

白术多糖对小肠上皮细胞屏障及黏附连接蛋白表达的影响

罗蒙, 伍婷婷, 李茹柳, 张东, 朱惠彬, 胡玲, 陈蔚文(广州中医药大学科技创新中心, 广州中医药大学脾胃研究所, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 观察白术多糖对小肠上皮细胞(IEC-6)渗透性的影响, 并从其对黏附连接蛋白表达影响的角度, 探讨白术多糖对肠黏膜上皮屏障的作用及机制。**方法** 在 3 种实验条件下[正常含钙、含钙+多胺合成抑制剂(DFMO)、无钙培养], 以检测 Transwell 小室酚红透过率的方法观察细胞间渗透性; 以 Western Blot 法检测细胞黏附连接蛋白(E-cadherin、 α -catenin 和 β -catenin)的表达。**结果** ①正常含钙培养时, 白术多糖(25、50、100 mg·L⁻¹)能降低细胞间渗透性并提高黏附连接蛋白表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); ②含钙+DFMO 负荷时, 细胞间渗透性增加且黏附连接蛋白表达下降($P < 0.01$); 各剂量的白术多糖能逆转 DFMO 所致的细胞间渗透性增加, 且对黏附连接蛋白表达下降有拮抗作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); ③无钙培养时, 细胞间渗透性增加且黏附连接蛋白表达下降($P < 0.01$), 各剂量的白术多糖可逆转无钙培养所致的细胞间渗透性增加及 E-cadherin 表达降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但对 α -catenin 和 β -catenin 表达无明显影响。**结论** 白术多糖有增强小肠上皮屏障的作用, 其机制与影响黏附连接蛋白表达有关, 研究结果为探讨益气健脾中药白术对胃肠黏膜保护作用提供了参考。

关键词: 白术多糖; IEC-6 细胞; 细胞间渗透性; 上皮屏障; 黏附连接蛋白

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)04-0533-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.04.013

Effect of *Atractylodes macrocephala* Polysaccharides on IEC-6 Cell Barrier and Expression of Adhesion Junction Proteins

LUO Meng, WU Tingting, LI Ruliu, ZHANG Dong, ZHU Huibin, HU Ling, CHEN Weiwen(Piwei Institute, Science and Technology Innovation Center of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To investigate the potential effect of *Atractylodes macrocephala* polysaccharides on the permeability of small intestinal epithelial cells(IEC-6), and to explore the mechanism of *Atractylodes macrocephala* polysaccharides on the intestinal mucosal epithelial barrier from the perspective of adhesion junction proteins expressing. **Methods** Under three experimental conditions(normal Ca²⁺-containing, Ca²⁺-containing+DFMO, and Ca²⁺-free), the transwell cell phenol red permeability was measured to observe the intercellular permeability; Western Blot was used to determine the expression of cell adhesion junction proteins(E-cadherin, α -catenin and β -catenin). **Results** ①When cultured in normal Ca²⁺-containing medium, the results showed that *Atractylodes macrocephala* polysaccharides(25, 50 or 100 mg·L⁻¹) can reduce intercellular permeability and improve the expression of adhesion junction proteins($P < 0.05$ or $P < 0.01$). ②In Ca²⁺-containing+DFMO culture, the intercellular permeability increased and the expression of adhesion junction proteins decreases($P < 0.01$). *Atractylodes macrocephala* polysaccharides could reverse the reduction of adhesion junction proteins expression and reduce intercellular permeability induced by polyamines synthesis inhibitor DFMO($P < 0.05$ or $P < 0.01$). ③In Ca²⁺-free culture, the intercellular permeability increased and the expression of adhesion junction proteins decreased($P <$

收稿日期: 2020-10-15

作者简介: 罗蒙, 女, 硕士研究生, 研究方向: 益气健脾中药的作用机制。Email: 472341756@qq.com。通信作者: 李茹柳, 女, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 益气健脾中药的作用机制。Email: lr@gzucm.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81673940); 广州市科技计划项目(201607010335), 广州中医药大学一流学科重点项目(广中医校办[2020] 62 号)。

0.01). *Atractylodes macrocephala* polysaccharides can reverse the increase of intercellular permeability and decrease of E-cadherin expression caused by Ca^{2+} -free culture ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but it had no obvious effect on the expression of α -catenin and β -catenin. **Conclusion** The results indicate that *Atractylodes macrocephala* polysaccharides can enhance the intestinal epithelial barrier, and the mechanism is related to its influence on the expression of adhesion junction protein. These findings provide reference for the herbs of reinforcing qi strengthen spleen for treating enteropathy characterized by mucosal damage in clinical practice.

