

DOI:10.16781/j.cn31-2187/R.20210760

· 论 著 ·

黄芪多糖通过影响 Ca^{2+} 调节蛋白及其复合体促进大鼠小肠隐窝上皮细胞迁移

曾 丹, 汪官玉, 李志锦, 伍婷婷, 胡 玲, 李茹柳*

广州中医药大学科技创新中心脾胃研究所, 广州 510405

[摘要] **目的** 观察黄芪多糖对大鼠小肠隐窝上皮 IEC-6 细胞迁移过程中多胺信号通路 Ca^{2+} 调节指标的影响, 并探讨黄芪促进胃肠黏膜损伤修复的作用机制。**方法** 采用划痕法建造细胞迁移模型并观察黄芪多糖在无钙培养时对细胞迁移的影响; 采用 qPCR 法检测经典瞬时受体电位通道 1 (TRPC1)、基质交感分子 (STIM) 1、STIM2 mRNA 表达; 采用免疫荧光法检测 STIM1 蛋白的分布及表达; 采用蛋白质印迹法检测 TRPC1、STIM1 和 STIM2 蛋白表达; 采用免疫沉淀法检测 STIM1/TRPC1、STIM1/STIM2 蛋白复合体的表达。**结果** 无钙培养 (去除胞外 Ca^{2+} 内流来源) 减弱了黄芪多糖促进细胞迁移的作用 ($P < 0.01$)。黄芪多糖能提高 TRPC1 mRNA 和蛋白的表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)、逆转二氟甲基鸟氨酸 (DFMO) 所致的 TRPC1 mRNA 和蛋白表达降低 ($P < 0.01$); 黄芪多糖能促进 STIM1 向胞膜移位并提高其表达水平, 改善 DFMO 所致的 STIM1 向胞膜移位延迟及表达抑制; 黄芪多糖能提高 STIM1 mRNA 和蛋白表达、逆转 DFMO 对 STIM1 mRNA 和蛋白表达的抑制 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 黄芪多糖能降低 STIM2 mRNA 和蛋白表达, 逆转 DFMO 对 STIM2 mRNA 和蛋白表达的提高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。黄芪多糖能提高 STIM1/TRPC1 的表达水平, 逆转 DFMO 对 STIM1/TRPC1 表达的抑制, 还可通过提高复合体中 STIM1 表达水平、降低 STIM2 表达水平调节 STIM1/STIM2 表达, 并能拮抗 DFMO 对 STIM1/STIM2 表达的影响。**结论** 黄芪多糖促进 IEC-6 细胞迁移的作用与其影响 Ca^{2+} 调节蛋白及蛋白复合体表达有关。

[关键词] 黄芪多糖; 肠上皮细胞; 细胞迁移; 多胺; Ca^{2+} 调节

[中图分类号] R 574 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-1338(2023)03-0298-12

Astragalus polysaccharides promoting migration of rat intestinal epithelial cells via Ca^{2+} regulatory proteins and their complexes

ZENG Dan, WANG Guan-yu, LI Zhi-jin, WU Ting-ting, HU Ling, LI Ru-liu*

Pi-wei Institute, Science and Technology Innovation Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong, China

[Abstract] **Objective** To observe the effect of *Astragalus polysaccharides* on the Ca^{2+} regulatory indexes of polyamine signaling pathway during the migration of rat intestinal epithelial cell line IEC-6 cells, so as to explore the mechanism by which *Astragalus membranaceus* promoting the repair of gastrointestinal mucosal injury. **Methods** The cell migration model was established by scratch method and the effect of *Astragalus polysaccharide* on cell migration was observed in calcium-free culture. The expression of transient receptor potential channel 1 (TRPC1), stromal interaction molecule (STIM)1 and STIM2 mRNA was determined by quantitative polymerase chain reaction. The distribution and expression of STIM1 protein were detected by immunofluorescence. The expression of TRPC1, STIM1 and STIM2 was detected by Western blotting. The expression of STIM1/TRPC1 and STIM1/STIM2 complexes was detected by immunoprecipitation. **Results** The promoting effect of *Astragalus polysaccharides* on cell migration was attenuated in calcium-free culture (removing the source of extracellular Ca^{2+} influx) ($P < 0.01$). *Astragalus polysaccharides* had promoting effects on TRPC1 mRNA and protein expression ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and had reversal effects on TRPC1 mRNA and protein expression in difluoromethylornithine (DFMO) treated cells ($P < 0.01$). *Astragalus polysaccharide* promoted the translocation of STIM1 to the plasma membrane and increased STIM1 protein expression, and reversed the translocation of STIM1 to the plasma membrane and the inhibition effect which was found in DFMO-treated cells. *Astragalus polysaccharides* increased

[收稿日期] 2021-03-08 **[接受日期]** 2022-12-04

[基金项目] 国家自然科学基金 (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 ([2020]62号)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81673940), Project of Guangzhou Science and Technology (201607010335), and First-class Discipline Key Project of Guangzhou University of Chinese Medicine ([2020]No.62).

[作者简介] 曾 丹, 博士, 讲师。E-mail: 523235573@qq.com

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 020-36585444, E-mail: lrl@gzucm.edu.cn

the expression of STIM1 mRNA and protein and reversed the inhibition effects on STIM1 mRNA and protein expression induced by DFMO ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In addition, *Astragalus* polysaccharides reduced the expression of STIM2 mRNA and protein and reversed the increased expression of STIM2 mRNA and protein induced by DFMO ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). *Astragalus* polysaccharides increased the expression of STIM1/TRPC1 complex and reversed the inhibition effect of DFMO on STIM1/TRPC1 complex expression, modulated the expression of STIM1/STIM2 by increasing STIM1 expression and reducing STIM2 expression, and antagonized the effect of DFMO on STIM1/STIM2 expression. **Conclusion** The role of *Astragalus* polysaccharides in promoting the migration of IEC-6 cells is related to its effect on the expression of Ca²⁺ regulatory protein and protein complex.

[**Key words**] *Astragalus* polysaccharides; intestinal epithelial cells; cell migration; polyamine; Ca²⁺ regulation

[Acad J Naval Med Univ, 2023, 44(3): 298-309]

中医脾虚证患者可见胃肠黏膜损伤的临床表现^[1-2], 益气健脾是脾虚证的主要治则, 益气健脾方药有胃肠黏膜保护作用。黄芪是常用的益气健脾中药, 含有黄芪的方剂用于治疗胃肠黏膜损伤病变也取得良好疗效, 黄芪建中汤联合西药(奥美拉唑、阿莫西林、克拉霉素、枸橼酸铋钾)治疗脾胃虚寒型胃溃疡, 可促进胃溃疡愈合, 改善消化功能^[3]; 白术黄芪汤加味联合西药柳氮磺胺吡啶治疗溃疡性结肠炎能改善患者临床症状、缓解炎症反应, 且疗效优于单用西药柳氮磺胺吡啶^[4]; 以黄芪+四君子汤为基础方协助治疗克罗恩病能有效缓解及改善患者生活质量, 对活动期有协助缓解作用^[5-6]。这些研究成果为开展黄芪对胃肠黏膜保护机制的研究提供了临床疗效基础。

胃肠黏膜损伤修复包括上皮细胞迁移、增殖、分化、黏膜重建等, 多胺在胃肠黏膜损伤修复中起重要作用^[7]。本课题组前期动物实验结果显示, 黄芪、白术、党参、甘草及四君子汤的水提取物或多糖提取物有防治大鼠应激性胃溃疡的作用, 其机制与其提高胃黏膜多胺含量有关^[8-10]; 四君子汤水提取物和多糖提取物对吡啶美辛所致大鼠胃或小肠黏膜损伤有防治作用, 可提高胃和小肠黏膜多胺水平, 提高胃和小肠黏膜紧密连接和黏附连接蛋白表达, 对肠通透性指标(血浆D-乳酸)增高和黏膜Ca²⁺含量降低有改善作用^[11-12]; 上述结果表明益气健脾中药多糖提取物的胃肠黏膜保护作用与传统剂型水提取物的药效相似, 多糖是其有效组分之一。细胞水平的研究显示, 黄芪、白术、党参、甘草及四君子汤的提取物(多糖或黄酮或皂苷等)可通过作用于多胺及其调控通路促进大鼠小肠隐窝上皮IEC-6细胞的增殖、迁移、分化、细胞连接及上皮屏障完整性, 表明益气健脾中药胃肠黏膜损伤修复作用与其影响多胺及

