

·药效与毒理学研究·

党参黄酮提取部位对小肠上皮细胞迁移及多胺的影响

李茹柳¹, 曾 丹¹, 温 鹏¹, 陶玉珠¹, 赵世清², 陈炜璇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** 观察党参黄酮提取部位对小肠上皮细胞(IEC-6)迁移及迁移过程细胞内多胺(精胺)含量的影响。**方法** 划痕法复制细胞迁移模型, 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)负荷下, 党参黄酮提取部位对细胞迁移的影响; 柱前衍生-高效液相色谱法检测给予党参黄酮提取部位 12 h 和 24 h 后细胞内精胺的含量。**结果** 党参黄酮提取部位可促进 IEC-6 细胞迁移, 逆转 DFMO 或 4-AP 所致细胞迁移抑制; 党参黄酮提取部位给药 12 h 和 24 h 后可提高细胞内精胺含量。**结论** 党参黄酮提取部位促进细胞迁移的作用与影响多胺调控信号通路有关。

关键词: 党参黄酮; 多胺; 小肠上皮细胞; 细胞迁移

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)05-0523-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.05.001

Effect of *Radix Codonopsis* Flavonoids on Intestinal Endothelial Cells 6 Migration and Polyamines Content

LI Ruliu¹, ZENG Dan¹, WEN Peng¹, TAO Yuzhu¹, ZHAO Shiqing², CHEN Weixuan¹, CHEN Weiwen¹(1. Piwei Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. School of Chinese Herbal Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of *Radix Codonopsis* flavonoids on intestinal endothelial cells 6 (IEC-6) migration and the content of intracellular polyamine(spermidine) during cell migration. **Methods** Cell migration model was established by scratch test, and then was used for investigating the effect of *Radix Codonopsis* flavonoids on cell migration, which was inhibited by difluoromethylornithine(DFMO, an irreversible specific inhibitor of polyamines) and 4-amino pyridine(4-AP, a potassium inhibitor). After coculture with the flavonoids for 12 and 24 hours, the content of intracellular polyamine(spermidine) in IEC-6 was detected by pre-column derivatization high performance liquid chromatography(HPLC) method. **Results** *Radix Codonopsis* flavonoids promoted IEC-6 migration, reversed the cell migration inhibition induced by DFMO or 4-AP. After administration of *Radix Codonopsis* flavonoids for 12 and 24 hours, the the content of intracellular spermidine was increased. **Coclusion** The effect of *Radix Codonopsis* flavonoids on promoting IEC-6 migration may be related to its regulation of polyamine-dependent signaling pathway.

Keywords: *Radix Codonopsis* flavonoids; Polyamines; Intestinal endothelial cells; Cell migration

党参是常用的益气健脾中药, 也是益气健脾著名方剂四君子汤、参苓白术散、补中益气汤等的组成药物。研究^[1]表明, 四君子汤有保护胃肠黏膜, 促进上皮细胞更新和黏膜修复等作用。胃肠黏膜

细胞迁移、增殖、分化是胃肠黏膜损伤修复的重要步骤^[2], 本实验室前期对党参胃肠黏膜损伤修复作用机制研究^[3]发现, 党参有促进小肠上皮细胞(IEC-6)增殖的作用, 党参皂苷和黄酮提取部位有促进 IEC-6

收稿日期: 2013-11-20

作者简介: 李茹柳, 女, 研究员, 研究方向: 益气健脾中药作用机理研究。Email: lrl@gzucm.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金项目(30772753, 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。

细胞迁移的作用^[4], 党参水提液能减轻应激性溃疡大鼠胃黏膜损伤, 减轻病理损害, 提高胃黏膜多胺(精脒)含量; 党参多糖提取物能促进 IEC-6 细胞迁移, 逆转由多胺合成抑制剂二氟甲基鸟氨酸(DFMO)或钾通道抑制剂 4-氨基吡啶(4-AP)所致的细胞迁移抑制, 并提高细胞迁移过程中细胞内多胺含量; 可逆转由 DFMO 所致的多胺含量降低^[5]。本研究观察党参黄酮提取部位(简称党参黄酮)对 IEC-6 细胞迁移及多胺的影响, 为探讨其胃肠黏膜保护的分子机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞株 大鼠小肠隐窝上皮细胞(IEC-6), American Type Culture Collection, 批号: 4988325。