Keywords: *Atractylodes macrocephala* polysaccharides; intestinal epithelial cells(IEC-6); intercellular permeability; epithelial barrier; adhesion junction protein

胃肠黏膜损伤是脾虚证的临床常见表现之一^[1-2]。胃肠黏膜通过细胞间的连接及相互作用形成上皮屏障以抵御外来有害物质的侵袭,胃肠黏膜上皮屏障受损是胃肠黏膜损伤的重要表现之一。肠上皮屏障的完整性和有效性依赖细胞间连接(包括紧密连接、黏附连接、缝隙连接和桥粒),而多胺(包括腐胺、精胺和精胍)则通过影响细胞信号而调控细胞连接;紧密连接位于连接复合体的顶端,下方是富含钙黏蛋白(Cadherin)的黏附连接,黏附连接的优先形成对紧密连接的组装有关键的影响;多胺通过影响钙黏蛋白水平而调控连接蛋白复合体的稳定,也影响了细胞间的渗透性^[3]。Cadherin 是依赖 Ca^{2+} 的跨膜蛋白, E-cadherin 位于肠黏膜的黏附连接并与胞内 α 、 β 、 γ 连环蛋白(Catenin)结合,将钙黏蛋白结合至骨架蛋白-肌动蛋白丝,对形成和调控上皮屏障有重要功能,多胺可通过影响 E-cadherin 表达以调控肠上皮屏障^[4]。

益气健脾中药有胃肠黏膜保护作用,以含白术的益气健脾方剂如四君子汤、参苓白术散为例,以健脾粉(四君子汤加黄芪)治疗小肠吸收功能障碍的脾虚患儿,可使脾虚症状基本消失,对木糖吸收率降低也有改善作用^[5]。以参苓白术散加减治疗脾虚型泄泻患儿,发现该方能改善临床症状及免疫功能^[6]。参苓白术散可改善脾虚湿盛型 IBS-D 患者肠黏膜屏障功能^[7]。本课题组研究表明,白术、黄芪、党参、甘草的多糖提取物及四君子汤水提物能防治大鼠应激性溃疡所致的胃黏膜损伤,作用机制与其提高胃黏膜多胺(精胺)水平有关;四君子汤(水提物和多糖)对吡哆美辛所致胃和小肠黏膜损伤有防治作用,可提高模型大鼠胃和小肠黏膜多胺(精胺)含量,提高胃和小肠黏膜紧密连接蛋白(ZO-1、Occludin、Claudin-3)和黏附连接蛋白(E-cadherin、 α -catenin)表达,对肠通透性指标(血浆 D-乳酸)增高和肠黏膜

Ca^{2+} 降低有改善作用;在小肠上皮细胞(IEC-6)的研究表明,白术多糖可通过提高细胞 Ca^{2+} 水平以促进细胞迁移和 E-cadherin 蛋白表达;提示益气健脾中药防治胃肠黏膜损伤的作用与其影响多胺、 Ca^{2+} 和黏膜上皮屏障有关^[8-10]。肠上皮屏障与肠道通透性密切相关,肠上皮屏障功能可用“肠道通透性”的指标来观察^[11-12];因此本研究在本课题组前期工作基础上,观察白术多糖(AMKP)在不同实验条件下[正常含钙培养、含钙+多胺合成抑制剂(DFMO)负荷、无钙培养]对 IEC-6 细胞间渗透性的影响(Transwell 小室酚红透过实验),并从对黏附连接蛋白(E-cadherin、 α -catenin 和 β -catenin)表达影响的角度,探讨益气健脾中药白术胃肠黏膜保护作用机制。

1 材料

1.1 受试药 白术药材购于广州同康药业有限公司,经广州中医药大学中药鉴定教研室童家赞副教授鉴定为菊科植物白术(*Atractylodes macrocephala* Koidz)的干燥根。白术经水提醇沉、去蛋白、DEAE-纤维素层析、Sephadex LH-20 凝胶柱层析得到白术多糖样品。

1.2 细胞株 大鼠小肠隐窝细胞(IEC-6),由 American Type Culture Collection(ATCC)提供,批号:70009131。选择 19~23 代细胞进行实验。

1.3 试剂 胎牛血清(批号:1846382)、青霉素-链霉素双抗(批号:1989511)、DMEM 高糖培养基(批号:8119363)、DMEM 无钙培养基(批号:2188914)、0.25% Trypsin-EDTA(1×,批号:1804456),美国 GIBCO 公司; α -二氟甲基鸟氨酸(DFMO,批号:61505),美国 MCE 公司;PBS(Phosphate Buffered Saline, 1×,批号:AE27749269),美国 HyClone 公司;精胺(SPD,批号:BCBL3389V),美国 Sigma 公司;Anti-E Cadherin antibody(批号:GR260008-3),

