

# 鼠尾草酸对葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠溃疡性结肠炎的改善作用

焦鑫鑫<sup>1</sup>, 许敏<sup>2</sup>, 吴华<sup>1</sup>, 刘梓萱<sup>1</sup>, 肖俊松<sup>2\*</sup>

(1. 北京工商大学化学与材料工程学院, 北京 100048)

(2. 北京市食品添加剂工程技术研究中心(北京工商大学), 北京 100048)

**摘要:** 研究了鼠尾草酸(CA)对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的小鼠溃疡性结肠炎(UC)的改善作用。小鼠自由饮用含3% DSS的蒸馏水,连续7 d造模。将60只小鼠随机分为5组:空白对照组(CK)、DSS模型组(DSS)、鼠尾草酸低剂量组(CAL)、鼠尾草酸高剂量组(CAH)、美沙拉嗪组(PC)。通过小鼠体质量变化、疾病活动指数(DAI)评分、结肠组织病理学和肠道通透性变化评估CA对UC小鼠的干预作用。通过测定结肠组织髓过氧化物酶(MPO)活性、超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量、紧密连接蛋白ZO-1和Occludin的表达及肠道菌群组成的变化探讨可能的影响机制。与DSS组相比,CA干预降低了UC小鼠的质量损失和DAI评分,改善了结肠组织病理损伤。同时,CAL和CAH组结肠组织MPO活性显著降低,MDA含量分别降低了13.75%、70.00% ( $P<0.05$ ),SOD活性分别升高了6.12倍、9.62倍 ( $P<0.05$ ),肠道通透性显著降低,ZO-1和Occludin蛋白的表达得到恢复。50 mg/kg  $m_0$ 的CA灌胃提高了厚壁菌门和拟杆菌门的丰度比值,恢复了DSS诱导的UC小鼠中 *Akkermansia* 等有益菌属的丰度下降,降低了 *Alistipes* 等有害菌属的相对丰度。CA对UC具有良好的改善作用,其机制可能与降低氧化应激水平、保护肠屏障和调控肠道微生物组成有关。

**关键词:** 鼠尾草酸; 溃疡性结肠炎; 氧化应激; 肠道通透性; 肠道菌群

文章编号: 1673-9078(2024)03-18-27

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.3.0353

## Ameliorative Effects of Carnosic Acid on Dextran Sulfate Sodium-induced Ulcerative Colitis in Mice

JIAO Xinxin<sup>1</sup>, XU Min<sup>2</sup>, WU Hua<sup>1</sup>, LIU Zixuan<sup>1</sup>, XIAO Junsong<sup>2\*</sup>

(1.College of Chemistry and Materials Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China) (2.Beijing Engineering and Technology Research Center of Food Additives (Beijing Technology and Business University), Beijing 100048, China)

**Abstract:** The ameliorative effects of carnosic acid (CA) on dextran sodium sulfate (DSS)-induced ulcerative colitis (UC) in mice were assessed. Ulcerative colitis was induced by the oral administration of 3% DSS via distilled drinking water

引文格式:

焦鑫鑫,许敏,吴华,等.鼠尾草酸对葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠溃疡性结肠炎的改善作用[J].现代食品科技,2024,40(3):18-27.

JIAO Xinxin, XU Min, WU Hua, et al. Ameliorative effects of carnosic acid on dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(3): 18-27.

收稿日期: 2023-03-25

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目(6212002); 北京市教委一般项目(KM202010011010)

作者简介: 焦鑫鑫(1997-),女,研究生,研究方向: 芳香植物的综合利用, E-mail: jiaox0822@163.com

通讯作者: 肖俊松(1980-),男,博士,副教授,研究方向: 多酚及其代谢产物对代谢综合症的干预机制, E-mail: xiaoj@th.btbu.edu.cn

for seven days. A total of 60 mice were randomly divided into five groups: blank control (CK), DSS model (DSS), low-dose carnosic acid (CAL), high-dose carnosic acid (CAH), and mesalazine (PC). The ameliorative effects of CA were evaluated based on body weight, disease activity index (DAI) score, colonic histopathology, and changes in intestinal permeability. To investigate the possible mechanism of CA, the activities of myeloperoxidase (MPO) and superoxide dismutase (SOD), the level of malondialdehyde (MDA), the expression level of tight junction proteins, including ZO-1 and occludin, and the changes in intestinal flora in mice were examined. When the CA and DSS groups were compared, CA intervention was found to reduce weight loss and the DAI score and ameliorate the pathological damage in colonic tissues in UC mice. The MPO activity was also found to significantly decrease in the CA groups. The MDA content in the colon tissue was reduced by 13.75% and 70%, respectively ( $P < 0.05$ ), while the SOD activity increased by 6.12- and 9.62-fold, respectively ( $P < 0.05$ ), in the CAL and CAH groups. Notably, the intestinal permeability was significantly reduced, and the expression levels of ZO-1 and occludin were restored. Gavage of 50 mg/kg CA enhanced the abundance ratios of *Firmicutes* and *Bacteroides* and restored the decrease in the abundance of beneficial bacteria, such as *Akkermansia*, caused by DSS. The relative abundance of detrimental bacteria, such as *Alistipes*, was also reduced. Overall, CA may mitigate UC by lowering the levels of oxidative stress, protecting the intestinal barrier, and regulating the composition of the intestinal microbial community.

**Key words:** carnosic acid; ulcerative colitis; oxidative stress; intestinal permeability; intestinal flora

溃疡性结肠炎 (Ulcerative Colitis, UC) 是一种以腹部疼痛、体重下降、出血性腹泻、粪便隐血为主要特征的慢性肠道炎症性疾病<sup>[1]</sup>。UC 是一种常见的消化系统疾病, 若不能得到有效的处理, 将导致 UC 发生恶性转化<sup>[2]</sup>。约有 2% 的大肠癌是由于 UC 引起, 并呈不断增长的趋势。UC 的发生可能与遗传、饮食等环境因素以及宿主细胞与肠道微生物的交互作用等密切相关, 从而引起肠上皮及黏膜下层屏障受损, 进而诱发氧化应激<sup>[3-5]</sup>。氧化应激会激活炎症有关的细胞因子, 从而导致慢性炎症, 这是 UC 治疗进程缓慢的主要原因之一<sup>[6]</sup>。由于肠道中存在着丰富的共生微生物群落, 肠道屏障的完整性对维持机体健康起着关键作用。在 UC 的发病过程中, 由于结肠上皮屏障的溃烂和损伤, 会导致肠道通透性的异常上升, 对肠腔内环境中存在的毒素和有害菌群的防御性能下降, 进而导致宿主的免疫反应发生变化<sup>[7,8]</sup>。研究表明, 肠道内容物微生物多样性的降低是 UC 发病机制的关键指标之一。UC 目前仍缺乏有效的治疗手段, 临床上主要以糖皮质激素及免疫抑制剂为主, 但存在用药复杂、毒副作用大等问题<sup>[9]</sup>。因此, 对治疗 UC 的天然成分相关研究日益增多, 它们被认为是一种替代品或补充品。

