

芸薹属紫菜蔬乙醇提取物对葡聚糖硫酸钠致小鼠结肠炎的预防作用

吴铭¹, 宋家乐^{1,2}, 任源¹, 曾榛¹, 钱波¹, 桂中玉¹, 吕芳芳¹, 庞棋期^{1,3}

(1. 桂林医学院公共卫生学院, 广西桂林 541100) (2. CHA 医科大学食品生命工学系及生物技术研究, 韩国抱川 11160) (3. 釜山大学食品科学与营养学系, 韩国釜山 609735)

摘要: 本研究探讨紫菜薹(BCEE)、紫甘蓝(RCEE)、紫苜蓿(BREE)及羽衣甘蓝(BOEE)乙醇提取物对葡聚糖硫酸钠(DSS, 2%)诱发 C57BL/6J 小鼠溃疡性结肠炎的影响。观察小鼠体重, 结肠长度, 疾病活性指数及结肠组织变化。试剂盒法检测小鼠结肠髓过氧化物酶(MPO)和超氧化物歧化酶(SOD), 过氧化氢酶(CAT), 谷胱甘肽还原酶(GSH-Px), 谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)水平。酶联法测定肠内炎症因子(TNF- α , IL-1 β , IL-6 和 IL-18)水平。qRT-PCR 法检测结肠内炎症因子, NLRP3, ASC, caspase-1, iNOS 和 COX-2 的 mRNA 水平。较模型小鼠 4 种紫菜蔬均显著抑制 DSS 致体重减轻, 增加结肠长度至 8.67 cm (BCEE 组), 8.23 cm (BREE 组), 7.66 cm (RCEE 组)和 7.40 cm (BOEE 组); 改善肠内炎症程度; 提升肠内抗氧化物酶(SOD, CAT 和 GSH-Px)和 GSH 水平; 降低炎症细胞因子(TNF- α , IL-1 β , IL-6 和 IL-18), MPO 及 MDA 水平。此外, 紫菜蔬能抑制结肠组织中炎症因子, NLRP3, ASC, caspase-1 和 iNOS 与 COX-2 的 mRNA 表达。综上数据提示, 4 种紫菜蔬缓解 DSS 诱导小鼠结肠炎能力为 BCEE>BREE>RCEE>BOEE。

关键词: 紫色菜蔬; 葡聚糖硫酸钠; C57BL/6J 小鼠; 实验性结肠炎; 抗炎

文章编号: 1673-9078(2019)09-153-162

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.9.019

Preventive Effects of Purple *Brassica* Vegetables Ethanolic Extracts in DSS Induced Mice Colitis

WU Ming¹, SONG Jia-le^{1,2}, REN Yuan¹, ZENG Zhen¹, QIAN Bo¹, GUI Zhong-yu¹, LYU Fang-fang¹, PANG Qi-qi^{1,3}

(1.School of Public and Health, Guilin Medical University, Guilin 541001, China)(2.Department of Food Science and Biotechnology, and Institute of Biotechnology, CHA Medical University, Pocheon 11160, Korea)
(3.Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea)

Abstract: The purpose of this study was to investigate the preventive effect of the ethanolic extracts from purple *Brassica* vegetables including *Brassica campestris* (BCEE), *red cabbage* (RCEE), *Brassica rapa* (BREE) and *Brassica oleracea* (BOEE) on dextran sulfate sodium (DSS, 2%)-induced ulcerative colitis in C57BL/6J mice. Body weight, colon length, ratio of colon length/weight, disease activity index (DAI) and histological changes were observed. Colonic myeloperoxidase (MPO), super oxygen dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione (GSH), and malondialdehyde (MDA) levels were also measured using commercial kits. Colonic levels of tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6 and IL-18 were measured with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The colonic mRNA expressions of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and cyclooxygenase-2 (COX-2), NLRP3, ASC and caspase-1 were quantified by a quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) assay. Four kinds of purple *Brassica* vegetable extracts significantly suppressed DSS-induced body weight loss, increased the colon length (to 8.67 cm in BCEE group, 8.23 cm in BREE group, 7.66 cm in RCEE group and 7.40 cm in BOEE group), decreased colon length/weight ratio, and reduced the inflammatory reaction in colon of colitis mice. Purple *Brassica* vegetable extracts also reduced the levels of inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-18), MPO and MDA in the colon of colitis mice. In addition, Purple *Brassica* vegetable extracts also decreased the mRNA expressions of

收稿日期: 2019-04-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(81560530、81760589); 广西自然科学基金项目(2016GXNSFGA380026); 广西高等学校千名中青年骨干教师培育计划资助项目(桂教人[2018]18号); 桂林医学院引进人才科研启动基金项目(04010150001)

作者简介: 吴铭(1999-), 女, 本科, 研究方向: 营养与食品卫生学

通讯作者: 宋家乐(1983-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 分子营养学与功能性食品学

inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-18), NLRP3, ASC, caspase-1, iNOS and COX-2. In summary, the four kinds of purple *Brassica* vegetable extracts were able to attenuate the DSS induced colitis in mice. The order of relieving DSS-induced colitis activity was BCEE>BREE>RCEE>BOEE.

Key words: purple *Brassica* vegetables; dextran sulfate sodium; C57BL/6J mice; experimental colitis; anti-inflammation

炎症性肠病(IBD)是主要包含溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩氏病(CD),并以反复慢性肠道炎症,肠上皮系统功能障碍,伴胃肠道粘膜组织损伤的一种消化系统复杂疾病^[1]。临床流行病学调查结果提示,慢性IBD与人类结直肠癌的发病密切相关。对于IBD的发病机制目前尚未研究清晰。一般认为IBD是由一种或多种危险因素单一或是联合作用后所致,其中包括由遗传或环境因素诱导的免疫调节异常,肠组织中氧化应激损伤所造成的肠上皮屏障系统损伤和饮酒、吸烟等不健康的生活方式^[2]。IBD在欧美等西方国家中属于一类较为严重的疾病。而在近十多年时间内,IBD的发病率在中国呈显著增加趋势^[3-5]。

研究发现,肠黏膜中免疫紊乱引起的促炎细胞因子如肿瘤坏死因子(TNF)- α 、干扰素(IFN)- γ 、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、IL-12和抗炎细胞因子(如IL-4和IL-10)间水平的失衡在IBD病理过程中的发挥着及其重要的作用^[1,6-8]。随着嗜中性粒细胞和巨噬细胞等炎性细胞被激活并浸润至病变部位后所产生大量的活性炎性细胞因子(TNF- α , IL-1 β 和IL-6)能导致结肠组织的炎症性损伤^[9]。因此,治疗IBD的主要目标是减少异常的免疫反应及抑制促炎性细胞因子诱导的炎症反应^[7]。