其调控有关, 其中对Ca²⁺的调节作用是关键环节之一^[13-23]。

本课题组前期研究表明, 黄芪多糖提取物可防治大鼠应激性胃溃疡, 机制与其提高胃黏膜多胺有关^[10]; 黄芪水提取物能防治吡啶美辛所致大鼠小肠黏膜损伤并降低模型动物死亡率^[24]; 黄芪总皂苷能促进IEC-6细胞增殖, 使G₀/G₁期细胞百分比下降而G₂/M+S期细胞百分比上升, 提高多胺调控的细胞增殖调节因子c-Myc、RhoA和细胞周期蛋白依赖性激酶2(cyclin-dependent kinase 2, Cdk2)蛋白表达, 逆转多胺合成抑制剂二氟甲基鸟氨酸(difluoromethylornithine, DFMO)对上述指标的抑制作用^[15,24]。黄芪多糖能促进IEC-6细胞迁移, 提高钾通道蛋白Kv1.1表达, 促进细胞膜电位超极化, 提高细胞Ca²⁺水平, 提高Rho-GTP蛋白(Cdc42、Rac1、RhoA)表达, 逆转DFMO对上述指标的抑制作用^[18]。本研究在此基础上提取分离黄芪多糖, 观察其对钙通道蛋白瞬时受体电位通道1(transient receptor potential channel 1, TRPC1)、Ca²⁺感受器正负向调节蛋白基质交感分子(stromal interaction molecule, STIM)1和STIM2、Ca²⁺调节蛋白复合体STIM1/TRPC1和STIM1/STIM2等的影响, 并研究黄芪多糖促进IEC-6细胞迁移的作用机制, 为探讨黄芪的胃肠黏膜保护作用机制提供参考。

1 材料和方法

1.1 药材

豆科植物蒙古黄芪[*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao]的干燥根(批号201506, 产地为甘肃)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赟副教授鉴定符合《中华人民共和国药典》规定。

1.2 细胞株 IEC-6 细胞(货号 CRL-1592, 批号 58541019), 由美国菌种保藏中心提供, 取 22~28 代细胞用于实验。

1.3 试剂 DMEM 高糖培养基(货号 12800-058)、FBS(货号 10099-141)、青霉素-链霉素双抗(货号 15140-122)、0.25%胰蛋白酶-EDTA(货号 25200-056)购自美国 Gibco 公司; 胰蛋白酶 1:250(货号 T810)、Triton X-100(货号 0694)、Tris(货号 0497)、甘氨酸(货号 0167)购自美国 Amresco 公司; 亚精胺(spermidine, SPD; 货号 C10010500BT)购自美国 HyClone 公司; SPD(货号 124-20-9)购自德国 Sigma 公司; DFMO(货号 288500-25MG)购自德国 Calbiochem 公司; RNA 提取试剂盒(货号 9767)、PrimeScript™ 反转录试剂盒(货号 RR036)、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseHPlus, 货号 RR820A)购自日本 TaKaRa 公司; DEPC 水(货号 RT121)购自天根生化科技(北京)有限公司; 山羊血清封闭液(货号 C-0005)购自北京博奥森生物技术公司; 4%多聚甲醛(货号 DF0135)、DAPI 染色封片剂(货号 DZ0125-10 mL)、聚乙烯醇荧光封片剂(货号 IH0258)购自北京雷根生物技术有限公司; 牛血清白蛋白 V(货号 735094)购自瑞士 Roche 公司; STIM1(货号 5668S)、抗兔 IgG Fab2 AlexaFluor® 488 分子探针(货号 4412S)购自美国 CST 公司; 兔 STIM1 单抗(货号 ab108994)、兔 TRPC1 单抗(货号 ab51255)购自英国 Abcam 公司; 脱脂奶粉(货号 BS102-100 g)购自广州硕谱生物科技有限公司; 蛋白 A+G 琼脂糖(货号 P2012)、蛋白质印迹法及免疫沉淀法细胞裂解液(货号 P0013K)、PMSF(货号 ST5062)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(货号 P0012A、P0012B)、5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(货号 P0015)购自上海碧云天生物技术有限公司; Precision Plus Protein™ Standards(货号 161-0374)、ECL 化学发光液(货号 170-5060)购自美国 Bio-Rad 公司; Pierce™ BCA 蛋白检测试剂盒(货号 23227)购自美国 ThermoFisher Scientific 公司; 氯化钠、苯酚、硫酸、三氯甲烷、正丁醇、无水乙醇购自广州东巨玻璃仪器有限公司(均为分析纯)。

1.4 仪器 AUW120D 电子分析天平及 Uvmini-1240 紫外分光光度计购自日本 Shimadzu 公司; E2695 型高效液相色谱仪、G 4000 PWXL 色谱柱(7.8 mm×300 mm)、2414 示差检测器购自美

国 Waters 公司; IX-71 型荧光倒置相差显微镜购自日本 Olympus 公司; 3111 型 CO₂ 培养箱、MULTIFUGE X1R 型离心机、NanoDrop 2000 紫外微量分光光度计购自美国 ThermoFisher Scientific 公司; CFX-96 荧光定量 PCR 仪、iMark™ 酶标仪、ChemiDox™ XRS+ 成像仪购自美国 Bio-Rad 公司; Mastercycler nexus X1 PCR 仪购自德国 Eppendorf 公司; SPE 型激光共聚焦显微镜购自德国 Leica 公司。

1.5 黄芪多糖受试药的制备 取黄芪 500 g, 打粉, 加入蒸馏水(2.5 L)后通过超声提取(35 kHz, 60 °C, 1 h)3 次, 合并水提液, 浓缩至适量, 加入 95%乙醇至含二醇量达 80%, 静置过夜, 取沉淀, 浓缩成干浸膏, 得到水提醇沉物, 即“黄芪多糖 1”。再以 Sevage 法去蛋白, 得到“黄芪多糖 2”。取“黄芪多糖 2”样品, 经 DEAE-纤维素柱(3.0 cm×35 cm)层析初步分离; 用蒸馏水洗脱, 流速 3 mL/min, 收集洗脱液, 减压浓缩, 真空干燥得到“黄芪多糖 3”, 即为本实验受试药(以下统称黄芪多糖, 得率 1.50%, 苯酚-硫酸法测得糖含量为 66.3%)。实验剂量以黄芪多糖提取物重量计算。实验时黄芪多糖样品以 PBS 配成所需浓度, 0.22 μm 滤膜过滤, -20 °C 保存备用。

1.6 HPLC 检测黄芪多糖 黄芪多糖配成 1 mg/mL, 过 0.45 μm 滤膜, 进行 HPLC 检测并记录图谱。HPLC 条件: 柱温为 30 °C, 示差折光检测器温度为 30 °C; 检测灵敏度为 4; 流动相为超纯水; 流速为 0.6 mL/min; 进样量为 20 μL。

1.7 细胞迁移实验(无钙培养) 无 Ca²⁺ 的 DMEM 高糖培养基配制: 100 mL 不含 Ca²⁺ 的 DMEM 高糖培养基加 11 mg 丙酮酸钠和 58.6 mg L-谷氨酰胺, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤后, 加入 5% 血清和 1% 双抗, 4 °C 保存。

细胞迁移实验及给药方法: 按文献[25-26]方法进行细胞培养和划痕, 细胞划痕后迅速加入含各种药物的培养基 2.5 mL [有钙对照组加入含 Ca²⁺ 的高糖 DMEM 培养基 2.5 mL; 无钙对照组、阳性对照药 (SPD 5 μmol/L) 组、受试药 (黄芪多糖 20、40、80、160 mg/L) 组均加入无 Ca²⁺ 的高糖 DMEM 培养基 2.5 mL]。37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养 24 h。在荧光倒置相差显微镜下观察细胞迁移情况并拍照, 每组 3 个复孔, 每孔拍 8 个视野, 用 Image-Pro Plus 软件统计细胞迁移数。

1.8 免疫荧光法检测 STIM1 蛋白移位及表达 细胞爬片放入 24 孔培养板, 加 1 mL 培养基在培养箱, 预平衡 15 min, 吸弃培养基。细胞以 4×10^4 /mL 接种于爬片, 每孔 1 mL, 37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养 24 h, 以 200 μ L 移液器吸头做一划痕, PBS 冲洗。空白组加完全培养基 1 mL; DFMO 模型组加含 2.5 mmol/L DFMO 的完全培养基 1 mL; 阳性对照药组加含 5 μ mol/L SPD 的完全培养基 1 mL (负荷实验同时加入 DFMO); 受试药组分别加入含 40、80 mg/L 黄芪多糖的完全培养基 1 mL (负荷实验同时加入 DFMO), 每组 6 个复孔, 37 °C、5% CO₂、饱和湿度下分别培养 0 min、10 min、30 min、1 h、3 h、6 h。取出 24 孔板, 吸弃培养基, PBS 冲洗, 预冷 4% 多聚甲醛固定 15 min, 吸弃固定液, PBS 冲洗, 用 PBS 配制的含 5% 山羊血清、0.3% Triton X-100 的封闭液室温封闭 1 h; 加入一抗 (用 PBS 配制的含 1% 牛血清白蛋白 V、0.3% Triton X-100 的抗体稀释液稀释, 稀释比例 1 : 250) 置于湿盒, 4 °C 孵育过夜, 回收一抗, PBS 冲洗; 加入荧光探针 (PBS 配制含 1% 牛血清白蛋白 V、0.3% Triton X-100 的抗体稀释液稀释, 稀释比例 1 : 250) 室温避光孵育 1 h, 吸弃二抗, PBS 冲洗; 加入 DAPI 染色封片剂, 孵育 5 min, 吸弃封片剂, PBS 冲洗; 载玻片上加入聚乙烯醇荧光封片剂 14 μ L, 将细胞爬片盖在载玻片上, 指甲油封片一圈, 通风橱内吹 1~2 h, 立即采用激光共聚焦显微镜检测。采用 ImageJ1.53e 软件对各组细胞荧光强度进行分析。