鼠尾草酸 (Carnosic Acid, CA) 是唇形科植物如迷迭香、鼠尾草等的次生代谢产物, 具有多种生物学特性如抗氧化、抗炎、抗菌、神经保护、心血管保护和改善代谢综合征等<sup>[10-12]</sup>, 是一种有益于胃肠道健康的膳食植物化学物质, 膳食补充 CA 能改

善许多炎症相关疾病, 如皮炎、胃炎、哮喘和肥胖等<sup>[13-16]</sup>。研究表明, 每日喂食 100 mg/kg 的迷迭香甲醇提取物可显著减轻 DSS 诱导的小鼠结肠炎疾病严重程度并减少炎症浸润<sup>[17]</sup>。陈雪香等<sup>[18]</sup>认为 CA 通过调节肠道微生物群组成和代谢功能发挥对结肠炎小鼠的保护作用。然而迷迭香提取物中含有鼠尾草酸、鼠尾草酚和迷迭香酚等多种成分, 关于 CA 单体对 UC 小鼠肠道氧化应激水平和屏障功能的影响研究较少。

本研究拟以 CA 为研究对象, 利用葡聚糖硫酸钠 (Dextran Sulfate Sodium, DSS) 诱导建立 UC 模型小鼠, 给予 CA 灌胃处理, 选择公认治疗 UC 有明确疗效的美沙拉嗪作为对照, 通过相关指标的测定, 明确其干预作用, 并初步探究其作用机制, 以期 UC 临床药物的研发或补充疗法提供一定的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

鼠尾草酸 (HPLC 60%, 产品批号: S31434)、美沙拉嗪、荧光素异硫氰酸葡聚糖 (FITC-Dextran)、苏木素-伊红 (Hematoxylin-eosin, HE)、4% 多聚甲醛溶液、0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffered Saline, PBS) (pH 值为 7.2~7.4), 上海源叶生物科技有限公司; RIPA 裂解液, 上海碧云天生物技术有限公司; 5% BSA 封闭液, 北京拜尔迪生物技术有限公司; 聚偏二氟乙烯膜 (Polyvinylidene

Fluoride, PVDF), 武汉科昊佳生物科技有限公司; DSS, 瑞禧生物科技有限公司; 髓过氧化物酶 (MPO) 检测试剂盒、脂质氧化 (MDA) 检测试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 检测试剂盒, 北京索莱宝生物科技有限公司; 总蛋白定量测定试剂盒 (BCA 法)、动物粪便隐血检测试剂盒, 南京建成科技有限公司; TIAN amp Stool DNA 试剂盒, 北京天根生化科技有限公司。

## 1.2 仪器与设备

TECAN 多功能酶标仪, 瑞士帝肯集团公司; DG-3D 水平电泳槽、DG-III 双稳数显电泳仪, 北京东林昌盛生物科技有限公司; CFX96 荧光定量 PCR 仪, 上海伯乐生命医学产品有限公司; Tanon 转印电泳槽、Tanon5200 显影仪、QuantiFluor™-ST 微型荧光计, 北京原平皓生物技术有限公司; ROCHE Light Cycler 96 qPCR 仪, 北京汉达森机械技术有限公司。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 溃疡性结肠炎小鼠模型建立

8 周龄雄性 Balb/c 小鼠购自北京维通利华实验动物科技有限公司。饲养于 SPF 级环境, 每日 12 h 光 / 暗交替, 期间饲喂普通小鼠维持饲料, 自由饮水, 适应性喂养 1 周。

将 60 只小鼠随机分为 5 组 ( $n=12$ ): 空白对照组 (CK)、DSS 模型组 (DSS)、鼠尾草酸低剂量组 (CAL)、鼠尾草酸高剂量组 (CAH)、美沙拉嗪组 (PC)。第 1 周所有组给予小鼠标准日粮, CK 组小鼠自由饮水, 其他组均给予含 3% DSS 的饮用水, 持续 7 d。第 2 周起所有组给予标准日粮和正常饮水, 结合 Medicherla 等<sup>[17]</sup>、Du 等<sup>[18]</sup>和邵亚杰<sup>[19]</sup>的给药剂量范围并适当调整。具体地说, CAL 和 CAH 组小鼠每日分别按照 50 mg/kg  $m_b$  和 100 mg/kg  $m_b$  的剂量灌胃鼠尾草酸水溶液, 灌胃体积为 1 mL/100 g  $m_b$ , PC 组小鼠每日按照 200 mg/kg  $m_b$  的剂量进行等体积灌胃美沙拉嗪水溶液, 其他组小鼠灌胃等体积的蒸馏水, 持续 7 d。

所有实验程序均严格遵守《实验动物护理和使用指南》, 并经动物实验伦理委员会批准, 批准编号为 PONY-2020-FL-51。

### 1.3.2 实验样本获取

喂养期间每日测定各组小鼠体质量, 每日收集粪便样品。最后一日粪便样本, 存放于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱, 用

于肠道菌群分析。最后一次给药结束后, 小鼠禁食 4 h, 灌胃质量浓度为 100 mg/mL 的 FITC-Dextran 100  $\mu\text{L}$ 。灌胃 4 h 后, 小鼠用乙醚麻醉, 断头取血。血液样本于室温下避光静置 30 min 后, 于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  3 000 r/min 离心 15 min 后吸取血清, 用于肠道通透性检测。解剖取出结肠后, 用预冷的 PBS 溶液缓慢清洗结肠, 清除其内容物后, 取结肠远端片段约 0.5 cm, 置于 10% 的福尔马林溶液中固定, 用于病理切片。剩余结肠组织液氮冷冻后储存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 一部分用于氧化应激水平的测定, 另一部分用于紧密连接蛋白的测定。

### 1.3.3 小鼠疾病活动指数测定

从造模开始到实验结束, 每日收集粪便样本, 参照文献的方法<sup>[20]</sup>, 观察小鼠粪便形态, 检测粪便隐血。按表 1 评分, 计算疾病活动指数 (Disease Activity Index, DAI)。DAI 指数为 3 个指标评分的均值。