目前,传统的类固醇抗炎药物,免疫调节剂和单克隆抗体是临床上主要用于治疗IBD疾病的药物。但5-氨基水杨酸酯(5-ASA),皮质类固醇激素及免疫抑制剂在治疗过程中存在一定的副作用^[10,11]。因此,从传统中草药及药食同源食物中寻找更为有效和具有较高安全性的IBD治疗药物已成为研究与开发的热点^[12,13]。十字花科芸苔属蔬菜是一类我国栽培面积最大,产量最高和消费量最大的蔬菜,富含膳食纤维、黄酮类物质、硫代葡萄糖苷、类胡萝卜素等多种功能性成分。其中紫菜薹、紫甘蓝、紫茼蒿及羽衣甘蓝均属于其变种,已成为大众餐桌较常见的新兴菜品,具有抗癌,抗肿瘤,抗氧化,预防心血管疾病和促进骨健康等生理功能^[14]。

本研究拟采用DSS诱导小鼠建立经典的结肠炎模型。通过观察4种不同紫色菜蔬提取物对结肠炎模型小鼠临床症状的改善情况,对小鼠结肠组织中抗氧化酶活性的影响,及对炎性细胞因子mRNA表达调控的影响。最后观察4种不同紫色菜蔬提取物对结肠炎小鼠结肠中NLRP3相关因子的影响。以此研究4种

不同紫色菜蔬对DSS所致小鼠实验性结肠炎的预防作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜蔬菜样本(紫菜薹、紫甘蓝、紫茼蒿及羽衣甘蓝)均由桂林市蔬菜科学研究所提供,分别制备紫菜薹乙醇提取物(BCEE),紫茼蒿乙醇提取物(BREE),紫甘蓝乙醇提取物(RCEE)及羽衣甘蓝乙醇提取物(BOEE)^[15-17]。硫酸葡聚糖钠(DSS,分子量:36,000~50,000),美国MP Biomedical公司;Trizol试剂、OligodT18、RNase、dNTP、MLV逆转录酶,美国Invitrogen公司;ROX reference Dye和SYBR Premix Ex Taq II,日本Takara公司;髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD),过氧化氢酶(catalase, CAT),谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;Bradford蛋白浓度测定试剂盒,谷胱甘肽(glutathione, GSH)测定试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;TNF- α 、IL-1 β 、IL-6及IL-18 ELISA试剂盒,武汉默沙克生物科技有限公司。其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

EYELAN-1001S真空旋转蒸发器,日本东京理化器械株式会社;5424R型冷冻离心机,德国Eppendorf公司;7500型Fast Real-Time PCR仪,美国ABI公司;ELx808酶标仪,美国BioTek公司;Leica DM4B显微镜,德国Leica光学器械有限公司;756S紫外线/可见光分光光度计,上海棱光技术有限公司。

1.3 实验动物

雄性C57BL/6J小鼠(总42只,6周龄,体重16~18g)购自桂林医学院实验动物中心(动物生产许可证号:SCXK(桂)2013-0001),饲养于桂林医学院公共卫生学院SPF级动物房(许可证号:SYXK(桂)2013-0001)。

饲养环境为标准光照/黑暗(12 h/12 h)循环饲养,自由摄食及清洁饮水。

1.4 结肠炎模型制备及实验分组

所有小鼠经1周驯化饲养后,均分为6组,每组7只。正常组饲喂标准饲料和清水,DSS组以饮用水中添加2%(W/V)的DSS连续7d诱导小鼠结肠炎,期间饲喂标准饲料。剩余4组小鼠,依照DSS模组方法诱导结肠炎,饲喂含有5%的不同紫色蔬菜样品提取物的饲料。本动物实验方案已通过桂林医学院动物伦理委员会审查批准(批准号:GLMC201604002)。

1.5 临床症状观察及临床评分

实验期间,每日定时观察所有实验动物的行为及摄食饮水情况,观察体重变化及粪便情况,记录粪便出血等异常数据,行临床疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分。评分标准如下:体重减轻(0分,无;1分,1.5%;2分,5.1%;3分,10%~20%;4分,>20%),腹泻(0分、正常;2分、稀便;4分、水样腹泻),出血情况(0分、正常;2分、轻微出血;4分、大量出血),DAI分数的范围为0分到12分。

1.6 小鼠结肠样本的收集及组织病理学观察

待整个实验结束后,所有动物均行CO₂安乐死,取结肠组织,测量其长度和重量。结肠组织用冰生理盐水洗涤去除血污,并用10%的中性甲醛溶液液固定。固定好的结肠组织经乙醇脱水、石蜡包埋后,制备切片(3 μm)并用苏木精和伊红(H&E)染色。使用Leica DM4B显微镜(配Leica DFC550 CCD数码相机)对组织切片进行病理学研究。

1.7 小鼠结肠组织中相关炎性细胞因子的测定

将预冷生理盐水清洗后的小鼠结肠组织置于冰上,加入3 mL磷酸缓冲溶液(PBS, 0.1 M, pH 7.4)制备组织匀浆,经12000 g, 4 °C下离心5 min后收集上清液。结肠组织中总蛋白水平使用Bradford蛋白浓度测定试剂盒测定。结肠组织中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和IL-18等细胞因子水平参考ELISA试剂盒说明书测定,以结肠组织中的总蛋白量校正所测细胞因子水平(单位表示为pg/mg protein)。

1.8 结肠组织中抗氧化物酶系,脂质过氧化水平及髓过氧化物酶(MPO)活性测定

取依1.7中所述制备的结肠组织匀浆液,参考比色法试剂盒说明书,分别测定结肠组织中内源性抗氧化物酶(SOD、GSH-Px以及CAT),脂质过氧化物(MDA)水平及髓过氧化物酶(MPO)活性。相关指标均根据结肠组织中总蛋白水平进行校正。

1.9 结肠组织中谷胱甘肽(GSH)含量测定

取适量结肠组织标本(100 mg),加入PBS缓冲液制备组织匀浆液。将匀浆液(0.5 mL)与10%三氯乙酸(0.5 mL)充分混合并在10,000 g条件下离心10 min。依照GSH测定试剂盒使用说明书要求,取离心后的上清液(0.1 mL)与反应试剂混合。使用756 S分光光度计在412 nm处测定吸光度值,每5 min测定一次,共测定25 min。

1.10 qRT-PCR法测定结肠组织中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18、NLRP3、ASC、caspase-1和iNOS及COX-2的mRNA表达

