

腺花素改善葡聚糖硫酸钠诱导小鼠溃疡性结肠炎的作用

曾诚^{1*}, 黄翊航²

(1. 广东药科大学附属第一医院临床药学重点专科, 广东药科大学新药研发中心, 广东广州 510006)

(2. 广东药科大学药学院, 广东广州 510006)

摘要: 研究了腺花香茶菜中提取的腺花素 (Adenanthin, Ade) 在溃疡性结肠炎 (Ulcerative Colitis, UC) 中的作用及其机制。用硫酸葡聚糖钠盐 (Dextran sulfate Sodium Salt, DSS) 构建 UC 动物模型, 并对其进行了 Ade 干预后, 通过苏木精-伊红染色观察结肠损伤情况, 并使用酶联免疫法检测炎症因子水平的变化。随后用 HT-29 构建体外肠道损伤模型。利用蛋白免疫印迹法评估了 Ade 对 UC 小鼠结肠和 HT29 细胞中 Toll 样受体 4/髓样分化因子 88/核因子 κ B (Toll-Like Receptor 4/Myeloid Differentiation Factor 88/Nuclear Factor- κ B, TLR4/MyD88/NF- κ B) 信号通路和相关凋亡蛋白的影响。体内实验表明, 高剂量 Ade 组的白介素 (Interleukin, IL) -1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α 表达量分别降低至 617.71、670.55、442.17 pg/mg。且 Ade 可以使 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路蛋白和凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-Cell Lymphoma-2, Bcl-2) 相关 X 蛋白 (Bcl2-Associated X, Bax) 显著降低 ($P < 0.01$), Bcl-2 表达显著增加 ($P < 0.01$)。相较于模型组, 高剂量 Ade 组中的 TLR4、Myd88、p-NF- κ B/NF- κ B、Bax 的表达量分别降低 40.30%、55.86%、48.23%、49.45%, Bcl2 的表达量增加 102.37%。综上所述, Ade 通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路, 降低炎症因子的表达, 从而实现改善 DSS 诱导小鼠 UC 的作用。

关键词: 腺花素; 溃疡性结肠炎; 炎症因子; TLR4/NF- κ B 通路; HT-29 细胞

文章编号: 1673-9078(2025)02-1-8

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.2.1575

Alleviation of Dextran Sodium Sulfate-induced Ulcerative Colitis in Mice by Adenanthin

ZENG Cheng^{1*}, HUANG Yihang²

(1. Key Specialty of Clinical Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, The Center for Drug Research and Development, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

(2. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The effects of adenanthin (Ade) extracted from *Isodon adenanthus* on ulcerative colitis and the associated mechanisms were examined. An animal model of ulcerative colitis was constructed by administering dextran sulfate sodium. After Ade intervention, colonic damage was observed by hematoxylin-eosin staining, and changes in the levels of inflammatory factors were detected using enzyme-linked immunoassay. HT-29 cells were used to construct *in vitro* intestinal

引文格式:

曾诚, 黄翊航. 腺花素改善葡聚糖硫酸钠诱导小鼠溃疡性结肠炎的作用[J]. 现代食品科技, 2025, 41(2): 1-8.

ZENG Cheng, HUANG Yihang. Alleviation of dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis in mice by adenanthin [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(2): 1-8.

收稿日期: 2023-12-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82100379); 广州科学技术项目 (202201010148); 2021 年广东省医学研究基金项目 (A2021120)

作者简介: 曾诚 (1990-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 药理学, E-mail: zengcheng@gdpu.edu.cn

models. The effects of Ade on the Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88/nuclear factor- κ B (TLR4/MyD88/NF- κ B) signaling pathway and related apoptotic proteins were evaluated using western blotting. *In vivo* experiments showed that the expression levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor- α in the high-dose Ade treatment group were reduced to 617.71, 670.55, and 442.17 pg/mg, respectively. In addition, Ade led to a significant ($P<0.01$) decrease in the expression of TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway proteins and B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)-associated X proteins (Bcl-2-associated X, Bax) ($P<0.01$) and a significant increase in Bcl-2 expression ($P<0.01$). The expression levels of TLR4, Myd88, p-NF- κ B/NF- κ B, and Bax in the high-dose Ade group were decreased by 40.30%, 55.86%, 48.23%, and 49.45%, respectively, and the expression level of Bcl2 was increased by 102.37% compared with that in the low-dose Ade group. In summary, Ade reduces the expression of inflammatory factors by inhibiting the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway, thus improving dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice.

