

• 论著 •

黄芪多糖对内毒素刺激体外培养肠上皮细胞间黏附分子-1 的调节作用

袁媛^{1,3}, 戚拥军², 许玲芬¹, 孙梅¹

(1. 中国医科大学附属盛京医院儿科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 大庆龙南医院儿科, 黑龙江 大庆 163453; 3. 解放军第二一〇一医院儿科, 黑龙江 哈尔滨 150086)

【摘要】 目的 观察黄芪多糖对内毒素脂多糖(LPS)体外刺激小肠上皮 IEC-6 细胞株产生细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的调节作用,探讨黄芪多糖对损伤 IEC-6 细胞的免疫保护机制。方法 以 IEC-6 细胞株为研究对象,将培养的细胞分别加入 50、100、200 和 500 mg/L 不同浓度的黄芪多糖,孵育 1 h,以 10 mg/L 的 LPS 刺激 1~4 h 后,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测 ICAM-1 mRNA 的表达变化。结果 LPS 刺激 IEC-6 细胞后 ICAM-1 mRNA 表达水平较正常对照组显著升高(0.74±0.06 比 1.45±0.07, $P<0.01$);黄芪多糖 100、200 和 500 mg/L 时的 ICAM-1 mRNA 表达量分别为 0.97±0.06、0.82±0.07 和 0.65±0.05;黄芪多糖 500 mg/L 作用 1 h 和 4 h 的 ICAM-1 mRNA 抑制率分别为 32.7%(1.19±0.06 和 0.80±0.10)和 36.3%(0.93±0.07 和 0.72±0.08),说明黄芪多糖呈浓度和时间依赖性抑制了 LPS 诱导 IEC-6 细胞表达 ICAM-1 mRNA 的水平(P 均 <0.01)。结论 黄芪多糖具有抑制 LPS 刺激 IEC-6 细胞分泌 ICAM-1 的作用,对 LPS 所致的肠道损伤具有保护作用。

【关键词】 黄芪多糖; 小肠上皮细胞株; 细胞间黏附分子-1

中图分类号:R285.5;R344.13 文献标识码:A 文章编号:1008-9691(2008)02-0114-03

Effect of Astragalus mongholicus polysaccharides (黄芪多糖) on intercellular adhesion molecule-1 secreted by in vitro intestinal epithelial cell induced by lipopolysaccharide YUAN Yuan^{1,3}, QI Yong-jun², XU Ling-fen¹, SUN Mei¹. 1. Department of Pediatrics, The Shengjing Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning, China; 2. Department of Pediatrics, The Longnan Hospital of Daqing, Daqing 163453, Heilongjiang, China; 3. Department of Pediatrics, The PLA 211th Hospital, Harbin 150086, Heilongjiang, China

【Abstract】 **Objective** To explore the regulatory effect of Astragalus mongholicus polysaccharides (黄芪多糖, APS) on lipopolysaccharide (LPS) -induced intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene expression in small intestinal epithelial cells (IEC-6) in vitro, and to approach the mechanism of immune protective effect of APS on IEC-6 injury. **Methods** The cultured IEC-6 were observed. They were added 50, 100, 200, and 500 mg/L of APS in different cultures respectively for 1 hour, and then were induced by LPS of 10 mg/L for 1 - 4 hours. The expression of ICAM-1 mRNA was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** After IEC-6 were stimulated by LPS, the level of ICAM-1 mRNA was significantly higher than that in the normal control group (0.74±0.06 vs. 1.45±0.07, $P<0.01$). The expressions of ICAM-1 mRNA in the cultures of APS 100, 200 and 500 mg/L were 0.97±0.06, 0.82±0.07 and 0.65±0.05, respectively. The inhibition rate of ICAM-1 mRNA under APS 500 mg/L at 1 hour and 4 hours were 32.7% (1.19±0.06 vs. 0.80±0.10) and 36.3% (0.93±0.07 vs. 0.72±0.08), respectively. Moreover, APS significantly abrogated LPS-induced ICAM-1 at mRNA level in a concentration and time dependent manner (all $P<0.01$). **Conclusion** APS can inhibit LPS-induced production of ICAM-1 mRNA, and has protective effect on the intestinal tract injury from LPS.

