, 黄芪多糖IV 24.52 mg。由于黄芪多糖I具有较好的调节细胞迁移的活性, 且分离的量最多, 所以对其进一步分离纯化。取黄芪多糖I样品200 mg, 适量蒸馏水溶解后以0.45 μm微孔滤膜滤过, 采用Sephadex LH-20凝胶柱(3 cm×90 cm)色谱纯化, 蒸馏水(体积流量0.5 mL/min)洗脱, 收集洗脱液, 冷冻干燥得到纯化的黄芪多糖V 125.3 mg。本研究的受试药为黄芪粗多糖、黄芪多糖I、黄芪多糖V。

2.2 细胞培养及迁移测定方法

参考本实验室前期建立的方法^[5-6]。细胞于37℃, 饱和湿度, 95%空气-5% CO₂环境培养箱中培养, 隔天换液1次。待细胞生长至80%~90%时, 消化细胞, 制作单细胞混悬液, 血球计数板计数, 细胞以1×10⁵/mL密度接种于6孔板, 每孔加入培养液2.5 mL。以红色标记笔在六孔板各孔底部水平方向划3条标记线。细胞接种于六孔板36 h后, 吸弃培养液, 采用1 mL移液枪头(tips)在6孔板各孔中央沿直径方向(移液枪头与水平面成45°)轻轻划一条痕, PBS清洗细胞表面以去除细胞残骸。立即加入含受试药的培养液, 8 h后于划痕和标记线的交叉部位进行拍照记录。NIH Image软件测量划痕面积, 计算细胞迁移率。

$$\text{细胞迁移率} = (S_0 - S_8) / S_0$$

S₀为0 h划痕面积, S₈为培养8 h后划痕面积

2.3 HPLC法检测细胞内多胺水平^[2]

给予受试药(黄芪多糖V)培养24 h后, 吸弃各孔培养液, 消化细胞, 转移细胞悬液至1.5 mL EP管, 3 000 r/min离心5 min, 重复2次。往细胞沉淀加入1.2 mL 5%冷高氯酸, 吹打混匀, 于4℃、14 000 r/min离心10 min, 保留上清液用于衍生化处理。取上清液1.0 mL, 加入1 mL 2 mol/L的NaOH

溶液和5 μL苯甲酰氯, 涡旋混匀, 静置20 min; 加入2 mL饱和氯化钠溶液和2 mL氯仿, 涡旋混合1 min, 3 000 r/min离心10 min, 吸取下层有机相并氮气吹干。以0.5 mL色谱甲醇溶解白色固体, 于50℃水浴中放置8 h, 所得溶液加入0.2 mL 2 mol/L NaOH溶液和2 mL氯仿, 涡旋混匀, 3 000 r/min离心10 min, 吸取下层有机相并氮气吹干, 以0.5 mL色谱甲醇溶解白色固体, 0.22 μm有机微孔滤膜滤过, 待测。色谱条件: 色谱柱为依利特Hypersil ODS₂柱, 检测波长234 nm; 柱温25℃; 流动相为55%甲醇-45%水; 体积流量1.0 mL/min; 进样量20 μL。

2.4 流式细胞仪检测[Ca²⁺]_{cyto}水平

取1×10⁵个细胞于流式管, 加PBS使细胞悬液的终体积为0.5 mL。每管加入10 μL 5 μmol/L的Fluo-3/AM溶液, 37℃避光孵育30 min。3 000 r/min离心3 min, 弃上清液, 加入0.5 mL PBS重悬。用CellQuest软件获取和分析数据, 激发波长为488 nm, FSC-SSC作散点图识别IEC-6细胞, FL1-Counts作直方图测定平均荧光强度(MFI)。上机时每个样本获取10 000个IEC-6细胞。