Key words: adenanthin; ulcerative colitis; inflammatory factor; TLR4/NF- κ B pathway; HT-29 cell

溃疡性结肠炎 (Ulcerative Colitis, UC) 是一种长期性炎症性疾病, 主要影响结肠内膜。这是一种非特异性肠道疾病, 表现为结肠黏膜层的持续性炎症, 通常伴有溃疡和糜烂^[1]。该疾病常见于青壮年消化系统疾病和慢性腹泻患者, 其症状包括腹泻、腹痛、体重减轻和便血等^[2,3]。UC 的发病机制相当复杂, 已有的研究表明, 炎性因子和抗炎因子失衡在其发展过程中发挥着关键的作用^[4]。目前, 临床上常用的治疗药物包括抗炎药物, 如氨基水杨酸制剂, 以及用于控制症状和炎症的糖皮质激素。此外, 还包括调节免疫系统的药物, 例如免疫抑制剂, 以帮助减轻和管理 UC 的症状^[5], 然而这些药物存在较大的副作用, 且疗效不尽如人意。因此, 当前需要寻找一种更安全、更有效的药物来治疗 UC。

Toll 样受体 (Toll-Like Receptors, TLR) 4 是 TLR 家族中的一种受体, 可通过与细菌、真菌和病毒中的脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS) 成分结合而被激活, 进而引发迅速的免疫反应, 促进病原微生物的清除^[6]。在 UC 患者中, 临床症状通常不是直接由微生物造成的损害, 而是由微生物产物引发的一系列免疫反应导致的^[7]。当 TLR 受体被 LPS 激活后, 会触发髓样分化因子 (Myeloid Differentiation Factor 88, MyD88) 依赖和非依赖的信号级联反应, 诱导核因子- κ B (Nuclear Factor- κ B) 信号的激活, 进而引发一系列炎症因子的“爆发”^[8]。临床研究和动物模型中发现, TLR4 的过度激活和其效应分子 NF- κ B 的过度表达, 会导致促炎因子的释放, 如: 肿瘤坏死因子 (Tumor Necrosis Factor, TNF) - α 、白细胞介素 (Interleukin, IL) -6 等, 引起肠上皮细胞异常死亡, 从而促进肠道炎症的发生和进展^[9]。

腺花香 (Adenanthin, Ade) 是从唇形科植物

腺花香茶菜中提取的一种药食两用的呋喃二萜类化合物^[10], 具有抑制过氧化物还原酶的能力, 并能诱导急性早幼粒白血病细胞分化并杀死肝癌细胞^[11]。研究报道显示, Ade 可以通过抑制 NF- κ B 信号通路来预防和治疗自身免疫性脑脊髓炎^[12]。在之前的研究中发现, Ade 能够抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路并改善小鼠的急性肺损伤, 这表明 NF- κ B 信号通路可能是 Ade 治疗疾病的潜在机制^[13]。然而, 目前尚未有关 Ade 对 UC 治疗作用的研究报道。

本研究拟采用硫酸葡聚糖钠盐 (Dextran Sulfate Sodium Salt, DSS) 构建 UC 动物模型, 并利用 LPS 诱导肠道上皮细胞损伤作为细胞模型^[14], 从体内外水平探究 Ade 对 UC 的作用机制, 检测其对 NF- κ B 及其上游信号的影响, 并为治疗 UC 新药研发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

1.1.1 细胞

人源结肠上皮细胞 HT-29, 采购自上海赛百慷生物技术有限公司。在 37 °C、 $\phi=5\%$ CO₂ 的湿度控制培养箱中, 使用含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培养基进行培养。

1.1.2 动物

C57BL/6 小鼠无特定病原体 (Specific Pathogen Free, SPF) 级, 年龄 6~8 周, 体质量 22~24 g, 购自广东省实验动物中心, 实验动物生产许可证号: SCXK (粤) 2022-0002。所有小鼠均饲养于温度 (23 \pm 2) °C、相对湿度 50%~70%、每 12 h 光照黑

暗循环的环境下,自由摄食饮水。本研究饲养环境符合实验动物环境设施要求,实验方案经广东药科大学实验动物管理与使用委员会批准(伦理批件编号:gdpulac2022254)。

1.1.3 药物及试剂

腺花素(Ade),上海麦克林生化科技股份有限公司;硫酸葡聚糖钠盐批号K182912,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;5-氨基水杨酸(5-Aminosalicylic Acid, 5-ASA),上海源叶生物科技有限公司;LPS, MCE (MedChemExpress);噻唑蓝(Methylthiazolyldiphenyl-Tetrazolium Bromide, MTT), Sigma-Aldrich;TLR4、MyD88、p-NF- κ B、NF- κ B、B淋巴细胞瘤-2基因(B-Cell Lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2-Associated X, Bax)以及 β -actin产品, Abclonal Technology;兔二抗IgG,采购自Cell Signaling Technology;Pierce™ BCA蛋白定量试剂盒, Thermo scientific公司;IL-6、IL-1 β 和TNF- α 酶联免疫吸附测定(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)试剂盒,联科生物公司。

1.1.4 主要仪器

1510型全波长酶标仪、EVOS M5000智能细胞成像系统,美国Thermo Fisher科技公司;Microfuge 20R型高速冷冻离心机、Allegra X-12R大型离心机,美国Beckman Coulter公司;HF151UV型CO₂培养箱,力康生物医疗科技控股有限公司;1658033美国伯乐Bio-Rad小型垂直电泳转印系统,美国伯乐Bio-Rad;3300 Mini型化学发光成像系统,上海勤翔科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 造模与分组