1.9 qPCR 法检测 *TRPC1*、*STIM1*、*STIM2* mRNA 表达 细胞接种于 6 孔板, 培养 24 h, 移液器吸头沿各孔中央做 3 条划痕, PBS 冲洗; 空白组加完全培养基 2.5 mL, DFMO 模型组加含 2.5 mmol/L DFMO 的完全培养基 2.5 mL, 阳性对照药组加含 5 μ mol/L SPD 的完全培养基 2.5 mL (负荷实验同时加入 DFMO), 受试药组分别加入含 20、40、80、160 mg/L 黄芪多糖的完全培养基 2.5 mL (负荷实验同时加入 DFMO), 每组 3 个复孔; 培养 24 h, 弃培养基, PBS 冲洗, 每孔加 0.5 mL PBS, 将各孔细胞刮下并转移至 1.5 mL 离心管, 25 800 \times g 离心 5 min, 弃上清液, 按试剂盒方法提取细胞总 RNA, 紫外分光光度计检测 RNA 纯度。用反转录试剂盒在 37 °C 15 min、

85 °C 5 s 反应条件下对各组 RNA 反转录, 得 cDNA。cDNA 加入 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 荧光物质进行 qPCR 反应。*TRPC1* 上游引物 5'-AGCCTCTTGACAAACGAGGA-3', 下游引物 5'-ACCTGACATCTGTCCGAACC-3'; *STIM1* 上游引物 5'-CCACCCTATTCTGCCTACTTC-3', 下游引物 5'-CTTTTGGATTCTTCCCATTTCTC-3'; *STIM2* 上游引物 5'-AGCAAACCAACAACCTCCAAC-3', 下游引物 5'-CTGACACGCCACCTCATAAT-3'; β -肌动蛋白上游引物 5'-GGAGATTACTGCCCTG-GCTCCTA-3', 下游引物 5'-GACTCATCGTACTCC-TGCTTGCTG-3'。25 μ L 反应体系, 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环。反应结束后, 采用荧光定量 PCR 仪分析并计算结果。以 β -肌动蛋白作为内参对各样本进行相对定量, 用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 *TRPC1*、*STIM1*、*STIM2* mRNA 表达, 3 次独立实验进行统计学分析。

1.10 蛋白质印迹法检测 *TRPC1*、*STIM1*、*STIM2* 蛋白表达 细胞划痕并给药 (分组和给药方法同 mRNA 检测实验) 培养 24 h 后, 吸弃培养基, PBS 冲洗; 每孔加 0.5 mL PBS, 将细胞刮下收集到 1.5 mL 离心管, 25 800 \times g 离心 5 min, 弃上清液; 加含 PMSF 的 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白质, 采用 BCA 法测蛋白浓度。各组样品调至相同蛋白量, 样品与 5 \times SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 1 : 4 混匀, 沸水中煮 5 min, 冰水浴 1 min, -20 °C 保存。SDS-PAGE 结束, 制作电转“三明治”, 300 mA 电转 90 min, TBST 洗膜 3 次, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, TBST 洗膜, 根据相应的蛋白分子量切膜。加入稀释的一抗 (*TRPC1* 抗体稀释比例为 1 : 5 000, *STIM1* 抗体、*STIM2* 抗体稀释比例均为 1 : 1 000, GAPDH 稀释比例为 1 : 10 000), 室温摇床孵育 20 min, 4 °C 孵育过夜; 次日室温孵育 20 min, TBST 洗膜 3 次, 回收一抗; 室温孵育二抗 1 h, TBST 洗膜 3 次, 加入 ECL 化学发光液反应 5 min, 显影。采用 Image Lab 软件分析蛋白条带光密度比值, 3 次独立实验后进行统计学分析。

1.11 免疫沉淀法检测 *STIM1/TRPC1*、*STIM1/STIM2* 复合体蛋白表达 细胞裂解及总蛋白提取后, 各样品取 500 μ g 蛋白, 加入 4 μ g *STIM1* 抗体, 4 °C 摇床孵育过夜; 加入 40 μ L 蛋白 A+G 琼脂糖, 4 °C 孵育 3 h。4 °C 1 000 \times g 离心 5 min, 弃上清液;

PBS 洗涤沉淀 5 次, 4 °C 1 000×g 离心 5 min, 弃上清液; 加入 50 μL SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 沸水中煮 5 min; 用 TRPC1 或 STIM2 抗体 (TRPC1 抗体稀释比例为 1 : 5 000, STIM1 抗体、STIM2 抗体稀释比例均为 1 : 1 000) 进行后续蛋白质印迹实验, 检测 TRPC1 或 STIM2 是否被 STIM1 抗体沉淀下来。

1.12 统计学处理 应用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素

方差分析, 多重比较采用最小显著性差异法 (方差齐) 或 Dunnett's T3 检验 (方差不齐)。检验水准 α 为 0.05。

2 结果

2.1 HPLC 检测结果 见图 1, 黄芪多糖有 3 个吸收峰, 最大吸收峰保留时间为 21 min, 所占比例为 79.7%, 提示黄芪多糖样品为杂多糖。

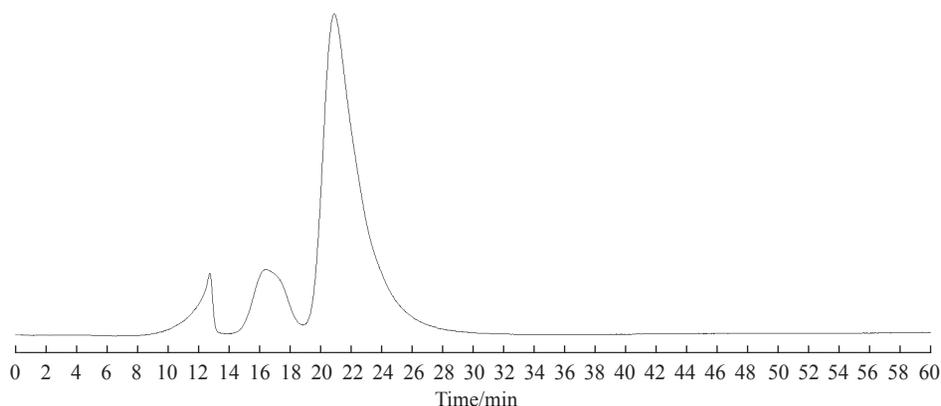


图 1 APS 的高效液相色谱图

Fig 1 High performance liquid chromatogram of APS

APS: *Astragalus polysaccharide*.

2.2 黄芪多糖能提高无钙培养条件下 IEC-6 细胞的迁移能力 结果 (图 2) 显示, 当去除了胞外 Ca^{2+} 内流来源时细胞迁移数较有钙对照组减少 [139.17 ± 80.14 vs 488.41 ± 42.09 , $P < 0.01$]; 各剂量 (20、40、80、160 mg/L) 黄芪多糖均可提高无钙培养时的细胞迁移数, 分别为 288.94 ± 80.14 、 371.27 ± 71.74 、 236.63 ± 86.04 、 $262.75 \pm$

92.71 , 与无钙对照组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但不能使细胞迁移数恢复至有钙培养的水平 (按公式“黄芪多糖各剂量组细胞迁移数均值 / 有钙对照组迁移数均值 $\times 100\%$ ”计算, 黄芪多糖 4 个剂量组细胞迁移数为有钙对照组的 48.5%~76.0%)。