2.5 Western blotting法检测RhoA蛋白表达

RIPA裂解液提取各组细胞总蛋白, BCA法对蛋白进行定量, 运用溴酚蓝指示剂制备SDS-PAGE电泳样品; 电泳结束后, 参照Marker切取RhoA和β-actin分子量所在的凝胶制成“三明治”结构, 200 mA恒流转膜90 min; 将PVDF膜置于含5% BSA的TBST中封闭1 h, TBS洗膜后分别用小鼠来源β-actin一抗和兔来源RhoA一抗于4℃孵育过夜, 以山羊抗小鼠、山羊抗兔HRP标记二抗室温孵育1.5 h, TBS洗膜3次, 加入ECL发光液避光反应5 min, 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。

2.6 统计学处理

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 19.0统计软件对数据进行处理, 组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 黄芪粗多糖对IEC-6细胞迁移的影响

表1结果显示, 50、100、200 mg/L的黄芪粗多糖可使细胞迁移率分别提升至47.29%、48.56%和48.92%, 与对照组(33.26%)相比, 差异均显著($P < 0.01$); 加入多胺合成抑制剂DFMO后, 细胞

表 1 黄芪粗多糖对 IEC-6 细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)
Table 1 Effect of crude polysaccharides of *A. membranaceus* on IEC-6 cell migration ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量	细胞迁移率/%
对照	—	33.26±3.23
腐胺	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	52.13±5.38**
黄芪粗多糖	50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	47.29±4.62**
	100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	48.56±5.12**
	200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	48.92±4.88**
DFMO	2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	18.25±2.08**
DFMO+腐胺	2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ +10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	34.47±4.01###
DFMO+黄芪粗多糖	2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ +50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	32.20±2.93###
	2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ +100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	33.24±2.85###
	2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ +200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	33.98±3.12###

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 DFMO 组比较: ### $P < 0.01$, 下表同
** $P < 0.01$ vs control group; ### $P < 0.01$ vs DFMO group, following tables are same

迁移被显著抑制, 迁移率仅为 18.25%, 与对照组相比差异非常显著 ($P < 0.01$); 给予 DFMO 的同时加入 50、100、200 mg/L 剂量的黄芪粗多糖, 细胞迁移速度明显加快, 迁移率与 DFMO 组相比差异均非常显著 ($P < 0.01$), 以上结果提示黄芪粗多糖可促进 IEC-6 细胞的迁移。

3.2 黄芪多糖 I 对 IEC-6 细胞迁移的影响

表 2 结果显示, 对照组细胞迁移率为 34.12%, 黄芪多糖 I 50、100、200 mg/L 剂量均可明显加速

表 2 黄芪多糖 I 对 IEC-6 细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)
Table 2 Effect of AMP I on IEC-6 cell migration ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量	细胞迁移率/%
对照	—	34.12±3.09
腐胺	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	51.46±5.02**
黄芪多糖 I	50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	49.94±4.88**
	100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	51.46±5.21**
	200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	52.80±6.02**
DFMO	2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	20.37±2.25**
DFMO+腐胺	2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ +10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	35.02±3.93###
DFMO+黄芪多糖 I	2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ +50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	34.77±3.71###
	2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ +100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	36.14±3.80###
	2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ +200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	37.25±3.15###

IEC-6 细胞迁移, 与对照组相比差异均非常显著 ($P < 0.01$)。多胺合成抑制剂 DFMO 使细胞迁移速度明显减慢, 细胞迁移率仅为 20.37%, 与对照组相比差异非常显著 ($P < 0.01$)。50、100、200 mg/L 的黄芪多糖 I 均可逆转 DFMO 所致的细胞迁移抑制作用, 使迁移率分别提升至 34.77%、36.14%、37.25%, 与 DFMO 组比较差异均非常显著 ($P < 0.01$)。以上结果提示, 黄芪多糖 I 具有促进 IEC-6 细胞迁移的作用, 并且其效果略强于黄芪粗多糖。

3.3 黄芪多糖 V 对 IEC-6 细胞迁移的影响

图 1 和表 3 结果显示, 在正常情况(未加 DFMO)