【Key words】 Astragalus mongholicus polysaccharides; small intestinal epithelial cell strain; intercellular adhesion molecule-1

黄芪为多年生草本植物,具有活血化瘀、清热解毒等功效,其有效成分有多糖、皂苷类、黄酮或黄酮

类物质等,其不同提取物具有抗氧化、抗炎、扩张血管等作用。研究显示,黄芪甲苷能显著抑制缺氧/复氧引起的血管内皮细胞分泌细胞间黏附分子-1 (ICAM-1),并呈剂量依赖效应^[1]。而黄芪多糖也是

作者简介:袁媛(1973-),女(汉族),黑龙江省人,博士研究生,主治医师,Email:yuan yuan1973@126.com.

重要的一种单体成分,目前的研究证实黄芪多糖具有免疫调理^[2]、刺激造血功能^[3]、神经系统保护^[4]等多种功效,并应用于肿瘤患者的免疫调理治疗及免疫缺陷疾病等诸多领域。本研究中采用体外培养小肠上皮 IEC-6 细胞株,观察黄芪多糖对内毒素脂多糖(LPS)刺激 IEC-6 细胞产生 ICAM-1 的调节作用,探讨黄芪多糖对 LPS 所致 IEC-6 细胞损伤的免疫保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料:IEC-6 细胞株由中国医学科学院肿瘤医院生物检测中心提供;TRIzol、逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒、Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)、胎牛血清购于美国 Gibco 公司;LPS 购自美国 Sigma 公司;黄芪多糖由美国泛美医药公司提供;ICAM-1 上、下游引物由上海生物工程公司设计合成。培养液由质量分数为 90%的 DMEM、体积分数为 10%的胎牛血清、0.01 g/L 胰岛素组成。黄芪多糖溶液由 250 mg 黄芪多糖加 DMEM 50、100、200 和 500 mg/L 稀释而成。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及分组:IEC-6 细胞在 CO₂ 培养箱(37 ℃,体积分数为 5%CO₂)中培养,次日换液,至 80%融合时,用质量分数为 0.25%的胰酶消化传代,5 d 传代 1 次,5 代后细胞用于实验。将培养的细胞分为正常对照组[以磷酸盐缓冲液(PBS)为对照]、LPS 组以及黄芪多糖 50、100、200 和 500 mg/L 组。

1.2.2 RT-PCR 分析:细胞以每孔 4×10^8 /L 的密度接种于培养板内孵育 24 h,然后加入不同剂量黄芪多糖溶液 100 μ l 使其终浓度分别为 50、100、200 和 500 mg/L,孵育 1 h,给予 LPS 继续孵育 1~4 h,收集细胞检测 ICAM-1 mRNA。PCR 条件:95 ℃ 2 min,94 ℃ 1 min,56 ℃ 1 min,72 ℃ 45 s,25 个循环后 72 ℃ 延伸 10 min。ICAM-1 的引物序列:上游引物 5'-AGAAGTGTGGCACCACGCAG-3',下游引物 5'-TCAGAAGCACCTGTGCC-3'。用体积分数为 1.5%的琼脂糖凝胶电泳[1.5 g 琼脂糖+0.5 \times TBE,TBE 由 Tris、乙二胺四乙酸(EDTA)、硼酸组成]至终体积 100 ml,加入溴化乙锭(EB)至终浓度为 0.5 mg/L。以 DL 2000 为 DNA Marker,每孔加样 10 μ l,90 V 电泳 50 min,紫外透射灯下观察结果,用凝胶图像扫描分析系统扫描凝胶得到内参照三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)与目的基因的电泳条带吸光度(A)值,以目的基因/GAPDH 的 A 值比值作为相对定量。

1.3 统计学分析:统计学处理采用 SPSS 软件包,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

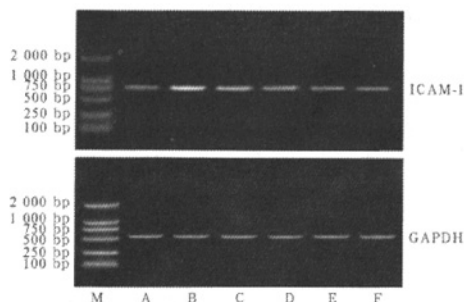
2.1 不同剂量黄芪多糖对 LPS 所致 IEC-6 细胞分泌 ICAM-1 mRNA 的影响(图 1):与正常对照组比较,LPS 刺激 IEC-6 细胞诱导 ICAM-1 mRNA 表达显著增加(0.74 ± 0.06 比 1.45 ± 0.07 , $P < 0.01$);而黄芪多糖可抑制其分泌增加,且有剂量依赖性,50 mg/L 黄芪多糖可抑制 LPS 刺激 IEC-6 细胞产生 ICAM-1 mRNA 水平(1.20 ± 0.05),随黄芪多糖浓度增加(100、200 及 500 mg/L),抑制 ICAM-1 mRNA 表达程度逐渐增加(0.97 ± 0.06 、 0.82 ± 0.07 和 0.65 ± 0.05 , P 均 < 0.01)。