在适应性喂养了30只雄性C57BL/6小鼠1周后,随机将它们分成了不同的实验组:正常组、模型组、5-ASA组(150 mg/kg)、以及Ade低、中、高剂量组(分别为5、10和20 mg/kg),每组均含有6只小鼠。在实验开始前1 d,所有小鼠被禁食12 h,但仍可饮水。随后,除了正常组外,其他组的小鼠开始饮用3.5 g/100 mL的DSS水溶液,自由饮用,持续7 d,以诱导UC模型^[15]。在模型建立的同时,药物组,给药组接受相应剂量的药物腹腔注射,而正常组和模型组则接受等量的生理盐水。在第8天,收集样本并进行相关指标的检测。

1.2.2 一般体征观察

每日按时记录各组小鼠的体质量、进食量以及饮水量等数据。同时,每天定时两次观察并记录小鼠的行为状态、身体状况以及排便情况,并记录小鼠的精神状态、粪便特征、毛发状态(包括柔软度、整洁度和光泽度)、肛门周围是否有异常病变以及粪便中隐血的情况。疾病活动指数(Disease Activity Index, DAI)的评分标准如表1所示,DAI=体质量下降分值+大便性状分值+便血情况分值^[15]。

表1 疾病活动指数评分标准

Table 1 Disease activity index score

评分/分	体质量下降率	大便性状	便血情况
0	<1%	正常	阴性
1	≥1%~5%	软便	阴性
2	≥5%~10%	软便	隐血阳性
3	≥10%~20%	腹泻	隐血阳性
4	≥20%	腹泻	血便

1.2.3 对结肠组织进行检查并评估其病理学特征变化

实验第8天给药后的2 h内,采用颈椎脱臼法对各组小鼠进行处理。迅速剖开小鼠的全段结肠,使用直尺测量各组小鼠结肠的长度。然后,在距肛门1 cm处的远端结肠剪取1 cm,并使用生理盐水进行冲洗。随后,将小鼠结肠组织固定,在4 wt.%多聚甲醛溶液中进行处理后,随后进行流水洗涤、乙醇梯度脱水、石蜡包埋等处理步骤。随后,进行常规切片,使用苏木精-伊红(Hematoxylin-Eosin Staining, HE)染色再用中性树脂封片,镜下观察结肠组织的病理变化,并依据表2进行评分^[16],见表2。

表2 病理学评分标准

Table 2 Pathological scoring criteria

评分/分	病理变化
0	无炎症迹象
1	低白细胞浸润
2	中度白细胞浸润
3	高白细胞浸润,中度纤维化,高血管密度,结肠壁增厚,中度杯状细胞丢失,局灶性隐窝丢失
4	白细胞透壁浸润,杯状细胞大量丢失,广泛纤维化,弥漫性隐窝丢失。

1.2.4 ELISA法检测结肠组织炎症因子水平

剪取部分结肠组织，于冰上剪碎制成匀浆，6 000 r/min 离心 10 min，取上清，根据试剂盒说明书的步骤检测结肠组织中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 水平。

1.2.5 细胞活力检测

采用 MTT 法检测 Ade 对 HT-29 细胞增殖的影响。以每孔 5×10^3 个细胞的密度接种到 96 孔板中，用不同浓度 Ade (0、2、4、6、8、12 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h。药物干预结束后，每孔中加入无血清培养基 180 μL 和 0.5 mg/mL MTT 溶液 20 μL ，并 37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育 4 h。最后，吸去 96 孔板中液体，每孔加入 DMSO 150 μL ，并用酶标仪在 570 nm 下测量每孔 A 值。

$$B = \frac{A_3 - A_1}{A_2 - A_1} \quad (1)$$

式中：

B——细胞活力；

A₁——空白组，mAU；

A₂——模型组，mAU；

A₃——Ade 组，mAU。

1.2.6 免疫印迹法检测TLR4、MyD88、p-NF- κ B、NF- κ B、Bcl-2及Bax蛋白表达

将人肠道细胞 HT-29 接种于 6 孔板中待细胞贴壁后，将细胞分为空白组、LPS 模型组 (1 $\mu\text{g/mL}$) 及 Ade 治疗组 (4、6、8 $\mu\text{mol/L}$) 并分别给予药物处理 24 h 进行制样。

将各组小鼠麻醉处死后，取 100 mg 肠道组织裂解、匀浆进行制样。所得细胞和小鼠肠道组织样品根据 BCA 蛋白检测试剂盒测定的蛋白浓度，加入上样缓冲液。沸水煮 5 min 以充分变性蛋白，将样品分装，方便上样，置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

每个样品取 20 μL 蛋白用 10% SDS-PAGE 电泳分离后，低温转移至 0.22 μm PVDF 膜，用 5% 脱脂奶粉封闭后分别在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育抗体 (稀释倍数 1:1 000) 过夜，次日加入兔二抗 (稀释倍数 1:10 000) 孵育，最后加入发光液后于凝胶成像仪进行曝光拍照，采用 ImageJ 1.47v 统计灰度值，计算 TLR4、MyD88、p-NF- κ B、NF- κ B、Bcl-2 及 Bax 的相对表达量。