Anti- α 1 Catenin antibody (批号: GR99635-10), Anti- β Catenin antibody (批号: GR177612-38), Goat Anti-Mouse IgG H & L(Dylight® 488, preadsorbed, 批号: GR252791-2), 英国 Abcam 公司。

1.4 仪器 3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo scientific 公司); TDZ5-WS 型离心机(湖南湘仪公司); AUW120D 型分析天平(苏州岛津公司); CKX41 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司); Imark 酶标仪、PowerPac Universal™ 电泳仪、ChemiDoc™ XRS+ 成像仪(美国 BioRad 公司); Mili-Q Integral 3 型超纯水系统(美国 Milipore 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 IEC-6 细胞复苏后接种于培养瓶中, 以含 5% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养液、37℃、95% 空气、5% CO₂、饱和湿度培养细胞, 待细胞生长至 90% 左右, 消化细胞以做实验。

2.2 Transwell 法观察细胞间渗透性(酚红透过实验)

参考文献[13]方法并改良, 利用 Transwell 上、下小室的特点, 以酚红溶液(15 mg·L⁻¹)从上室渗透至下室的结果(酶标仪检测)来判断细胞间渗透性。细胞消化后, 以 4×10⁶ mL⁻¹ 接种于 25 cm² 培养瓶, 按实验设计分别以正常含钙培养液、含钙培养液+DFMO 或无钙培养液(培养液中的 Ca²⁺ 以 Mg²⁺ 代替)培养 72 h; 以 EDTA-胰酶消化细胞, 再以 2.5×10⁴ mL⁻¹ 接种于 24 孔中(Transwell 小室的上室)。①受试药对正常含钙培养时细胞渗透性的影响: 正常组上室加含钙培养液 0.2 mL, 下室加含钙培养液 0.6 mL(下同); 受试药组加含终浓度为 25、50、100 mg·L⁻¹ 白术多糖的培养液。②受试药对 DFMO 所致细胞间渗透性增加的影响: 正常组处理同上, 模型组以 DFMO (2.5 mmol·L⁻¹)造模, 受试药组为白术多糖各剂量组+DFMO。③受试药对无钙所致细胞渗透性增加的影响: 正常组处理同上, 模型组无钙培养造模, 受试药组为白术多糖各剂量组+无钙培养。各实验均在培养 72 h 后, PBS 冲洗 2 次, 上室加 0.2 mL 含酚红培养液(不含胎牛血清), 下室加 0.6 mL PBS(不含胎牛血清); 再培养 4 h, 分别取出上室、下室溶液各 200 μ L 加入 96 孔板, 酶标仪于 570 nm 波长处检测 OD 值。

酚红透过率(%)=下室溶液 OD 值/上室溶液 OD 值×100%。

2.3 Western Blot 法检测蛋白表达 细胞培养方法同“2.1”项下, 细胞以 1×10⁶ mL⁻¹ 接种于 6 孔板, 每孔 2.5 mL。培养 24 h 后, 以 1 mL 移液器吸头在孔中划

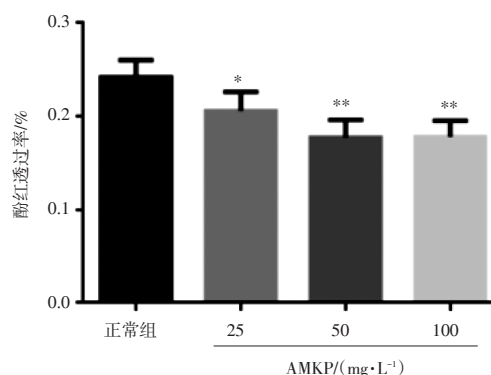
一“十”字, PBS 冲洗 2 次。正常组加入完全培养液 2.5 mL, 阳性对照组加含终浓度 5 μ mol·L⁻¹ SPD 的完全培养液 2.5 mL, 受试药组加完全培养液 2.5 mL 并使白术多糖终浓度为 25、50、100 mg·L⁻¹。DFMO 负荷实验和无钙培养实验加药方法同“2.2”项下。各组细胞培养 24 h 后, RIPA 裂解细胞, 提取细胞总蛋白, BCA 试剂盒测定样品蛋白含量, 绘制标准曲线; 上样, 以浓缩胶 80 V、分离胶 100 V 的电压电泳, 由电转夹子、海绵、滤纸、胶、PVDF 膜制成的“三文治”浸泡于电转液, 200 mA 电流转膜 80 min, 将膜于含 5% 脱脂牛奶的 TBST 封闭 1 h; 参照 Marker 切取黏附连接相关蛋白(E-cadherin、 α -catenin 和 β -catenin)条带, TBST 清洗 3 次, 分别加一抗 E-cadherin(1:1 000)、 α -catenin(1:5 000)、 β -catenin(1:5 000)和 GAPDH(1:10 000), 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次; 加入二抗, 摇床摇动孵育 1 h; 洗膜后加入 ECL 发光液反应 1 min, 凝胶成像系统观察蛋白条带。