2.2 不同时间黄芪多糖对 LPS 刺激 IEC-6 细胞分泌 ICAM-1 mRNA 表达的抑制作用(图 2):LPS 诱导的 ICAM-1 mRNA 表达能被 500 mg/L 黄芪多糖有效抑制,作用 1 h 和 4 h 的抑制率分别为 32.7% (1.19 ± 0.06 比 0.80 ± 0.10) 和 36.3% (0.93 ± 0.07 比 0.72 ± 0.08)。

3 讨论

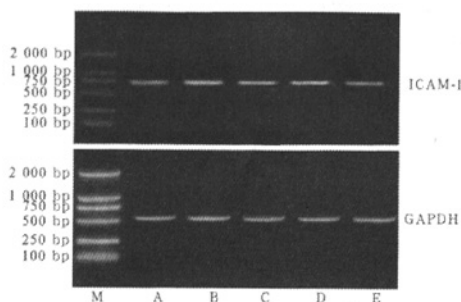
胃肠道的屏障功能受损是胃肠功能障碍发生的病理基础,肠上皮细胞是肠道屏障的重要组成部分,是宿主与病原微生物双向联系的第一道防御^[5-6]。免疫功能低下时,肠道内大量细菌和内毒素侵入体循环及组织中,造成细菌移位和肠源性内毒素血症^[7]。内毒素血症又加剧了肠黏膜屏障功能的破坏,肠道内更多的细菌和毒素侵入血液,激活机体免疫系统,触发“瀑布效应”,使炎症介质如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1(IL-1)、IL-6、IL-8 等大量、失控性产生和释放,并可激活补体系统,引起全身炎症反应综合征(SIRS),启动并加速多器官功能衰竭^[8-10]。说明肠功能障碍在危重病发展过程中起重要作用。阻止胃肠功能障碍的发生有重要意义。

ICAM-1 属免疫球蛋白超家族,是一种具有多种生物功能的跨膜糖蛋白,能介导细胞黏附、趋化、淋巴细胞归巢等,参与炎症和免疫反应,ICAM-1 作为免疫调节因子,通过受配体相互作用,介导白细胞不同亚群间的接触和黏附,调节白细胞的功能活性和免疫反应。中性粒细胞的吞噬作用、T 淋巴细胞的识别抗原及活化、靶细胞的杀伤、T 淋巴细胞对 B 淋巴细胞的激活及诱导分化、抗体形成等过程均与之有关^[11]。ICAM-1 低表达可导致中性粒细胞黏附渗出障碍,有利于减轻炎症反应^[12]。正常肠组织



M:Marker; A~F 依次为正常对照组、LPS 组及黄芪多糖 50、100、200 和 500 mg/L 组

图 1 不同浓度黄芪多糖对 LPS 刺激小肠上皮细胞分泌 ICAM-1 mRNA 的影响



M:Marker; A~E 依次为正常对照组、LPS 1 h 组、黄芪多糖 500 mg/L 1 h 组、LPS 4 h 组、黄芪多糖 500 mg/L 4 h 组

图 2 不同时间黄芪多糖对 LPS 刺激小肠上皮细胞分泌 ICAM-1 mRNA 的影响

ICAM-1 通常低水平表达于血管内皮细胞、肠黏膜固有层和淋巴结中的单核/巨噬细胞。当内毒素损伤肠上皮细胞时, ICAM-1 表达增加, 效应细胞活化及细胞因子分泌增加, 最终导致炎症、组织损伤和纤维化, 并且炎症在循环免疫细胞和各种细胞因子的相互作用下进一步发展。IL-1 β 、TNF- α 可增强黏附分子及其配体在内皮细胞和免疫细胞中的表达。有研究表明, ICAM-1 表达和分布的明显增加, 导致细胞的炎症程度增加^[13]。