1.2.7 统计学方法

使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据处理，结果以平均值 \pm 标准差 (SD) 展示。多组之间的差异则通过单因素方差分析来进行比较，而两组之

间的比较则采用双样本独立 t 检验。当 $P < 0.05$ 时，则认为差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 Ade对DSS诱导UC小鼠一般体征的影响

在 UC 模型建立后的第 3 天，模型组和各给药组的小鼠表现出了懒动、精神萎靡、毛发暗沉无光泽、喜欢蜷卧、肛门红肿出血、腹泻、便血、体质量下降等症状^[17]。特别是模型组的小鼠体质量下降更为显著，但是 Ade 给药组的小鼠体质量在模型建立后的第 5 天开始回升。相比之下，正常组小鼠的大便情况、体质量、毛发、精神状态等一般体征均无明显变化，并且没有出现死亡。如图 1 所示，模型组小鼠的疾病活动指数 (DAI) 评分明显高于空白组 ($P < 0.01$)；而 5-ASA 组和 Ade 各剂量组小鼠的 DAI 评分显著低于模型组 ($P < 0.01$)，Ade 高剂量组的治疗效果与 5-ASA 组相当。这些结果表明，Ade 在改善溃疡性结肠炎方面能够在一般体征上发挥积极的作用。

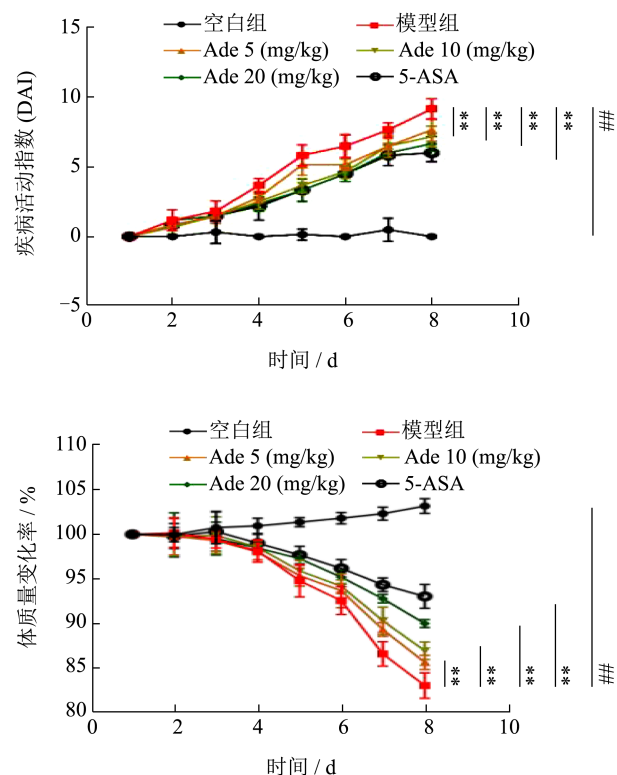


图 1 Ade 对 UC 小鼠体质量、疾病活动指数 (DAI) 的影响

Fig.1 The influence of Ade on body weight and Disease Activity Index (DAI) in mice afflicted with ulcerative colitis ($\bar{X} \pm S, n=6$)

