

# 谷维素抑制 DSS 诱导的小鼠结肠炎症及其分子机理研究

陈娅娅<sup>1</sup>, 罗非君<sup>1</sup>, 田媛媛<sup>1</sup>, 李新华<sup>2</sup>, 石立民<sup>1</sup>, 严明<sup>1</sup>, 曾琳娜<sup>1</sup>, 刘博<sup>1</sup>, 林亲录<sup>1</sup>

(1. 中南林业科技大学食品科学与工程学院, 稻谷及副产物深加工国家工程实验室, 湖南长沙 410004)

(2. 中南大学湘雅医院消化内科, 湖南长沙 410008)

**摘要:** 谷维素 (oryzanol) 是米糠中重要的活性物质之一。C57BL/6 小鼠连续饮用 1.0% 葡聚糖硫酸钠 (dextran sulphate sodium, DSS) 12 d, 用以建立溃疡性结肠炎模型, 评估谷维素的抗炎作用及其分子机理研究。结果发现: 谷维素组小鼠能明显缓解 DSS 诱导的结肠炎症, 小鼠肠壁厚度、结肠长度、结肠重量、炎症细胞浸润、疾病活动指数 (disease active index, DAI) 等病理指标明显改变; 谷维素也能明显改善结肠组织中炎症损伤重要生化指标如髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 的含量, 同时减少血浆中亚硝酸盐的含量; RT-qPCR 技术分析发现结肠组织炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 和 IL-6 等 mRNA 表达水平受到明显抑制, Western blotting 分析进一步证实了谷维素能抑制炎症因子的蛋白表达水平。结论: 谷维素对 DSS 诱导的小鼠结肠炎具有抑制作用, 其作用的分子机理可能与下调炎症因子的表达相关。

**关键词:** 谷维素; 结肠炎; 炎症因子; 髓过氧化物酶; 丙二醛

文章编号: 1673-9078(2016)5-14-21

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.5.03

## Molecular Mechanism Underlying the Amelioration of Dextran Sulphate Sodium (DSS)-induced Colitis in Mice by Oryzanol

CHEN Ya-ya<sup>1</sup>, LUO Fei-jun<sup>1</sup>, TIAN Yuan-yuan<sup>1</sup>, LI Xin-hua<sup>2</sup>, SHI Li-min<sup>1</sup>, YAN Ming<sup>1</sup>, ZENG Lin-na<sup>1</sup>, LIU Bo<sup>1</sup>, LIN Qin-lu<sup>1</sup>

(1. Food Science and Engineering College, National Laboratory for Rice and Byproducts Deep Process, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China) (2. Department of Gastroenterology, Central South University, Xiangya Hospital, Changsha 410008, China)

**Abstract:** Oryzanol is one of the important active substances in rice bran. A mouse model of ulcerative colitis was established by feeding C57BL/6 mice continuously with 1.0% sulphate sodium D (DSS), and the anti-inflammatory effect of oryzanol and its molecular mechanism were evaluated. The results showed that the symptoms of DSS-induced colitis in the mice from oryzanol group were significantly alleviated. The thickness of bowel wall, colon length, colon weight, inflammatory cell infiltration, disease activity index (DAI) and other important pathological indicators were improved significantly. Oryzanol could also significantly improve important biochemical indicators of inflammatory injury in colonic tissues, such as myeloperoxidase (MPO) and malondialdehyde (MDA) contents, and reduce the plasma nitrite content. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis found that the mRNA expression levels of inflammatory factors, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interferon (IFN)- $\gamma$ , interleukin (IL)-1, and IL-6 were significantly reduced in colonic tissues. Western blotting further confirmed that oryzanol suppressed the protein expression of inflammatory factors in colonic tissues. It was concluded that oryzanol had an inhibitory effect on DSS-induced colitis in mice and its molecular mechanism may involve the down-regulation of the expression of inflammatory factors.

**Key words:** oryzanol; colitis; inflammatory factor; myeloperoxidase (MPO); malondialdehyde (MDA)

收稿日期: 2016-01-12

基金项目: 湖南省教育厅重点项目“谷维素抗炎的分子机理研究”(13A124); 国家自然科学基金“加工贮藏中营养成分变化对稻米主食品质影响的机理研究”(31571874); 湖南省“2011”协同创新课题“粮油深加工与品质控制”(2013, 448)

作者简介: 陈娅娅(1990-), 女, 研究生, 研究方向为食品分子营养; 罗非君(1968-), 男, 研究员, 博士生导师, 从事食品分子营养研究(共同第一作者)

谷维素是糙米、米糠、米糠油中含有的功能性活性组分, 主要成分为环木菠萝醇类阿魏酸酯和甾醇类阿魏酸酯<sup>[1,2]</sup>。研究表明: 谷维素具有抗氧化、清除自由基、降低血脂与胆固醇等生理功能, 可预防心血管疾病和癌症的发生发展等<sup>[3,4]</sup>。近年来, 国内外研究者发现了谷维素可能具有抗炎作用。如在佛波脂 (TPA) 诱导的小鼠皮炎动物模型中, 谷维素及其主要活性成分均能显著抑制炎症反应<sup>[5]</sup>。在大鼠过敏性皮炎模型中, 谷维素主要成分阿魏酸酯 (cycloartenol ferulic acid ester) 能抑制肥大细胞脱颗粒, 减少炎症因子的分泌<sup>[6]</sup>; Zucker 老鼠饮食中添加酶辅助米糠提取物, 能够治疗改善肥胖相关联的促炎症状, 减少腹部内脏脂肪组织和内脏附睾的脂肪组织中炎症因子的过量表达<sup>[7]</sup>。我们最近的研究也发现, 谷维素能抑制体外培养的巨噬细胞炎症因子的表达<sup>[8]</sup>。