黄芪是常用的益气健脾中药之一, 黄芪多糖是黄芪的单体成分。国内对黄芪药理作用的研究较为深入, 涉及免疫、促进胃肠黏膜细胞增殖、分化、移行等作用^[2, 14-15]。国内研究较多的是复方黄芪提取物能够抑制细菌 LPS 诱导大鼠腹腔巨噬细胞释放的 TNF、ILs 及一氧化氮的分泌^[16], 说明黄芪可以通过抑制炎症因子分泌从而减少组织细胞损伤来发挥其对机体的免疫保护作用。研究发现: 黄芪多糖能抑制 LPS 刺激 IEC-6 细胞分泌产生的 ICAM-1 mRNA 表达, 且这种抑制作用随着黄芪多糖的浓度增加及作用时间的延长作用越来越明显。我们前期的研究已证实黄芪多糖对小肠上皮细胞的免疫保护作用是通过抑制细胞因子 TNF- α 、IL-8 等的表达, 从而减少其对组织细胞的炎性损伤。本实验从另一个因子角度证实黄芪多糖发挥肠道免疫保护作用还可能是通过抑制 ICAM-1 表达, 从而削弱白细胞和内皮细胞之间的黏附作用, 减缓损伤的发生发展过程而起到肠道的保护作用。

参考文献

[1] 杨富国, 刘革新, 王力. 黄芪甲苷对缺氧/复氧损伤血管内皮细胞核转录因子- κ B 表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(6): 367-369.

[2] 徐毅, 王守富, 张英, 等. 黄芪注射液对体液免疫功能的影响[J]. 临床医学, 1998, 18(1): 17-18.

[3] 张仲平, 洪介民. 黄芪多糖对体外人骨髓造血祖细胞生成的影响[J]. 中药药理与临床, 2000, 16(1): 16-17.

[4] 刘兵荣, 肖瑾, 丁新生. 黄芪多糖干预实验性脑出血后血肿周围细胞凋亡及核因子 κ B 表达的变化[J]. 中国临床康复, 2006, 10(35): 13-15.

[5] Haller D, Jobin C. Interaction between resident luminal bacteria and the host; can a healthy relationship turn sour[J]? J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2004, 38(2): 123-136.

[6] Rolfe R D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health[J]. J Nutr, 2000, 130(2S Suppl): 396S-402S.

[7] Feigin R D, Cherry J D. Textbook of pediatric infectious diseases [M]. 4th ed. Philadelphia: W B Saunders Co, 1998: 601-602.

[8] 林洪远, 盛志勇. 全身炎症反应和 MODS 认识的变化及现状[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13(11): 643-646.

[9] 葛宏伟, 岳茂兴. 多器官功能障碍综合征与免疫失衡[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13(9): 565-567.

[10] 梅雪, 李春盛, 王烁. 全身炎症反应综合征患者血清细胞因子动态变化的研究[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(2): 85-88.

[11] Gemmell E, Walsh L J, Savage N W, et al. Adhesion molecule expression in chronic inflammatory periodontal disease tissue[J]. J Periodontal Res, 1994, 29(1): 46-53.

[12] 闫萍, 乐进秋, 江汉. 细胞黏附 ICAM-1 慢性牙周炎牙龈组织中白细胞的表达[J]. 广东牙病防治, 2003, 11(1): 18-19.

[13] 杨丰, 方国恩. 细胞黏附分子在多器官功能障碍综合征中的表达变化及意义[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(11): 702-704.

[14] 张子理, 陈蔚文. 黄芪注射液通过激活鸟氨酸脱羧酶促进 IEC-6 细胞分化的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(6): 439-443.

[15] 郑天珍, 李伟, 墨颂义, 等. 黄芪对大鼠离体胃平滑肌条运动的影响[J]. 中药药理与临床, 1999, 15(2): 22-24.

[16] 路景涛, 陈敏珠. 复方黄芪提取物对细菌脂多糖诱导大鼠腹腔巨噬细胞分泌 TNF- α 、NO 及 IL-1 的影响[J]. 安徽医药, 2006, 10(5): 330-331.

(收稿日期: 2007-12-24 修回日期: 2008-02-15)

(本文编辑: 李银平)