表 1 疾病活动指数评分标准

Table 1 DAI scoring criteria

指标	现象	评分/分
粪便形态	正常形态	0
	稀便	2
	液化粪便	4
便血情况	无便血	0
	轻微便血	2
	严重便血	4
体质量下降率	0%	0
	1%~5%	1
	5%~10%	2
	10%~15%	3
	>15%	4

### 1.3.4 肠道屏障通透性检测

随机获取 4 只小鼠, 通过检测血清中 FITC-Dextran 的荧光强度表征肠道屏障通透性。取 1.3.2 获取的血清 100  $\mu\text{L}$ , 加入到酶标板中, 加入等量 PBS, 混匀, 使用酶标仪测量吸光度。荧光激发波长为 492 nm, 检测波长为 520 nm。

### 1.3.5 结肠组织病理切片及分析

随机获取 3 只小鼠的结肠组织于 10% 福尔马林中固定 24 h, 取出, 依次进行梯度脱水、石蜡包埋、切片。切片厚度为 4  $\mu\text{m}$ 。将切片置于染色架上, 进行 HE 染色。在光学显微镜下观察其结肠组织学形态。



### 1.3.6 氧化应激水平测定

按照 1.3.2 的方法随机获取来自 6 只小鼠的结肠组织，放于 1.5 mL 离心管中，加入 4 °C 预冷的 PBS 作为匀浆介质，使用手持式匀浆机匀浆至视野内无可见组织块，制备成合适浓度的组织匀浆液。采用 BCA (Bicinchoninic Acid) 法测定总蛋白浓度，计算对应的蛋白浓度。取适量组织匀浆，按照试剂盒说明书流程测定 MPO 和 SOD 活性，以及 MDA 水平。

### 1.3.7 结肠紧密连接蛋白表达水平的测定

按照 1.3.2 的方法随机获取来自 3 只小鼠的结肠组织样本，放于 1.5 mL 离心管中，加 RIPA 蛋白裂解液，用手持式匀浆机进行匀浆。匀浆完成后放置冰上充分裂解 30 min、4 °C 12 000 r/min 离心 15 min，收集上清液，采用 BCA 法测定蛋白浓度。每体积的上清液中加入 1/3 体积的上样缓冲液，于 100 °C 水浴 10 min 至蛋白完全变性，随后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳结束后，将蛋白转移到 PVDF 膜上，经 5% BSA 封闭液震荡封闭后，根据所需的蛋白位置对条带进行切割。切割后的条带分别加入 Occludin (1:1 000)、ZO-1 抗体 (1:1 000) 和  $\beta$ -actin (1:3 000)，4 °C 孵育过夜，洗膜后加入二抗 (1:5 000)，常温孵育 1 h，滴加增强型化学发光试剂 (Enhanced Chemiluminescence, ECL) 显色，进行曝光显影后可视化处理。

### 1.3.8 肠道微生物DNA的提取和16S rRNA基因测序分析

参照 TIAN amp Stool DNA 试剂盒说明书，从随机获取的 3 只小鼠粪便样品中提取基因组 DNA。以提取的 DNA 为模板扩增细菌 16S rRNA V3-V4 可变区。从 2% 琼脂糖凝胶中回收所得 PCR 产物并进一步纯化，使用 Quanti Fluor TM-ST 进行定量。样品交由上海美吉生物医药科技有限公司在 Illumina Mi Seq 平台上进行高通量测序。

### 1.4 数据处理与分析

数据的统计分析使用 SPSS 软件。数据以平均值  $\pm$  标准差表示。通过单因素方差分析和事后 Duncan 多重比较法比较组间差异， $P < 0.05$  时表示差异显著。

## 2 结果与讨论

### 2.1 鼠尾草酸对小鼠体质量变化的影响

如图 1 所示，CK 组小鼠体质量在整个实验期

间，体质量增量维持在 1 g 左右，没有太大的变化。其余各组小鼠造模结束后，连续 5 d (第 7~11 天) 体重表现出不同程度的下降。实验结束时，与 CK 组相比，DSS 组小鼠的体质量显著降低 ( $P < 0.05$ )。与 DSS 组相比，CAH 组小鼠体质量总体下降程度相对缓慢，并且在实验结束时恢复至与 CK 组无显著差异的水平，说明按照 100 mg/kg  $m_0$  的剂量灌胃 CA 可以缓解 UC 小鼠体质量减轻的症状。与 DSS 组相比，低剂量的 CA (50 mg/kg  $m_0$ ) 和美沙拉嗪干预后对体质量变化影响较小。

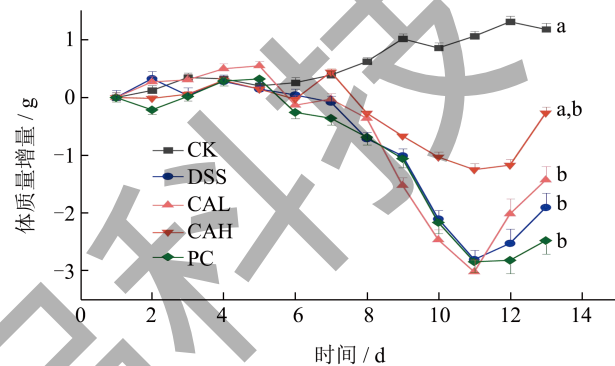


图 1 各组小鼠体质量变化情况

Fig.1 Weight changes of mice in different groups

注： $P < 0.05$  认为具有统计学差异，不同字母代表显著性差异，下同。

### 2.2 鼠尾草酸对小鼠结肠炎严重程度的影响

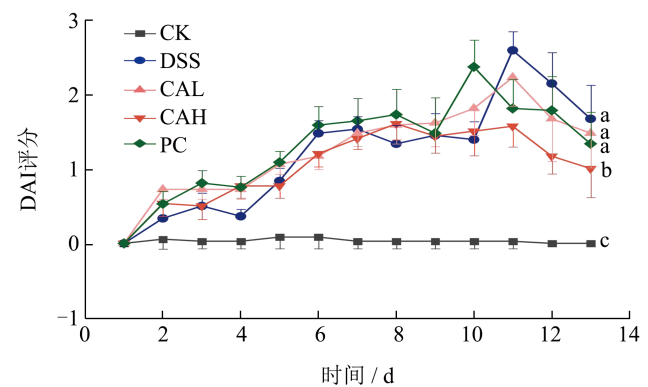


图 2 CA 对溃疡性结肠炎小鼠 DAI 评分的影响

Fig.2 Effect of CA on DAI score in mice with ulcerative colitis

采用 DAI 评分评价小鼠溃疡性结肠炎的严重程度。如图 2 所示，在整个实验期间，CK 组小鼠 DAI 评分基本保持为 0。其余各组小鼠在给予 3% DSS 溶液 7 d 后，DAI 评分均逐渐升高。停止给予 3% DSS 溶液后的第 10~13 天，包括 DSS 组在内的结肠炎小鼠 DAI 评分均下降，说明 UC 小鼠的症状都有所减轻。实验结束时与 DSS 组相比，CAL 组