溃疡性结肠炎是常见慢性肠道疾病之一, 主要症状包括腹泻、腹痛、便血以及里急后重等, 且易反复, 迁延不愈。目前国内外防治溃疡性结肠炎的药物包括肾上腺皮质激素、柳氮磺胺吡啶、抗生素和免疫抑制剂等, 但这些药物停药后, 患者非常容易复发, 而长期用此类药物, 副反应很多, 对于部分较顽固的病例防治效果较差<sup>[9-11]</sup>。葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 是诱导溃疡性结肠炎的经典模型, 其病理改变更接近人类溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC), 往往出现以血便、肠道黏膜溃疡和粒细胞浸润为特征的结肠炎症; 病理组织切片显示: 小鼠结肠黏膜明显充血水肿、炎性细胞浸润、陷窝脓肿、炎性渗出和大面积溃疡形成等<sup>[12,13]</sup>。

本课题使用 DSS 诱导 C57BL6 小鼠, 建立结肠炎模型, 在整体动物水平评估谷维素的抗炎作用及并研究其分子机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验试剂

右旋葡聚糖硫酸钠购自美国法玛西亚 (Pharmacia, 分子量 36~50 ku) 公司; 谷维素 (米糠来源) 购自日本 OSHA Haz 有限公司; 逆转录试剂盒、荧光 SYBR 购自北京全式金生物技术有限公司; SDS 购自美国 Sigma 公司; 小鼠 IL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒 (Cat: 001814)、小鼠 IL-2 ELISA 试剂盒 (Cat: 002295)、小鼠 TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒 (Cat: 002095)、小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒 (Cat: 002293)、小鼠 IL-8 ELISA 试剂盒 (Cat: 001856)、小鼠 IFN- $\gamma$  ELISA 试剂盒 (Cat: 002293)、MDA 测试盒 (Cat: 022446) 和 MPO 测试

盒 (Cat: 022378) 均购自南京建成生物公司; 抗 IL-1 $\beta$  兔单克隆 (Cat #12703)、抗 iNOS 兔单克隆 (Cat#13120)、抗 TNF- $\alpha$  兔单克隆 (Cat #11948)、抗 IL-6 兔单克隆 (Cat#12912)、抗 Cox-2 兔单克隆 (Cat #12282)、抗 IFN- $\gamma$  兔单克隆 (Cat#8455) 均购自美国 Cell Signaling Technology (CST); 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 试验动物

健康雄性 C57BL6 小鼠 60 只购于湖南省斯莱克动物实验有限公司, 鼠龄 6~7 周, 体重 20~25 g, 饲养于湖南师范大学医学院动物中心, 动物使用许可证号: SYXK (湘) -2014-0112。小鼠恒温环境饲养 (温度 22  $^{\circ}$ C, 湿度 40~60%), 昼夜明暗交替时间 12/12 h, 购买后适应性饲养 1 周开展试验, 动物自由采食, 饮水。

### 1.3 试验动物分组

经过约一周的适应性喂养后, 随机分成 3 组。正常对照组 20 只, DSS 损伤组 20 只, 谷维素保护组 20 只。正常对照组每日自由饮水摄食, DSS 损伤组, 第 1、2 d 自由饮水, 第 3 d 开始每日自由饮用 1.0% DSS 溶液, 替代饮用水, 自由进食饲料, 损伤 12 d; 谷维素保护组, 试验第 1、2 d 灌胃 150 mg/kg 谷维素 1 次, 自由进食饮水, 第 3 d 开始, 继续灌胃谷维素, 饮用 1.0% DSS 溶液, 替代饮用水, 自由进食饲料, 损伤 12 d, 治疗 14 d。

### 1.4 疾病活动指数 (DAI) 的评分

每天观察小鼠的精神状态、活动情况、毛发光泽度、大便性状等。按照 DAI 评分标准进行评估, 每日测量小鼠的体重, 大便性状和潜血情况, 并记录评分<sup>[14]</sup>。DAI = (体重下降分数 + 大便性状分数 + 便血分数) / 3。

表 1 DAI 评分标准

计分	体重下降/%	大便性状	便血
0	<1	正常	阴性
1	1~5	松散	弱阳性
2	5~10	半成形稀	阳性
3	10~20	不成形稀	强阳性
4	>20	水样泻	肉眼便血

### 1.5 小鼠粪便隐血测定

每天同一时间用消毒棉签黏取少量小鼠粪便涂抹

在洁净的载玻片上,滴加邻联甲苯胺 2~3 滴,然后再滴加 3%  $H_2O_2$  数滴,观察粪便颜色变化。隐血结果判断:①阴性:2 min 内颜色无变化;②弱阳性:10 s 后由浅蓝渐渐变为蓝色;③阳性:初现浅蓝褐色,渐渐变成明显蓝褐色;④强阳性:立即呈蓝褐色。

### 1.6 结肠组织髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 检测

取结肠中段组织在冰冷生理盐水中漂洗干净,干燥滤纸吸干,准确称重后,立即用眼科剪剪碎,置于冰浴的玻璃匀浆器中,加入事先预冷的 PBS 后匀浆,然后按重量体积比为 1:9 加匀浆介质制备成 10% 的组织匀浆,按照 MPO 试剂盒测定方法,取待测组织匀浆液 0.9 mL 加 3 号试剂 0.1 mL,充分混匀后,37 °C 水浴 15 min,再加入试剂 70.5 mL,混匀,60 °C 水浴 10 min,取出后测定各管 OD (460 nm) 值。计算公式: MPO 单位/克组织 = (测定管 OD 值 - 对照管 OD 值) / 11.3 × 取样量 (克) 注: 11.3 为斜率的倒数; 取样量为取样中所含组织匀浆的量 (克)。