注：与空白组比较， $\#P < 0.01$ ；与模型组比较， $**P < 0.01$ 。

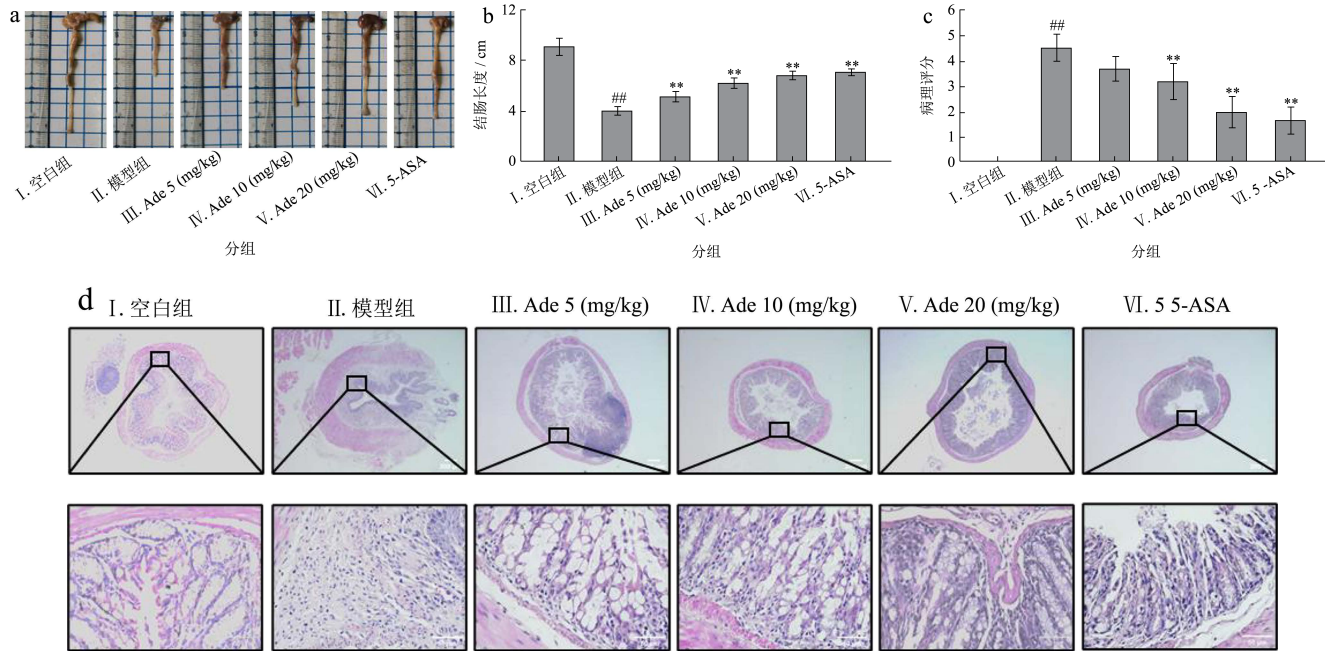


图 2 Ade 对 UC 小鼠结肠组织结肠长度、病理变化的影响

Fig.2 The impact of Ade on colon length and histopathological changes in colon tissue of mice suffer from ulcerative colitis ($\bar{X} \pm S, n=6$)

注: 与空白组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。HE 染色。

表 3 Ade对UC小鼠结肠组织中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平的影响

Table 3 The impact of Ade on levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in colon tissue of mice suffer from ulcerative colitis ($\bar{X} \pm S, n=6$)

组别	IL-1 β (pg/mg)	IL-6/(pg/mg)	TNF- α (pg/mg)
空白组	151.11 \pm 27.86	192.51 \pm 21.41	103.32 \pm 18.71
模型组	1 553.73 \pm 205.68 ^{##}	1 868.63 \pm 152.40 ^{##}	1 153.35 \pm 99.42 ^{##}
Ade 5 (mg/kg)	1 308.78 \pm 172.82 [*]	1 575.03 \pm 160.50	932.37 \pm 139.08 [*]
Ade 10 (mg/kg)	778.14 \pm 137.96 ^{**}	997.05 \pm 192.60 ^{**}	671.41 \pm 90.74 ^{**}
Ade 20 (mg/kg)	617.71 \pm 74.06 ^{**}	670.55 \pm 87.90 ^{**}	442.17 \pm 74.96 ^{**}

注: 与空白组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。下同。

2.2 Ade对DSS诱导UC小鼠肠道损伤的影响

如图 2 所示, 模型组小鼠的结肠长度相较于其他组都明显缩短。与模型组相比, 经过 Ade 治疗的小鼠结肠长度显著增加 ($P < 0.01$)。在 HE 染色下观察各组小鼠结肠的镜下病理变化。空白组小鼠的结肠组织能清晰地看到隐窝及杯状细胞, 黏膜肠上皮细胞和肠腺丰富且排列整齐, 看不到任何充血迹象。相比之下, 模型组小鼠的结肠组织呈现极为显著的病变特征: 上皮细胞普遍出现严重损伤, 隐窝结构大面积受损, 大量杯状细胞丧失, 且有大量中性粒细胞浸润至固有层, 表现出了严重的溃疡及炎症反应。这些病理变化清晰地展示了 UC 模型小鼠结肠组织的严重受损程度, 突显了该疾病对结肠黏膜的影响。Ade 治疗组小鼠结肠组织病理损伤程度

均有所改善, 尤其是高剂量组小鼠, 小鼠的结肠组织呈现出更为鲜明的变化。高剂量组小鼠的结肠组织显示隐窝结构相对完整, 腺体排列整齐, 上皮细胞的异常形态减少, 同时炎症细胞的浸润也明显减少。相对于模型组, 接受 Ade 治疗的小鼠在组织病理学评分方面表现出显著的降低趋势 ($P < 0.01$)。这一研究结果清楚地证实了 Ade 对小鼠结肠肠道损伤的显著缓解效果, 表明 Ade 可能作为潜在的治疗手段, 在减轻 UC 引起的肠道损伤方面具有治疗潜力。

2.3 Ade对DSS诱导UC小鼠结肠组织炎性因子水平的影响

白介素是细胞因子中最为重要且具备多种生物活性的成员, 在某些细胞激活过程中发挥着重要的调节作用。在 UC 的发展过程中, IL-6、IL-1 β 和

TNF- α 作为关键的促炎因子，通常被视为可靠的标志物，反映了炎症的活跃程度^[18,19]。这些因子在疾病的炎症反应中发挥着重要的角色，对于评估炎症程度和疾病活性具有重要意义。文献表明，IL-6 通过调节免疫细胞的活化、黏膜屏障的破坏以及炎症介质的释放，参与了 UC 的病理过程^[18]。在 UC 中，IL-1 β 的过度表达与炎症反应的加剧密切相关。IL-1 β 的释放导致炎性细胞浸润黏膜和亚黏膜层，加重了 UC 的病理损害^[19]。因此，抑制这些炎症因子的表达可能成为治疗 UC 的有效策略，以改善 UC 患者的生活质量。本实验结果如表 3 所示，模型组小鼠结肠组织中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 水平相较于正常组显著升高 ($P < 0.01$)；而与模型组相比，5-ASA 和 Ade 中、高剂量组则显著降低 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 水平 ($P < 0.01$)。上述结果与马广礼等^[20]结果一致，模型组小鼠结肠组织中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 水平显著高于正常组，而 Ade 干预能够有效降低这些炎症因子的分泌，且 Ade 高剂量的治疗效果最佳，说明 Ade 干预能够显著下调促炎因子 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 水平，从而发挥抗炎作用。