和 PC 组小鼠 DAI 评分有下降的趋势, 相较各自的 DAI 评分最高值分别下降了 38.82% 和 52.17%, 但未能在实验结束时达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。而 CAH 组小鼠 DAI 评分显著降低 ( $P < 0.05$ ), 相较最高值下降了 40.25%, 说明连续一周每天按照 100 mg/kg  $m_b$  的剂量对 UC 小鼠灌胃 CA 能够显著降低 UC 的严重程度, 结合低剂量 CA 和美沙拉嗪灌胃后的 DAI 评分变化可以推测 50 mg/kg  $m_b$  的 CA 干预也能在一定程度上降低 DAI 评分, 改善 UC 小鼠的便血、稀便等症状。

### 2.3 鼠尾草酸对结肠组织病理学变化的影响

结肠组织病理切片染色结果如图 3 所示。CK 组小鼠黏膜层和黏膜下层完好无损, 上皮细胞排列有序且结构致密 (图 3a), DSS 组小鼠结肠组织学形态出现明显改变, 隐窝萎缩且表面不规则, 排列疏松、开口增宽, 上皮细胞大量脱落, 黏膜内外壁厚薄不均 (图 3b)。与 DSS 组相比, CAL 组和 CAH 组小鼠结肠组织学形态有所改善, 黏膜结构完整, 排列紧密, 上皮细胞脱落明显减轻, 表明两种剂量 (50、100 mg/kg  $m_b$ ) 下 CA 灌胃缓解了 DSS

诱导的病理状态 (图 3c 和 d)。另外, 美沙拉嗪干预后的小鼠结肠组织上皮黏膜损伤也得到明显改善 (图 3e)。

### 2.4 鼠尾草酸对肠道通透性的影响

FITC-Dextran 是一种荧光染料, 不能透过正常的肠道屏障, 但可以透过受损的肠道屏障, 进入血液循环。因此, 通过测定血清中的 FITC-Dextran 质量浓度可以反映肠道屏障的完整性。与 CK 组相比, DSS 组小鼠血清中的 FITC-Dextran 质量浓度高出 4.83 倍左右, 说明 UC 小鼠的结肠黏膜通透性显著升高 ( $P < 0.05$ )。刘瑶等<sup>[21]</sup>采用类似的方法诱导 UC 小鼠模型并检测血清中 FITC-Dextran 的质量浓度, 发现 DSS 模型组小鼠的 FITC-Dextran 质量浓度约为 4 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 是正常对照组的 5.00 倍左右。在分别灌胃 50、100 mg/kg  $m_b$  剂量的 CA 和美沙拉嗪后, UC 小鼠血清中 FITC-Dextran 的质量浓度显著降低 ( $P < 0.05$ ), 恢复到与正常值无显著差异的水平, 说明两种剂量下的 CA 干预起到了和美沙拉嗪相同的效果, 均能显著改善 UC 小鼠肠道屏障的完整性 ( $P < 0.05$ )。

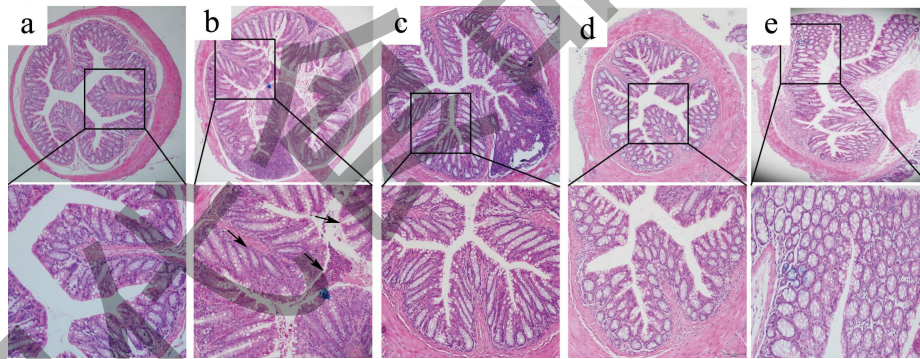


图 3 小鼠结肠组织病理切片 HE 染色图

Fig.3 Histopathological map of HE stain of mice colon

注: (a) CK 组; (b) DSS 组; (c) CAL 组; (d) CAH 组; (e) PC 组。均放大 200 倍。

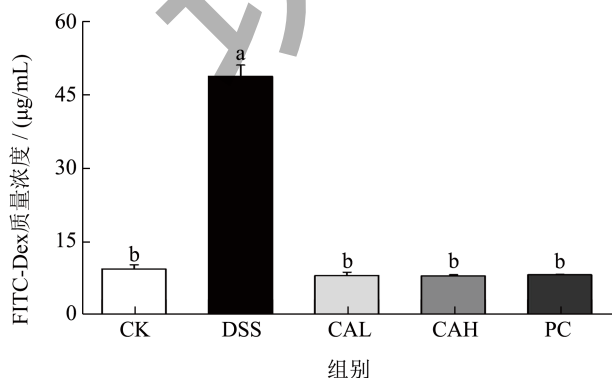


图 4 各组小鼠血清 FITC-Dextran 质量浓度

Fig.4 Serum FITC-Dextran mass concentration in different group

### 2.5 鼠尾草酸对氧化应激的影响

MPO 活性升高是结肠组织发生炎症浸润的指标, 被广泛用作肠道炎症的标志。从图 5a 可以看出 DSS 诱导的 UC 小鼠结肠中 MPO 活性相较 CK 组升高了 190.70% ( $P < 0.05$ ), 而给药后 MPO 活性均显著降低 ( $P < 0.05$ ), 说明两种剂量的 CA 灌胃与美沙拉嗪干预均可以显著改善 UC 小鼠的炎症水平。UC 发病过程中, 炎症细胞浸润肠腔, 引起活性氧的产生和释放, 当机体的抗氧化物质无法消除多余的活性氧时, 肠黏膜内氧化还原平衡被打破, 过量的活性氧物质会破坏核酸、蛋白等生物大分子,