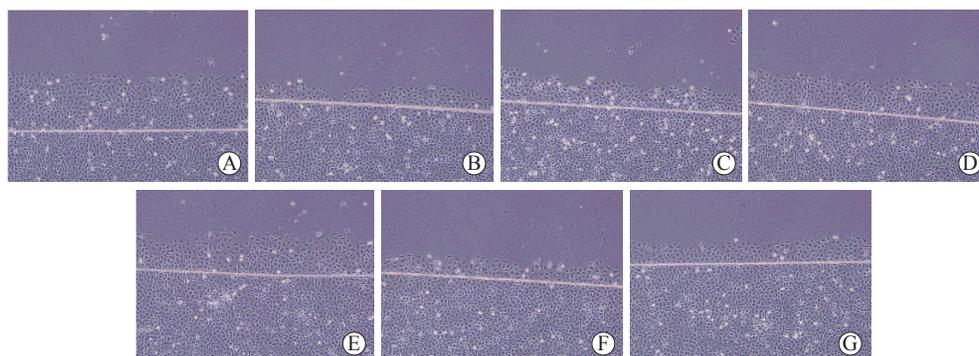


图 2 APS 对无钙培养下 IEC-6 细胞迁移的影响 (100×)

Fig 2 Effect of APS on IEC-6 cell migration in calcium-free culture (100×)

A: $Ca^{2+}(+)$ control group; B: $Ca^{2+}(-)$ control group; C: $Ca^{2+}(-) + 5 \mu\text{mol/L SPD}$; D: $Ca^{2+}(-) + 20 \text{ mg/L APS}$; E: $Ca^{2+}(-) + 40 \text{ mg/L APS}$; F: $Ca^{2+}(-) + 80 \text{ mg/L APS}$; G: $Ca^{2+}(-) + 160 \text{ mg/L APS}$. APS: *Astragalus polysaccharide*; SPD: Spermidine.

2.3 黄芪多糖能促进IEC-6细胞TRPC1 mRNA及蛋白表达 qPCR检测结果显示, 与空白组比较, 各剂量(20、40、80、160 mg/L)黄芪多糖组TRPC1 mRNA表达均增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 图3A)。负荷实验中DFMO模型组的TRPC1 mRNA

表达水平低于空白组($P<0.01$), 而各剂量黄芪多糖组TRPC1 mRNA表达水平均高于DFMO模型组(P 均 <0.01 , 图3B)。结果表明黄芪多糖在正常或DFMO负荷时均可上调钙通道蛋白TRPC1 mRNA表达。

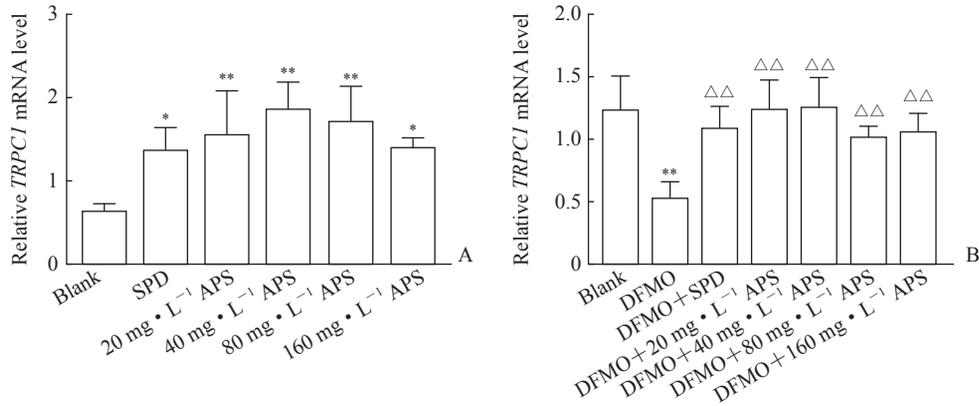


图3 qPCR检测APS对IEC-6细胞TRPC1 mRNA表达的影响

Fig 3 Effect of APS on TRPC1 mRNA expression in IEC-6 cells detected by qPCR

A: No load; B: Under DFMO loading. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs blank group; $\triangle\triangle P<0.01$ vs DFMO group. $n=3$, $\bar{x}\pm s$. qPCR: Quantitative polymerase chain reaction; APS: Astragalus polysaccharide; TRPC1: Transient receptor potential channel 1; SPD: Spermidine; DFMO: Difluoromethylornithine.

蛋白质印迹法检测结果(图4)显示, 黄芪多糖各剂量组TRPC1蛋白表达水平均高于空白组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。负荷实验中DFMO模型组的TRPC1蛋白表达水平低于空白组($P<0.01$),

而各剂量黄芪多糖组TRPC1蛋白表达水平均高于DFMO模型组(P 均 <0.01)。结果表明黄芪多糖在正常或DFMO负荷时均可上调钙通道蛋白TRPC1蛋白表达。

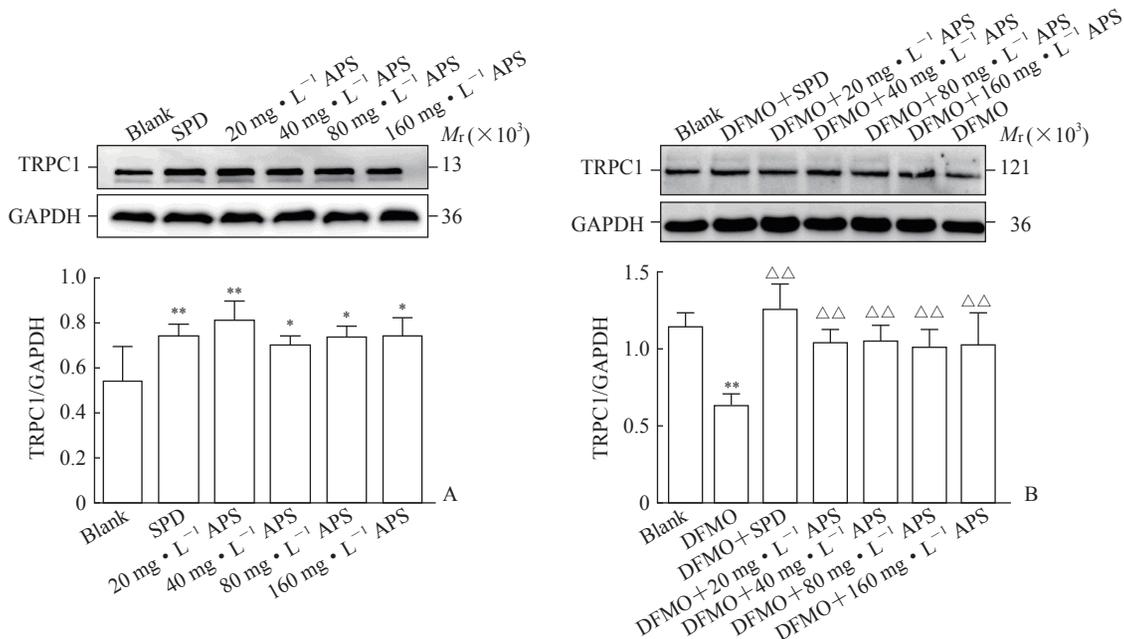


图4 蛋白质印迹法检测APS对IEC-6细胞TRPC1蛋白表达的影响

Fig 4 Effect of APS on TRPC1 protein expression in IEC-6 cells detected by Western blotting

A: No load; B: Under DFMO loading. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs blank group; $\triangle\triangle P<0.01$ vs DFMO group. $n=3$, $\bar{x}\pm s$. APS: Astragalus polysaccharide; TRPC1: Transient receptor potential channel 1; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; SPD: Spermidine; DFMO: Difluoromethylornithine.

2.4 黄芪多糖对 IEC-6 细胞 Ca²⁺ 感受器蛋白 STIM1、STIM2 的影响

2.4.1 无负荷条件下黄芪多糖对 STIM1 蛋白移位及表达的影响 STIM1 蛋白荧光图显示,空白组 STIM1 蛋白在划痕后 0 min 主要分布在胞质内;划痕后 10 min STIM1 开始向胞膜移位,胞膜附近出现点状绿色荧光,胞膜的 STIM1 表达增加;划痕后 10 min~1 h, STIM1 在胞膜表达增加而在胞质表达减少;划痕后 3 h STIM1 在胞膜表达开始下降;

划痕后 6 h 胞膜的 STIM1 表达已很弱。与空白组比较,黄芪多糖组在划痕后 10 min~1 h 时 STIM1 移位至胞膜增加且表达升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);划痕后 3 h 时 STIM1 在胞膜的表达开始减少,6 h 时在胞膜上的表达下降至接近 0 min 时水平。另外,黄芪多糖作用后胞膜 STIM1 荧光强度增加的同时胞质内的荧光强度也有一定增加,提示 40 mg/L 和 80 mg/L 剂量的黄芪多糖不仅能促进 STIM1 移位至胞膜,还能增加细胞 STIM1 蛋白表达。见图 5。