2.4 统计学方法 所有统计结果均用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 以 SPSS 21.0 统计软件分析, 先进行方差齐性检验, 再用 Dunnett 法进行组间比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 白术多糖对不同实验条件下细胞间渗透性的影响

3.1.1 对正常含钙培养时细胞间渗透性的影响 见图 1。正常含钙培养时, 白术多糖(25、50、100 mg·L⁻¹)能降低细胞间渗透性, 与正常组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 提示白术多糖有增强细胞屏障的作用。

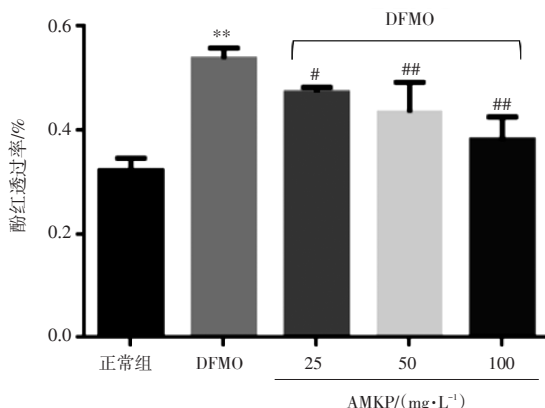


注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 1 白术多糖(AMKP)对正常含钙培养时细胞渗透性的影响 ($n=4$)

Figure 1 The effect of *Atractylodes macrocephala* polysaccharides on cell permeability during normal Ca²⁺-containing culture ($n=4$)

3.1.2 对 DFMO 所致细胞间渗透性增加的影响 见图 2。2.5 mmol·L⁻¹ DFMO 负荷可致细胞间渗透性增加,与正常组比较,差异有统计学意义($P<0.01$);白术多糖(25、50、100 mg·L⁻¹)能抑制 DFMO 所致细胞间渗透性增加,与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),提示白术多糖对 DFMO 负荷下多胺减少所致的细胞屏障功能减弱有改善作用。

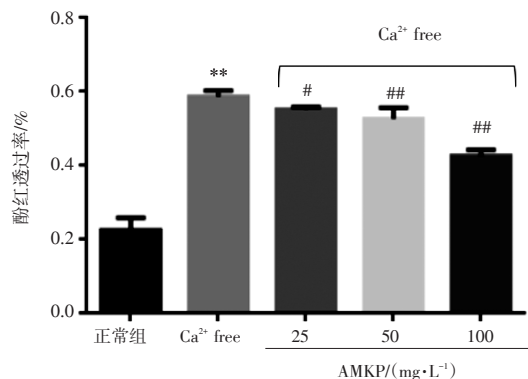


注:与正常组比较, ** $P<0.01$;与 DFMO 模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

图 2 白术多糖(AMKP)对 DFMO 所致细胞间渗透性增加的影响($n=4$)

Figure 2 The effect of *Atractylodes macrocephala* polysaccharides on the increase of intercellular permeability induced by DFMO ($n=4$)

3.1.3 对无钙培养所致细胞间渗透性增加的影响 见图 3。无钙培养可致细胞间渗透性增加,与正常组比较,差异有统计学意义($P<0.01$);白术多糖(25、50、100 mg·L⁻¹)能抑制无钙培养所致细胞间渗透性



注:与含钙正常组比较, ** $P<0.01$;与无钙模型组(Ca²⁺ free)比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

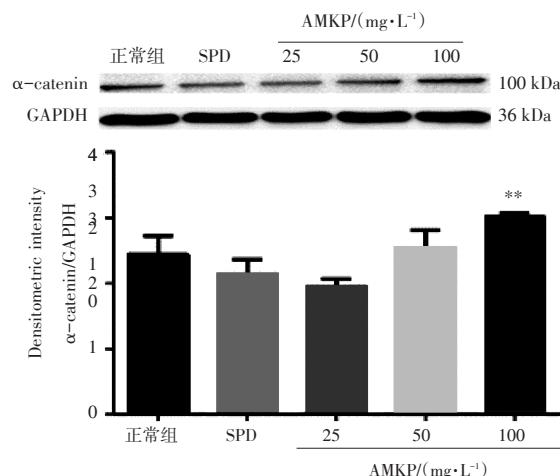
图 3 白术多糖(AMKP)对无钙培养所致细胞间渗透性增加的影响($n=4$)

Figure 3 The effect of *Atractylodes macrocephala* polysaccharides on the increase of intercellular permeability induced by Ca²⁺-free culture($n=4$)