### 1.7 结肠组织丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测

MDA 测定采用硫代巴比妥酸比色法,试剂盒由南京建成生物工程研究所提供,试验操作严格按说明书进行。

### 1.8 血浆硝酸盐/亚硝酸盐含量检测

NO 非常不稳定,会形成亚硝酸盐 ( $NO_2^-$ ) 和硝酸盐 ( $NO_3^-$ )。取小鼠血液,1000 r/min 离心,取上清血清,按照 NO 试剂盒说明操作测试 NO 含量。计算公式:  $NO_2^-/NO_3^- (\mu M) = (\text{测量 OD 值} - \text{空白 OD 值}) / (\text{标准品 OD 值} - \text{空白 OD 值}) \times \text{标准品浓度} (20 \mu\text{mol/L}) \times \text{样品测试前稀释倍数}$ 。

### 1.9 ELISA 法检测血浆炎症因子的含量

肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 1 $\beta$  (interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白细胞介素 2 (interleukin 6, IL-2)、白细胞介素 6 (interleukin 6, IL-6)、白细胞介素 8 (interleukin 8, IL-8) 和干扰素  $\gamma$  (interferon, IFN- $\gamma$ ) 是重要的炎症因子。取小鼠血液离心,取上清液。设立对照组孔、DSS 组孔、谷维素保护组孔,每组三个重复,严格按照说明步骤操作。绘出标准曲线,测得血浆中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6、

IL-8 和 IFN- $\gamma$  的含量。

### 1.10 荧光定量 PCR 检测小鼠结肠组织炎症因子 mRNA 表达水平

Trizol 提取各组小鼠结肠中段组织中总 mRNA,0.8% 的琼脂糖胶电泳检测 RNA 完整性并测其浓度,用逆转录试剂盒将 RNA 合成 cDNA 后进行扩增反应。RT-PCR 反应条件为: 94 °C, 3 min; 94 °C, 30 s; 60 °C, 40 s; 72 °C, 1 min; 40 个循环。TNF- $\alpha$  上游引物: 5'CAA AAT TCG AGT GAC AAG CCT G3', 下游引物: 5'GAG ATC CAT GCC GTT GGC3'; IL-6 上游引物: 5'ATG GAT GCT ACC AAA CTG GAT3'; 下游引物: 5'TGA AGG ACT CTG GCT TTG TCT3'; IL-1 $\beta$  上游引物 5'GAG CAC CTT CTT TTC CTT CAT CTT 3', 下游引物 5'TCA CAC ACC AGC AGG TTA TCA TC 3'; IL-2 上游引物 5'AAG CTC TAC AGC GGA AGC AC 3', 下游引物 5'TCA TCG AAT TGG CAC TCAA 3'; IL-6 上游引物 5'ATG GAT GCT ACC AAA CTG GAT 3', 下游引物 5'TGA AGG ACT CTG GCT TTG TCT 3'; IL-8 上游引物 5'TAC TCC AAA CCT TTC CAC CC 3', 下游引物 5'CCT ACA ACA GAC CCA CAC AAT 3'; IFN- $\gamma$  上游引物 5'TGC ATC TTG GCT TTG CAG CTC TTC CTC ATG GC3', 下游引物 5'TGG ACC TGT GGG TTG TTG ACC TCA AAC TTG GC3';  $\beta$ -actin 上游引物 5'CCA TAA ACG ATG CCG GA3', 下游引物 5'CAC CAC CCA TAG AAT CAA GA3'。

### 1.11 Western blotting 分析小鼠结肠组织炎症因子蛋白表达水平

小鼠结肠中段组织加液氮研磨成粉末,用含 PMSF 的 RIPA 裂解液裂解后离心,取上清液。取 2  $\mu$ l 蛋白裂解液,直接采用 Nanodrop 仪测定蛋白浓度,取 20  $\mu$ g 的蛋白质样品进行 SDS/PAGE 凝胶电泳,再转移到硝酸纤维素膜上。将硝酸纤维素膜在含有 5% 的脱脂牛奶的 PBST 中封闭 1 h。一抗孵育过夜 (一抗按 1:1000 稀释),孵育后用 PBST 清洗 4 次,二抗孵育 (稀释比例为 1:1000)。继续 PBST 清洗 4 次。加入化学发光底物, X 光片曝光、显影、定影显示阳性条带,样本结果用看家蛋白  $\beta$ -actin 条带作为内对照校正。

### 1.12 统计分析

试验数据用 SPSS 17.0 统计软件进行处理,数据结果以均数  $\pm$  标准差 (means  $\pm$  SD) 的形式表示,组间比

较采用方差分析和 t 检验,  $p < 0.05$  有显著差异,  $p < 0.01$  有极显著差异。

## 2 结果

### 2.1 谷维素对 DSS 诱导小鼠表型的影响

通过使 C57BL6 小鼠自由饮用 1.0% DSS 溶液建立结肠炎模型, 正常对照组小鼠生长及生活状况良好, 体毛有光泽, 无血便, 饮水进食正常; DSS 损伤组小鼠饮用 DSS 溶液 4~6 d 后, 小鼠粪便隐血呈弱阳性, 大便松散, 第 8 d 体重明显下降, 隐血试验强阳性, 便秘, 并伴随小鼠活动明显减少、拱背、厌食、体毛光泽度下降, 第 9 d 出现肉眼血便, DAI 评分急剧上升, 无 1 例死亡; 相对于 DSS 组小鼠, 谷维素组小鼠症状明显减轻, 平均体重从  $18.53 \pm 1.17$  g 增加至  $20.51 \pm 2.40$  g (正常对照组为  $24.05 \pm 1.74$  g), 统计学分析显示具有显著性差异,  $p < 0.01$  (见图 1)。试验结果显示谷维素能明显改善 DSS 诱导的结肠炎小鼠的宏观表型, 谷维素组小鼠血便的比率显著降低, 体毛的光泽度有明显改善, 相对于 DSS 组, 小鼠活动增加, 同时小鼠的体重的增加提示谷维素能改善 DSS 小鼠的整体健康状况。