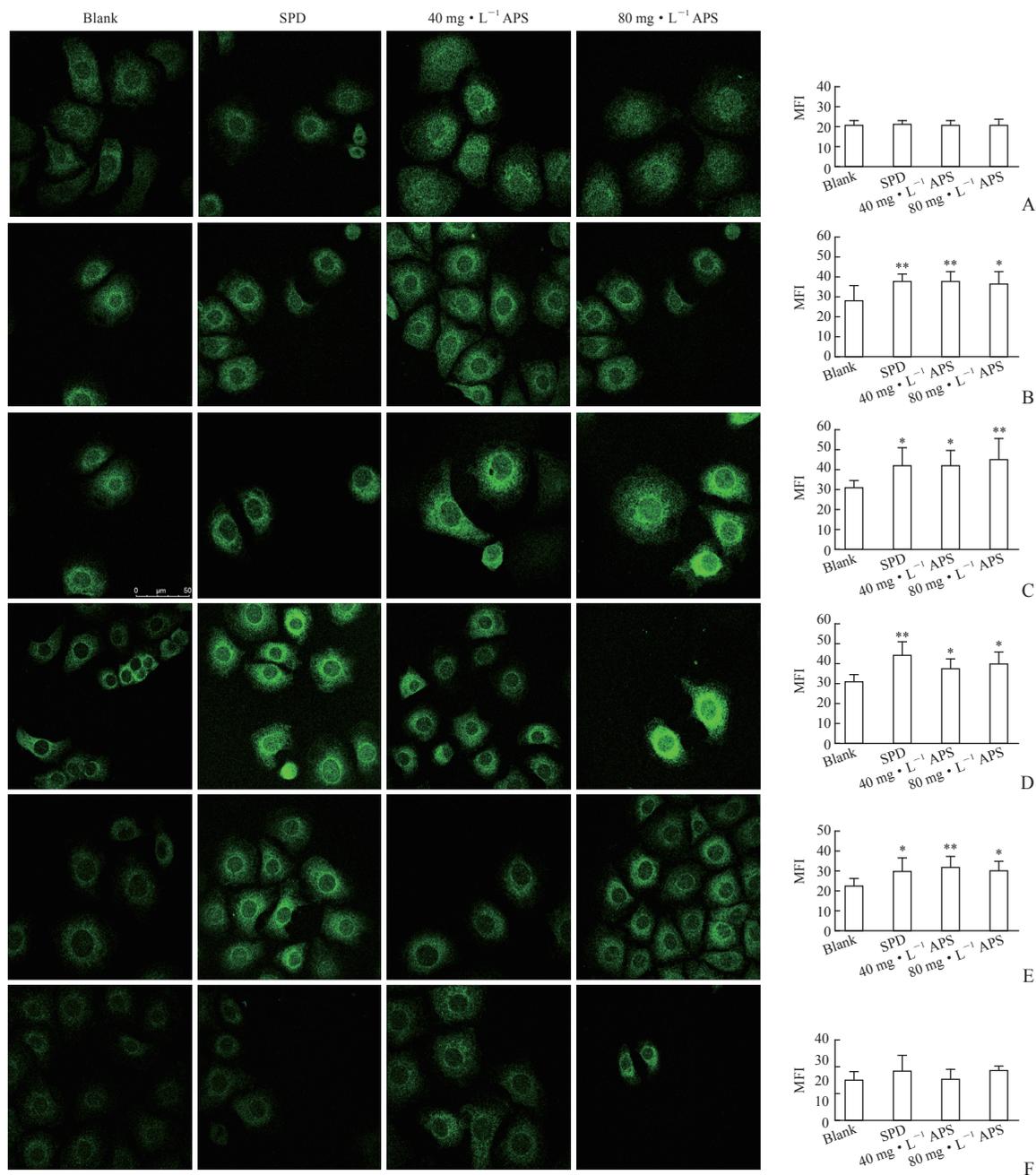


图 5 APS 对 IEC-6 细胞 STIM1 移位至胞膜及 STIM1 蛋白表达的影响

Fig 5 Effects of APS on translocation of STIM1 to plasma membrane and STIM1 protein expression in IEC-6 cells

A: 0 min; B: 10 min; C: 30 min; D: 1 h; E: 3 h; F: 6 h. The fluorescence graphs (600×) are the results of immunofluorescence detection and the bar graphs are the results of statistical analysis. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs blank group. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. APS: *Astragalus polysaccharide*; STIM1: Stromal interaction molecule 1; SPD: Spermidine; MFI: Mean fluorescence intensity.

2.4.2 DFMO 负荷实验中黄芪多糖对 STIM1 蛋白移位及表达的影响 DFMO 负荷下 STIM1 蛋白荧光图显示, DFMO 模型组 STIM1 荧光主要出现在胞质内, 胞核和胞膜分界不清, 划痕后 10 min~3 h 荧光表达仍集中在胞质内, 荧光强度较空白组减弱, 提示 DFMO 负荷导致 STIM1 向胞膜移位延迟, STIM1 蛋白表达降低, 在胞膜上的表达不增加; 划痕后 6 h 开始 STIM1 向胞膜移位, 细胞由实心状向有清晰胞核、胞膜轮廓转变, 提示 DFMO 负荷对 STIM1 移位的影响开始减弱, 但对

STIM1 蛋白表达抑制的作用仍在。黄芪多糖组划痕后 10 min 时, STIM1 荧光也主要分布在胞质, 向胞膜移位相对空白组延迟; 黄芪多糖组在 30 min 时 STIM1 开始向胞膜移位; 与 DFMO 模型组相比, 1、3 h 时黄芪多糖组在胞膜的 STIM1 表达增加 (P 均 <0.01), 6 h 时胞膜上仍有少量 STIM1 蛋白表达, 提示 40 mg/L 和 80 mg/L 的黄芪多糖可拮抗 DFMO 所致的 STIM1 向胞膜移位延迟及蛋白表达降低。见图 6。

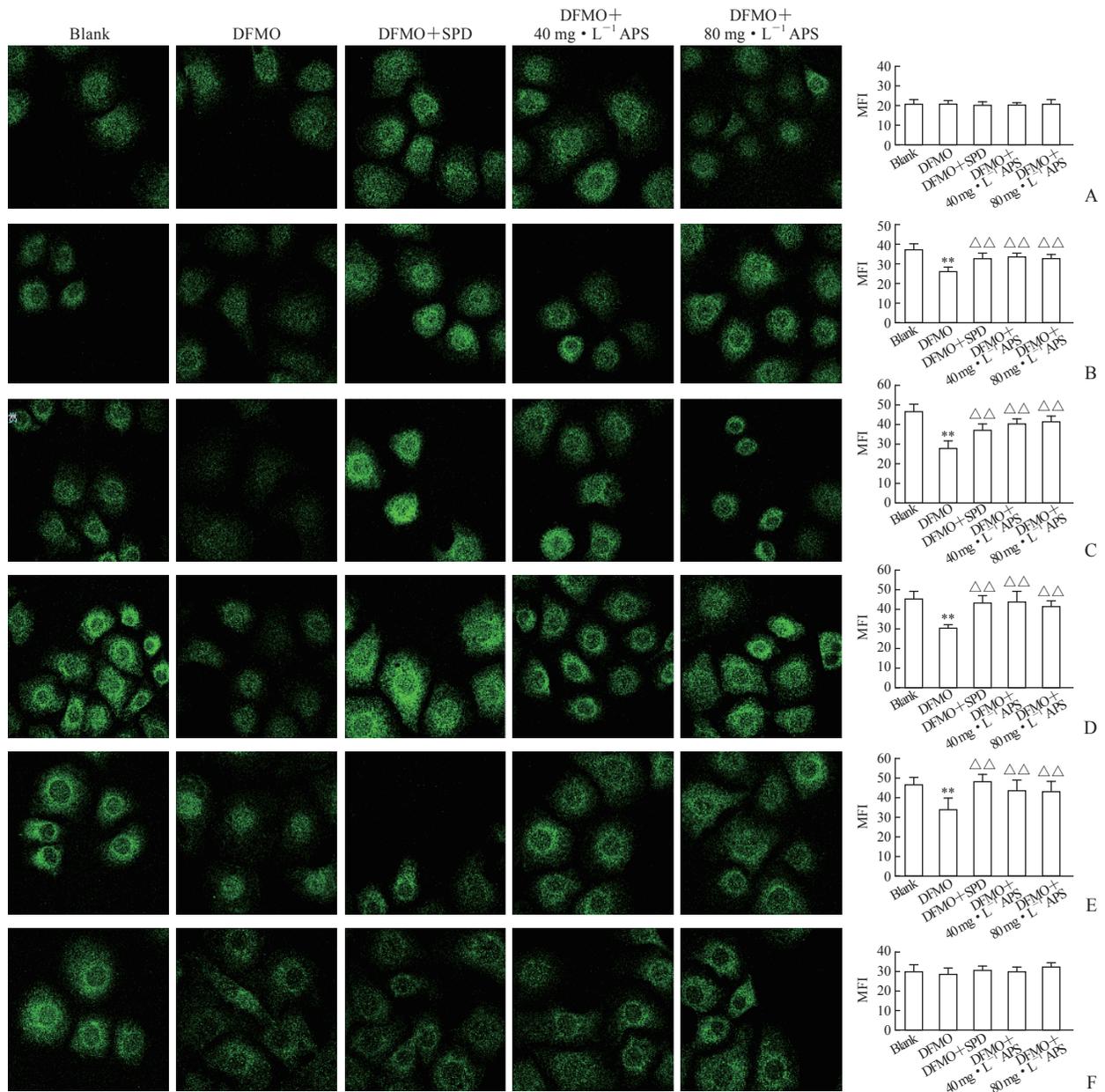


图 6 DFMO 负荷下 APS 对 IEC-6 细胞 STIM1 分布和表达的影响

Fig 6 Effects of APS on distribution and expression of STIM1 under DFMO loading in IEC-6 cells