1.2 药物及试剂 党参为桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula*(Franch.) Nannf 的干燥根, 购自广州采芝林药店, 由广州中医药大学中药鉴定教研室童家赞讲师鉴定。高糖 DMEM(批号: 8111307)、胎牛血清(FBS, 批号: 8180833)、青霉素-链霉素(批号: 877195), 美国 Gibco 公司; 精脒(spermidine, SPD, 分子量 124.25, 批号: 10157115)、4-氨基吡啶(4-aminopyridine, 4-AP, 分子量 94.11), 美国 Sigma 公司; 二氟甲基鸟氨酸(α -difluoromethylornithine, DFMO, 分子量 236.7), 美国 Calbiochem 公司, 批号: D00080766; 胰酶(trypsin, 1:250), 美国 Amresco 公司, 批号: 2716B052; 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na), 广州威佳科技科技有限公司, 进口分装。

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。

1.4 党参黄酮制备和含量测定 党参加 8 倍量石油醚回流提取 1 h, 过滤, 药渣挥干溶剂, 加 10 倍量 80%乙醇回流提取 2 次, 每次 1 h, 合并醇提液, 浓缩至 0.5 kg·L⁻¹。取醇提液上 D101 大孔吸附树脂, 先以蒸馏水洗脱至洗脱液加 5 倍 95%乙醇不产生浑浊为止, 再分别以 50%和 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部位。分光光度计法测定党参黄酮含量(以芦丁计)为 41.73%。实验剂量以党参黄酮质量计算。

1.5 细胞迁移模型复制及党参黄酮对 IEC-6 细胞迁

移的影响^[6] 划痕法复制细胞迁移模型, 细胞以含 10% FBS、100 U·mL⁻¹ 青霉素-链霉素的 DMEM 培养液稀释至 4 × 10⁵ mL⁻¹, 每孔 2 mL 接种于 6 孔板中, 5% CO₂, 95% 空气, 饱和湿度下 37℃ 培养 24 h, 然后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; 各组(每组 3 个复孔)迅速加药, 空白对照组加 DMEM 完全培养基, 每孔 2.5 mL; 模型组加入含 DFMO(2.5 mmol·L⁻¹)或 4-AP (40 μmol·L⁻¹) 的完全培养基 2.5 mL; 阳性对照药组加入含终浓度为 5 μmol·L⁻¹ 精脒的完全培养基 2.5 mL (负荷实验同时加入 DFMO 或 4-AP); 受试药组分别加入不同剂量的党参黄酮完全培养基 2.5 mL (负荷实验同时加入 DFMO 2.5 mmol·L⁻¹ 或 4-AP 40 μmol·L⁻¹)。同法培养 24 h 后, 于相差倒置显微镜下放大 100 倍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 6~8 个视野, 每组 3 个复孔视野总数的迁移细胞数的均数和标准差为本组数据。IPP 计数软件(美国 Media Cybernetics 公司, Version 6.0)计算越过划痕的细胞数。

1.6 党参黄酮对细胞迁移过程多胺含量的影响 如 1.5 项下接种细胞, 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, 各组(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)迅速加药, 分组及给药同 1.5 项下, 培养 12 h 或 24 h, 消化细胞, PBS 重悬, 3000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清液后加入 5% 冷高氯酸 1.2 mL, 混匀, 4℃, 14000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液备用。