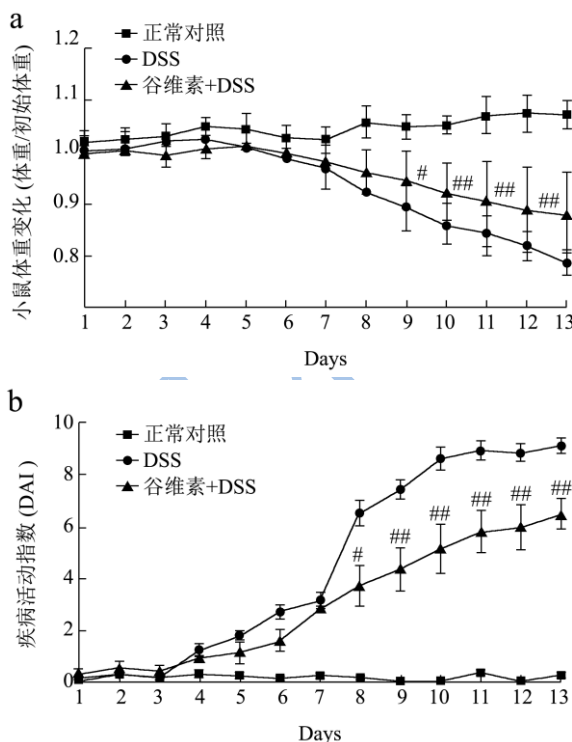


图 1 谷维素对 DSS 诱导结肠炎小鼠表型的影响。

Fig.1 Effect of oryzanol on the phenotype of mice with DSS-induced colitis

注: #:  $p < 0.05$ , ##:  $p < 0.01$ 。

### 2.2 谷维素对 DSS 诱导小鼠结肠的影响

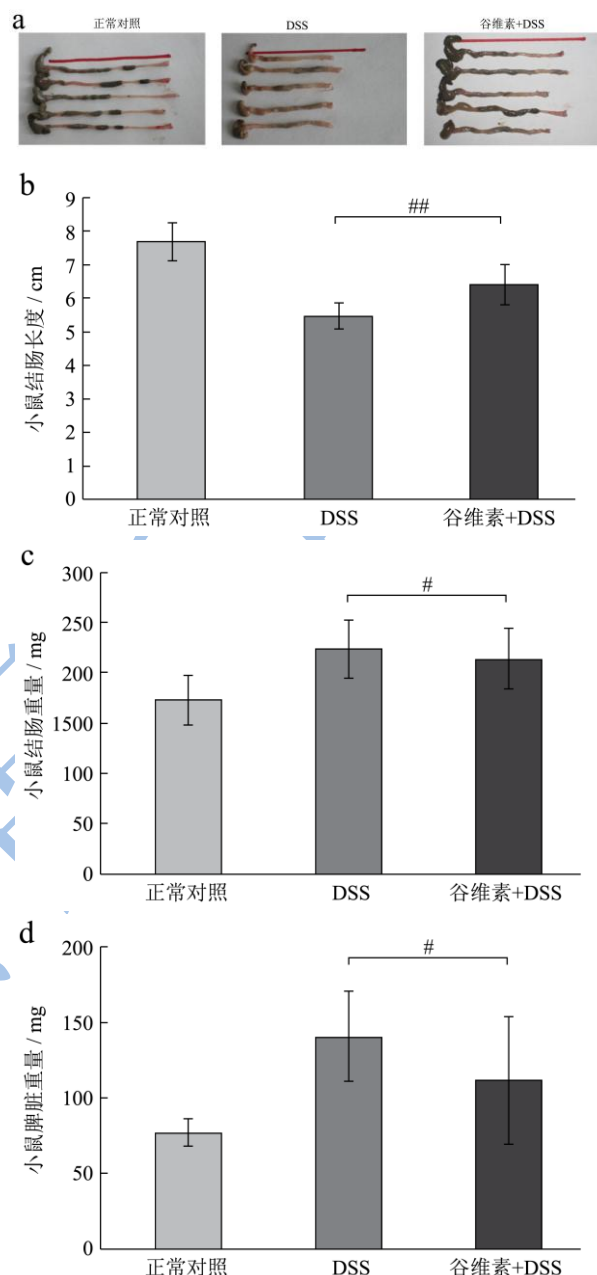


图 2 谷维素对 DSS 诱导的小鼠结肠炎的保护作用

Fig.2 Protective effect of oryzanol on DSS-induced colitis in mice

注: #:  $p < 0.05$ , ##:  $p < 0.01$ 。

DSS 诱导小鼠产生结肠炎症, 引起的结肠充血、水肿, 结肠肠壁增厚、生成溃疡面等都会增加结肠的重量, 并且使结肠长度缩短, 因此, 结肠长度、结肠重量能直接反映结肠炎患病程度和药物的疗效。试验完成后, 脱臼处死小鼠, 迅速剖腹, 取出完整结肠, 去除残留粪便, 对结肠进行称重和长度测量。经测量三组小鼠结肠长度分别为:  $7.66 \pm 0.61$  cm、 $5.46 \pm 0.41$

cm 和  $6.41 \pm 0.61$  cm, 统计学分析显示: DSS 诱导后, 小鼠结肠出现明显水肿, 长度明显缩短; 谷维素保护组小鼠能明显减少 DSS 造成的结肠缩短, 差异极显著 ( $p < 0.01$ )。正常对照组、DSS 组及谷维素保护组小鼠结肠重量分别为:  $173.3 \pm 24.7$  mg、 $224.6 \pm 28.3$  mg 和  $212.9 \pm 30.2$  mg, 谷维素能显著降低小鼠结肠重量的增加,  $p < 0.01$ , 见图 2。同时, 也发现 DSS 也导致小鼠脾脏肿大, 重量增加, 谷维素同样对小鼠脾脏的炎症具有部分的抑制作用。

