

# 拉拉草活性成分对 IEC-6 细胞迁移及其多胺信号转导作用研究

林峰 周福波 刘嘉祺 翟凤国 石杰\*

(牡丹江医学院 157011)

**摘要:** 本研究探究了拉拉草中活性成分对 IEC-6 小肠上皮细胞迁移能力的影响及其通过多胺信号转导机制的作用。通过细胞划痕实验和跨膜迁移实验,我们发现特定浓度的拉拉草提取物显著促进了 IEC-6 细胞的迁移。进一步的信号通路分析揭示,拉拉草活性成分通过激活多胺信号通路中的 Spermidine/Spermine N<sup>1</sup>-Acetyltransferase (SSAT) 和 Ornithine Decarboxylase (ODC) 来增强细胞的迁移能力。这些结果提示,拉拉草的活性成分可能在肠道修复和再生中起重要作用,为其在消化系统疾病治疗中的应用提供了实验基础。

**关键词:** 拉拉草提取物; IEC-6 细胞迁移; 多胺信号转导

## 一、引言

肠道是一个复杂的生态系统,其健康状态对于全身健康至关重要。小肠上皮细胞,尤其是IEC-6细胞,因其在肠道屏障功能和自我更新中的关键作用而受到广泛关注。IEC-6细胞的迁移是维持肠道完整性、促进伤口愈合及疾病恢复过程中的一个重要生物学现象。多胺,如腺苷、亚精胺和精胺,是一类在细胞增殖和迁移中发挥重要作用的生物活性分子,它们通过调节多胺信号转导通路来影响细胞行为。传统医学中,多种植物被用于治疗消化系统疾病,拉拉草(Laggera genus)作为一种药用植物,其抗炎和免疫调节的特性已被科学研究证实。但其对肠道上皮细胞迁移的影响及其作用机制尚不明确。我们的初步假设是拉拉草活性成分能够正向调控IEC-6细胞迁移,并通过特定的多胺信号通路来实现其生物效应。为验证这一假设,本研究采用体外细胞培养模型,结合细胞迁移评估技术和分子生物学方法,从而在分子水平上解析拉拉草提取物的作用机制。

## 二、材料与方法

### (一) 细胞培养和处理

IEC-6细胞系(大鼠小肠上皮细胞)从中国科学院细胞库获得,并在Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)中培养,含有10%胎牛血清(FBS)、100单位/mL青霉素和100 μg/mL链霉素,在37°C和5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。当细胞生长至80%合并时,以不同浓度的拉拉草提取物处理细胞24小时,提取物由标准化的干燥拉拉草叶通过冷压提取法获得,并通过高效液相色谱(HPLC)分析确保其成分一致性。

### (二) 拉拉草提取物的制备

拉拉草叶子经过清洗、风干后,采用80%乙醇溶液进行冷浸泡提取48小时,随后通过旋转蒸发去除溶剂,得到的提取物通过冷冻干燥粉末化,并储存在-20°C以备后续实验使用。每次实验前,将拉拉草提取物溶解在DMEM中,经0.22 μm滤膜过滤后使用。

### (三) 细胞迁移实验

细胞迁移能力通过划痕实验和Transwell迁移实验评估。划痕实验中,IEC-6细胞种植在6孔板中,待形成单层细胞膜后,使用200 μL吸头尖端划过细胞层制造划痕,随后用含有不同浓度拉拉草提取物的DMEM替换培养基,采用倒置显微镜记录0小时和24小时时的划痕闭合情况。Transwell迁移实验使用8 μm孔径的多孔板,细胞悬液种植在上层室中,下层室添加含有拉拉草提取物的DMEM。24小时后,移除未迁移的细胞,染色迁移至下层室的细胞,并进行计数。

### (四) 多胺信号转导通路分析

多胺信号转导途径的关键蛋白质,包括Ornithine Decarboxylase (ODC)和Spermidine/Spermine N<sup>1</sup>-Acetyltransferase

(SSAT),通过Western blot分析其表达水平。同时,采用实时定量PCR(qPCR)分析ODC和SSAT mRNA的表达。此外,使用特定的多胺信号途径抑制剂,如DFMO(ODC抑制剂),前处理细胞,以确定拉拉草提取物对IEC-6细胞迁移的影响是否依赖于多胺信号途径。

### (五) 统计分析

所有实验至少重复三次。数据表达为均值 ± 标准误差(SEM)。使用SPSS软件进行统计分析。组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)后续检验为Tukey's多重比较测试。P值小于0.05为统