并引起脂质过氧化,产生MDA等有害物质<sup>[22]</sup>。与CK组相比,DSS组小鼠结肠中MDA含量升高了133.33% ( $P<0.05$ ),同时SOD活性降低了85.63% ( $P<0.05$ )。连续一周每天分别按照50、100 mg/kg  $m_b$ 的剂量进行CA灌胃,UC小鼠结肠组织中MDA的含量分别降低了13.75%、70.00% ( $P<0.05$ ),抗氧化酶SOD的活性分别升高了6.12倍、9.62倍 ( $P<0.05$ )。与此结果类似,曹静等<sup>[23]</sup>研究了鼠尾草酸对庆大霉素(GM)诱导的急性肾损伤模型大鼠的作用,发现分别灌胃50、100、200 mg/kg  $m_b$ 剂量的CA能够以剂量依赖的方式显著降低急性肾损伤大鼠肾脏组织中MDA含量同时升高SOD的活性 ( $P<0.05$ ),这些结果说明CA可以起到抗氧化的作用,改善UC小鼠的氧化应激水平。

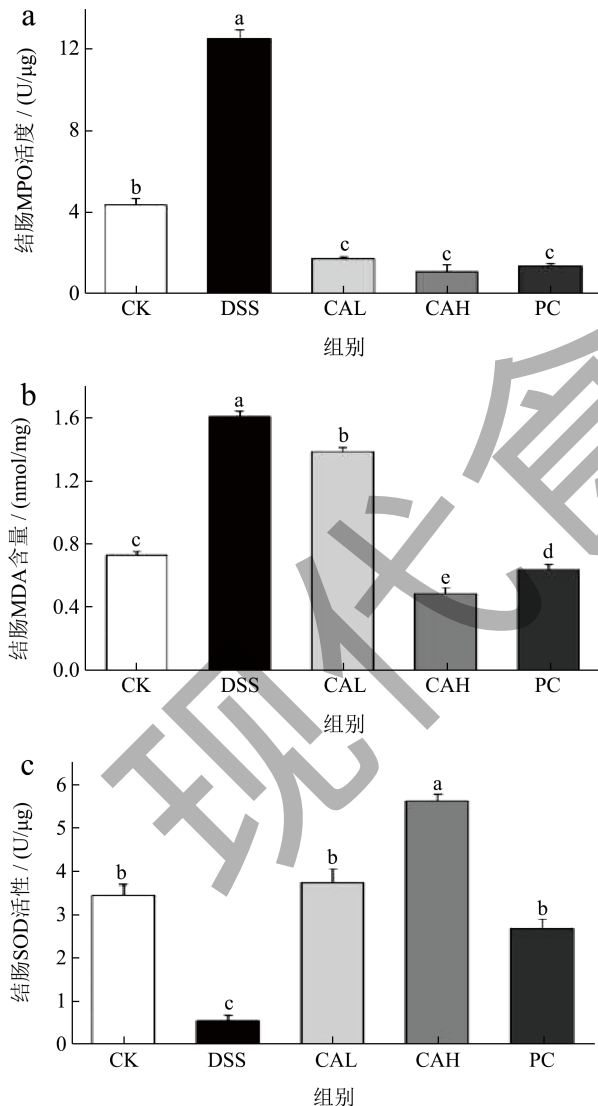


图5 各组小鼠氧化应激水平

Fig.5 Oxidative stress level in different group

注:(a) 结肠 MPO 活性;(b) 结肠 MDA 含量;(c) 结肠 SOD 活性。

## 2.6 鼠尾草酸对肠道屏障紧密连接蛋白表达的影响

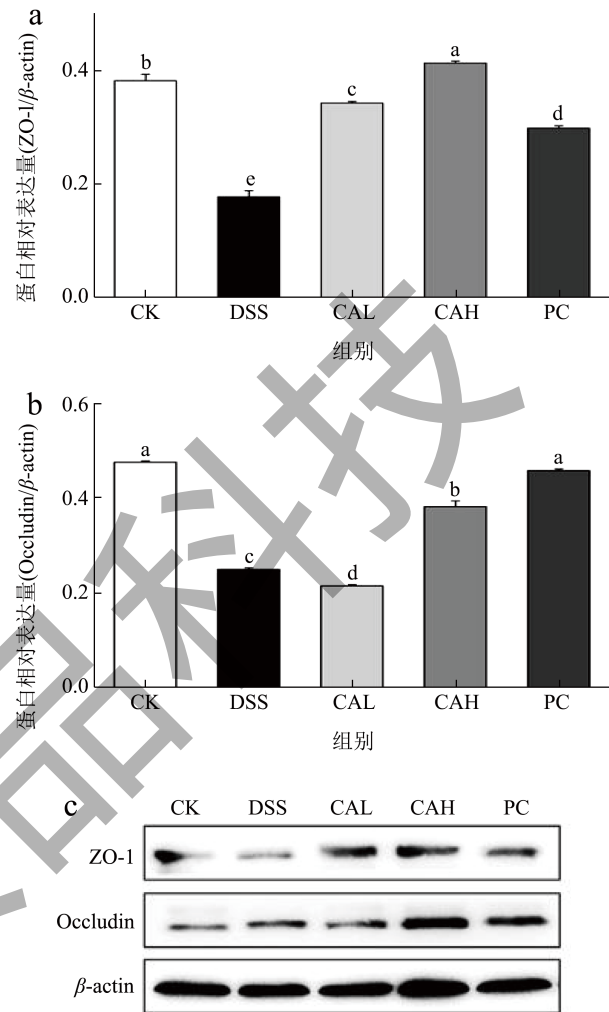


图6 各组小鼠紧密连接蛋白的表达

Fig.6 Expression of tight junction proteins in different group

注:(a) ZO-1/β-actin 的相对表达;(b) Occludin/β-actin 的相对表达;(c) 蛋白条带示意图。

肠道上皮细胞通过细胞间紧密连接形成整体,从而防止物质的扩散,维持自身极性,是构成肠道机械屏障的重要组成部分。紧密连接由闭合蛋白(Occludin)、密封蛋白(Claudin)、连接粘附分子(JAM)、ZO蛋白等蛋白组成,其中ZO蛋白属于细胞内的接头蛋白,将肌动蛋白纤维以及闭合蛋白(Occludin)、密封蛋白(Claudin)、连接粘附分子胞内区连接起来,以多种方式影响肠屏障的完整性<sup>[24-26]</sup>。通过测定ZO-1和Occludin在结肠组织中的表达进一步明确CA对肠道屏障完整性的作用机制。结果表明,DSS诱导的UC小鼠结肠组织中ZO-1和Occludin的表达均显著降低 ( $P<0.05$ ),与CK组相比,分别下降了55.56%、45.65%。两种