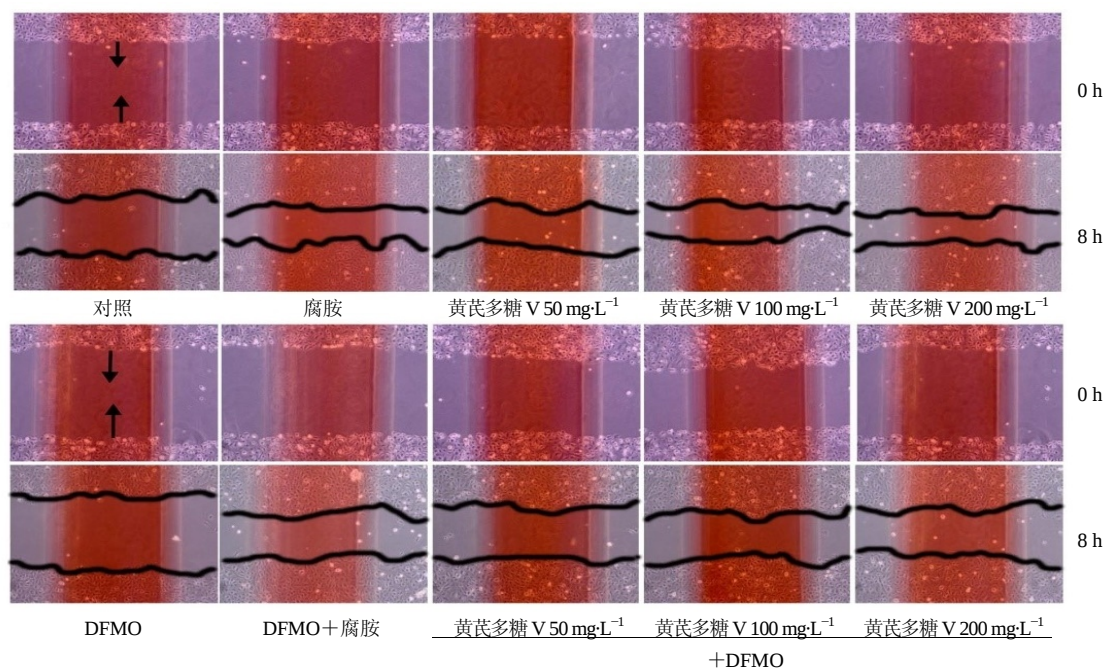


图 1 黄芪多糖 V 对 IEC-6 细胞迁移的影响

Fig. 1 Effect of AMP V on IEC-6 cell migration

表3 黄芪多糖 V 对 IEC-6 细胞迁移、多胺水平及 $[Ca^{2+}]_{cyto}$ 的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 Effect of AMP V on IEC-6 cell migration, intracellular polyamines content, and cytosolic free Ca^{2+} concentration ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	细胞迁移率/% ($n=9$)	多胺/nmol ($n=6, 1 \times 10^6$ 细胞)	MFI ($n=6$)
对照	—	33.08 ± 2.32	65.15 ± 3.44	120.83 ± 8.05
腐胺	$10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$50.28 \pm 4.86^{**}$	$106.92 \pm 3.64^{**}$	$196.56 \pm 12.34^{**}$
黄芪多糖 V	$50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$53.16 \pm 4.96^{**}$	67.02 ± 3.73	$194.49 \pm 9.09^{**}$
	$100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$55.48 \pm 5.22^{**}$	$91.63 \pm 3.90^{**}$	$206.75 \pm 12.68^{**}$
	$200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$56.02 \pm 6.01^{**}$	$111.76 \pm 5.89^{**}$	$224.18 \pm 16.32^{**}$
DFMO	$2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$19.78 \pm 2.13^{**}$	$32.28 \pm 1.92^{**}$	$35.32 \pm 4.19^{**}$
DFMO+腐胺	$2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} + 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$34.31 \pm 3.36^{##}$	$70.01 \pm 4.03^{##}$	$118.95 \pm 8.24^{##}$
DFMO+黄芪多糖 V	$2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} + 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$37.07 \pm 3.25^{##}$	30.67 ± 1.96	$116.84 \pm 9.43^{##}$
	$2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} + 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$38.12 \pm 3.90^{##}$	$55.24 \pm 2.67^{##}$	$119.09 \pm 7.90^{##}$
	$2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} + 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$39.07 \pm 2.92^{##}$	$66.48 \pm 3.43^{##}$	$124.75 \pm 8.26^{##}$