2.4 Ade对肠道上皮细胞HT-29生长的影响

为进一步验证 Ade 对肠上皮细胞生长是否存在

抑制作用，于是采用 MTT 法检测不同浓度下 Ade 对 HT-29 细胞存活率的影响。如图 3 所示，2-8 $\mu\text{mol/L}$ 的 Ade 治疗组与空白组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 相比，在在测试的浓度范围内，Ade 并未对 HT-29 细胞展现出任何毒害作用，与细胞存活率没有显著变化 ($P > 0.05$)。表明 Ade 并不会影响肠上皮细胞的生长，意味着可以安全地选取这个浓度范围进行更深入的研究^[13]，进一步探索 Ade 在细胞层面的作用机制以及对 UC 等疾病的潜在治疗效果。这个结果为后续实验提供了有力的实验基础，同时也提示了 Ade 对细胞的可接受耐受性，为其进一步的临床研究提供了坚实的依据。

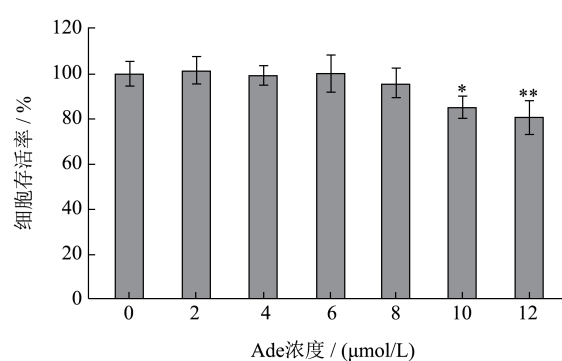


图 3 Ade 对 HT-29 细胞存活率的影响

Fig.3 The impact of Ade on the viability of HT-29 cells ($\bar{X} \pm S, n=6$)

注：与空白组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

表 4 Ade对LPS刺激的HT-29细胞TLR4、Myd88、p-NF- κ B、NF- κ B、Bcl-2、Bax蛋白的相对表达量比较

Table 4 Comparative analysis of the relative expression levels of TLR4, MyD88, p-NF- κ B, NF- κ B, Bcl-2, and Bax proteins in

HT-29 cells stimulated with LPS and subsequently treated with Ade ($\bar{X} \pm S, n=6$)

组别	TLR4	Myd88	p-NF- κ B/NF- κ B	Bcl-2	Bax
空白组	1 \pm 0.09	1 \pm 0.09	1 \pm 0.18	1 \pm 0.03	1 \pm 0.03
模型组	2.27 \pm 0.20 ^{##}	2.76 \pm 0.24 ^{##}	2.57 \pm 0.22 ^{##}	0.4 \pm 0.12 ^{##}	2.93 \pm 0.25 ^{##}
Ade 4 ($\mu\text{mol/L}$)	1.85 \pm 0.14*	2.37 \pm 0.14	1.81 \pm 0.14**	0.66 \pm 0.08*	2.04 \pm 0.16**
Ade 6 ($\mu\text{mol/L}$)	1.49 \pm 0.08**	1.69 \pm 0.13**	1.46 \pm 0.22**	0.79 \pm 0.08**	1.66 \pm 0.19**
Ade 8 ($\mu\text{mol/L}$)	1.27 \pm 0.09**	1.34 \pm 0.07**	1.23 \pm 0.07**	0.9 \pm 0.07**	1.13 \pm 0.11**

表 5 Ade对UC小鼠结肠组中TLR4、Myd88、p-NF- κ B、NF- κ B、Bcl-2、Bax蛋白的相对表达量比较

Table 5 Comparative analysis of the relative expression levels of TLR4, MyD88, p-NF- κ B, NF- κ B, Bcl-2, and Bax proteins in the colon tissue of ulcerative colitis-induced mice following Ade treatment ($\bar{X} \pm S, n=6$)

组别	TLR4	Myd88	P-NF- κ B/NF- κ B	Bcl-2	Bax
空白组	1 \pm 0.06	1 \pm 0.09	1 \pm 0.07	1 \pm 0.14	1 \pm 0.09
模型组	2.25 \pm 0.24 ^{##}	2.49 \pm 0.14 ^{##}	2.82 \pm 0.18 ^{##}	0.30 \pm 0.06 ^{##}	2.39 \pm 0.27 ^{##}
Ade 5 (mg/kg)	1.95 \pm 0.20*	1.99 \pm 0.21**	2.44 \pm 0.11**	0.47 \pm 0.14**	1.91 \pm 0.20**
Ade 10 (mg/kg)	1.64 \pm 0.15**	1.52 \pm 0.18**	2.12 \pm 0.15**	0.70 \pm 0.14**	1.52 \pm 0.22**
Ade 20 (mg/kg)	1.33 \pm 0.11**	1.19 \pm 0.18**	1.46 \pm 0.20**	0.61 \pm 0.07**	1.21 \pm 0.15**