表1 引物序列表

Table 1 Sequences of primers

Genes	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
Mouse <i>TNF-α</i>	ATGAGCACAGAAAGCATGA	AGTAGACAGAAGAGCGTGTT
Mouse <i>IL-1β</i>	AATGAAAGACGGCACACCCA	TGCTTGTGAGGTGCTGATGT
Mouse <i>IL-6</i>	CCTCTGGTCTTCTGGAGTACC	ACTCCTTCTGTGACTCCAGC
Mouse <i>IL-18</i>	ATGAGCACAGAAAGCATGA	AGTAGACAGAAGAGCGTGTT
Mouse <i>Nlrp3</i>	CCAGACACTCATGTTGCCTGTTG	GAGGCTCCGGTTGGTGCTTA
Mouse <i>Asc</i>	CAGTTCGTGCAGAGACCACCA	CTGCTCCAGGTCCATCACCA
Mouse <i>Caspase-1</i>	ACTCGTACACGTCTTGCCCTCA	CTGGGCAGGCAGCAAATTC
Mouse <i>Cox-2</i>	GCGCAGTTTATGTTGTCTGT	CAAGACAGATCATAAGCGAGGA
Mouse <i>Inos</i>	CTGCAGCACTTGGACTCAGGAACCTG	GGGAGTAGCCTGTGTGCACCTGGAA
Mouse <i>Gapdh</i>	CGGAGTCAACGGATTTGGTC	AGCCTTCTCCATGGTCGTGA

适量组织清洗血污后按照 Trizol 试剂要求提取组织中总 RNA。提纯后的 RNA 经紫外分光法检测浓度用于后续实验。取 2 μg 的总 RNA 加入 dNTPs(1 μL)、OligodT18 引物(1 μL)、MMLV 逆转录酶(1 μL)、RNases 抑制剂(1 μL)及 5×Buffer (10 μL)逆转录成 cDNA。取适量 cDNA(2 μL)用 qRT-PCR 法检测相关因子的表达量。在总反应体系中(20 μL)加入上游和下游引物(10 μmol/L)各 1 μL、2×SYBR Premix Ex Taq II (10 μL)、50×ROX reference Dye (0.4 μL)和灭菌双蒸水(5.6 μL),充分混匀后置于 QuantStudio™ 6 Flex PCR 仪中进行反应。扩增反应条件为 95 °C 30 s, 95 °C 25 s, 55 °C 25 s, 72 °C 50 s, 共 35~40 个循环, 72 °C 延伸 5 min。每个基因 cDNA 样本平行扩增 3 次, 并取 Ct 值均数, 按照公式计算目的基因的表达量 $[F=2^{-(\text{检测样品中基因的 Ct 值}-\text{检测样品中持家基因的 Ct 值})/2^{-(\text{空白样品中基因的 Ct 值}-\text{空白样品中持家基因的 Ct 值})}]$ 。相关基因的引物序列见表 1 所示。

1.11 数据处理与统计分析

本研究中, 所有实验均重复 3 次, 结果以均值 (means)±标准偏差 (SD) 表示。所得实验数据运用 SPSS20.0 统计软件进行单因素方差分析与统计处理, $p<0.05$ 为具有统计差异。

2 结果与讨论

2.1 紫菜蔬乙醇提取物对结肠炎小鼠体重及疾病活动指数(DAI)的影响

与正常组小鼠相比, DSS(2%)处理能够造成小鼠体重的显著下降($p<0.05$)。给予结肠炎小鼠含 5% 不同种类紫色菜蔬提取物的标准饲料后, 4 组小鼠的体重均呈升高趋势。比较最后一天(第 7 d)体重时发现, BCEE 干预能较其他紫菜蔬提取物显著抑制 DSS 所致结肠炎小鼠体重的减少($p<0.05$)。在临床症状方面, DSS 诱发的溃疡性结肠炎存在与人类 UC 及其类似的体重减轻, 腹泻及便血等典型症状^[18]。观察小鼠临床疾病活动指数(DAI)时发现, DSS 能显著造成结肠炎小鼠 DAI 指数的升高($p<0.05$)。而经不同紫色菜蔬提取物干预后, 各组结肠炎小鼠的 DAI 指数均呈降低趋势。特别是, BCEE 所干预后的结肠炎小鼠的 DAI 指数较 BREE, RCEE 和 BOEE 等处理后的结肠炎小鼠显著降低($p<0.05$)。

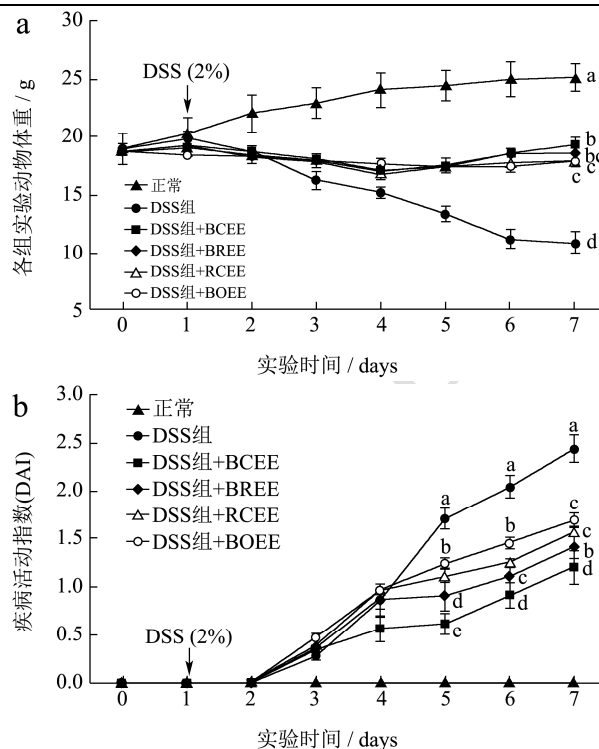


图1 紫菜蔬乙醇提取物对结肠炎小鼠的体重及疾病活动指数 (DAI) 的影响

Fig.1 Effects of purple *Brassica* vegetables ethanolic extracts on body weight and disease activity index (DAI) in DSS-induced colitis mice

注: a~d: 字母不同表示组间差异显著($p<0.05$)。

2.2 紫菜蔬乙醇提取物对结肠炎小鼠结肠长度及结肠重量的影响

如表 2 示, DSS 处理能显著引发结肠炎模型小鼠结肠长度的缩减(至 4.76 cm), 较正常对照组相比缩短 61.70%。给予含有 5% 不同种类紫色菜蔬提取物的饲料干预 7 d 后, DSS 所致结肠炎模型小鼠结肠长度缩短的情况被抑制。其中, 经 BCEE、BREE 分别干预处理后的小鼠结肠长度为 8.67、8.23 cm。RCEE、BOEE 分别处理后, 模型小鼠的结肠长度分别为 7.66、7.40 cm。此外, 在结肠重量与长度比方面, DSS 模型小鼠中结肠重量与长度比为最高值(76.47 mg/cm), 约为正常小鼠的 5.69 倍。而不同种类紫色菜蔬提取物能够显著改善 DSS 所引发的小鼠结肠肿胀程度。与结肠炎模型小鼠相比, BCEE 干预能减少 61.58% 的结肠重量与长度比。BREE 和 RCEE 干预能分别减少 53.32% 和 48.43%, 而 BOEE 则仅能减少 46.42%。

