

· 药理 ·

溃结灵含药血清对 Caco-2 细胞损伤模型细胞增殖的影响

张涵¹, 王伟明¹, 李燕舞², 巫燕莉², 王汝俊^{2*}

(1. 黑龙江省中医研究院, 哈尔滨 150036; 2. 广州中医药大学脾胃研究所, 广州 510405)

[摘要] 目的: 观察溃结灵含药血清对 Caco-2 细胞损伤模型细胞增殖的影响。方法: 应用三硝基苯磺酸灌肠法复制溃疡性结肠炎大鼠模型, 3 d 后采集血液, 分离血清, 作为损伤剂作用于 Caco-2 细胞一段时间, 模拟细胞炎性损伤模型, MTT 法观察不同浓度溃结灵含药血清对 Caco-2 细胞损伤模型细胞增殖的影响。结果: 与模型血清组比较, 10%、5%、2.5%、1.25%、0.625% 溃结灵含药血清作用 Caco-2 细胞损伤模型 24 h 后, 有促进其增殖的作用, 尤以 10% 溃结灵含药血清效果最佳 ($P < 0.05$)。结论: 溃结灵含药血清可促进 Caco-2 细胞炎性损伤后细胞增殖。

[关键词] 溃结灵; 含药血清; 溃疡性结肠炎; Caco-2 细胞; 损伤模型

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0167-04

[doi] 10.11653/syfy2013150167

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130527.1133.001.html>

[网络出版时间] 2013-05-27 11:33

Effect of Kuijieling Decoction Contained Serum on Cell Proliferation in Caco-2 Cell Injury Model

ZHANG Han¹, WANG Wei-ming¹, LI Yan-wu², WU Yan-li², WANG Ru-jun^{2*}

(1. Heilongjiang Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine (TCM), Haerbin 150036, China;
2. Guangzhou University of TCM, Institute of Spleen and Stomach, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Kuijieling decoction contained serum on cell proliferation in Caco-2 cell injury model. **Method:** Rectal instillation of trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) was used to establish the rats model of ulcerative colitis, 3 days later blood simples were collected and serum was separated, which was used to intervene Caco-2 cells for a period of time to simulate cell inflammatory injury model, the effect of different concentrations of Kuijieling decoction contained serum on cell proliferation was observed by the method of MTT. **Result:** Compared with the model serum group, 10%, 5%, 2.5%, 1.25%, 0.625% of Kuijieling decoction contained serum promoted proliferation, especially 10% of Kuijieling decoction contained serum was best ($P < 0.05$). **Conclusion:** Kuijieling decoction contained serum could promote the proliferation of Caco-2 cells after injury.

[Key words] Kuijieling; drug contained serum; ulcerative colitis; Caco-2; injury model

[收稿日期] 20121217(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30772754)

[第一作者] 张涵, 博士, 助理研究员, 从事中药新药与复方药理研究, Tel: 0451-55653086-6845, E-mail: zhanghan04@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 王汝俊, 硕士, 教授, 从事调理脾胃方药的机制研究, Tel: 86-20-36585078, E-mail: wangrujun888@163.com

中药复方溃结灵由救必应、白术、白芍、水蛭、炙甘草等中药组成, 具有健脾、清热、活血等功效, 是脾胃研究所在多年临床经验基础上总结出的治疗溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 的验方, 临床治疗效果良好^[1]。前期动物实验研究^[2-3]表明, 该方对多种 UC 模型有较好的治疗作用, 其作用机制不但与抗炎作用有关, 还与结肠黏膜的损伤后修复作用

有关。为进一步探讨溃结灵治疗 UC 的作用机制,本文采用血清药理学方法,以 UC 模型大鼠血清作为损伤剂,作用于 Caco-2 细胞一段时间,模拟细胞炎性损伤模型,探讨溃结灵含药血清对该模型细胞增殖的影响,为进一步探讨其作用机制提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠, SPF 级,雌雄各半,体重(180~220)g,由广东省医学实验动物中心提供,合格证号粤监证字 2008A003。

1.2 细胞 Caco-2 细胞,购自中国科学院上海细胞生物学研究所。

1.3 药物 溃结灵(含救必应、水蛭、白术、白芍、炙甘草等中药)浓缩液由广州固志医药科技有限公司制备,批号 080321。每 1 g 浓缩液含 21 g 生药,药物用蒸馏水配成含生药 $1\ 830\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.4 试剂 5% 三硝基苯磺酸(TNBS, Sigma, 批号 P2297), DMEM 培养基(美国 Gibco 公司,批号 1272014),胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号 8112018),噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司,批号 M2128),二甲基亚砜(美国 Sigma 公司,批号 02650)。