柱前衍生-高效液相色谱法测定细胞内多胺(精脒)含量^[7]。取上清液 1.0 mL, 分别加入 2 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠溶液 1 mL 和苯甲酰氯 5 μL, 涡旋混合后放置 20 min, 再加入饱和氯化钠溶液 2 mL 和氯仿 2 mL, 涡旋混合 1 min, 3000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 吸取下层 1.5 mL 有机相并用氮气吹干。残渣用 0.5 mL 流动相溶解在带有螺盖的玻璃管中, 分别在 50℃ 下放置 8 h, 所得溶液分别加入 2 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 0.2 mL 及氯仿 2 mL, 涡旋混合 1 min, 3000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 吸取下层 1.5 mL 有机相并用氮气吹干, 残渣用 0.5 mL 流动相溶解。进样前过 0.22 μm 有机微孔滤膜, 按拟定条件进样测定。色谱条件: 检测波长 234 nm; 柱温: 25℃; 流动相: 甲醇: 水 (55:45); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样量: 20 μL。

1.7 统计学处理方法 数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS10.0 统计软件分析, 数据先进行方差齐性检验, 再进行单因素方差分析, 组间比较采用 Dunnett 法。

2 结果

2.1 党参黄酮对细胞迁移的影响 党参黄酮组(50, 100 mg·L⁻¹)和精脬组都可促进 IEC-6 细胞迁移, 与空白对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见图 1 和表 1。

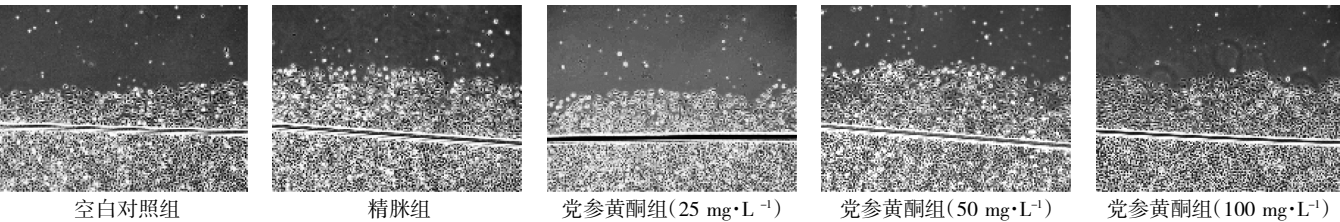


图 1 党参黄酮对细胞迁移的影响
Figure 1 Effect of *Radix Codonopsis* flavonoids extract on IEC-6 cell migration

表 1 党参黄酮对细胞迁移的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Effect of *Radix Codonopsis* flavonoids extract on IEC-6 cell migration

组别	<i>n</i>	剂量 /mg·L ⁻¹	细胞迁移数
空白对照组	18		143.0 ± 53.6
精脬组	18	5 μmol·L ⁻¹	194.9 ± 55.7*
党参黄酮组	22	25	148.5 ± 50.0
党参黄酮组	20	50	197.8 ± 90.4*
党参黄酮组	22	100	269.9 ± 75.5**

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

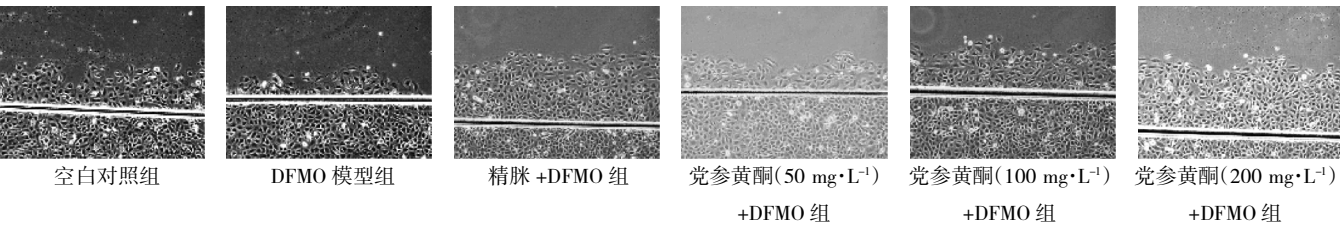


图 2 党参黄酮对 DFMO 负荷下细胞迁移的影响
Figure 2 Effect of *Radix Codonopsis* flavonoids extract on IEC-6 cell migration with DFMD