### 2.3 谷维素对 DSS 诱导小鼠结肠组织病理特征的影响

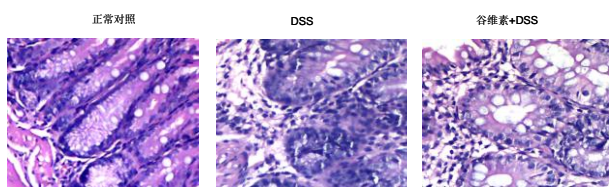


图 3 谷维素减少小鼠结肠组织炎症细胞的浸润

Fig.3 Oryzanol mediated reduction of inflammatory cell infiltration in colon tissue of mice

将各组小鼠结肠中段组织切片进行 HE 染色, 置于光镜下观察, 可明显观察到 DSS 损伤组小鼠结肠上皮粘膜糜烂, 损伤严重, 腺体隐窝结构被 DSS 破坏, 淋巴细胞及伴中性粒细胞等浸润, 杯状细胞丢失, 防治组小鼠结肠损伤明显减轻, 上皮结构相对完整, 隐窝结构完整, 排列比较整齐, 炎症细胞浸润得到缓解。

### 2.4 谷维素对 DSS 诱导小鼠 MPO、MDA 和亚硝酸盐的影响

MPO 是中性粒细胞的功能标志和激活标志, 其水平及活性变化代表着嗜中性多形核白细胞 (PMN) 的功能和活性状态。提取小鼠结肠组织蛋白, 测定 MPO 活性, 发现 DSS 刺激后, 小鼠结肠组织 MPO 活性从  $8.12 \pm 2.43$  IU/g 上升到  $21.52 \pm 4.78$  IU/g, 提示结肠组织中性粒细胞明显激活; 谷维素则能下调结肠组织 MPO 活性至  $14.56 \pm 3.29$  IU/g, 具有统计学差异,  $p < 0.01$ , 见图 4a。

丙二醛 (MDA) 是膜脂过氧化的终产物之一, 其含量高低可以作为考察细胞受损程度的指标之一。采用 MDA 试剂盒测定其活性, 发现 DSS 刺激小鼠后, 小鼠结肠组织 MDA 含量从  $1.44 \pm 0.35$  nmol/mg 上升到  $4.56 \pm 1.67$  nmol/mg, 说明 DSS 刺激导致了结肠组织细胞严重受损; 谷维素则能下调结肠组织 MDA 含量至

$3.25 \pm 1.29$  nmol/mg, 与 DSS 组比, 具有显著性差异,  $p < 0.05$ , 见图 4b。

NO 是机体炎症时释放的重要炎症因子, 其化学性质极不稳定, 在炎症组织形成亚硝酸盐, 进一步氧化形成硝酸盐, 随血液循环到达血浆。通过测定小鼠血浆中的亚硝酸盐含量 (测定时将硝酸盐还原成亚硝酸盐), 发现 DSS 刺激小鼠后, 小鼠结肠组织亚硝酸盐含量从  $1.82 \pm 0.66$   $\mu$ M 上升到  $6.32 \pm 2.54$   $\mu$ M, 提示 DSS 刺激导致了结肠组织细胞产生了 iNOS 酶, 进而产生了大量的 NO; 谷维素则能下调结肠组织亚硝酸盐含量至  $4.42 \pm 2.25$  nmol/mg, 与 DSS 组比, 下调了 30%, 具有显著性差异,  $p < 0.05$ , 见图 4c。

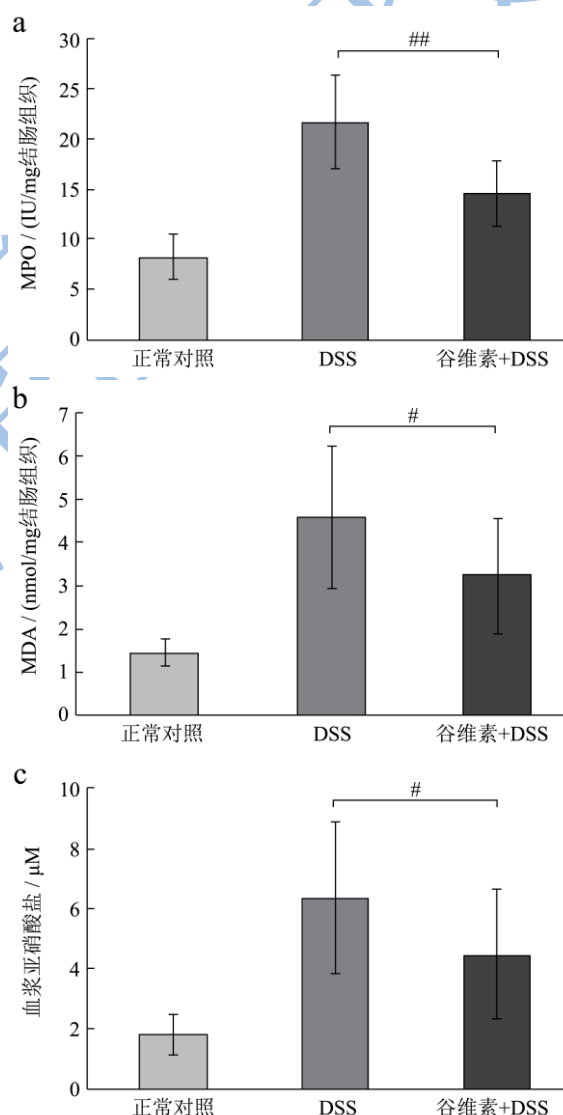


图 4 谷维素对 DSS 诱导小鼠 MPO、MDA 和亚硝酸盐的影响。

Fig.4 Effects of oryzanol on MPO, MDA, and nitrite in mice with DSS-induced colitis