或细胞内多胺耗竭(加 DFMO)情况下,黄芪多糖 V 均可明显促进 IEC-6 细胞迁移。对照组细胞迁移率为 33.08%, 50、100、200 mg/L 的黄芪多糖 V 可使细胞迁移率分别提高至 53.16%、55.48% 和 56.02%, 与对照组相比差异均非常显著 ($P < 0.01$); 多胺合成抑制剂 DFMO 使细胞迁移率降至 19.78%, 50、100、200 mg/L 黄芪多糖 V 均可逆转 DFMO 诱导的细胞迁移抑制作用, 细胞迁移率分别提高至 37.07%、38.12% 和 39.07%, 与 DFMO 组相比差异均非常显著 ($P < 0.01$)。以上结果提示, 黄芪多糖 V 可促进 IEC-6 细胞迁移, 且其效果略强于黄芪粗多糖和黄芪多糖 I。

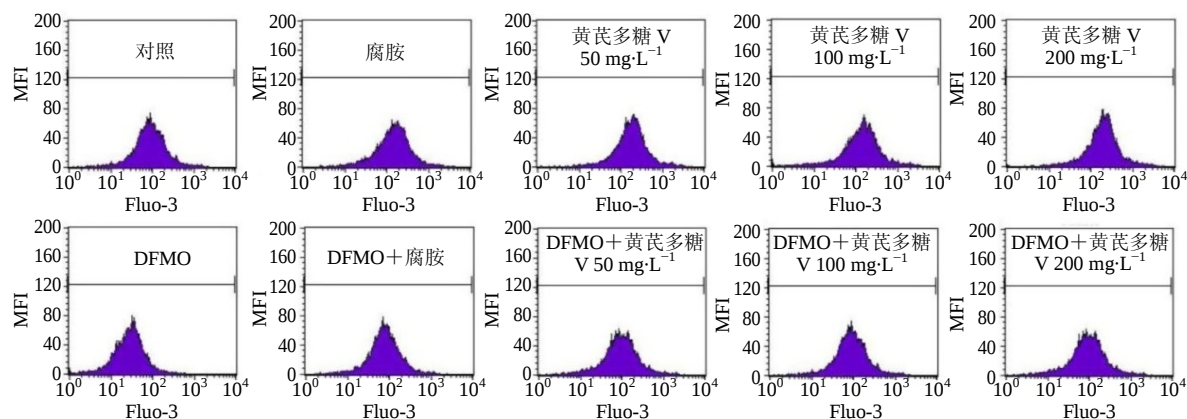
3.4 黄芪多糖 V 对 IEC-6 细胞迁移过程多胺水平的影响

表 3 结果显示, 100、200 mg/L 的黄芪多糖 V 明显提高了细胞内多胺的量, 与对照组比较差异均非常显著 ($P < 0.01$); 多胺合成抑制剂 DFMO 显著

降低了细胞内多胺水平, 与对照组比较差异非常显著 ($P < 0.01$); 给予 DFMO 的同时加入 100 mg/L 或 200 mg/L 的黄芪多糖 V 可逆转 DFMO 所致的细胞内多胺水平下降效果, 使多胺的量显著增加, 与 DFMO 组比较差异非常显著 ($P < 0.01$)。以上结果提示, 黄芪多糖 V 可增加 IEC-6 迁移过程细胞内多胺的量。