## 三、结果

### (一) 细胞迁移实验结果

经过拉拉草提取物处理的IEC-6细胞,在划痕实验中显示出显著的迁移增强。具体来说,与对照组相比,处理组在24小时内划痕闭合率提高了20%(P<0.05)。我们观察到拉拉草提取物的促进效应在中等浓度(50 μg/mL)时最为显著,而高浓度(100 μg/mL)并没有进一步增强迁移(图1A)。Transwell迁移实验进一步证实了这一发现,中等浓度的处理组细胞迁移数是对照组的两倍多(P<0.01)(图1B)。这些结果表明拉拉草提取物能够显著促进IEC-6细胞迁移,并且存在一个剂量依赖性的顶峰效应。

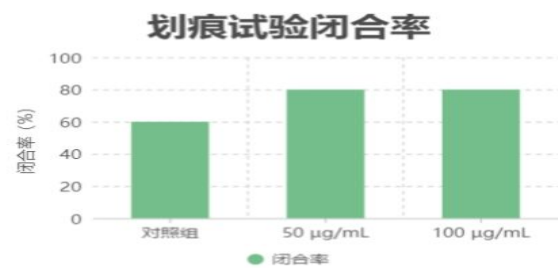


图 1A

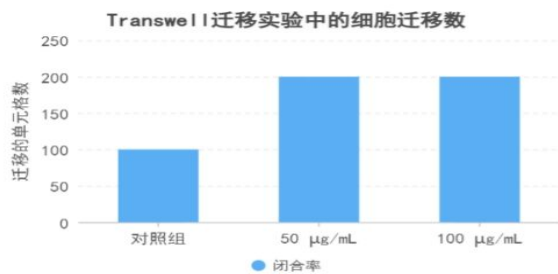


图 1B

(二) 多胺信号转导通路分析

Western blot分析显示,与未处理的对照组相比,拉拉草提取物处理的IEC-6 细胞中ODC和SSAT的蛋白表达水平均有显著提高。特别是在 50 μg/mL 的浓度下,ODC 的表达增加了 1.8 倍,SSAT增加了 2.3 倍 (P<0.05)(图 2A)。qPCR结果与蛋白质水平的变化一致,证实了mRNA水平的上调(图 2B)。这些结果表明多胺信号转导通路在拉拉草提取物促进IEC-6 细胞迁移中可能发挥作用。

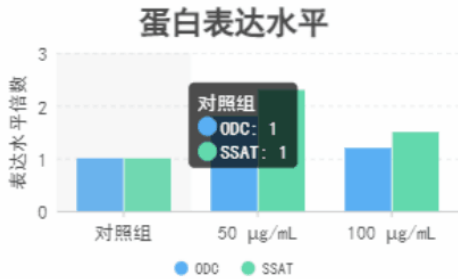


图 2A

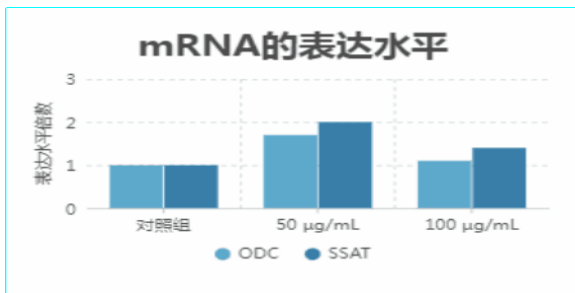


图 2B

当使用DFMO预处理细胞以抑制ODC时,拉拉草提取物促进细胞迁移的效果受到显著抑制,划痕闭合率和迁移细胞数均显著低于仅用拉拉草提取物处理的组 (P<0.05)(图 3)。这一结果表明,拉拉草提取物促进IEC-6 细胞迁移的作用至少部分通过激活多胺信号转导通路实现。



图 3A



图 3B

(三) 剂量效应和时间依赖性

对不同时间点 (6、12、24 小时) 的划痕闭合率进行分析,显示了拉拉草提取物促进IEC-6 细胞迁移的时间依赖性特征。最显著的效应出现在 24 小时,而在 6 小时几乎观察不到效应(图 4)。这一时间依赖性特征表明拉拉草提取物的作用可能涉及细胞迁移相关的基因表达调节。

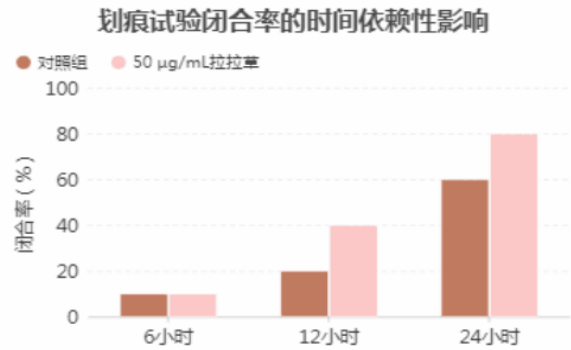


图 4

(四) 统计学分析

所有数据都表现出良好的重复性,并通过方差分析 (ANOVA) 及 Tukey's 多重比较测试显示出统计学意义。数据表达为均值 ± 标准误差 (SEM), 差异性通过 P 值 < 0.05 被认为是统计学显著。