增加,与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),提示白术多糖对缺乏 Ca²⁺所致的细胞屏障功能减弱有改善作用。

3.2 白术多糖(AMKP)对不同实验条件下细胞黏附连接蛋白表达的影响

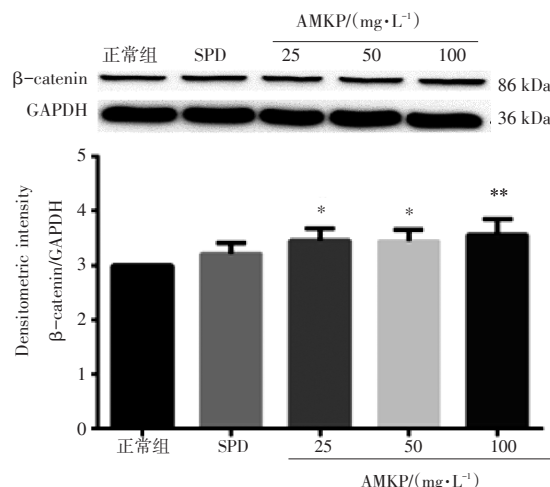
3.2.1 对细胞黏附连接蛋白表达的影响(正常含钙培养) 见图 4 和图 5。加入外源性多胺(SPD 5 μmol·L⁻¹)对正常含钙培养的细胞黏附连接蛋白无明显影响,正常含钙培养时,白术多糖(100 mg·L⁻¹)可提高 α-catenin 蛋白表达($P<0.01$);白术多糖(25, 50,



注:SPD:精脒。与正常组比较, ** $P<0.01$

图 4 白术多糖(AMKP)对 α-catenin 蛋白表达的影响(正常含钙培养, $n=3$)

Figure 4 The effect of *Atractylodes macrocephala* polysaccharides on α-catenin(normal culture, $n=3$)



注:SPD:精脒。与正常组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图 5 白术多糖(AMKP)对 β-catenin 的影响(正常含钙培养, $n=3$)

Figure 5 The effect of *Atractylodes macrocephala* polysaccharides (AMKP) on β-catenin(normal culture, $n=3$)

100 mg·L⁻¹)可提高 β-catenin 蛋白表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。本课题组前期研究^[10]发现正常含钙培养时白术多糖能提高 E-cadherin 表达。表明白术多糖有提高黏附连接蛋白 E-cadherin、α-catenin 和 β-catenin 表达的作用。

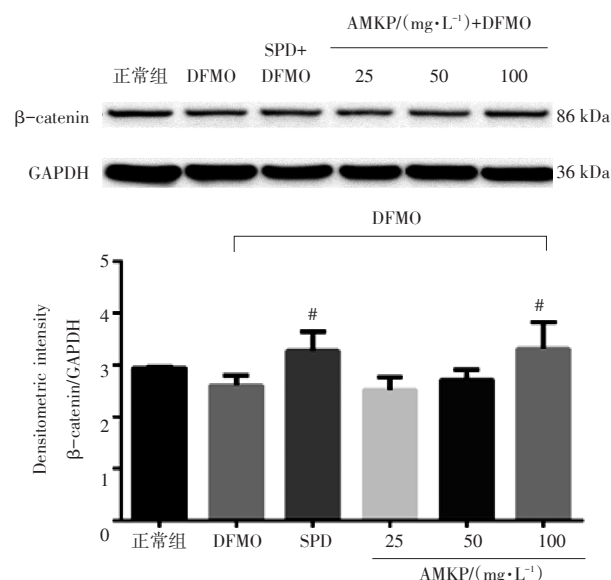
3.2.2 对细胞黏附连接蛋白表达的影响(DFMO 负荷)

见图 6 和图 7。DFMO 负荷可致 α-catenin 蛋白表达下降,与正常组比较,差异有统计学意义($P<0.01$),可致 β-catenin 蛋白轻微下降,但与正常组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。白术多糖(100 mg·L⁻¹)对 DFMO 所致的 α-catenin 和 β-catenin 蛋白表达降低有抑制作用($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。本课题组前期研究^[10]发现,白术多糖能逆转 DFMO 所致的 E-cadherin 蛋白表达降低(与模型组比较, $P<0.05$ 或 $P<0.01$)。综上所述,白术多糖对 DFMO 负荷下多胺减少所致的黏附连接蛋白 E-cadherin、α-catenin 和 β-catenin 表达下降有拮抗作用。

3.2.3 对细胞黏附连接蛋白表达的影响(无钙培养)

见图 8~图 10。无钙培养可致 E-cadherin 和 α-catenin 表达下降($P<0.05$, $P<0.01$),而对 β-catenin 表达无明显影响($P>0.05$);白术多糖(100 mg·L⁻¹)可逆转