3.5 黄芪多糖 V 对 IEC-6 细胞迁移过程 $[Ca^{2+}]_{cyto}$ 的影响

图 2 和表 3 结果显示, 50、100、200 mg/L 的黄芪多糖 V 可使细胞内 Fluo-3 MFI 明显提高, 与对照组比较差异非常显著 ($P < 0.01$); 多胺合成抑制剂 DFMO 使 MFI 显著降低, 与对照组比较差异非常显著 ($P < 0.01$); 黄芪多糖 V 50、100、200 mg/L 均可逆转 DFMO 所致的 MFI 降低作用, 使 MFI 显著增加, 与 DFMO 组比较差异均非常显著 ($P < 0.01$)。以上结果提示, 黄芪多糖 V 可提高 IEC-6 细胞迁移过程中 $[Ca^{2+}]_{cyto}$ 水平。

图2 黄芪多糖 V 对 IEC-6 细胞迁移过程 $[Ca^{2+}]_{cyto}$ 的影响Fig. 2 Effect of AMP V on $[Ca^{2+}]_{cyto}$ concentration

3.6 黄芪多糖 V 对 IEC-6 细胞迁移过程 RhoA 蛋白表达的影响

图 3 结果表明,与对照组比较,100、200 mg/L 黄芪多糖 V 可明显提高 RhoA 蛋白表达($P < 0.01$); DFMO 使 RhoA 蛋白表达明显减少($P < 0.01$); 100、200 mg/L 黄芪多糖 V 可逆转 DFMO 所致的 RhoA 蛋白表达抑制作用,使 RhoA 表达上调并接近正常水平,与 DFMO 组比较差异均非常显著($P < 0.01$)。

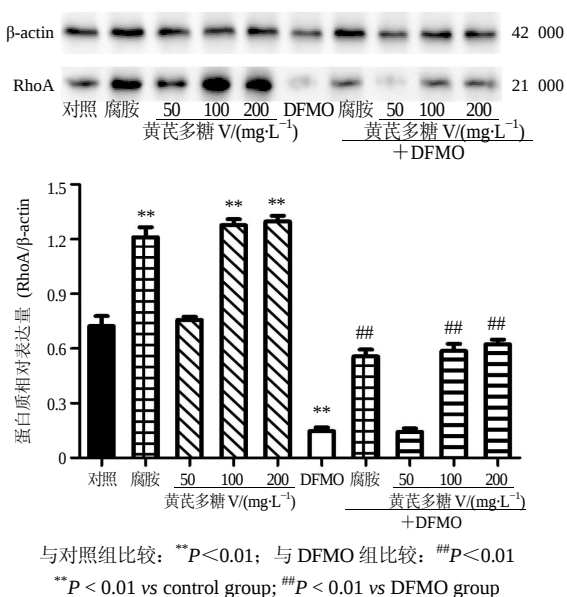


图 3 黄芪多糖 V 对 IEC-6 细胞迁移过程 RhoA 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effect of AMP V on RhoA protein expression ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

人体的胃肠黏膜是机体免疫系统的一道重要屏障,可阻止毒性物质和免疫原性成分侵袭,胃肠黏膜屏障功能的维系很大程度上依赖于胃肠黏膜结构的完整性。流行病学资料显示,由肿瘤治疗所导致的胃肠黏膜损伤发生率高达 100%,服用 NSAIDs 的患者胃肠黏膜损伤发生率达 60%^[7]。胃肠黏膜损伤可引起消化不良症状如上腹部不适、恶心、呕吐、嗝气、食欲减退等,甚至出现溃疡、出血、穿孔、幽门梗阻等症状,严重影响到患者的日常生活,使临床多数患者不得不停止原有药物的治疗,从而加重原发疾病,因此制定系统性防治措施已经成了胃肠黏膜保护领域的一个重要课题。近年来,对胃肠黏膜保护作用的相关研究显示,中药可通过不同的有效成分和多种机制对胃肠黏膜损伤进行修复。有学者提出中医脾气虚证与胃肠黏膜损