剂量的 CA 干预逐步恢复了 ZO-1 的表达，相比之下，只有 CAH 组显著促进了 Occludin 的表达。马一骏<sup>[27]</sup>采用腹腔注射 3 mg/kg m<sub>0</sub> 的 CA 治疗蛛网膜下腔出血后引起的早期脑损伤大鼠，发现 CA 阻止了 Occludin、Claudin 和 ZO-1 的降解从而改善大鼠蛛网膜下腔出血后血脑屏障渗透性的破坏，说明一定剂量的 CA 干预可以促进细胞间紧密连接蛋白的表达，从而改善 UC 小鼠的屏障受损。

### 2.7 鼠尾草酸对肠道菌群多样性的影响

在 UC 患者或实验诱导的 UC 小鼠中，微生物生态失调通常表现为多样性降低<sup>[28]</sup>。通过细菌 16S rRNA V3-V4 可变区扩增和测序来阐明 CA 灌胃对 UC 小鼠结肠内容物多样性和丰富度的影响。如图 7 所示，与 CK 组相比，DSS 组小鼠的肠道菌群多样性指数 Simpson 指数显著升高 ( $P < 0.05$ )，而 Chao 指数没有显著性变化，这表明 UC 小鼠肠道菌群的多样性显著下降 ( $P < 0.05$ )。低剂量的 CA (50 mg/kg m<sub>0</sub>) 和美沙拉嗪干预使 Simpson 指数下降了 28.57%，恢复至与 CK 组无显著差异的水平，说明 CA 增加了 UC 小鼠肠道菌群的多样性。

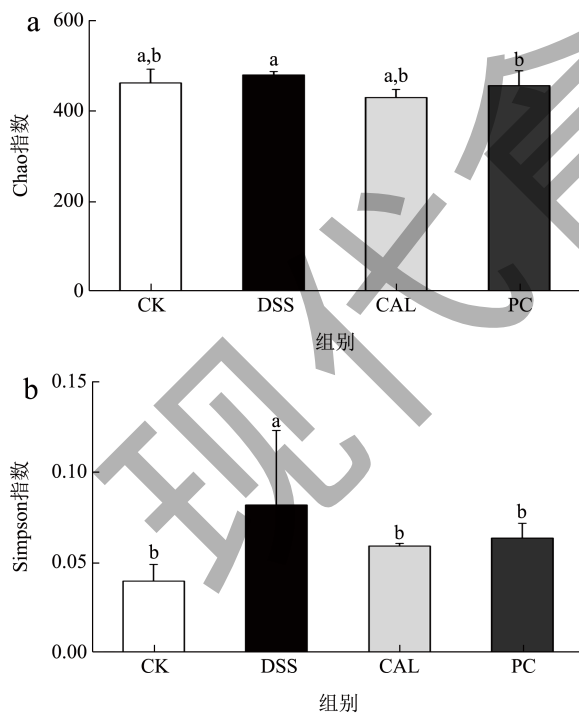


图 7 对小鼠肠道菌群多样性的影响

Fig.7 Effects on intestinal flora diversity in mice

注: (a) Chao 指数; (b) Simpson 指数。

PCoA 分析 (Principal Co-ordinates Analysis, PCoA), 即主坐标分析, 可通过样本间的距离研究样本群落物种组成的相似性或差异性。PCoA 分析显示 DSS

组和 CK 组具有相对独特的肠道菌群结构，相比之下，CAL 组和 PC 组则聚集在 CK 和 DSS 组之间 (图 8)，说明 50 mg/kg m<sub>0</sub> 的 CA 灌胃和美沙拉嗪干预后能够在一定程度上影响 UC 小鼠肠道菌群的物种组成。

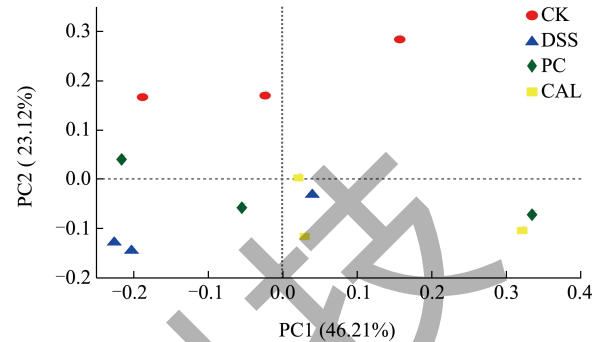


图 8 基于非加权 Unifrac 距离的 PCoA 分析

Fig.8 Un weighted Unifrac distance-based PCoA analysis

### 2.8 鼠尾草酸对肠道微生物组成的影响

肠道菌群组成的变化对肠道免疫系统的激活和发展起着重要作用。由图 9a 可知，在门水平，小鼠肠道微生物的 OTU 主要由 Bacteroidetes (拟杆菌门)、Firmicutes (厚壁菌门) 和 Verrucobacteria (疣微菌门) 组成。其中，Bacteroidetes 和 Firmicutes 在所有组别中占据绝对优势。研究表明，Firmicutes 和 Bacteroidetes 丰度比值 (F/B 值) 升高是肠道细菌紊乱的一个重要表现<sup>[29]</sup>。由图 9b 可知，DSS 诱导的 UC 小鼠体内 F/B 值显著高于 CK 组 ( $P < 0.05$ )，说明 UC 小鼠体内肠道菌群可能存在失调。经过连续一周按照 50 mg/kg m<sub>0</sub> 的剂量进行 CA 灌胃后，CA 组小鼠 F/B 值恢复至与 CK 组小鼠无显著差异的水平 ( $P < 0.05$ )，同样地，经美沙拉嗪处理后的 PC 组小鼠体内 F/B 值显著下调 ( $P < 0.05$ )，说明 CA 有利于恢复 DSS 引起的溃疡性结肠炎小鼠的肠道菌群失调。

在属水平，四组小鼠肠道微生物的 OTU 主要由 15 个属组成。比较 CK 和 DSS 组的物种相对丰度发现，DSS 诱导的 UC 小鼠增加了 *norank\_f\_Muribaculaceae*、*Alistipes* 和 *Rikenellaceae\_RC9\_gut\_group* 菌群的相对丰度；降低了 *Akkermansia* 和 *unclassified\_f\_Lachnospiraceae* 菌群的相对丰度，张慧莹等<sup>[30]</sup>在研究山药多糖对 DSS 诱导的小鼠结肠炎的影响中得到了类似的结论。50 mg/kg m<sub>0</sub> 的 CA 灌胃增加了 DSS 组小鼠肠道菌群中降低的两种菌属的相对丰度，减少了 *Alistipes* 和 *norank\_f\_Muribaculaceae* 菌群的相对