2.2 党参黄酮对 DFMO 所致细胞迁移抑制的影响 DFMO 模型组细胞出现迁移抑制, 与空白对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$), 党参黄酮组(50, 100, 200 mg·L⁻¹)和精脬组可逆转由 DFMO 所致的细胞迁移抑制, 与 DFMO 模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$), 见图 2 和表 2。

表 2 党参黄酮对 DFMO 负荷下细胞迁移的影响($\bar{x} \pm s$, $n=24$)
Table 2 Effect of *Radix Codonopsis* flavonoids extract on IEC-6 cell migration with DFMO

组别	剂量	迁移细胞数
空白对照组		172.5 ± 113.1
DFMO 模型组	2.5 mmol·L ⁻¹	66.8 ± 51.2**
精脬 +DFMO 组	5 μmol·L ⁻¹ +2.5 mmolL ⁻¹	199.6 ± 63.2 ^{ΔΔ}
党参黄酮 +DFMO 组	50 mg·L ⁻¹ +2.5 mmolL ⁻¹	148.7 ± 60.9 ^{ΔΔ}
党参黄酮 +DFMO 组	100 mg·L ⁻¹ +2.5 mmol·L ⁻¹	169.5 ± 49.6 ^{ΔΔ}
党参黄酮 +DFMO 组	200 mg·L ⁻¹ +2.5 mmol·L ⁻¹	217.4 ± 62.4 ^{ΔΔ}

注: 与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 DFMO 模型组比较, ^{ΔΔ} $P < 0.01$ 。

2.3 党参黄酮对 4-AP 所致细胞迁移抑制的影响 4-AP 模型组细胞出现迁移抑制, 与空白对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$), 党参黄酮组(50, 100, 200 mg·L⁻¹)可逆转由 4-AP 所致的细胞迁移抑制, 与 4-AP 模型组组比较差异有统计学意义($P < 0.01$), 见表 3。

表 3 党参黄酮对 4-AP 负荷下细胞迁移的影响($\bar{x} \pm s$, $n=24$)
Table 3 Effect of *Radix Codonopsis* flavonoids extract on IEC-6 cell migration with 4-AP

组别	剂量	迁移细胞数
空白对照组		384.2 ± 47.7
4-AP 模型组	40 μmol·L ⁻¹	158.2 ± 34.9**
精脬 +4-AP 组	5 μmol·L ⁻¹ +40 μmol·L ⁻¹	429.5 ± 76.8 ^{ΔΔ}
党参黄酮 +4-AP 组	50 mg·L ⁻¹ +40 μmol·L ⁻¹	307.8 ± 33.8 ^{ΔΔ}
党参黄酮 +4-AP 组	100 mg·L ⁻¹ +40 μmol·L ⁻¹	402.0 ± 59.2 ^{ΔΔ}
党参黄酮 +4-AP 组	200 mg·L ⁻¹ +40 μmol·L ⁻¹	532.5 ± 61.0 ^{ΔΔ}

注: 与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 4-AP 模型组比较, ^{ΔΔ} $P < 0.01$ 。

2.4 党参黄酮对细胞迁移过程细胞内多胺(精脒)含量的影响 给药 12 h 和 24 h, 100 mg·L⁻¹ 党参黄酮组可提高细胞迁移过程精脒含量, 与空白对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 4。

表 4 党参黄酮对细胞迁移过程细胞内精脒含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 4 Effect of *Radix Codonopsis* flavonoids extract on the polgamine content(spermidine) during cell migration

组别	剂量 /mg·L ⁻¹	10 ⁶ 个 IEC-6 中精脒的含量 /nmol	
		给药 12 h	给药 24 h
空白对照组		11.6 ± 3.9	3.6 ± 0.5
精脒组	5 μmol·L ⁻¹	43.5 ± 5.8*	8.3 ± 0.8*
党参黄酮组	50	8.6 ± 5.2	15.0 ± 7.9
党参黄酮组	100	23.0 ± 4.9*	16.2 ± 4.2*