伤在病因和发病机制方面存在相关性,益气健脾是治疗胃肠黏膜损伤相关疾病的基本治法^[4,8]。

黄芪为临床常用的益气健脾中药,性味甘、微苦、微温,归心、肺、脾经,具有大补元气、补脾益肺、生津止渴、安神益智的功效。多糖是自然界含量丰富的天然大分子物质之一,多糖及其复合物(如糖蛋白、脂多糖)广泛存在于高等动、植物的细胞膜和微生物的细胞壁中,在人类生命活动中发挥着至关重要的作用。近年来,糖生物学、糖医药学和糖化学的研究逐渐成为生命医学领域的热点^[9]。文献报道黄芪多糖具有免疫调节、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤、抗病毒、抗衰老、降血糖等作用^[10-11]。本研究发现,黄芪多糖还可促进胃肠黏膜上皮细胞迁移,提示其加速胃肠黏膜损伤修复、保护胃肠黏膜屏障的作用。

为了能从黄芪饮片中尽可能多地分离多糖,课题组采用 95%乙醇对黄芪饮片进行超声提取,醇沉法去除苷类、挥发油等极性小的化合物,再用 Sevage 试剂除蛋白,得到黄芪粗多糖。随后的药效实验表明黄芪粗多糖具有明显的促进 IEC-6 细胞迁移的效果。因此,课题组采用 DEAE 纤维素阴离子柱进一步分离纯化黄芪粗多糖。DEAE 纤维素法可吸附粗多糖中的离子型物质和小分子物质,如蛋白质、无机盐、色素、单糖和寡糖等,而大部分的多糖则可顺利流出。此外,DEAE 较小的直径同时也起到了分子筛的作用,最终达到去粗取精、分离纯化的目的。通过 DEAE 纤维素法总共得到 4 个黄芪多糖,其中经水洗脱的黄芪多糖 I 的量最高,并且具有较好的促进 IEC-6 细胞迁移的效果,而黄芪多糖 II、III、IV 的量均比较低,并且仅表现出微弱的促进 IEC-6 细胞迁移的作用。为了能从除杂后的混合多糖里获得均一的多糖,课题组采用 Sephadex LH-20 凝胶柱对黄芪多糖 I 色谱分离纯化,得到黄芪多糖 V,并发现黄芪多糖 V 可明显促进 IEC-6 细胞迁移,其活性略强于黄芪粗多糖和黄芪多糖 I。

多胺是一类带正电荷的烷基胺类小分子,普遍存在于哺乳动物细胞,机体多胺可通过离子键与 DNA、蛋白质、磷脂等带负电荷的生物大分子结合,在细胞迁移、增殖、分化等生命活动中发挥着重要作用^[2]。本研究结果表明,黄芪多糖 V 可明显提高细胞内总的多胺的量。钙离子是细胞内多胺下游重要的第二信使,在细胞迁移、增殖等活动中具有关键的枢纽作用^[12]。细胞内钙离子的量的增加主要来

源于细胞外钙离子内流和细胞内钙库的释放。在 IEC-6 细胞, Ca^{2+} 内流途径包括 Ca^{2+} 被动渗漏、储存操纵性钙通道 (SOC)、受体操纵性钙通道 (ROC), 瞬时受体电位阳离子通道 (TRPC) 是构成 IEC-6 细胞膜 SOC 和 ROC 的分子基础, 调控细胞外钙离子内流; 磷脂酶 $\text{C}\gamma$ -1 (PLC- γ 1) 可催化二酰甘油 (DAG) 和三磷酸肌醇 (IP_3) 的产生, IP_3 是细胞内 Ca^{2+} 动员的使者, 可促进细胞内质网和肌浆网释放 Ca^{2+} , 同时还可通过细胞膜钙离子渗透通道激活 Ca^{2+} 内流^[2-3]。本研究结果显示, 低、中、高剂量的黄芪多糖 V 均能提高细胞迁移过程总的钙离子含量 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$), 但到底是上调 TRPC 蛋白表达促进 Ca^{2+} 内流, 抑或激活 PLC- γ 1 促进细胞内钙库释放 Ca^{2+} 有待进一步研究。