表 2 紫菜蔬乙醇提取物对结肠炎小鼠的结肠长度, 结肠重量及结肠重量长度比的影响

Table 2 Effects of purple *Brassica* vegetables ethanolic extractson colon length, colon weight and ratio of colon weight to length in

DSS-induced colitis mice			
实验分组	结肠长度/cm	结肠重量/mg	结肠重量/长度比/(mg/cm)
正常对照组	12.45±1.40 ^a	165.04±23.91 ^d	13.44±2.42 ^d
DSS 模型组	4.76±0.69 ^d	354.53±25.13 ^a	76.47±15.00 ^a
DSS 模型组+BCEE	8.67±1.15 ^b	252.19±38.83 ^c	29.38±4.86 ^c
DSS 模型组+BREE	8.23±0.76 ^{bc}	291.91±15.98 ^b	35.69±2.85 ^{bc}
DSS 模型组+RCEE	7.66±1.11 ^{bc}	296.63±22.03 ^b	39.43±5.57 ^b
DSS 模型组+BOEE	7.40±0.56 ^c	301.67±9.48 ^b	40.97±3.07 ^b

注: a~d: 字母不同表示组间差异显著($p < 0.05$)。

2.3 紫菜蔬乙醇提取物对结肠炎小鼠结肠组

织学改变及结肠中髓过氧化物酶(MPO)的影响

组织观察发现, 正常小鼠结肠组织中隐窝腺, 基质和粘膜等上皮结构保存完整(图 2)。而 DSS 处理后小鼠肠组织出现典型的隐窝上皮损毁, 粘膜广泛损伤和炎症细胞浸润。以不同种类紫色菜蔬提取物干预结肠炎模型小鼠后, DSS 所诱发的小鼠结肠上皮细胞损毁, 隐窝结构丧失, 黏膜损伤及炎症细胞浸润均得到较好控制。特别是, BCEE 和 BREE 干预能减轻 DSS 引发的肠上皮损伤, 炎症细胞浸润并维持肠表面上皮和隐窝腺的完整。此外, 髓过氧化物酶(MPO)属血红素氧合酶-环氧合酶超家族的成员, 能够在嗜中性粒细胞中大量表达, 是常用于评估嗜中性粒细胞向结肠组织浸润的特异性标志物之一^[19]。DSS 处理能显著升高结肠炎小鼠结肠中 MPO 活性($p < 0.05$)。而不同种类紫色蔬菜提取物处理后, 小鼠结肠中 MPO 酶活性水平显著降低。特别是经 BCEE 和 BREE 处理后, 结肠炎小鼠结肠中 MPO 酶活性分别降低 29.4%和 26.3%。而 RCEE 和 BOEE 处理的结肠炎小鼠结肠中 MPO 酶活性分别降低 18.8%和 16.4%。结肠组织中 MPO 酶活性的下降意味着嗜中性粒细胞浸润被抑制, 可提示结肠组织中炎症状况的改善^[20]。

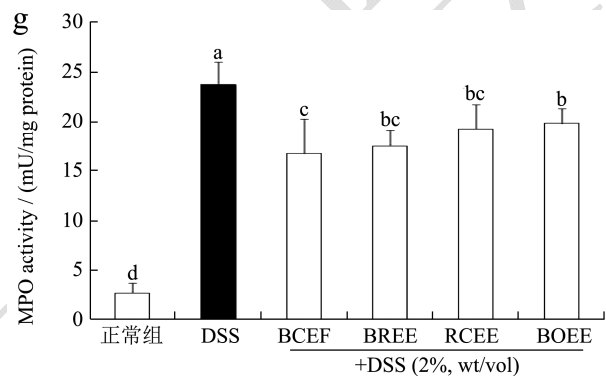
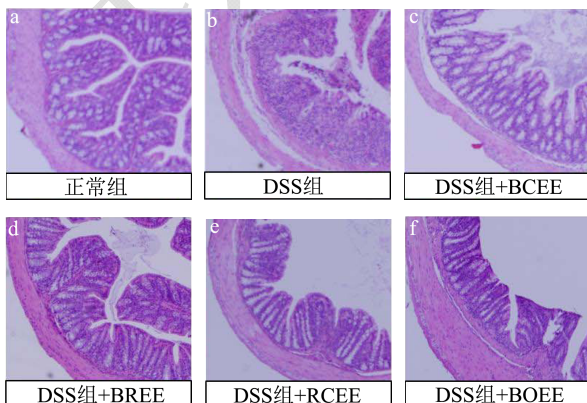


图 2 紫菜蔬乙醇提取物对结肠炎小鼠肠组织学改变及髓过氧化物酶(MPO)的影响

Fig.2 Effects of purple *Brassica* vegetables ethanolic extracts on histological changes and MPO levels in DSS-induced colitis mice

注: 图 g 中字母 a~d: 字母不同表示组间差异显著($p < 0.05$)。

2.4 紫菜蔬乙醇提取物对结肠炎小鼠结肠组

织中 TNF- α , IL-1 β , IL-6 和 IL-18 的影响

机体内 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 等细胞因子的异常升高是诱发 IBD 肠黏膜免疫紊乱以及后续肠黏膜炎症反应的重要机制之一^[21]。DSS 能够诱导小鼠结肠组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 水平的上升。结肠炎小鼠结肠组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 水平分别较正常组小鼠升高 17.8 倍、31.6 倍、10.6 倍和 11.9 倍, 这一结果与李晴等^[22]和徐永芳等^[23]的研究结果相类似。经不同紫菜蔬提取物干预后, 结肠炎小鼠结肠中 TNF- α 水平分别降低了 36.0%、32.5%、25.0%和 26.5%; IL-1 β 水平分别降低了 42.9%、34.5%、37.6%和 35.4%; IL-6 水平分别降低了 29.9%、27.3%、22.5%和 20.8%; IL-18 水平分别降低了 28.2%、33.5%、10.0%和 12.9%。抑制这类炎症细胞因子的生成有利于控制 UC 的发展^[7]。

表3 紫菜蔬乙醇提取物对结肠炎小鼠结肠组织中的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 的影响

Table 3 Effects of purple *Brassica* vegetables ethanolic extracts on colon levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-18 in DSS-induced colitis mice