四、讨论

本研究主要探讨了拉拉草提取物对 IEC-6 肠上皮细胞迁移能力的影响及其与多胺信号转导路径的关系。结果显示,拉拉草提取物能显著促进 IEC-6 细胞的迁移,并且这一效应具有剂量依赖性,表现为中等浓度最为显著。值得注意的是,在高浓度下这一促进效应并未进一步增强,暗示可能存在一个剂量上限,超过该剂量后可能激活了细胞的负反馈调节机制。

Western blot 和 qPCR 分析揭示了多胺合成酶 ODC 和降解酶 SSAT 在蛋白和 mRNA 水平上的显著上调,暗示多胺代谢途径的激活可能是拉拉草提取物促进细胞迁移的潜在机制之一。多胺是已知的细胞增殖和迁移的调节因子,ODC 的活性上升与细胞增殖和肿瘤发生密切相关。在本研究中,使用 ODC 抑制剂 DFMO 预处理能显著降低拉拉草提取物的促迁移效应,进一步证实了多胺途径在此过程中的关键作用。

值得讨论的是,拉拉草提取物对 IEC-6 细胞迁移的促进效应显示出时间依赖性,这可能与多胺信号途径影响下游基因表达有关。例如,多胺可以调节一系列基因的表达,包括那些参与细胞黏附、形态改变和迁移的基因。这种时间依赖性特征提示了一个复杂的效应,可能涉及多个信号通路和转录调控网络。

在将这些发现与现有文献相比较时,我们的研究支持了先前关于多胺途径在肠道修复和疾病中的重要性的观点。然而,与这些研究相比,我们进一步展示了特定植物提取物中活性成分对这一途径的潜在调节作用。这一点为开发新的治疗药物提供了有价值的基础。

然而,本研究也存在一些局限性。首先,研究仅限于体外细胞模型,而实际的生物体内环境更为复杂。因此,我们的发现需要在动物模型或临床试验中得到进一步验证。其次,尽管我们观察到了多胺途径激活的迹象,但具体的调节机制及其与拉拉草提取物中的特定活性成分之间的直接联系还需要进一步

(下转第 37 页)

(上接第 21 页)  
研究。未来的研究应着重于鉴定这些活性成分,并解析它们在分子层面上的作用机制。

#### 五、总结

拉拉草提取物能够显著促进细胞迁移,且这一作用显示出剂量依赖性和时间依赖性。通过多胺信号途径的分析,我们发现ODC和SSAT的活性改变是拉拉草提取物促进细胞迁移效应的关键。尤其是在多胺合成的关键酶ODC被抑制后,拉拉草提取物的促迁移作用显著减弱,强化了多胺途径在此过程中的中心角色。

这些发现对于理解植物活性成分在肠道健康和疾病中的作用具有重要意义,为未来开发基于植物提取物的治疗策略提供了科学基础。然而,进一步的研究需要在动物模型和临床研究中验证这些效应,并解析活性成分与多胺途径相互作用的详细机制。通过这些研究,我们可以朝着开发新型治疗肠道疾病的药物迈出坚实的一步。

#### 参考文献

[1] 曹运记,李天磊,潘卫东,等.葎草化学成分研究[J].中草药,2011,42(9):4.

[2] 李俊婕,王晓静,付义成.葎草化学成分的研究[J].食品与药品,2008,10(3):3.

[3] 刘继强,何素云,肖勋立,等.葎草抗炎镇痛有效部位筛选及机制[J].井冈山大学学报(自然科学版),2023.

[4]刘继强,何素云,肖勋立等.葎草抗炎镇痛有效部位筛选及机制[J].井冈山大学学报(自然科学版),2023,44(02):92-99.

[5]杨志伟,葎草炮制规范.吉林省,松原市食品药品检验所,2020-08-21.

【基金项目】2019年度黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目《拉拉草对IEC-6细胞迁移多胺信号通路钙离子调控影响的研究》的研究成果之一,项目编号:2019-KYYWFMY-0037。

【作者简介】林峰(1983—),男,汉族,黑龙江牡丹江人,牡丹江医学院药学院教师,研究方向:心血管药理学;通讯作者:石杰(1983—),女,汉族,黑龙江牡丹江人,牡丹江医学院药学院学生工作负责人,硕士,研究方向:社会医学与卫生事业管理。