细胞迁移是依赖于细胞骨架动态组装及空间位置改变的复杂过程。细胞骨架为存在于胞浆中的纤维状网架结构体系, 具有支撑和维持细胞形态及细胞运动的功能。Rho 鸟苷三磷酸酶 (Rho GTPases) 通过改变细胞骨架结构, 在调节细胞迁移过程中具有重要作用^[13]。研究表明, RhoA 是位于多胺及 Ca^{2+} 下游的信号分子, 细胞内多胺量的增加可提高 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ 量, 从而提高 RhoA 蛋白表达, 增加细胞骨架中应力纤维水平, 进而刺激细胞迁移^[14]。本研究结果表明, 100、200 mg/L 黄芪多糖 V 可上调 RhoA 蛋白表达, 并且可逆转 DFMO 所致的 RhoA 蛋白表达抑制效果。以上结果提示, 黄芪多糖促进 IEC-6 迁移可能与增加细胞内多胺的量, 从而提高 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$, 进而上调 RhoA 蛋白表达有关。本研究考察黄芪多糖对黏膜损伤修复早期细胞迁移的作用效果及机制, 为阐述益气健脾中药黄芪治疗脾胃病的科学内涵提供实验依据, 同时为从中医药角度寻求和开发胃肠黏膜保护剂提供一定的理论基础。

参考文献

- [1] Kemmerly T, Kaunitz J D. Gastroduodenal mucosal defense [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2013, 29(6): 642-649.
- [2] Song H P, Li R L, 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.
- [3] Rao J N, Rathor N, Zhuang R, et al. Polyamines regulate intestinal epithelial restitution through TRPC1-mediated Ca^{2+} signaling by differentially modulating STIM1 and STIM2 [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012, 303(3): 308-317.
- [4] 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.
- [5] 宋厚盼, 谢梦洲, 胡志希, 等. 白术、黄芪、党参促进 IEC-6 细胞损伤后的快速修复 [J]. *中成药*, 2015, 37(6): 1170-1175.
- [6] 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.
- [7] Fong S Y, Efferth T H, Zuo Z. Modulation of the pharmacokinetics, therapeutic and adverse effects of NSAIDs by Chinese herbal medicines [J]. *Exp Opin Drug Metab Toxicol*, 2014, 10(12): 1711-1739.
- [8] Song H P, Li R L, Zhou C, et al. *Atractylodes macrocephala* Koidz. stimulates intestinal epithelial cell migration through a polyamine dependent mechanism [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 159(1): 23-35.
- [9] 谢明勇, 聂少平. 天然产物活性多糖结构与功能研究进展 [J]. *中国食品学报*, 2010, 10(2): 1-11.
- [10] 韩镭徽, 王洪新, 唐富天, 等. 黄芪多糖对异丙肾上腺素诱导的心肌肥厚大鼠内皮功能的影响 [J]. *中草药*, 2015, 46(24): 3722-3726.
- [11] 张 莹, 贾英杰, 李小江, 等. 注射用黄芪多糖对耐顺铂人肺腺癌细胞 A549/DDP 耐药逆转作用研究 [J]. *药物评价研究*, 2012, 35(6): 417-419.
- [12] Rao J N, Rathor N, Zou T, et al. STIM1 translocation to the plasma membrane enhances intestinal epithelial restitution by inducing TRPC1-mediated Ca^{2+} signaling after wounding [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 299(3): C579-588.
- [13] 宋厚盼, 陈 珣, 李茹柳. Rho 鸟苷三磷酸酶调节细胞迁移中细胞骨架结构的研究进展 [J]. *广州中医药大学学报*, 2013, 30(2): 275-280.
- [14] Rao J N, Li L, Golovina V A, et al. Ca^{2+} -RhoA signaling pathway required for polyamine-dependent intestinal epithelial cell migration [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 280(4): C993-C1007.