2.5 Ade对LPS诱导的肠道上皮细胞中TLR4/MyD88/NF-κB信号通路和凋亡蛋白的影响

研究表明, 转录因子 NF-κB 活化后可进入细胞核与 B 细胞免疫球蛋白 κ 链启动子结合, 导致炎症的发生^[21]。作为 NF-κB 的上游蛋白, TLR4 在先天免疫反应中也有助于炎症递质的释放, 并且可通过激活下游 Myd88 和 NF-κB 信号通路调节炎症反应。有研究表明, Ade 可通过 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路抑制 LPS 诱导的巨噬细胞 RAW264.7 产生炎症反应^[13]。为了进一步验证 Ade 是否通过 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路发挥抗炎作用, 进行了相应的体外实验。如图 4 和表 4 所示, LPS 明显导致 HT-29 细胞中 NF-κB 的磷酸化程度上升, 同时增加了 TLR4/MyD88 蛋白的表达水平, 并伴随着促凋亡蛋白 Bax 的显著增加和抗凋亡蛋白 Bcl2 的明显减少 ($P < 0.01$)。然而, Ade 显著抑制了 LPS 引发的上述生物学效应。这些发现表明 Ade 具有潜在的抗炎和抗凋亡特性。

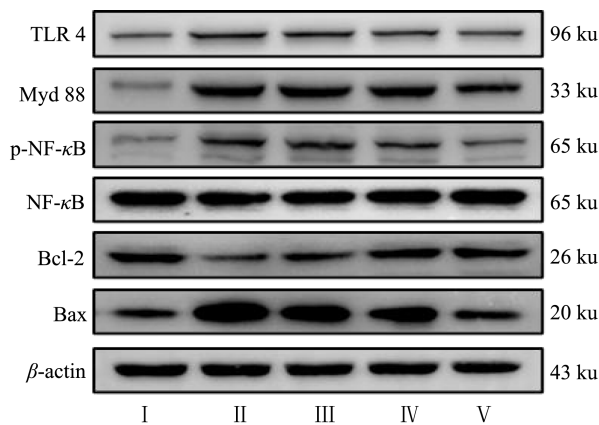


图 4 Ade 对 LPS 刺激的 HT-29 细胞 TLR4、Myd88、p-NF-κB、NF-κB、Bcl-2、Bax 蛋白表达水平的影响
Fig.4 The impact of Ade on the expression levels of TLR4, MyD88, p-NF-κB, NF-κB, Bcl-2, and Bax proteins in LPS-stimulated HT-29 cells ($\bar{X} \pm S, n=6$)

注: I: 空白组; II: 模型组; III: Ade 4 (μmol/L); IV: Ade 6 (μmol/L); V: Ade 8 (μmol/L)。

2.6 Ade对DSS诱导UC小鼠结肠组织TLR4/MyD88/NF-κB信号通路的影响及凋亡相关蛋白的影响

在体外实验的基础上, 又对小鼠结肠组织进行了进一步实验, 以探究 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路及凋亡相关蛋白的表达量, 结果如图 5 和表 5 所示, Ade 展现出了抑制 NF-κB 的磷酸化和 TLR4/

MyD88 表达的效果, 同时显著减少促凋亡蛋白 Bax 的表达, 并显著增加抗凋亡蛋白 Bcl2 的表达。进一步的体内实验显示, Ade 能抑制 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路并下调凋亡相关信号分子^[17]。模型组小鼠的 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路表达量相比于正常组显著增加, 给与 Ade 治疗后其表达量与模型组相比显著减少 ($P < 0.01$), 该现象在 Ade 高剂量组中尤为明显。上研究结果明确表明, Ade 可以抑制 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路并改善 UC。

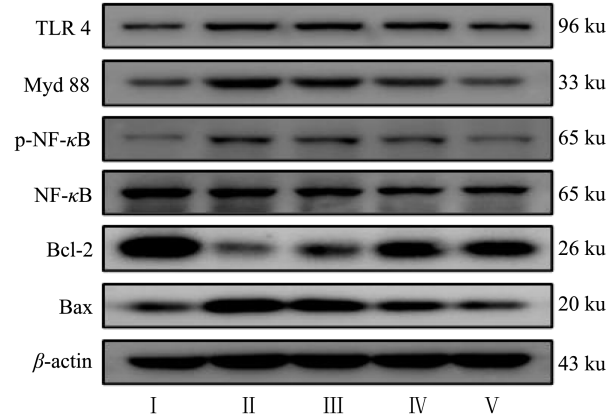


图 5 Ade 对 UC 小鼠结肠组织中 TLR4、Myd88、p-NF-κB、NF-κB、Bcl-2、Bax 蛋白表达水平的影响
Fig.5 The impact of Ade on the expression levels of TLR4, MyD88, p-NF-κB, NF-κB, Bcl-2 and Bax proteins in colon tissue of mice suffering from ulcerative colitis ($\bar{X} \pm S, n=6$)