丰度。除此之外，还增加了 *Ruminococcaceae\_UCG-014*、*Bacteroides*、*unclassified\_f\_Ruminococcaceae*、*[Eubacterium]\_xylanophilum\_group* 和 *Alloprevotella* 的相对丰度，而 *norank\_f\_Lachnospiraceae* 和 *norank\_f\_Ruminococcaceae* 的相对丰度降低。

*Akkermansia* 是一种肠道有益菌，其代谢产物在保护肠上皮细胞和维持黏液层的代谢方面起保护作用。有研究显示，给小鼠口服 *Akkermansia* 活菌，可以改善其肠道通透性<sup>[31]</sup>。隶属于毛螺菌科的 *unclassified\_f\_Lachnospiraceae* 和瘤胃球菌科的 *Ruminiclostridium* 主要负责分解淀粉和其他糖类，产生短链脂肪酸等一些有益代谢产物，被视

为肠道的有益菌属。*Alistipes* 是拟杆菌门中的一个属，有研究表明该菌属在结肠癌中表现出明显的致病性<sup>[32]</sup>。*norank\_f\_Muribaculaceae* 是肠道中较为主要的菌群，有研究发现可能与肠道菌群的失调有关<sup>[33]</sup>。*norank\_o\_Mollicutes\_RF39* 可能与肠系膜淋巴结中免疫细胞的数量呈正相关，这在卵清蛋白诱导的小鼠过敏模型中得到证实<sup>[34]</sup>。由于有害菌属丰度增加和有益菌属的丰度下降，DSS 诱导的 UC 小鼠肠道菌群发生失调，按照 50 mg/kg  $m_0$  剂量进行 CA 灌胃调控了 UC 小鼠的微生物菌群，在一定程度上恢复肠道内稳态。

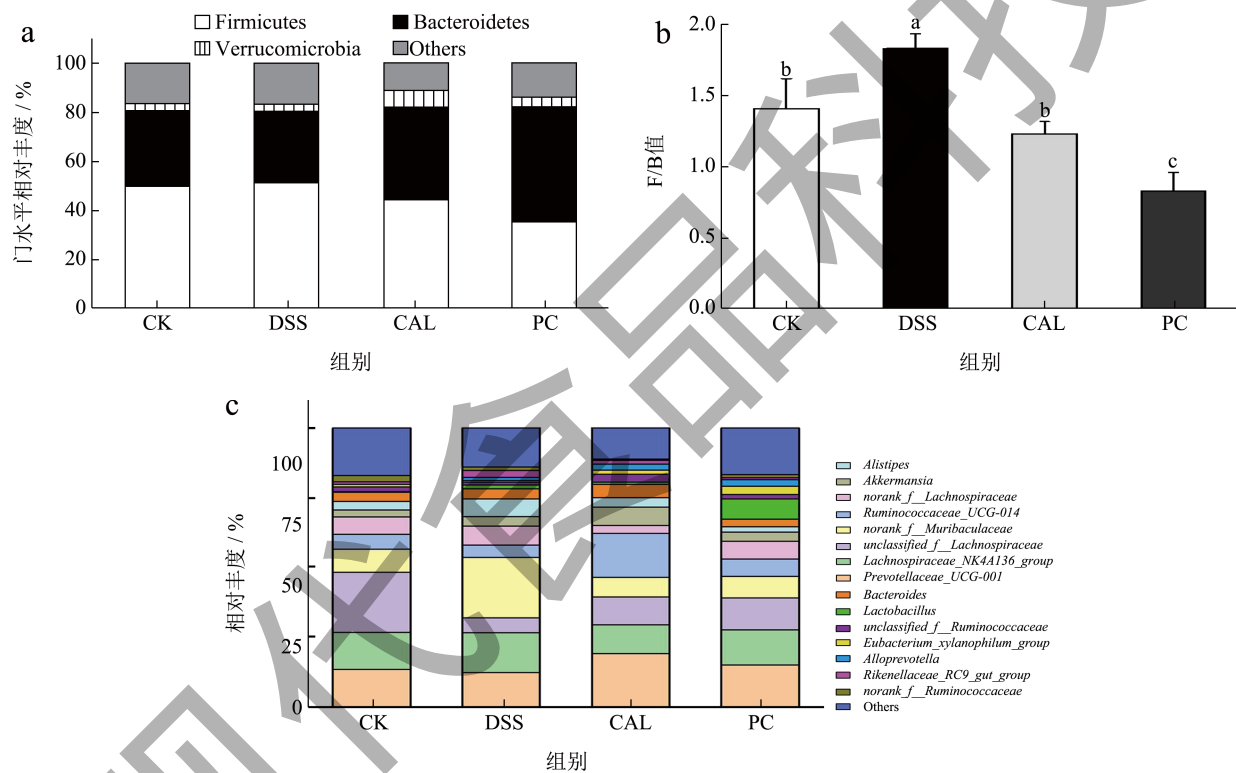


图9 各组小鼠肠道菌群物种组成的变化

Fig.9 Changes in species composition of intestinal microbiota in different group

注: (a) 门水平物种组成; (b) F/B 值变化; (c) 属水平物种组成。

### 3 结论

UC 作为一种世界性胃肠道疾病影响着数百万人，美沙拉嗪被普遍用于 UC 的治疗，但其在使用过程中有很多不良反应。CA 具有多种生物学活性，但其对 UC 的缓解作用和机制尚不清楚。本实验利用含 3% DSS 的饮用水诱导 UC 模型小鼠，发现高剂量的 CA 可以缓解 UC 小鼠的体质量减轻、降低 DAI 评分，差异具有统计学意义。两种剂量的 CA 干预可以减轻结肠组织黏膜损伤和上皮细胞脱落，

显著降低血清中 FITC-Dextran 质量浓度和结肠组织中的 MPO 活性，同时以剂量依赖的方式显著升高 SOD 活性、降低 MDA 含量。我们推测，CA 可能通过抑制 UC 小鼠结肠组织紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin 的降解、改善肠道有益微生物数量下降、降低潜在致病菌的增加来减轻 UC 模型小鼠肠黏膜组织的氧化应激和屏障受损，缓解 UC 的发生发展。因此，CA 在缓解 UC 方面具有光明的应用前景，可作为一种功能性食品进行深度开发。