实验分组	TNF- α /(pg/mg protein)	IL-1 β /(pg/mg protein)	IL-6/(pg/mg protein)	IL-18/(pg/mg protein)
正常对照组	12.46±0.12 ^c	9.50±3.37 ^d	25.53±6.45 ^d	9.60±3.03 ^d
DSS 模型组	221.40±23.54 ^a	299.84±18.29 ^a	270.94±27.88 ^a	113.88±29.22 ^a
DSS 模型组+BCEE	141.69±15.07 ^b	171.30±20.17 ^c	189.93±19.10 ^c	75.72±15.97 ^c
DSS 模型组+BREE	149.35±23.87 ^b	196.36±9.62 ^b	196.98±10.80 ^{bc}	81.75±7.60 ^{bc}
DSS 模型组+RCEE	166.05±17.66 ^b	187.15±22.70 ^{bc}	209.97±19.38 ^{bc}	102.53±9.31 ^a
DSS 模型组+BOEE	162.75±36.41 ^b	193.76±10.42 ^b	214.61±16.75 ^b	99.23±11.15 ^{ab}

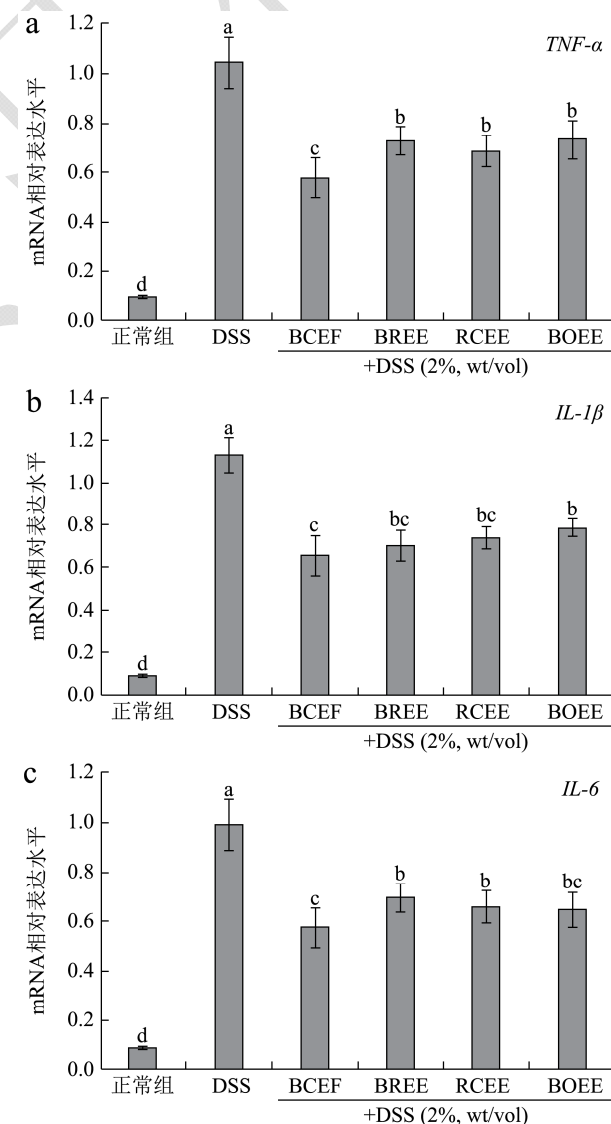
注: a~d: 字母不同表示组间差异显著($p < 0.05$)。

2.5 紫菜蔬乙醇提取物对结肠炎小鼠结肠组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 的 mRNA 转录影响

结肠黏膜组织中异常升高的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 等炎性细胞因子水平是导致肠道黏膜的炎性损伤和溃疡发生的主要原因,也是结肠炎发生发展过程中的重要事件之一^[7,24]。由单核巨噬细胞所产生的 TNF- α 能够促进中性粒细胞浸润肠道病变部位,是 UC 发生过程中的主要促炎因子之一^[25]。如图 3 示,模型小鼠肠道中 TNF- α 的 mRNA 表达水平较正常小鼠升高 11.1 倍。不同紫菜蔬提取物干预能分别降低结肠炎小鼠结肠中 TNF- α 的 mRNA 表达水平约 45.1%、30.3%、34.8%和 29.6%。IL-1 β 能促进黏附分子表达,引起炎症蛋白和炎症介质释放,进而引起肠道炎症反应和局部组织的损伤,加剧 UC 早期的炎症反应^[26]。结肠炎小鼠肠道中 IL-1 β 的 mRNA 表达水平较正常小鼠升高 12.8 倍(图 3)。经 4 种不同紫菜蔬提取物干预后,结肠炎小鼠结肠组织中 IL-1 β 的 mRNA 表达水平分别降低了 41.8%、38.0%、34.9%和 30.4%。此外,IL-6 能够通过激活转录激活因子 3(STAT3)信号通路加重 UC,并在与 UC 相关的结肠癌肿瘤的发生中起重要作用^[27]。与正常小鼠相比,结肠炎小鼠肠道中 IL-6 的 mRNA 表达水平升高 11.2 倍。不同紫菜蔬提取物干预后结肠炎小鼠后,结肠组织中 IL-6 的 mRNA 表达水平分别降低 42.4%、29.4%、33.7%和 35.2%。此外,作为一种前炎性细胞因子,异常升高的 IL-18 水平与 UC 患者的黏膜损伤程度,临床 DAI 指数, C 反应蛋白水平具有高度相关性^[28]。DSS 直接造成小鼠结肠组织中 IL-18 的 mRNA 表达水平升高 10.5 倍。而经不同紫菜蔬样品的干预能使模型小鼠结肠中 IL-18 的 mRNA 表达水平分别降低 34.9%、34.7%、28.0%和

23.7%。

2.6 紫菜蔬乙醇提取物对结肠炎小鼠结肠组织中 SOD, CAT, GSH-Px, GSH 和 MDA 的影响



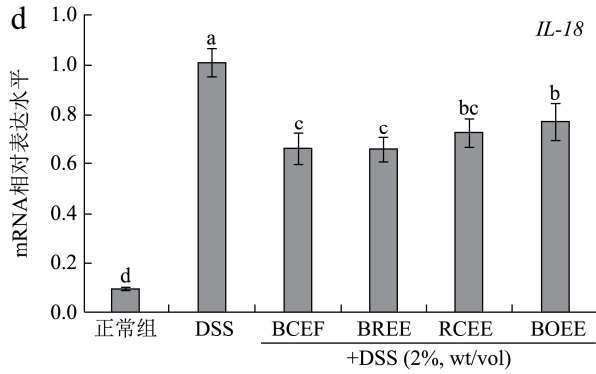


图3 紫菜蔬乙醇提取物对结肠炎小鼠结肠中 TNF- α , IL-1 β , IL-6 和 IL-18 的 mRNA 转录影响

Fig.3 Effects of purple *Brassica* vegetables ethanolic extracts on colon mRNA levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-18 in DSS-induced colitis mice