1.5 仪器 3110 Series II 水套式二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司),SW-CJ-1F 型洁净工作台(江苏苏净集团有限公司),3k-20z 型高效冷冻离心机(美国 Sigma 公司),TH4-200 型倒置显微镜(日本 Olympus)。

2 方法

2.1 含药血清的制备 45 只 SD 大鼠,随机分为溃结灵组、模型组、空白组。溃结灵组给药剂量为 $18.3\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,给药体积为 $10\ \text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,按体表面积折算法相当于临床等效剂量的 3.2 倍给药,每日 2 次,连续 ig 3 d,末次给药前禁食 12 h,给药后 2 h 无菌条件下腹主动脉取血。模型组造模方法参照文献[1]:空白组 ig 予等容量生理盐水,各组同一时间点取血。血液经 $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,10 min 离心,取上清液,经 $56\ ^\circ\text{C}$,30 min 灭活,于超净台内用 $0.22\ \mu\text{m}$ 针式过滤器过滤分装, $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱贮存备用。

2.2 细胞培养 Caco-2 细胞贴壁生长于含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液中, $37\ ^\circ\text{C}$,5% CO_2 培养箱中孵育,每 2~3 d 更换培养液 1 次,常规传代培养。

2.3 Caco-2 细胞生长曲线 Caco-2 细胞以 $1\times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于 96 孔板中,每孔 $100\ \mu\text{L}$,留 4 孔

不加细胞做空白对照;将培养板移入 CO_2 孵箱中,在 $37\ ^\circ\text{C}$,5% CO_2 培养箱中分别培养 24,48,72,96,120,144,168 h,每孔加入 MTT 溶液($5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) $20\ \mu\text{L}$, $37\ ^\circ\text{C}$ 继续孵育 4 h 后终止培养,小心吸弃孔内培养上清液;每孔加入 $150\ \mu\text{L}$ 二甲基亚砜,室温振荡 10 min,使结晶物充分溶解;在 490 nm 波长,酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度(A),记录结果;以时间为横轴,A 为纵轴绘制细胞生长曲线。

2.4 UC 大鼠模型血清对 Caco-2 细胞增殖的影响 试验分 6 组,分别为正常细胞组、UC 模型血清组(共 5 组)。取对数生长期 Caco-2 细胞常规消化成单细胞悬液,计数后以 $1\times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于 96 孔板,每孔 $100\ \mu\text{L}$,48 h,待细胞完全贴壁,弃去培养液,分别换成含 10% 空白大鼠血清、含 10%,5%,2.5%,1.25%,0.625% UC 大鼠模型血清(各组分别用空白大鼠血清补至终体积分数为 10%)的高糖 DMEM 培养液,每组设 5 个平行孔,继续培养 24 h,每孔加入 $5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MTT 溶液 $20\ \mu\text{L}$,培养箱中继续培养 4 h,弃去培养基,每孔加入 DMSO $150\ \mu\text{L}$,室温振荡 10 min,全自动酶标仪检测 490 nm 波长各孔 A,记录结果。

2.5 溃结灵含药血清对 Caco-2 细胞损伤模型细胞增殖的影响 试验分 7 组,分别为空白对照组、UC 模型血清组、溃结灵含药血清组(5 个组)。取对数生长期 Caco-2 细胞常规消化成单细胞悬液,计数后以 $1\times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种于 96 孔板,每孔 $100\ \mu\text{L}$,48 h 后,待细胞完全贴壁,弃去培养液,UC 模型血清组及溃结灵含药血清组分别给予含 10% UC 大鼠模型血清的高糖 DMEM 培养液,空白对照组给予含 10% 正常大鼠血清的高糖 DMEM 培养液,每组设 5 个平行孔,作用 24 h 后弃去培养液,其中空白对照组及 UC 模型血清组给予含 10% 正常大鼠血清的高糖 DMEM 培养液,溃结灵含药血清组分别给予含 10%,5%,2.5%,1.25%,0.625% 溃结灵含药血清(各组分别用空白大鼠血清补至 10%)的高糖 DMEM 培养液分别培养 24,48,72 h,每孔加入 $5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MTT 溶液 $20\ \mu\text{L}$,按 2.4 方法,全自动酶标仪检测 490 nm 波长各孔 A,记录结果。

2.6 统计学处理 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,使用 SPSS 11.0 统计软件处理,单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 Caco-2 细胞生长曲线 图 1 结果显示,Caco-2 细胞在第 1~6 天呈增殖状态,故在第 1~6 天内进