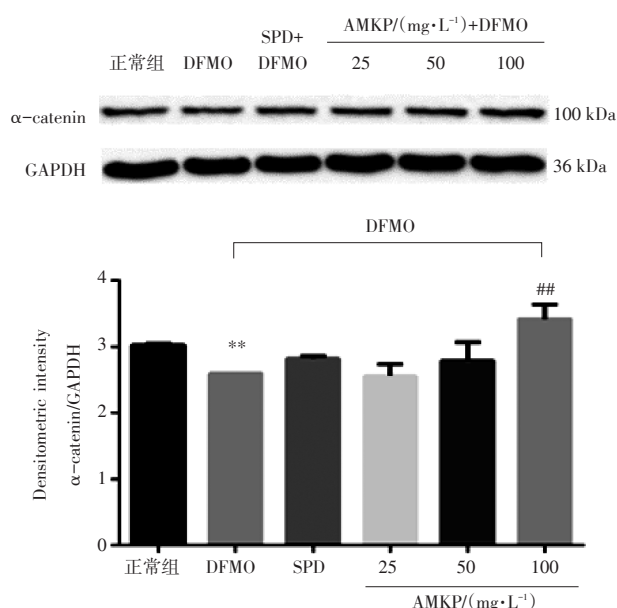
无钙培养所致的 α-catenin 表达降低($P<0.01$),但对 β-catenin 和 E-cadherin 表达无明显影响($P>0.05$)。结果提示在胞外缺乏 Ca²⁺时黏附连接蛋白表达可降低,而白术多糖在此条件下对黏附连接蛋白表达的影响也减弱。



注: SPD: 精脉。与 DFMO 模型组比较, [#] $P<0.05$

图 7 白术多糖(AMKP)对 β-catenin 表达的影响(DFMO 负荷, $n=3$)

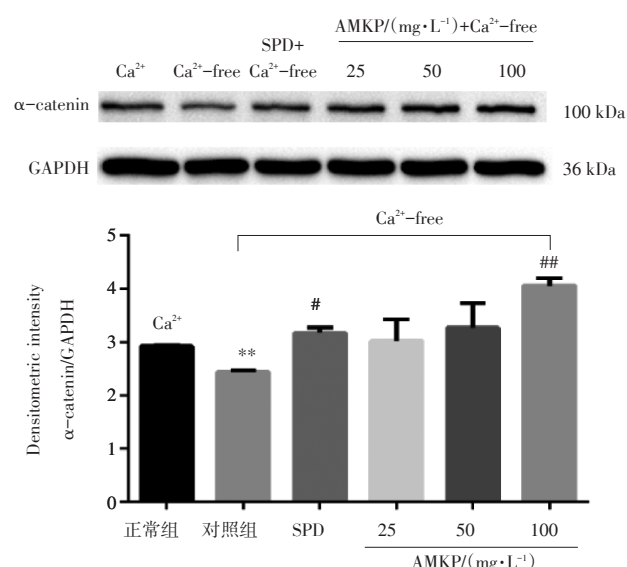
Figure 7 The effect of *Atractylodes macrocephala* polysaccharides (AMKP) on β-catenin(under DFMO load, $n=3$)



注: SPD: 精脉。与正常组比较, ^{**} $P<0.01$; 与 DFMO 模型组比较, ^{##} $P<0.01$

图 6 白术多糖(AMKP)对 α-catenin 表达的影响(DFMO 负荷, $n=3$)

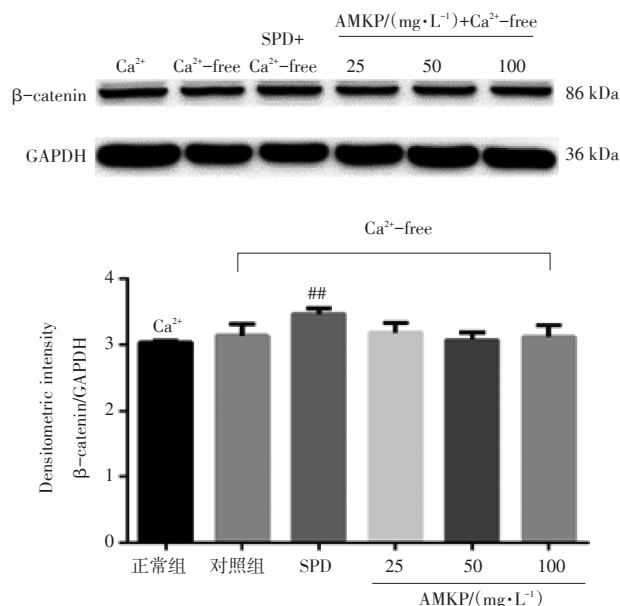
Figure 6 The effect of *Atractylodes macrocephala* polysaccharides (AMKP) on α-catenin(under DFMO load, $n=3$)