注: #:  $p < 0.05$ , ##:  $p < 0.01$ 。

### 2.5 谷维素对 DSS 诱导小鼠血浆炎症因子的

影响

采用小鼠 ELISA 试剂盒检测血浆中炎症因子的含量, 相对于正常对照组, 发现 DSS 组小鼠血浆中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 和 IFN- $\gamma$  含量均明显上调, 分别增加了 6.73 倍、7.43 倍、5.63 倍、5.52 倍和 2.85 倍, 均具有极显著的差异, 但 IL-2 无显著性改变。与 DSS 组比, 谷维素保护组血浆中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 和 IFN- $\gamma$  含量则明显下降, 分别下降了 56.4%、62.7%、59.6%、45.3% 和 42.7%, 统计学分析均具有显著性差异 ( $p < 0.01$  或  $p < 0.05$ , 见图 5)。

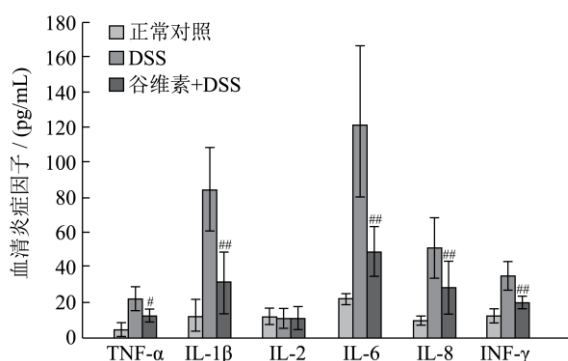


图 5 谷维素对 DSS 诱导小鼠血浆炎症因子的影响。

Fig.5 Effect of oryzanol on the inflammatory factors in plasma of mice with DSS-induced colitis

注: #:  $p < 0.05$ , ##:  $p < 0.01$ 。

## 2.6 谷维素对 DSS 诱导小鼠结肠组织炎症因子

表达的影响

取各组小鼠结肠组织提取总 RNA, RT-qPCR 分析组织中炎症因子 mRNA 表达水平, 结果发现 DSS 导致结肠组织炎症因子 mRNA 表达水平显著升高, 与正常对照组比, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$  和 IL-6 分别上升 8.46、5.25、7.28 和 3.76 倍, 均具有极显著的差异 ( $p < 0.01$ )。与 DSS 组比, 谷维素保护组结肠组织炎症因子 mRNA 表达水平则明显下降, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$  和 IL-6 分别下降了 38.1%、28.0%、36.1% 和 20.3%, 统计学分析均具有显著性差异 ( $p < 0.01$  或  $p < 0.05$ , 见图 6)。提取小鼠结肠组织总蛋白, Western blotting 分析显示 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$  和 IL-6 蛋白表达水平在 DSS 刺激下明显上升, 而谷维素则能部分抑制这些炎症因子的蛋白表达, 进一步证实了谷维素能抑制小鼠结肠组织炎症因子的表达, 见图 7。

Cox-2 能促进前列腺素的合成, 参与机体的炎症反应, 在正常状态下细胞内的活性极低。DSS 诱导促使小鼠结肠组织 Cox-2 mRNA 表达。Western blotting

分析进一步确定了谷维素能抑制 Cox-2 蛋白表达。NO 是体内重要的信号分子和炎症介质, 在炎症反应中起重要作用。急性炎症反应发生时, 细胞免疫系统中大量中性粒细胞和少量巨噬细胞在细胞因子或内毒素的诱导下促使 iNOS, 由精氨酸转化产生大量 NO。DSS 诱导促使小鼠结肠组织 iNOS mRNA 表达, Western blotting 也证实了能促进 iNOS 蛋白表达; 谷维素能显著抑制小鼠结肠组织 iNOS 蛋白和 mRNA 表达。(见图 6 和图 7)。

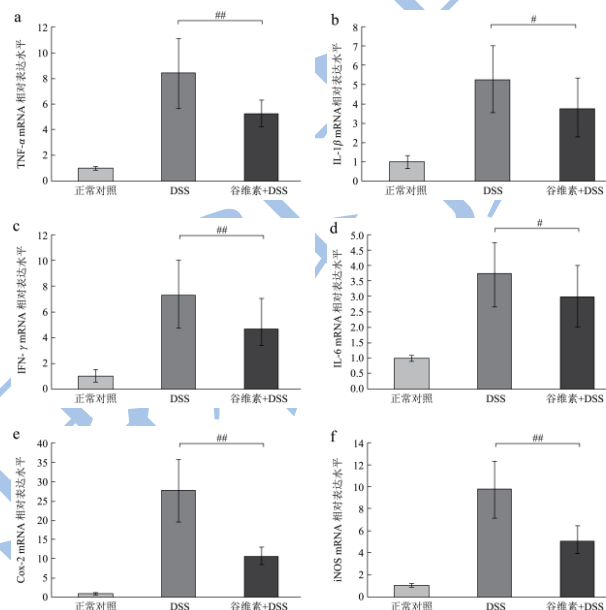


图 6 谷维素对 DSS 诱导小鼠结肠组织炎症因子 mRNA 表达的影响

Fig.6 Effect of oryzanol on mRNA expressions of the inflammatory factors in colonic tissues of mice with DSS-induced colitis