## 参考文献

- [1] 苏晓路,董弛,张静,等.溃疡性结肠炎临床病理特点及鉴别诊断[J].生物医学转化,2022,3(2):66-74.
- [2] 万捷.溃疡性结肠炎组织学炎症负担评估与结直肠癌及癌前病变的相关性研究[D].济南:山东大学齐鲁医学院,2021.
- [3] FUKUI H. Increased intestinal permeability and decreased barrier function: does it really influence the risk of inflammation? [J]. Immunity Inflammation and Disease, 2016, 1(3): 135-145.
- [4] HOSSEN I, HUA W, TING L, et al. Phytochemicals and inflammatory bowel disease: a review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 60(8): 1321-1345.
- [5] SZANDRUK M, MERWID-LAD A, SZELAG A. The impact of mangiferin from *belamcanda chinensis* on experimental colitis in rats [J]. Inflammopharmacology, 2018, 26(2): 571-581.
- [6] RANA S V, SHARMA S, PRASAD K K, et al. Role of oxidative stress and antioxidant defence in ulcerative colitis patients from north India [J]. Indian Journal of Medical Research, 2014, 139(4): 568-571.
- [7] LORANSKAIA I D, ZORIN S N, GMOSHINSKII I V, et al. Permeability of intestinal barrier fo macromolecules in patients with crohn's disease and ulcerative colitis [J]. Klinicheskaia Meditsina, 1999, 77(11): 31-33.
- [8] BUENING C, GEISSLER N, PRAGER M, et al. Increased small intestinal permeability in ulcerative colitis: rather genetic than environmental and a risk factor for extensive disease? [J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2012, 18(10): 1932-1939.
- [9] ZHANG Z, KENNEDY H. Ulcerative colitis: current medical therapy and strategies for improving medication adherence [J]. European Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2009, 21(1): 1-8.
- [10] 赵盼盼,汪豪.迷迭香二萜类化学成分及生物活性研究进展[J].海峡药学,2020,32(11):37-41.
- [11] 何立威,付晨青,姚珊,等.迷迭香提取物的有效成分及其药理作用简述[J].浙江农业科学,2020,61(10):2068-2073.
- [12] 罗成,谭新敏,刘红卫,等.鼠尾草酸药理作用的研究进展[J].中药药理与临床,2020,36(2):271-276.
- [13] AMARAL G P, DE CARVALHO N R, BARCELOS R P, et al. Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats [J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 55: 48-55.
- [14] LU M, CAO Y, XIAO J, et al. Molecular mechanisms of the anti-obesity effect of bioactive ingredients in common spices: a review [J]. Food and Function, 2018, 9(9): 4569-4581.
- [15] MIRSADRAEE M, TAVAKOLI A, GHORANI V, et al. Effects of *Rosmarinus officinalis* and *Platanus orientalis* extracts on asthmatic subjects resistant to routine treatments [J]. Avicenna Journal of Phytomedicine, 2018, 8(5): 399-407.
- [16] OH J, YU T, CHOI S J, et al. Syk/Src pathway-targeted inhibition of skin inflammatory responses by carnosic acid [J]. Mediators of Inflammation, 2012, 2012: 781375.
- [17] MEDICHERLA K, KETKAR A, SAHU BD, et al. *Rosmarinus officinalis* L. extract ameliorates intestinal inflammation through MAPKs/NF- $\kappa$ B signaling in a murine model of acute experimental colitis [J]. Food and Function, 2016, 7(7): 3233-3243.
- [18] DU C, LI Z, ZHANG J, et al. The protective effect of carnosic acid on dextran sulfate sodium-induced colitis based on metabolomics and gut microbiota analysis [J]. Food Science and Human Wellness, 2023, 12(4): 1212-1223.
- [19] 邵亚杰.鼠尾草酸对慢性束缚应激小鼠模型的影响及机制研究[D].长沙:湖南师范大学,2017.
- [20] FAN L, ZUO S, TAN H, et al. Preventive effects of pectin with various degrees of esterification on ulcerative colitis in mice [J]. Food and Function, 2020, 11(4): 2886-2897.
- [21] 刘瑶,卢素宏,林华景.藿香正气口服液对DSS诱导结肠炎小鼠肠黏膜屏障的保护作用及机制研究[J].中药新药与临床药理, 2021,4:473-478.
- [22] ACHITEI D, CIOBICA A, BALAN G, et al. Different profile of peripheral antioxidant enzymes and lipid peroxidation in active and non-active inflammatory bowel disease patients [J]. Digestive Diseases and Sciences, 2013, 58(5): 1244-1249.
- [23] 曹静,何苗,罗颂,等.鼠尾草酸对庆大霉素诱导急性肾损伤的保护作用[J].西北药学杂志,2021,36(1):61-65.
- [24] CHELAKKOT C, GHIM J, RYU S H. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications [J]. Experimental and Molecular Medicine, 2018, 50(8): 1-9.
- [25] 胡红卫,熊晶晶,赵川,等.溃疡性结肠炎大鼠肠紧密连接 Occludin蛋白表达降低及药物的影响[J].基础医学与临床,2015,35(11): 1540-1541.
- [26] 谭悦,郑长清.紧密连接蛋白Occludin、ZO-1在溃疡性结肠炎中的表达及其临床意义[J].现代药物与临床,2018, 33(7): 1803-1808.
- [27] 马一骏.鼠尾草酸通过抑制炎症相关的血脑屏障破坏减轻蛛网膜下腔出血后的早期脑损伤[D].杭州:浙江大学, 2017.
- [28] LI Y, PAN H, LIU J X, et al. l-arabinose inhibits colitis by modulating gut microbiota in mice [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(48): 13299-13306.
- [29] YANG Q, LIANG Q, Balakrishnan B, et al. Role of dietary nutrients in the modulation of gut microbiota: a narrative review [J]. Nutrients, 2020, 12(2): 381.

- [30] 张慧莹,曾丽萍,任运红,等.乳酸芽孢杆菌发酵液护色的山药多糖对葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠结肠炎的改善作用及机制[J].食品科学,2022,43(9):120-127.
- [31] EVERARD A, BELZER C, GEURTS L, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110(22): 9066-9071.
- [32] HASAN R, BOSE S, ROY R, et al. Tumor tissue-specific bacterial biomarker panel for colorectal cancer: *Bacteroides massiliensis*, *Alistipes species*, *Alistipes onderdonkii*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Corynebacterium appendicis* [J]. Archives of Microbiology, 2022, 204(6): 204-348.
- [33] CHUNG Y, RYU Y, AN B C, et al. A synthetic probiotic engineered for colorectal cancer therapy modulates gut microbiota [J]. Microbiome, 2021, 9(1): 122.
- [34] ZHOU C, CHEN L L, LU R Q, et al. Alteration of intestinal microbiota composition in oral sensitized C3H/HeJ Mice is associated with changes in dendritic cells and T cells in mesenteric lymph nodes [J]. Frontiers in Immunology, 2021, 12: 631494.

现代食品科技