A: 0 min; B: 10 min; C: 30 min; D: 1 h; E: 3 h; F: 6 h. The fluorescence graphs (600×) are the results of immunofluorescence detection and the bar graphs are the results of statistical analysis. ** $P < 0.01$ vs blank group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs DFMO group. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. DFMO: Difluoromethylornithine; APS: *Astragalus polysaccharide*; STIM1: Stromal interaction molecule 1; SPD: Spermidine. MFI: Mean fluorescence intensity.

2.4.3 黄芪多糖对 *STIM1*、*STIM2* mRNA 表达的影响 由图 7A 可见, 20、40、80 mg/L 黄芪多糖能上调 *STIM1* mRNA 表达、降低 *STIM2* mRNA 表达, 与空白组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。由图 7B 可见, 与空白组比较, DFMO 模型组 *STIM1* mRNA 表达水平下降、*STIM2* mRNA 表达水平升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) ;

DFMO 负荷下 20、40、80 mg/L 黄芪多糖均能促进 *STIM1* mRNA 表达、抑制 *STIM2* mRNA 表达, 与 DFMO 模型组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果表明黄芪多糖在正常或 DFMO 负荷时均能提高 *STIM1* mRNA 表达、降低 *STIM2* mRNA 表达。

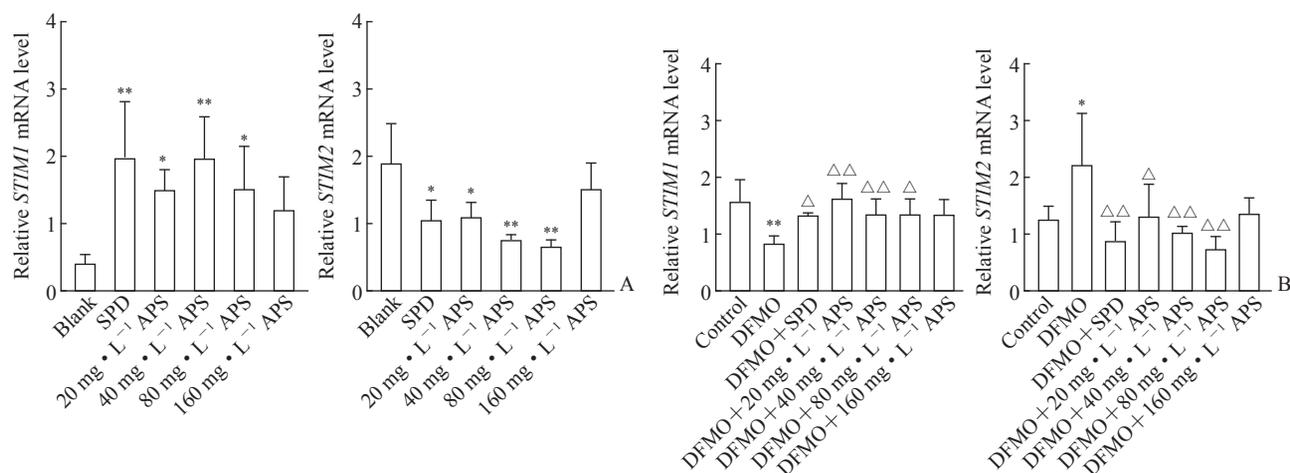


图 7 qPCR 检测 APS 对 IEC-6 细胞 *STIM1*、*STIM2* mRNA 表达的影响

Fig 7 Effects of APS on expression of *STIM1* and *STIM2* mRNA detected by qPCR in IEC-6 cells

A: No load; B: Under DFMO loading. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs blank group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs DFMO group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. qPCR: Quantitative polymerase chain reaction; ASP: *Astragalus polysaccharide*; STIM: Stromal interaction molecule; SPD: Spermidine; DFMO: Difluoromethylornithing.

2.4.4 黄芪多糖对 *STIM1*、*STIM2* 蛋白表达的影响 由图 8A 可见, 20、40、80 mg/L 黄芪多糖能促进 *STIM1* 蛋白表达、抑制 *STIM2* 蛋白表达, 与空白组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。由图 8B 可见, DFMO 抑制了 *STIM1* 蛋白表达、增加了 *STIM2* 蛋白表达, 与空白组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) ; DFMO 负荷下 20、40、80、160 mg/L 黄芪多糖可促进 *STIM1* 蛋白表达, 20、40、80 mg/L 黄芪多糖可抑制 *STIM2* 蛋白表达, 与 DFMO 模型组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果表明黄芪多糖在正常或 DFMO 负荷时均能促进 *STIM1* 蛋白表达、降低 *STIM2* 蛋白表达。

DFMO 负荷可降低复合体中 *STIM1* 和 TRPC1 蛋白表达, 抑制了 *STIM1*/TRPC1 复合体表达; 与 DFMO 模型组相比, DFMO 负荷下 40 mg/L 黄芪多糖增加了复合体中 *STIM1* 和 TRPC1 表达。结果表明黄芪多糖在正常或 DFMO 负荷时均可促进 *STIM1*/TRPC1 蛋白复合体表达。

2.5 黄芪多糖对 IEC 细胞 Ca^{2+} 调节蛋白复合体表达的影响

2.5.2 黄芪多糖对 *STIM1*/*STIM2* 蛋白复合体表达的影响 免疫沉淀法检测结果 (图 10) 显示, 40 mg/L 黄芪多糖通过促进复合体中 *STIM1* 表达、降低 *STIM2* 表达而调节 *STIM1*/*STIM2* 复合体表达; 与空白组相比, DFMO 负荷对 *STIM1*/*STIM2* 复合体的影响表现为增加 *STIM2* 表达、降低 *STIM1* 表达; 与 DFMO 模型组相比, DFMO 负荷下 40 mg/L 黄芪多糖对 *STIM1*/*STIM2* 复合体的影响表现为降低 *STIM2* 表达、增加 *STIM1* 表达。结果提示黄芪多糖可拮抗 DFMO 对 *STIM1*/*STIM2* 复合体表达的影响, 在正常或 DFMO 负荷均对 *STIM1*/*STIM2* 蛋白复合体表达有调节作用。

2.5.1 黄芪多糖对 *STIM1*/TRPC1 蛋白复合体表达的影响 免疫沉淀法检测结果 (图 9) 显示, 与空白组相比, 40 mg/L 黄芪多糖增加 *STIM1* 表达, 促进 *STIM1*/TRPC1 复合体表达; 与空白相比,