注: a~d: 字母不同表示组间差异显著($p < 0.05$)。

结肠组织中炎症性细胞的浸润是结肠炎病理发展过程中的典型事件, 过度的炎症反应能够引发机体组织中氧化应激^[29]。活性氧(reactive oxygen species, ROS)和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)是氧化应激过

表4 紫菜蔬乙醇提取物对结肠炎小鼠结肠组织中 SOD、CAT、GSH-Px、GSH 和 MDA 的影响

Table 4 Effects of purple *Brassica* vegetables ethanolic extracts on colon levels of SOD, CAT, GSH-Px, GSH and MDA in DSS-induced colitis mice

实验分组	SOD/ (U/mg protein)	CAT/ (U/mg protein)	GSH-Px/ (U/mg protein)	GSH/ (μ mol/mg protein)	MDA/ (nmol/mg protein)
正常对照组	4.50 \pm 0.94 ^a	1.76 \pm 0.15 ^a	5.58 \pm 0.68 ^a	7.31 \pm 1.08 ^a	0.29 \pm 0.11 ^c
DSS 模型组	1.07 \pm 0.23 ^d	0.52 \pm 0.24 ^d	1.17 \pm 0.45 ^d	3.18 \pm 1.15 ^d	2.16 \pm 0.25 ^a
DSS 模型组+BCEE	2.99 \pm 0.57 ^b	1.01 \pm 0.30 ^b	4.44 \pm 0.51 ^b	6.11 \pm 0.56 ^b	1.72 \pm 0.23 ^b
DSS 模型组+BREE	2.66 \pm 0.39 ^{bc}	0.87 \pm 0.24 ^{bc}	4.12 \pm 0.80 ^b	5.77 \pm 0.44 ^b	1.91 \pm 0.33 ^{ab}
DSS 模型组+RCEE	2.51 \pm 0.45 ^{bc}	0.62 \pm 0.22 ^{cd}	3.11 \pm 0.84 ^c	4.35 \pm 0.64 ^c	1.99 \pm 0.43 ^{ab}
DSS 模型组+BOEE	2.20 \pm 0.46 ^c	0.55 \pm 0.28 ^d	3.05 \pm 0.64 ^c	4.17 \pm 0.69 ^c	2.01 \pm 0.30 ^{ab}

注: a~d: 字母不同表示组间差异显著($p < 0.05$)。

2.7 紫菜蔬乙醇提取物对结肠炎小鼠结肠组织中 NLRP3、ASC 和 caspase-1 的 mRNA 转录影响

NLRP3 是 NOD 样受体家族的主要成员, 在维持肠道环境与健康过程中发挥着重要作用^[31]。NLRP3 炎性小体是由 NLRP3、ASC 和 caspase-1 所构成的复合小体, 自身活化后能够激活 caspase-1 从而参与肠道黏膜免疫反应^[32]。过度活化的 NLRP3 在 DSS 诱导的结肠炎动物模型及其人类 IBD 发病过程中起着非常重要的作用, 抑制 NLRP3 活性能够有效改善 DSS 结肠炎小鼠结肠黏膜的炎症反应^[32,33]。如图 4 示, DSS 处

理显著上调结肠炎小鼠结肠组织中 NLRP3、ASC 以及 caspase-1 的 mRNA 表达水平($p < 0.05$)。与正常组小鼠相比, 模型小鼠结肠中 NLRP3 表达水平上升约 9.8 倍, ASC 表达水平上升 8.6 倍, caspase-1 表达水平升高 11.8 倍。经不同紫色菜蔬提取物处理后, 结肠炎小鼠结肠组织中 NLRP3、ASC 以及 caspase-1 的 mRNA 转录水平均明显低于 DSS 模型小鼠($p < 0.05$)。其中, BCEE 干预使小鼠结肠组织中 NLRP3、ASC 和 caspase-1 的 mRNA 转录水平分别下降 45.3%、36.5% 和 44.1%; BREE 干预后 NLRP3、ASC 和 caspase-1 的 mRNA 转录水平则分别降低 32.8%、33.4% 和 40.9%。此外, RCEE 和 BOEE 干预后小鼠结肠组织中 NLRP3、ASC 和 caspase-1 的 mRNA 转录水平降低程度较 BCEE 和 BREE 干预后改善幅度弱。

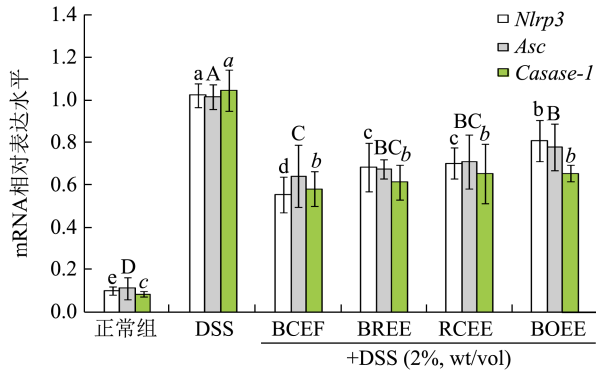


图4 紫菜蔬乙醇提取物对结肠炎小鼠结肠中NLRP3、ASC和caspase-1的mRNA转录影响

Fig.4 Effects of purple Brassica vegetables ethanolic extracts on colon mRNA levels of NLRP3, ASC and caspase-1 in DSS-induced colitis mice

注: a~d, A~D, a~d: 字母不同表示组间差异显著(p<0.05)。

2.8 紫菜蔬乙醇提取物对结肠炎小鼠结肠组织中iNOS和COX-2的mRNA转录影响

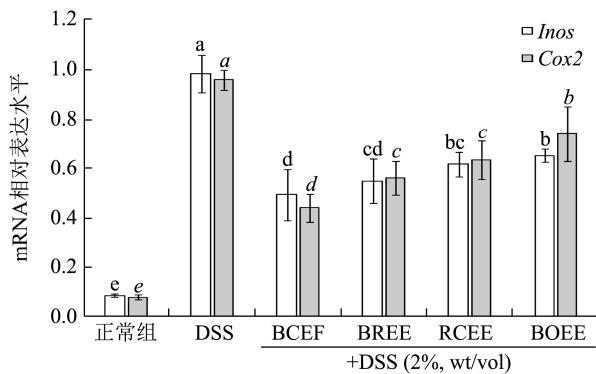


图5 紫菜蔬乙醇提取物对结肠炎小鼠结肠中iNOS和COX-2的mRNA转录影响

Fig.5 Effects of purple Brassica vegetables ethanolic extracts on colon mRNA levels of iNOS and COX-2 in DSS-induced colitis mice