注: #:  $p < 0.05$ , ##:  $p < 0.01$ 。

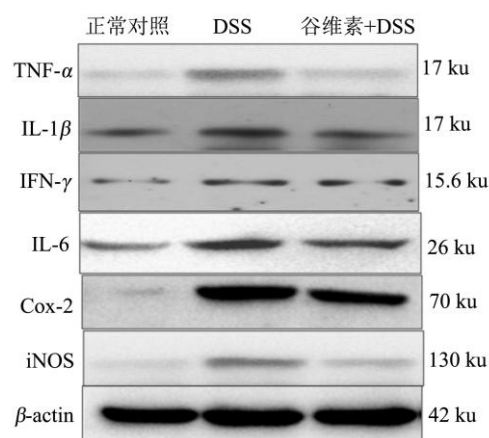


图 7 谷维素对 DSS 诱导小鼠结肠组织炎症因子蛋白表达的影响

Fig.7 Effect of oryzanol on the protein expression of inflammatory factors in colonic tissues of mice with DSS-induced colitis.

### 3 讨论

溃疡性结肠炎是一种肠道慢性非特异性炎症性疾病, 病变主要累及粘膜和粘膜下层, 多累及直肠和远端结肠, 可向近端扩展至全结肠, 临床主要表现为腹泻、腹痛和粘液脓血便, 其发病机制尚不清楚<sup>[14]</sup>。本试验采用小鼠饮 DSS 溶液, 成功的建立了溃疡性结肠炎小鼠模型。结肠炎小鼠体毛光泽变暗, 少数出现便血, 体重明显减轻, 隐血试验强阳性, 便秘, 并伴随小鼠活动明显减少等, 其炎症特征与其它学者发现的表型一致<sup>[15]</sup>。增加谷维素灌胃, 小鼠上述指标均得到明显改善, 说明谷维素具有明显的抗小鼠结肠炎的作用。阿魏酸是谷维素重要组分之一, 在 DSS 刺激小鼠结肠炎模型中, 植物甾醇阿魏酸盐对炎症也具有明显的抑制作用, 减轻隐窝变形和丢失, 降低杯状细胞损伤和炎症细胞的浸润<sup>[15]</sup>。本研究发现谷维素能抑制 DSS 刺激小鼠结肠组织炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、Cox-2 mRNA 表达, 与 Islam 等发现一致<sup>[15]</sup>, 我们通过 Western blotting 进一步证实谷维素也能抑制小鼠结肠炎症组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、Cox-2 蛋白表达。本研究还发现谷维素能抑制其它炎症因子如 IFN- $\gamma$  和 IL-8 表达, 并且发现谷维素能降低小鼠血浆 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 和 IFN- $\gamma$  炎症因子表达浓度。NO 也是重要的炎症因子, 本研究新发现谷维素能下调小鼠结肠炎症组织 iNOS 表达, 也能下调血浆中硝酸盐浓度, 进一步证实了谷维素能抑制炎症组织 NO 的释放。

小鼠结肠炎症会导致炎症细胞的广泛浸润, MPO 是中性粒细胞的功能标志和激活标志, 其水平及活性变化代表着嗜中性多形核白细胞 (PMN) 的功能和活性状态, 其主要功能是在吞噬细胞内杀灭微生物, 利用过氧化氢和氯离子产生次氯酸盐, 并形成具有氧化能力的自由基<sup>[16]</sup>。本研究发现谷维素能抑制 MPO 活性, 提示谷维素能在水平抑制细胞的激活。丙二醛 (MDA) 是膜脂过氧化的终产物之一, 其含量高低可以作为考察细胞受损程度的指标之一, 小鼠结肠炎症会导致肠上皮细胞的损伤, 本研究新发现谷维素能降低结肠组织 MDA 的含量, 减少膜脂过氧化和生物膜结构损伤, 改变膜的通透性, 说明谷维素对肠细胞具有保护作用。

谷维素 DSS 刺激小鼠结肠组织中炎症因子是其抗炎的最重要机制。Sakai S 等发现在牛动脉内皮细胞中谷维素能抑制 NF- $\kappa$ B 的活化, 减少细胞粘附分子 VCAM-1 和 ICAM-1, 下调肠内皮细胞粘附分子表达将提升结肠粘膜的通透性, 减轻结肠水肿与肠道细菌

的入侵等<sup>[17]</sup>。同时, 在炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6 和 IL-8 基因的启动子区域均存在 NF- $\kappa$ B 的结合位点, 在 LPS 诱导巨噬细胞 Raw264.7 炎症模型中, 谷维素的多个组分能抑制巨噬细胞 RAW264.7 转录因子 NF- $\kappa$ B p65 亚基的核移位, 阻断其下游靶分子的转录表达, 提示在 DSS 刺激小鼠结肠炎症的模型中, 谷维素可能通过 NF- $\kappa$ B 抑制炎症因子的表达。谷维素如何影响 NF- $\kappa$ B 的活性, 目前尚不清楚, 但研究发现谷维素具有较强的抗氧化活性, NF- $\kappa$ B 活性氧的调控, 又称为氧应激转录因子, 提示谷维素可能通过其抗氧化作用降低 NF- $\kappa$ B 活性, 除此之外, 是否还存在其它机制? 特别是谷维素如何从细胞外进入细胞内? 进入细胞内如何发挥作用尚需进一步深入研究。