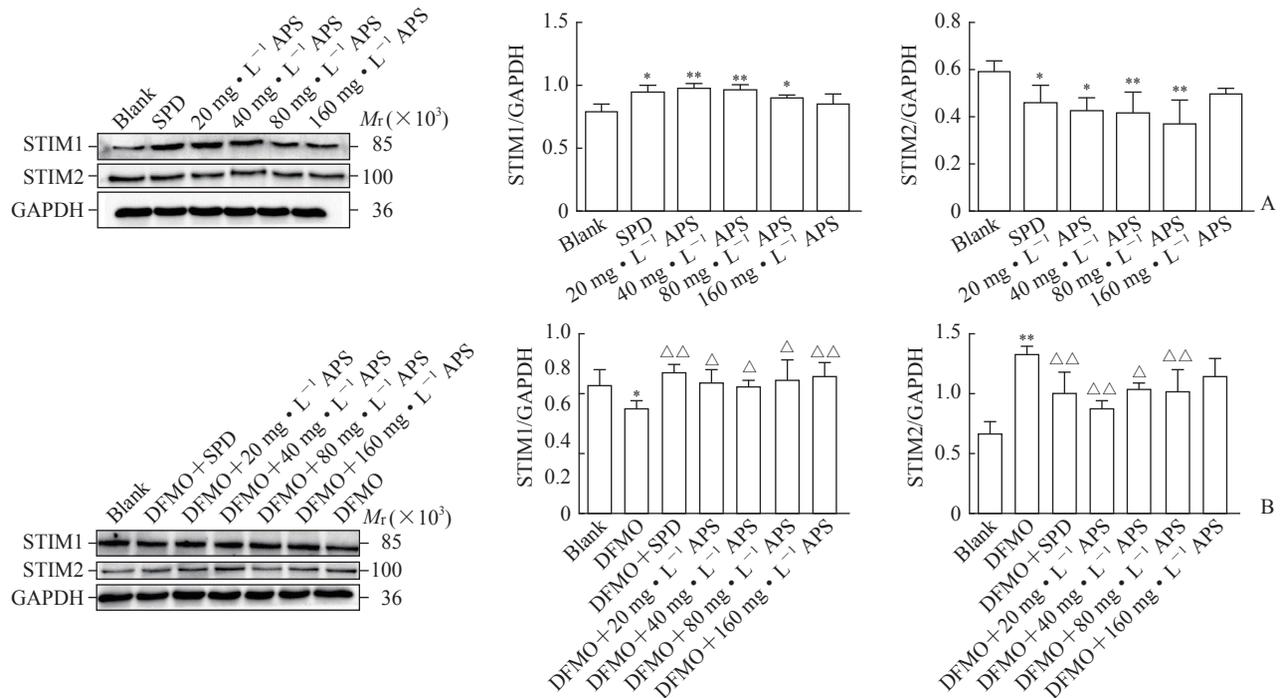


图8 蛋白质印迹法检测 APS 对 IEC-6 细胞 STIM1、STIM2 蛋白表达的影响

Fig 8 Effects of APS on expression of STIM1 and STIM2 proteins in IEC-6 cells detected by Western blotting

A: No load; B: Under DFMO loading. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs blank group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs DFMO group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. APS: *Astragalus polysaccharide*; STIM: Stromal interaction molecule; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; SPD: Spermidine; DFMO: Difluoromethylornithine.

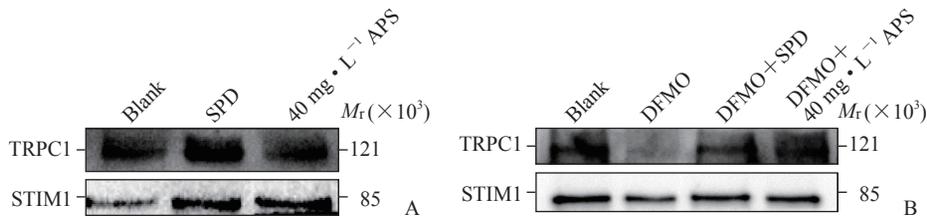


图9 免疫沉淀法检测 APS 对 IEC-6 细胞 STIM1/TRPC1 复合体表达的影响

Fig 9 Effect of APS on expression of STIM1/TRPC1 complex in IEC-6 cells detected by immunoprecipitation

A: No load; B: Under DFMO loading. APS: *Astragalus polysaccharide*; STIM1: Stromal interaction molecule 1; TRPC1: Transient receptor potential channel 1; SPD: Spermidine; DFMO: Difluoromethylornithine.

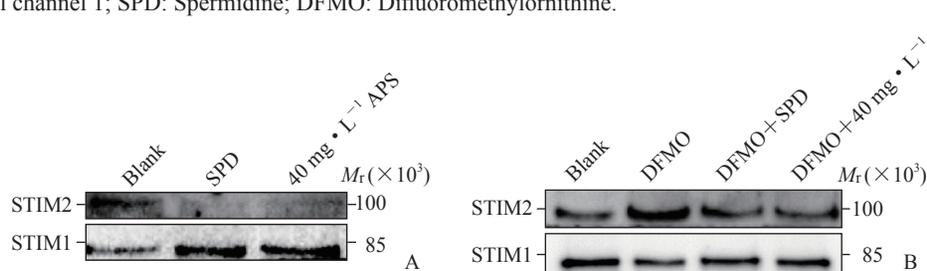


图10 免疫沉淀法检测 APS 对 IEC-6 细胞 STIM1/STIM2 复合体表达的影响

Fig 10 Effect of APS on expression of STIM1/STIM2 complex in IEC-6 cells detected by immunoprecipitation

A: No load; B: Under DFMO loading. APS: *Astragalus polysaccharide*; STIM: Stromal interaction molecule; SPD: Spermidine; DFMO: Difluoromethylornithine.

3 讨论

黄芪性味甘、微温，归肺、脾经，功效补气升

阳、固表止汗、利水消肿、生津养血、行滞通痹、托毒排脓、敛疮生肌，用于气虚乏力、食少便溏、中气下陷、久泻脱肛、表虚自汗、气虚水肿、内热

消渴、血虚萎黄等病症。本研究主要针对黄芪的胃肠黏膜保护作用,从胃肠黏膜损伤修复的重要步骤——上皮细胞迁移入手,在本课题组前期工作基础上围绕多胺信号通路 Ca^{2+} 调节蛋白及其蛋白复合体等探讨黄芪多糖促进小肠上皮细胞迁移的作用机制。

研究表明多胺对IEC-6细胞迁移是必需的^[27];多胺通过增加钾通道蛋白Kv1.1表达、促进细胞膜电位超极化而调控 Ca^{2+} 内流驱动力。细胞 Ca^{2+} 升高主要有胞内钙库释放和胞外 Ca^{2+} 内流2种方式;虽然胞内钙库释放可引起 Ca^{2+} 瞬间升高并刺激细胞迁移,但持久的细胞迁移主要依赖胞内 Ca^{2+} 耗竭而诱导的 Ca^{2+} 内流。钙库操控通道(store-operated channel, SOC)是小肠上皮细胞 Ca^{2+} 内流主要通道之一,TRPC1作为SOC蛋白对上皮细胞迁移过程中 Ca^{2+} 内流驱动力和 Ca^{2+} 的调控起重要作用^[28]。STIM1是位于内质网的跨膜蛋白,作为胞内 Ca^{2+} 感应器,是激活SOC的关键指标,当胞内钙库 Ca^{2+} 耗竭时STIM1从内质网移位到胞膜并与TRPC1相互作用形成STIM1/TRPC1复合体,进而增强TRPC1介导的 Ca^{2+} 内流而促进细胞迁移^[29]。 Ca^{2+} 感应器蛋白STIM2也是内质网跨膜蛋白,属于SOC的负调控蛋白,多胺通过改变STIM1/STIM2比值而调控TRPC1介导的 Ca^{2+} 信号。多胺增加刺激STIM1表达、抑制STIM2表达,消除多胺则会减少STIM1表达、增加STIM2表达。多胺增加提高了STIM1/TRPC1复合体表达,增强了 Ca^{2+} 内流,刺激了细胞迁移;消除多胺则下调STIM1/TRPC1复合体表达,减少 Ca^{2+} 内流,抑制细胞迁移;消除多胺增加了STIM1/STIM2复合体表达,抑制STIM1移位到细胞膜,减少 Ca^{2+} 流入和细胞迁移,表明多胺通过对STIM1和STIM2的差异性调节作用调控TRPC1介导的 Ca^{2+} 信号^[30]。因此多胺调控的STIM1移位至胞膜并形成STIM1/TRPC1复合体是TRPC1介导的 Ca^{2+} 内流的重要环节。

本研究结果显示,在缺乏胞外 Ca^{2+} 内流途径时(无钙培养),黄芪多糖虽有促进细胞迁移的作用,但不能使细胞迁移恢复至正常水平(仅为有钙对照组细胞迁移数的48.5%~76.0%);与有钙培养时黄芪多糖促进细胞迁移的作用有较大差距(20、40、80、160 mg/L黄芪多糖组细胞迁移数是有钙培养对照组的133.7%~159.5%)^[18],提示 Ca^{2+} 是黄芪多糖促进细胞迁移作用的重要条件,黄芪多糖对 Ca^{2+} 的调节是其促进细胞迁移的作用机制之一。

本研究结果显示,黄芪多糖对细胞迁移过程中 Ca^{2+} 调节的影响机制包括:(1)对钙通道的作用:黄芪多糖提高钙通道蛋白TRPC1 mRNA和蛋白表达,逆转DFMO所致的TRPC1 mRNA和蛋白表达降低。(2)对 Ca^{2+} 感应器正、负向调节蛋白STIM1、STIM2的作用:黄芪多糖促进STIM1向细胞膜移位并提高其表达水平,改善DFMO所致的STIM1向细胞膜移位延迟及蛋白表达抑制;提高STIM1 mRNA和蛋白表达,逆转DFMO对STIM1 mRNA和蛋白表达的抑制;降低STIM2 mRNA和蛋白表达,逆转DFMO对STIM2 mRNA和蛋白表达的提高。(3)对 Ca^{2+} 调节蛋白复合体的影响:黄芪多糖提高STIM1/TRPC1复合体表达,逆转DFMO对STIM1/TRPC1复合体表达的抑制;通过提高STIM1/STIM2复合体中STIM1表达、降低STIM2表达调节该复合体表达,并能拮抗DFMO对STIM1/STIM2表达的影响。本研究结果表明黄芪多糖可通过调节TRPC1表达、STIM1移位至细胞膜、STIM1和STIM2表达、STIM1/TRPC1复合体和STIM1/STIM2复合体表达等作用于TRPC1介导的 Ca^{2+} 内流,是黄芪多糖促进细胞迁移的重要作用机制之一;若去除胞外 Ca^{2+} 内流途径(无钙培养),黄芪多糖促进细胞迁移的作用明显减弱,也佐证了黄芪多糖通过增加胞外 Ca^{2+} 内流促进细胞迁移的作用机制。