注: a~e: 字母不同表示组间差异显著(p<0.05)。

iNOS和COX-2均为经典的炎性介质因子,异常活化的iNOS和COX-2在UC和CD等IBD病理生理过程中发挥着重要作用^[34]。DSS处理显著诱发小鼠结肠中iNOS和COX-2的mRNA表达。与正常组小鼠相比,模型小鼠中iNOS和COX-2的mRNA表达水平分别增高约11.2倍和11.4倍。经不同紫色菜蔬提取物处理后,模型小鼠结肠组织中iNOS和COX-2的mRNA转录水平明显低于DSS模型小鼠(p<0.05)。其中,BCEE干预后小鼠结肠组织中iNOS和COX-2的mRNA转录水平分别下降49.5%和52.7%;BREE干预后iNOS和COX-2的mRNA转录水平分别下降

43.9%和39.8%。此外,RCEE和BOEE干预后小鼠结肠组织中iNOS和mRNA转录水平分别下降37.1%和32.1%,COX-2转录水平分别降低33.5%和20.8%。抑制iNOS和COX-2的活性能够抑制结肠炎发展过程中的炎症反应,并利于改善临床症状^[35]。

3 结论

本研究中,紫菜薹、紫甘蓝、紫茺箐及羽衣甘蓝等4种紫色菜蔬提取物均能有效抑制DSS所致结肠炎小鼠的体重减轻和结肠缩短情况,修复过度炎症反应所致结肠组织损伤,改善小鼠临床DAI指数。通过增强结肠炎小鼠结肠组织中抗氧化酶(SOD,CAT和GSH-Px)和GSH水平来抑制结肠氧化应激损伤的发生。同时,4种紫菜蔬样品还能抑制结肠组织中炎性细胞因子(TNF- α ,IL-1 β ,IL-6和IL-18)的生成及其mRNA表达,并能通过下调NLRP3,ASC和caspase-1等NLRP3炎性小体相关分子来改善结肠炎症微环境以此来抑制DSS诱发的小鼠结肠炎发生。综合比较而言,紫菜薹和紫茺箐对DSS所致小鼠结肠炎的预防效果要强于紫甘蓝和羽衣甘蓝。

参考文献

- [1] Long A G, Lundsmith E T, Hamilton K E. Inflammation and colorectal cancer [J]. Current Colorectal Cancer Reports, 2017, 13(4): 341-351
- [2] Fischer S, Rath T, Neurath M F. Inflammatory bowel diseases: Crohn's disease and ulcerative colitis [J]. Der Internist, 2018, 59(7): 681-693
- [3] Tsai M S, Lin C L, Chen H P, et al. Long-term risk of acute coronary syndrome in patients with inflammatory bowel disease: a 13-year nationwide cohort study in an Asian population [J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2014, 20(3): 502-507
- [4] Yang H, Li Y, Wu W, et al. The Incidence of inflammatory bowel disease in northern China: A prospective population-based study [J]. Plos One, 2014, 9(7): e101296
- [5] Kaplan G G, Ng S C. Globalisation of inflammatory bowel disease: perspectives from the evolution of inflammatory bowel disease in the UK and China [J]. Lancet Gastroenterology and Hepatology, 2016, 1(4): 307-316
- [6] Guan Q, Zhang J. Recent Advances: The imbalance of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. Mediators of Inflammation, 2017; 2017: 4810258
- [7] Yamamoto-Furusho J K. Inflammatory bowel disease therapy: blockade of cytokines and cytokine signaling pathways [J].

- Current Opinion in Gastroenterology, 2018, 34(4): 187-193
- [8] Velikova T, Kyurkchiev D, Spassova Z, et al. Alterations in cytokine gene expression profile in colon mucosa of inflammatory bowel disease patients on different therapeutic regimens [J]. Cytokine, 2017, 92: 12-19
- [9] Grégoire C, Lechanteur C, Briquet A, et al. Review article: mesenchymal stromal cell therapy for inflammatory bowel diseases [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2017, 45(2): 205-221.
- [10] van Dieren J M, Kuipers E J, Samsom J N, et al. Revisiting the immunomodulators tacrolimus, methotrexate, and mycophenolate mofetil: their mechanisms of action and role in the treatment of IBD [J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2006, 12(4): 311-327
- [11] Kerget B, Araz O, Ucar E Y, et al. Sulfasalazine-induced interstitial fibrosis [J]. Eurasian Journal of Medicine, 2018, 50(3): 207-209
- [12] Somani S J, Modi K P, Majumdar A S, et al. Phytochemicals and their potential usefulness in inflammatory bowel disease [J]. Phytotherapy Research, 2015, 29(3): 339-350
- [13] Hossen I, Hua W, Ting L, et al. Phytochemicals and inflammatory bowel disease: A review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 7: 1-25
- [14] 宋亚,杨静.芸薹属蔬菜功能性成分研究进展[J].浙江农业科学,2014,1(6):837-840
SONG Ya, YANG Jing. Research progress on functional components of Brassica vegetables [J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2014, 1(6): 837-840
- [15] 宋家乐,刘斯悦,何仲文,等.紫菜薹乙醇提取物对 Caco-2 细胞氧化损伤保护作用[J].食品科技,2018,43(5):254-260
SONG Jia-le, LIU Si-yue, HE Zhong-wen, et al. Protective effects of *Brassica campestris* ethanol extract on oxidative damage in Caco-2 cells [J]. Food Science and Technology, 2018, 43(5): 254-260
- [16] 宋家乐,钱波,王程强,等.紫菜薹乙醇提取物对 Caco-2 细胞氧化损伤的保护作用[J].现代食品科技,2018,34(6):32-38
SONG Jia-le, QIAN Bo, WANG Cheng-qiang, et al. Protective effect of *Brassica rapa* var L ethanol extract on oxidative damage of Caco-2 cells [J]. Modern Food Science & Technology, 2018, 34(6): 32-38
- [17] 钱波,何仲文,刘斯悦,等.羽衣甘蓝对小肠上皮 Caco-2 细胞氧化应激损伤的保护作用[J].食品科技,2018,43(1):222-227
QIAN Bo, HE Zhong-wen, LIU Si-yue, et al. Effects of *Brassica oleracea* ethanol extracts on oxidative stress in intestinal epithelial Caco-2 cells [J]. Food Science and Technology, 2018, 43(1): 222-227
- [18] Strober W, Fuss I J, Blumberg R S. The Immunology of mucosal models of inflammation [J]. Annual Review of Immunology, 2002, 20: 495-549
- [19] Babbs C F. Oxygen radicals in ulcerative colitis [J]. Free Radical Biology and Medicine, 1992, 13: 169-181
- [20] Holma R, Salmenperä P, Riutta A, et al. Acute effects of the cys-leukotriene-1 receptor antagonist montelukast on experimental colitis in rats [J]. European Journal of Pharmacology, 2001, 429: 309-318
- [21] 潘晓菲,孟存英.白细胞介素与炎症性肠病关系的研究进展 [J].中国综合临床,2017,33(6):572-576
PAN Xiaofei, MENG Cunying. Research progress in the relation between interleukin and inflammatory bowel disease [J]. Clinical Medicine of China, 2017, 33(6):572-576
- [22] 李晴,胡丽红,曲波.不同浓度 DSS 诱导小鼠溃疡性结肠炎模型的比较 [J].胃肠病学和肝病杂志,2016,25(10): 1106-1110
LI Qing, HU Li-hong, QU Bo. Comparison of different concentrations of DSS induced a mouse model of ulcerative colitis [J]. Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2016, 25(10): 1106-1110
- [23] 徐永芳,郑小翠,王海燕,等.葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠肠炎模型中炎症因子的变化 [J].中国血液流变学杂志,2017,27(1):12-16
XU Yong-fang, ZHENG Xiao-cui, WANG Hai-yan, et al. Regularity of inflammatory cytokines change in DSS-induced colitis mouse model [J]. Chinese Journal of Hemorheology, 2017, 27(1): 12-16
- [24] 孙钦娟,李琴,宛东,等.细胞因子在炎症性肠病患者肠黏膜中表达的分析 [J].胃肠病学,2018,1:13-17
SUN Qing-juan, LI Qing, WAN Dong, et al. Cytokine expressions in intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease [J]. Chinese Journal of Gastroenterology, 2018, 1: 13-17
- [25] Ben-Horin S, Chowers Y. Tailoring anti-TNF therapy in IBD: drug levels and disease activity [J]. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology, 2014, 11(4): 243-55
- [26] Impellizzeri D, Siracusa R, Cordaro M, et al. Therapeutic potential of dinitrobenzene sulfonic acid (DNBS)- induced colitis in mice by targeting IL-1 β and IL-18 [J]. Biochemical Pharmacology, 2018, 155: 150-161
- [27] Mudter J, Neurath M F. IL-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance [J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2010, 13(8): 1016-1023
- [28] 高伟,司雁菱,吴瑜.白细胞介素-8、白细胞介素-15、白细