行增殖等相关研究比较适宜。

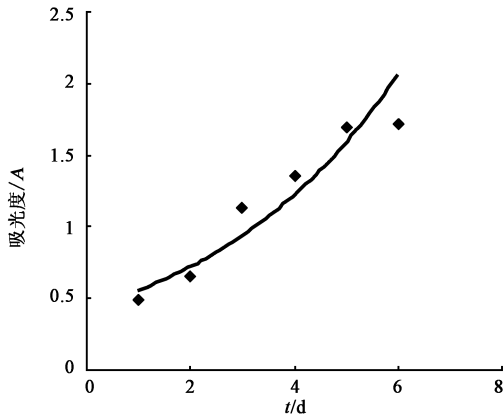


图1 Caco-2 细胞的生长曲线 ($n=5$)

3.2 UC 大鼠模型血清对 Caco-2 细胞增殖的影响

10% ,5% ,2.5% ,1.25% ,0.625% UC 大鼠模型血清作用 Caco-2 细胞 24 h,对 Caco-2 细胞增殖都有一定程度的抑制作用,尤以 10% 的 UC 大鼠模型血清的抑制作用最强 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 UC 大鼠模型血清对 Caco-2 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	血清含量/%	A
正常细胞	10	0.538 ± 0.062
模型血清	10	0.451 ± 0.054 ¹⁾
	5	0.469 ± 0.056
	2.5	0.482 ± 0.042
	1.25	0.492 ± 0.057
	0.625	0.501 ± 0.029

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 溃结灵含药血清对 Caco-2 细胞增殖的影响
与正常细胞组比较,模型组,10% ,5% ,2.5% ,1.25% ,0.625% 溃结灵含药血清组在造模后 24 h 细胞增殖明显受到抑制 ($P < 0.05$),即造模成功;与模型血清组比较,不同体积分数的溃结灵含药血清作用 Caco-2 细胞损伤模型 24 h,有一定促进其增殖的作用,尤以 10% 溃结灵含药血清效果最佳 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 溃结灵含药血清对 Caco-2 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	血清/%	A			
		0 h	24 h	48 h	72 h
正常细胞	10	0.508 ± 0.040	0.615 ± 0.055	0.745 ± 0.086	1.031 ± 0.102
模型血清	10	0.442 ± 0.045 ¹⁾	0.548 ± 0.037	0.672 ± 0.052	0.972 ± 0.074
溃结灵含药血清	10	0.440 ± 0.045 ¹⁾	0.595 ± 0.024 ²⁾	0.719 ± 0.096	1.028 ± 0.101
	5	0.420 ± 0.065 ¹⁾	0.577 ± 0.041	0.704 ± 0.054	1.013 ± 0.125
	2.5	0.446 ± 0.039 ¹⁾	0.576 ± 0.034	0.706 ± 0.103	1.000 ± 0.151
	1.25	0.433 ± 0.050 ¹⁾	0.582 ± 0.057	0.701 ± 0.081	1.027 ± 0.127
	0.625	0.437 ± 0.045 ¹⁾	0.578 ± 0.024	0.708 ± 0.072	1.012 ± 0.107

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

本研究采用了 TNBS 灌肠法复制 UC 大鼠模型,给予 TNBS 灌肠后,血中各种炎症介质如 TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8 等会发生明显变化,与人类 IBD 类似^[6-9]。根据本课题组前期研究结果, TNBS 灌肠大鼠 3 d,结肠损伤处于急性期,血中的各种炎性介质含量可能处于高峰,故采用 TNBS 灌肠 3 d,采集血液,分离血清,作为损伤剂,作用于 Caco-2 细胞一段时间,模拟细胞炎性损伤模型。为了更好的了解细胞在正常状态下的生长、增殖情况,本研究用 MTT 法绘制了 Caco-2 细胞的生长曲线,结果显示:Caco-2 细胞在第 1~6 天呈增殖状态,故在第 1~6 天内进行增殖等相关研究比较适宜。

为了考察不同浓度 UC 模型血清对 Caco-2 细胞

增殖的影响,本研究采用 MTT 法,考察了 10% ,5% ,2.5% ,1.25% ,0.625% UC 模型血清作用 Caco-2 细胞 24 h 对其增殖的影响。实验结果显示:10% UC 模型血清对其增殖的抑制作用有统计学意义,故后续的实验,都采用 10% UC 模型血清作用 Caco-2 细胞 24 h 模拟在体 UC 细胞炎性损伤模型。随后,本实验探讨了不同体积分数溃结灵含药血清作用 UC 细胞炎性损伤模型 24,48,72 h 对其增殖的影响,结果显示:不同体积分数的溃结灵含药血清作用 UC 细胞炎性损伤模型 24 h,对其增殖都有一定的促进作用,尤其以 10% 溃结灵含药血清效果最佳;而在 48,72 h 2 个时间点,促进增殖并无统计学意义。究其原因,可能是作用 24 h 后,模型血清对细胞增殖的影响减弱、药物本身或者其诱导细胞增殖的活