综上所述,黄芪多糖促进细胞迁移的作用与其影响多胺调控信号通路有关,尤其对 Ca^{2+} 的调节作用是关键机制。其对细胞迁移过程中 Ca^{2+} 调节的作用包括:(1)对信号通路 Ca^{2+} 调节上游指标的影响。黄芪多糖可提高细胞SPD含量,提高钾通道蛋白Kv1.1 mRNA和蛋白表达促进 K^{+} 外流,对DFMO或钾通道抑制剂4-AP所致的细胞迁移抑制、SPD含量降低、Kv1.1 mRNA和蛋白表达降低、 K^{+} 外流抑制有逆转作用,并促进细胞膜电位超极化、逆转DFMO所致的膜电位去极化。

(2)对信号通路 Ca^{2+} 的影响。黄芪多糖能提高细胞 Ca^{2+} 水平;通过提高TRPC1、STIM1及STIM1/TRPC1表达、促进STIM1移位至胞膜、降低STIM2表达、调节STIM1/STIM2表达而促进TRPC1介导的 Ca^{2+} 内流,并逆转DFMO对上述指标的作用。(3)对信号通路 Ca^{2+} 调节下游指标的影响。黄芪多糖可提高Rho-GTP酶(RhoA、Rac1、Cdc42)蛋白表达,逆转DFMO对上述蛋白表达的抑制作用^[14,18]。综合黄芪提取物在细胞水

平和整体动物水平^[10,24]的实验研究结果, 益气健脾中药黄芪的胃肠黏膜保护作用可能与其促进上皮细胞迁移有关, 从新视角为探讨黄芪的胃肠黏膜保护作用机制提供了参考。

[参 考 文 献]

- [1] 许长照,张瑜瑶,刘隆棣,朱启锭,田启鹏,沙家豪. 脾虚证患者十二指肠的病理形态及组织化学研究[J]. 中西医结合杂志,1987,7:722-725,708.
- [2] 尹光耀,张武宁,何雪芬,陈一,尹玉芬,沈小静. 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,1999,19:660-663.
- [3] 闫芳. 黄芪建中汤治疗脾胃虚寒型胃溃疡60例[J]. 河南中医,2020,40:1503-1506.
- [4] 朱超,常凤玲. 白术黄芪汤对溃疡性结肠炎患者证候积分及炎性反应的影响[J]. 现代诊断与治疗,2020,31:1190-1191.
- [5] 陈延,黄智斌,刘奇,何家鸣,欧阳博文,杨弘楚,等. 补土方案维持克罗恩病缓解期及生存质量研究[J]. 中国中西医结合消化杂志,2015,23:888-890.
- [6] 周巧萍,黄智斌,陈延. 加味四君子汤对提高克罗恩病患者血红蛋白含量及降低相关炎症指标的作用[J]. 中国中西医结合消化杂志,2019,27:284-288.
- [7] GAO J H, GUO L J, HUANG Z Y, RAO J N, TANG C W. Roles of cellular polyamines in mucosal healing in the gastrointestinal tract[J]. J Physiol Pharmacol, 2013, 64: 681-693.
- [8] 赵世清. 甘草、党参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,2012.
- [9] 李茹柳,年立全,赵世清,温鹏,随晶晶,陶玉珠,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,2013,30:519-524,604.
- [10] 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.
- [11] 王东旭,李茹柳,朱易平,时玉霞,朱惠彬,胡玲,等. 从多胺及细胞连接蛋白角度探讨四君子汤防治胃黏膜损伤的作用机制[J]. 中药材,2018,41:2886-2892.
- [12] 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.
- [13] SONG H P, LI R L, CHEN X, WANG Y Y, CAI J Z, LIU J, et al. *Atractylodes macrocephala* Koidz promotes intestinal epithelial restitution via the polyamine-voltage-gated K⁺ channel pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 152: 163-172.
- [14] ZENG D, HU C, LI R L, LIN C Q, CAI J Z, WU T T, 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: 674-682.
- [15] 朱易平,李茹柳,时玉霞,王东旭,梁雪丹,胡玲,等. 黄芪总皂苷对IEC-6细胞增殖及相关蛋白表达的影响[J]. 中药新药与临床药理,2019,30:60-65.
- [16] 李茹柳,陶玉珠,曾丹,赵世清,林传权,陈蔚文. 党参、甘草糖提取物对小肠上皮细胞迁移多胺信号通路的影响[J]. 中国药理学通报,2016,32:245-251.
- [17] 涂小华,李茹柳,邓娇,曾丹,蔡佳仲,陈蔚文. 四君子汤多糖对小肠上皮细胞迁移多胺信号通路钙离子调控的影响[J]. 中华中医药杂志,2016,31:1665-1673.
- [18] 曾丹,李茹柳,伍婷婷,王东旭,时玉霞,陈蔚文. 黄芪多糖对IEC-6细胞迁移多胺信号通路相关指标的影响[J]. 中华中医药杂志,2017,32:3447-3452.
- [19] 伍婷婷,李茹柳,曾丹,胡玲,时玉霞,王东旭,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,2017,28:145-150.
- [20] SHI Y X, ZHU H B, LI R L, WANG D X, ZHU Y P, HU L, et al. Effect of polysaccharides from *Sijunzi* decoction on Ca²⁺ related regulators during intestinal mucosal restitution[J/OL]. Phytomedicine, 2019, 58: 152880. DOI: 10.1016/j.phymed.2019.152880.
- [21] 王洲,李茹柳,徐颂芬,陈蔚文. 白术糖复合物对IEC-6细胞分化及绒毛蛋白表达的影响[J]. 中药材,2010,33:938-944.
- [22] 朱惠彬. 人参多糖对IEC-6细胞迁移钙离子调控相关指标影响的研究[D]. 广州:广州中医药大学,2020.
- [23] 罗蒙,伍婷婷,李茹柳,张东,朱惠彬,胡玲,等. 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[J]. 中药新药与临床药理,2021,32:533-539.
- [24] 朱易平. 从细胞增殖和黏附连接角度探讨黄芪和人参胃黏膜损伤修复机制[D]. 广州:广州中医药大学,2019.
- [25] HU C, LI R L, LU W B, YANG Y Q, WANG J, CHEN W W. Studies on cell migration model in intestinal epithelial restitution for pharmacological research[J]. J Chin Med Mater, 2011, 34: 738-746.
- [26] RATHOR N, CHUNG H K, SONG J L, WANG S R, WANG J Y, RAO J N. TRPC1-mediated Ca²⁺ signaling enhances intestinal epithelial restitution by increasing $\alpha 4$ association with PP2Ac after wounding[J/OL]. Physiol Rep, 2021, 9: e14864. DOI: 10.14814/phy2.14864.
- [27] RAO J N, XIAO L, WANG J Y. Polyamines in gut epithelial renewal and barrier function[J]. Physiology (Bethesda), 2020, 35: 328-337.
- [28] RAO J N, PLATOSHYN O, GOLOVINA V A, LIU L, ZOU T T, MARASA B S, et al. TRPC1 functions as a store-operated Ca²⁺ channel in intestinal epithelial cells and regulates early mucosal restitution after wounding[J/OL]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006, 290: G782-G792. DOI: 10.1152/ajpgi.00441.2005.
- [29] RAO J N, RATHOR N, ZOU T T, LIU L, XIAO L, YU T X, et al. STIM1 translocation to the plasma membrane enhances intestinal epithelial restitution by inducing TRPC1-mediated Ca²⁺ signaling after wounding[J/OL]. Am J Physiol Cell Physiol, 2010, 299: C579-C588. DOI: 10.1152/ajpcell.00066.2010.
- [30] RAO J N, RATHOR N, ZHUANG R, ZOU T T, LIU L, XIAO L, et al. Polyamines regulate intestinal epithelial restitution through TRPC1-mediated Ca²⁺ signaling by differentially modulating STIM1 and STIM2[J/OL]. Am J Physiol Cell Physiol, 2012, 303: C308-C317. DOI: 10.1152/ajpcell.00120.2012.