注: SPD: 精脉。与正常含钙组比较, ^{**} $P<0.01$; 与无钙(Ca²⁺ free)对照组比较, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$

图 8 白术多糖(AMKP)对 α-catenin 的影响(无钙培养, $n=3$)

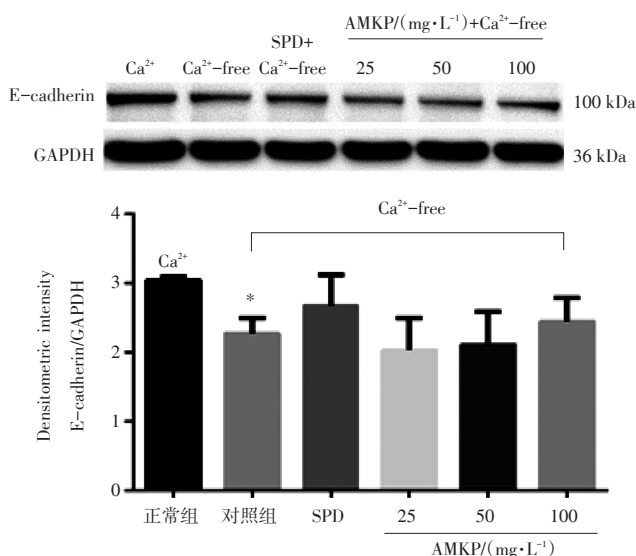
Figure 8 The effect of *Atractylodes macrocephala* polysaccharides (AMKP) on α-catenin(Ca²⁺-free, $n=3$)



注: SPD: 精脉。与无钙(Ca²⁺-free)对照组比较, ^{##}P < 0.01

图9 白术多糖(AMKP)对β-catenin的影响(无钙培养, n=3)

Figure 9 The effect of *Atractylodes macrocephala* polysaccharides (AMKP) on β-catenin (Ca²⁺-free, n=3)



注: 与正常含钙组比较, ^{*}P < 0.05

图10 白术多糖(AMKP)对E-cadherin的影响(无钙培养, n=3)

Figure 10 The effect of *Atractylodes macrocephala* polysaccharides (AMKP) on E-cadherin (Ca²⁺-free, n=3)

4 讨论

白术的化学成分主要由挥发油、多糖、内酯类成分、氨基酸、维生素、微量元素等组成, 其中多糖是其主要有效组分之一^[14]。本研究结合本课题组在动物及细胞水平的研究基础, 所用受试药白术多糖经酸水解、扫描电子显微镜、凝胶渗透色谱-多角度激

光散射联用技术、傅里叶变换红外光谱、核磁共振波谱等初步表征了分子结构, 显示其为线团型均一性多糖组分, 绝对分子量为6 546, 分子结构是由大量果糖单元β(2→1)果糖苷键, 终末端以α(1→2)葡萄糖苷键连接构成的果聚糖, 是药效物质基础较明确的白术多糖样品^[15]。

肠上皮屏障可抵御外来有害物质, 而细胞间的黏附连接是上皮屏障的重要组成部分。提高胞内Ca²⁺能促进黏附连接的聚集, 维持上皮细胞骨架的稳定及功能; E-cadherin是黏附连接的主要部分且受多胺调控, 加入DFMO以耗竭多胺则Ca²⁺降低并致E-cadherin表达降低, 多胺通过调控细胞Ca²⁺而对E-cadherin表达是必需的^[13]。E-cadherin与β-catenin相互作用形成蛋白复合体, 继而参与肌动蛋白细胞骨架的重建, 钙黏蛋白基底部到细胞骨架由β-catenin络氨酸磷酸化调节, 多胺通过调节Ca²⁺而诱导β-catenin络氨酸磷酸化^[16]; α-catenin是构成细胞骨架稳态的关键蛋白且其表达需要多胺, α-catenin是连接E-cadherin、β-catenin复合体到肌动蛋白微丝的媒介, 它与E-cadherin、β-catenin组成Cadherin-Catenin复合体, 让细胞间的黏附蛋白产生机械性的联系并作用于肌动球蛋白细胞骨架而稳定上皮屏障^[13]。