- 胞介素-18 在溃疡性结肠炎患者结肠黏膜的表达及意义[J]. 中国综合临床,2006,22(12):1095-1097
- GAO Wei, SI Yan-ling, WU Yu. The expression and significance of IL-8、IL-15、IL-18 in colonic mucosa of ulcerative colitis patients [J]. Clinical Medicine of China, 2006, 22(12): 1095-1097
- [29] 夏婷婷,钟良,戎兰,等.活性氧簇与炎症性肠病[J].国际消化病杂志,2015,4:234-237
- XIAO Ting-ting, ZHONG Liang, RONG Lan, et al. Reactive oxygen species and inflammation bowel disease [J]. International Journal of Digestive Diseases, 2015, 4: 234-237
- [30] Strober W, Fuss IJ and Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation I [J]. Annual Review of Immunology, 2002, 20: 495-549
- [31] 刘丽,曹海龙,董文道,等.NLRP3 炎症小体与结肠炎及其相关肠癌发生的研究进展[J].肿瘤药学,2018,8(2):129-134.
- LIU Li, CAO Hai-long, DONG Wen-xiao, et al. Research progress of the correlation of NLRP3 inflammasome with the correlation of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer [J]. Anti-Tumor Pharmacy, 2018, 8(2):129-134
- [32] Perera A P, Kunde D, Eri R. NLRP3 Inhibitors as potential therapeutic agents for treatment of Inflammatory Bowel Disease[J]. Current Pharmaceutical Design,2017;23(16): 2321-2327
- [33] 张懿,刘磊,刘韵姿,等.NLRP3 炎症小体研究新进展[J].现代生物医学进展,2014,14(9):1763-1765.
- ZHANG Yi, LIU Lei, LIU Yun-zi, et al. Recent research progress of the NLRP3 inflammasome [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2014, 14(9): 1763-1765.
- [34] Sakthivel KM, Guruvayoorappan C. Amentoflavone inhibits iNOS, COX-2 expression and modulates cytokine profile, NF- κ B signal transduction pathways in rats with ulcerative colitis [J]. International Immunopharmacology, 2013, 17(3): 907-916
- [35] Qian Q L, Hai L W, Ke C, et al. Oridonin derivative ameliorates experimental colitis by inhibiting activated T-cells and translocation of nuclear factor-kappa B [J]. Journal of Digestive Diseases, 2016, 17(2): 104-112

(上接第 125 页)

- [13] Hayakawa K, Tanaka K, Nakamura T, et al. Quality Characteristics of Waxy Hexaploid Wheat (*Triticum aestivum* L.) properties of starch gelatinization and retrogradation [J]. Cereal Chemistry, 1997, 74(5):576-580
- [14] Zhang B, Dhital S, Flanagan B M, et al. Extrusion induced low-order starch matrices: Enzymic hydrolysis and structure [J]. Carbohydr Polymers, 2015, 134: 485-496
- [15] Zhang B, Wang K, Hasjim J, et al. Freeze-drying changes the structure and digestibility of B-polymorphic starches [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(7): 1482-1491
- [16] Hoover R, Ratnayake W S. Starch characteristics of black bean, chick pea, lentil, navy bean and pinto bean cultivars grown in Canada [J]. Food Chemistry, 2002, 78: 489-498
- [17] 汝远,王蕾,周君等.干热处理对玉米淀粉性质的影响[J].食品工业科技,2015,36(16):138-141
- RU Yuan, WANG Lei, ZHOU Jun, et al. Effect of dry heating on properties of corn starch [J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(16): 138-141
- [18] Edwards C H, Warren F J, Milligan P J, et al. A novel method for classifying starch digestion by modelling the amylolysis of plant foods using first-order enzyme kinetic principles [J]. Food & Function, 2014, 5(11): 2751-2758
- [19] Gernat C, Radosta S, Damaschun G, et al. Supramolecular structure of legume starches revealed by X-ray scattering [J]. 1990, 42(5): 175-178
- [20] Goñi I, Garcia-Alonso A, Saura-Calixto F. A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index [J]. Nutrition Research, 1997, 17(3): 427-437
- [21] Noah L, Guillon F, Bouchet B, et al. Digestion of carbohydrate from white beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in healthy humans [J]. Journal of Nutrition, 1998, 128(6): 977-985
- [22] Carpita N, Sabulase D, Montezinos D P, et al. Determination of the pore size of cell walls of living plant cells [J]. Science, 1979, 205(4411): 1144-1147