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$ 。

3 讨论

党参甘、平, 归脾、肺经, 功能健脾益肺、养血生津, 用于脾肺气虚、食少倦怠、咳嗽虚喘、气血不足、面色萎黄、心悸气短、津伤口渴、内热消渴^[8]。药理研究^[9]发现, 党参有调节血糖, 促进造血机能, 降血压, 抗缺氧, 耐疲劳, 增加免疫力, 抗溃疡等作用。黄酮是党参的主要化学成分, 新疆野生党参总黄酮有抗氧化、抗疲劳的作用^[10], 与党参多糖等的药理研究成果相比^[11], 党参黄酮类的药理研究较少。

研究^[12-13]表明, 党参水提液对无水乙醇、应激性溃疡、幽门结扎所致大鼠胃黏膜损伤有防治作用。本课题组最近研究^[4-5]发现, 党参多糖、党参黄酮可促进 IEC-6 细胞迁移, 可能是党参胃肠黏膜保护作用的有效部位, 其中党参多糖能促进 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多胺含量, 并可逆转由 DFMO 所致的多胺含量降低。本文在上述研究的基础上, 观察党参黄酮提取部位对 IEC-6 细胞迁移及多胺的影响。结果表明, 党参黄酮提取部位可促进细胞迁移, 逆转由多胺合成抑制剂 DFMO 和钾通道抑制剂 4-AP 所致的细胞迁移抑制, 提高细胞迁移过程中细胞内多胺含量; 细胞迁移是胃肠黏膜损伤修复的重要步骤, 而多胺是细胞迁移所必需的, 本研究结果提示益气健脾中药党参可以通过促进胃肠黏膜细胞迁移从而修复胃肠黏膜损伤, 与课题组对甘草黄酮的研究结果相似^[14]。

益气健脾中药黄酮类成分对修复胃肠黏膜损伤有较好药理活性, 如甘草黄酮是较早被研究开发的治疗胃肠病的中药有效成分, 其产品甘酮胃片(由甘草黄酮、叶绿酸铜钠、海螵蛸、普鲁本辛组成)治疗消化性溃疡有较好疗效^[15], 安胃疡胶囊(甘草黄酮制成的纯中药制剂)也取得了国家二类新药批文, 其治疗消化性溃疡及溃疡愈合后的维持也有较好效果^[16]。本研究结果提示, 党参黄酮提取部位能促进细胞迁移, 作用机制可能与其影响多胺介导的钾通道激活信号通路有关, 为进一步阐明党参黄酮提取部位的药理作用及其胃肠黏膜保护机制提供了依据。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Wang JY. Cellular signaling in rapid intestinal epithelial restitution: implication of polyamines and K⁺ channels[J]. Acta Physiologica Sinica, 2003, 55(4): 365-372.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [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] 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.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 264-265.
- [9] 玉洁, 邓长泉, 石磊, 等. 党参的现代研究进展[J]. 中国医药指南, 2011, 9(31): 279-281.
- [10] 汪建红, 原慧, 李雪红. 新疆野生党参总黄酮体内抗氧化及抗疲劳作用的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24: 1035-1039.
- [11] 陈克克, 王喆之. 党参多糖的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(4): 635-637.
- [12] 黄萍, 王建华, 劳绍贤. 党参、蒲公英、川芎及其配伍对大鼠胃黏膜损伤的保护作用[J]. 广州中医学院学报, 1991, 9(1): 41-44.
- [13] 黄玲, 黄萍, 王建华, 等. 党参、川芎、蒲公英及其配伍抗溃疡与抗胃黏膜损伤作用与机制研究 I [J]. 中药药理与临床, 1991, 7(3): 8-10.
- [14] 李茹柳, 陶玉珠, 温鹏, 等. 甘草黄酮对小肠上皮 IEC-6 细胞迁移及多胺的影响[J]. 中草药, 2013, 44(19): 2722-2726.
- [15] 源福游. 甘酮胃片的临床疗效[J]. 广州医药, 1987, (2): 47-48.
- [16] 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.

(编辑: 梁进权)