上皮屏障还有选择性渗透的作用, 肠黏膜屏障受损与临床多种病变的发生发展有密切关系, 而胃肠黏膜保护是益气健脾中药的作用之一。细胞间渗透性是上皮屏障功能的重要指标。本研究利用Tanswell装置以酚红溶液从上室到下室的透过率为指标观察白术多糖对细胞间渗透性的影响, 从而反映白术多糖对上皮屏障的药理作用。本实验及前期研究结果^[10]显示: ①正常含钙培养时, 白术多糖能降低细胞间渗透性并提高E-cadherin、α-catenin和β-catenin表达, 提示其增强细胞屏障的作用与提高黏附连接蛋白表达有关; ②含钙培养+DFMO负荷时, 细胞间渗透性增加且E-cadherin和α-catenin表达下降, 提示多胺减少可致上皮屏障功能下降及黏附连接蛋白表达降低, 说明多胺对调控上皮屏障及黏附连接有关键作用, 而白术多糖对DFMO负荷所致的上皮屏障功能减弱有改善作用, 并能提高E-cadherin、α-catenin和β-catenin表达, 表明白术多糖增强上皮屏障的作用与其影响多胺及黏附连接蛋白表达有关; ③无钙培养时, 细胞间渗透性增加且E-cadherin和α-catenin表达下降, 提示胞外缺乏Ca²⁺时对依赖钙

的 E-cadherin 及黏附连接蛋白复合体产生不利影响, 白术多糖可逆转无钙培养所致的 E-cadherin 表达降低, 但对 α -catenin 和 β -catenin 表达无明显影响, 提示在胞外缺乏 Ca^{2+} 时白术多糖对黏附连接蛋白表达的影响也有所减弱。综上结果表明, 白术多糖在不同培养条件下(含钙培养、含钙+DFMO、无钙培养)均对上皮屏障有增强作用, 而白术多糖对黏附连接蛋白表达的作用则与目标蛋白的特点及不同实验条件产生的影响有关。本课题组对白术多糖的另一研究^[17]表明, 白术多糖通过影响多胺介导钾通道激活信号通路而促进 IEC-6 细胞迁移。提示白术多糖可通过影响多胺及其调控机制而起胃肠黏膜保护作用, 此为探讨益气健脾中药白术治疗胃肠病的作用机制提供了参考。

参考文献:

- [1] 许长照, 张瑜瑶, 刘隆棣, 等. 脾虚证患者十二指肠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.
- [2] 尹光耀, 张武宁, 何雪芬, 等. 脾虚证胃粘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, 600.
- [3] LIU L, GUO X, RAO J N, et al. Polyamines regulate E-cadherin transcription through c-Myc modulating intestinal epithelial barrier function[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2009, 296: C801-C810.
- [4] GUO X, JALADANKI N, RAO L L, et al. Regulation of adherens junctions and epithelial paracellular permeability: a novel function for polyamines[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2003, 285: C1174-C1187.
- [5] 危北海. 中医脾胃学说应用研究[M]. 北京: 北京出版社, 1993: 79-99.
- [6] 郭春华, 景玉霞, 张学青. 参苓白术散对小儿脾虚泄泻消化吸收局部免疫功能的影响[J]. 世界中医药, 2018, 13(10): 2503-2506.
- [7] 郑宝乃. 参苓白术散对脾虚湿盛型 IBS-D 患者的疗效观察及对肠屏障功能的影响[D]. 福州: 福建中医药大学, 2020.
- [8] 年立全. 益气健脾中药提取物对大鼠应激性溃疡及多胺影响的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2013.
- [9] 王东旭. 四君子汤通过影响多胺以防治胃肠黏膜损伤的实验研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.
- [10] 伍婷婷, 李茹柳, 曾丹, 等. 白术多糖调控钙离子以促进细胞迁移及 E-钙黏蛋白表达的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(2): 145-150.
- [11] BRANDTZAEG P. The gut as communicator between environment and host: immunological consequences[J]. European Journal of Pharmacology, 2011, 668(S1): S16-S32.
- [12] BISCHOFF S C. 'Gut health': a new objective in medicine[J]. BMC Medicine, 2011, 9: 24.
- [13] GUO X, RAO J N, LIU L, et al. Regulation of adherens junctions and epithelial paracellular permeability: a novel function for polyamines[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2003, 285(5): C1174-C1187.
- [14] 顾思浩, 孔维崧, 张彤, 等. 白术的化学成分与药理作用及复方临床应用进展[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(1): 69-73.
- [15] 王一寓, 刘嘉炜, 司马贞华, 等. 白术多糖调节 IEC-6 细胞迁移活性成分的分离和表征[J]. 高等学校化学学报, 2015, 36(2): 299-305.
- [16] GUO X, RAO J N, LIU L, et al. Polyamines regulate beta-catenin tyrosine phosphorylation via Ca^{2+} during intestinal epithelial cell migration[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2002, 283(3): C722-C734.
- [17] ZENG D, HU C, LI R L, et al. Polysaccharide extracts of Astragalus membranaceus and Atractylodes macrocephala promote intestinal epithelial cell migration by activating the polyamine-mediated K^+ channel[J]. Chin J Nat Med, 2018, 16(9): 674-682.

(编辑: 梁进权)