### 4 结论

溃疡性结肠炎临床上采用的药物治疗很难断根, 呈现反复发作, 且毒副作用很强, 谷维素具有抗结肠炎作用与无毒副作用的特性将为结肠炎患者的防治开辟新的思路。虽然谷维素的抗炎机理以前并不清楚, 但在临床上作为抗炎的辅助药物已有应用, 徐百胜等采用谷维素、柳氮磺吡啶联用治疗溃疡性结肠炎, 也发现谷维素能增强抗炎的疗效<sup>[18]</sup>。本研究发现谷维素抑制小鼠结肠炎症组织炎症因子的表达和降低炎症因子在血浆的浓度, 显著减少炎症细胞的浸润和结肠组织结构的损伤, 对小鼠结肠炎症具有明显的抑制作用。谷维素可作为一种抗炎肠的辅助药物, 同时, 将谷维素添加到食品, 可开发预防肠炎的功能性食品或保健食品。

### 参考文献

- [1] YOON S W, PYO Y G, LEE J, et al. The concentrations of tocopherols and  $\gamma$ -oryzanol compounds in rice bran oil obtained by fractional extraction with supercritical carbon dioxide [J]. *J. Oleo Sci.*, 2014, 63(1): 47-53
- [2] ALADEDUNYE F, PRZYBYLSKI R, RUDZINSKA M, et al.  $\gamma$ -Oryzanol of North American Wild Rice (*Zizania palustris*) [J]. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 2013, 90(8): 1101-1109
- [3] KIM S P, KANG M Y, NAM S H, et al. Dietary rice bran component  $\gamma$ -oryzanol inhibits tumor growth in tumor-bearing mice [J]. *Mol. Nutr. Food Res*, 2012, 56(6): 935-944
- [4] MISHRA R, SHARMA H K, et al. Effect of frying conditions on the physico-chemical properties of rice bran oil and its blended oil [J]. *J. Food Sci. Technol*, 2014,

- 51(6): 1076-1084
- [5] CAMPBELL S E, STONE W L, WHALEY S G, et al. Gamma tocopherol upregulates peroxisome proliferator activated receptor gamma expression in SW480 human colon cancer cell lines [J]. *BMC Cancer*, 2003, 3: 25-31
- [6] SMOLAREK A K, SO J Y, BURGESS B, et al. Dietary administration of  $\delta$ - and  $\gamma$ -tocopherol inhibits tumorigenesis in the animal model of estrogen Receptor-Positive, but not HER-2 breast cancer [J]. *Cancer Prev. Res.*, 2012, 5(11): 1310-1320
- [7] CANDIRACCI M, JUSTO ML, CASTANO A, et al. Rice bran enzymatic extract-supplemented diets modulate adipose tissue inflammation markers in Zucker rats [J]. *Nutrition*, 2014, 30(4): 466-472
- [8] 刘远锦,田媛媛,刘博,等. $\gamma$ -谷维素对脂多糖诱导的巨噬细胞炎症因子表达的影响[J].*食品科学*, 2015, 36(19): 238-243  
LIU Yuan-jin, TIAN Yuan-yuan, LIU Bo, et al. The effect of  $\gamma$ -oryzanol on inflammatory factor expressions in the lipopolysaccharide-induced macrophage [J]. *Food Sci.*, 2015, 36(19): 238-243
- [9] ORDAS I, ECKMANN L, TALAMINI M, et al. Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2012, 380(9853): 1606-1619
- [10] NG S C, CHAN F K, SUNG J J. The role of non-biological drugs in refractory inflammatory bowel disease [J]. *Aliment Pharmacol Ther.*, 2011, 33(4): 417-427
- [11] KHALILI H, HIGUCHI L M, ANANTHAKRISHNAN A N, et al. Hormone therapy increases risk of ulcerative colitis but not Crohn's disease [J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(5): 1199-1206
- [12] FANG K, BRUCE M, PATTILLO C B, et al. Temporal genomewide expression profiling of DSS colitis reveals novel inflammatory and angiogenesis genes similar to ulcerative colitis [J]. *Physiol. Genomics*, 2011, 43(1): 43-56
- [13] GOTO H, TAKEMURA N, OGSAWARA T, et al. Effects of fructo-oligosaccharide on DSS-induced colitis differ in mice fed nonpurified and purified diets [J]. *J. Nutr.*, 2010, 140(12): 2121-2127
- [14] GRIVENNIKOV S I, GRETEN F R, KARIN M. Immunity, inflammation, and cancer [J]. *Cell*, 2010, 140(6): 883-899
- [15] ISLAM M S, MURATA T, FUJISAWA M, et al. Anti-inflammatory effects of phytosteryl ferulates in colitis induced by dextran sulphate sodium in mice [J]. *Br. J. Pharmacol.*, 2008, 154(4): 812-824
- [16] LAU D, BALDUS S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease [J]. *Pharmacol. Ther.*, 2006, 111(1): 16-26
- [17] SAKAI S, MURATA T, TSUBOSAKA Y, et al.  $\gamma$ -Oryzanol reduces adhesion molecule expression in vascular endothelial cells via suppression of nuclear factor- $\kappa$ B activation [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60(13): 3367-3372
- [18] 徐百胜.谷维素、柳氮磺吡啶联用治疗溃疡性结肠炎的疗效观察[J].*临床和实验医学杂志*,2011,2(1):127-128  
XU Bai-sheng. Observing curative effect of combining oryzanol and willow nitrogen sulfonyl pyridine in treatment of ulcerative colitis [J]. *Clin. Lab. Med.*, 2011, 2(1): 127-128