注: I: 空白组; II: 模型组; III: Ade 5 (mg/kg); IV: Ade 10 (mg/kg); V: Ade 20 (mg/kg)。

3 结论

综上所述, Ade 可以抑制 DSS 诱导的 UC 小鼠结肠组织中炎症因子的升高, 这一效果可能是通过抑制 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路实现的, 并且减少炎症因子的分泌, 从而改善小鼠肠道组织病理损伤。此外, 在体外实验中发现, Ade 对小鼠肠上皮细胞的正常生长没有产生明显影响, 且未表现出明显的毒性作用。虽然 Ade 的具体作用机制还有待进一步的研究与证实但本实验为临床上应用 Ade 减轻 UC 患者的肠道损伤提供实验基础。此外, 这也为 Ade 成为保健食品的进一步研发提供理论基础。

参考文献

[1] LE BERRE C, HONAP S, PEYRIN-BIROULET L. Ulcerative colitis [J]. Lancet, 2023, 402(10401): 571-584.
[2] UNGARO R, MEHANDRU S, ALLEN P B, et al. Ulcerative colitis [J]. Lancet, 2017, 389(10080): 1756-1770.

- [3] 弓艳霞,唐艳萍,牛薇,等.溃疡性结肠炎发病机制及治疗研究进展[J].中国中西医结合外科杂志,2018,24(4):512-516.
- [4] RUTELLA S, LOCATELLI F. Intestinal dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(33): 3761-75.
- [5] 吴笑,夏俊东,方珂,等.溃疡性结肠炎中西医治疗临床研究进展[J].中西医结合研究,2021,13(2):118-121.
- [6] LU Y C, YE H W C, OHASHI P S. LPS/TLR4 signal transduction pathway [J]. *Cytokine*, 2008, 42(2): 145-151.
- [7] AZIMI T, NASIRI M J, CHIRANI A S, et al. The role of bacteria in the inflammatory bowel disease development: a narrative review [J]. *APMIS*, 2018, 126(4): 275-283.
- [8] LI X, HUANG R, LIU K, et al. Fucoxanthin attenuates LPS-induced acute lung injury via inhibition of the TLR4/MyD88 signaling axis [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 13(2): 2655-2667.
- [9] 郑烈,戴彦成,张亚利,等.中医药对NF- κ B信号通路介导溃疡性结肠炎治疗进展[J].中华中医药学刊,2016,34(7): 1585-1587.
- [10] SIERNICKA M, WINIARSKA M, BAJOR M, et al. Adenanthin, a new inhibitor of thiol-dependent antioxidant enzymes, impairs the effector functions of human natural killer cells [J]. *Immunology*, 2015, 146(1): 173-183.
- [11] HOU J K, HUANG Y, HE W, et al. Adenanthin targets peroxiredoxin I/II to kill hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(9): e1400-e1400.
- [12] YIN Q Q, LIU C X, WU Y L, et al. Preventive and therapeutic effects of adenanthin on experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting NF-kappaB signaling [J]. *J Immunol*, 2013, 191(5): 2115-2125.
- [13] 司徒杰,曾诚.腺花素对急性肺损伤模型小鼠的保护作用及其机制[J].医药导报,2022,41(9):1289-1296.
- [14] 谌雪梅.DSS和TNBS诱导溃疡性结肠炎的肠道微生态对比研究[D].南充:西华师范大学,2022.
- [15] ZHANG L, ZHANG Y, ZHONG W, et al. Heme oxygenase-1 ameliorates dextran sulfate sodium-induced acute murine colitis by regulating Th17/Treg cell balance [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(39): 26847-26858.
- [16] SANTUCCI L, FIORUCCI S, RUBINSTEIN N, et al. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice [J]. *Gastroenterology*, 2003, 124(5): 1381-1394.
- [17] 叶志明,刘冰,张陆勇.常春藤皂苷元对葡聚糖硫酸钠诱导小鼠溃疡性结肠炎的作用及机制研究[J].中药新药与临床药理,2023,34(12):1721-1728.
- [18] 汪雯,杨军平,肖亮.粪钙卫蛋白、IL6、IgA联合检测在溃疡性结肠炎诊疗中的价值[J].江西医药2023, 58(7):781-785.
- [19] NAKASE H, SATO N, MIZUNO N, et al. The influence of cytokines on the complex pathology of ulcerative colitis [J]. *Autoimmun Rev*, 2022, 21(3): 103017.
- [20] 马广礼,夏晓培,马金亮.蒿本内酯对葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎小鼠的改善作用[J].食品工业科技,2024, 45(4):321-327.
- [21] GULDENPFENNIG C, TEIXEIRO E, DANIELS M. NF- κ B's contribution to B cell fate decisions [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1214095.