木蹄复方提取物体内抗肿瘤作用研究

何晓义¹,葛卫红¹,刘琮²,沈先荣^{2*},何颖²,蒋定文²,
陈伟²,莫琳芳²,刘玉明²,侯登勇²,王庆蓉²,钱甜甜²
(1. 浙江中医药大学中药体外代谢实验室,杭州 310053;
2. 海军医学研究所防护医学研究室,上海 200433)

[摘要] 目的:考察木蹄复方提取物(ECF)的体内抗肿瘤活性,并探讨部分作用机制。方法:制备 S 180 和 Lewis 肺癌实体瘤小鼠模型,接种次日将 2 种实体瘤模型小鼠均分为模型组,EFC 低、中、高剂量(0.05,0.1,0.15 g·kg⁻¹)组和环磷酰胺(CTX)阳性对照组,分别连续给药 8 和 15 d,观察 ECF 对荷瘤小鼠瘤质量、胸腺指数和脾脏指数、血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)水平的影响。结果:ECF 低、中、高 3 个剂量组对 S 180 荷瘤小鼠肿瘤抑制率分别为 11.8%、47.1% 和 58.8%;对 Lewis 肺癌实体瘤小鼠肿瘤抑制率分别为 7.1%、57.1% 和 28.6%。与模型组比较,ECF 高剂量组能抑制 S₁₈₀ 荷瘤小鼠肿瘤的生长($P < 0.05$),提高胸腺指数($P < 0.05$),降低血清中 M-CSF 水平;中剂量组可抑制 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤的生长($P < 0.05$),提高胸腺指数($P < 0.05$),降低血清中 M-CSF 水平,3 个剂量组均能提高血清中 TNF- α 水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:ECF 对 S 180 荷瘤小鼠和 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤的生长具有明显抑制作用,显示较强的体内抗肿瘤活性,其作用机制可能与提高免疫器官指数以及调节血清中 TNF- α 和 M-CSF 的表达有关。

[关键词] 木蹄复方; 体内; 抗肿瘤; 肿瘤坏死因子- α ; 巨噬细胞集落刺激因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0170-04

[doi] 10.11653/syfj2013150170

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130527.1142.008.html>

[网络出版时间] 2013-05-27 11:42

[收稿日期] 20130104(020)

[基金项目] 全军医学科技“十二五”重大项目(AS11J003)

[第一作者] 何晓义,硕士研究生,从事中药药理与新产品开发研究,Tel:13817429757,E-mail:hy062412@163.com

[通讯作者] * 沈先荣,博士生导师,研究员,从事海洋生物及中药研究,Tel:021-81883171,E-mail:xianrong_sh@yahoo.com

性物质减少所致,具体的原因有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] 常东,刘子志,李健,等. 大肠湿热型溃疡性结肠炎患者防御素和白细胞介素 8 表达及溃结灵的干预作用[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2010, 18(5):294.

[2] 唐立海,纪艳艳,杜群,等. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜 IB、IKK β 蛋白表达的作用[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(1):135.

[3] 李燕舞,黄秋凌,杜群,等. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜 ITF、MUC2、TGF- α 动态变化的影响[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(6):68.

[4] 黄志新,劳绍贤,崔琦珍,等. 溃结灵颗粒治疗活动期溃疡性结肠炎的临床与实验研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2003, 11(3):141.

[5] 黄秋凌,李燕舞,巫燕莉,等. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜超微结构动态变化的影响[J]. 中药药理与临床, 2009, 25(5):86.

[6] 杜群,李红,王建华,等. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜 NF- κ B p65 蛋白表达及血清 TNF- α 含量的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2007, 24(5):396.

[7] 李燕舞,宋宁,杜群,等. 溃结灵对 UC 大鼠结肠黏膜 IL-1 β mRNA 表达的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(6):592.

[8] 吴慧丽,李慧. 白芍总苷对溃疡性结肠炎大鼠细胞因子影响的研究[J]. 中南药学, 2010, 8(2):128.

[9] 周燕红,刘毅飞. 银杏天冬对大鼠实验性溃疡性结肠炎 IFN- γ 、IL-4 的影响[J]. 咸宁学院学报, 2005, 19(3):164.

[责任编辑 聂淑琴]