

可可粉对 DSS 诱导的小鼠结肠炎的抑制作用及分子机制

孙晶晶, 季影, 王勉, 牟明军, 邹璟, 黄叶飞*

(徐州医科大学公共卫生学院, 江苏徐州 221004)

摘要: 利用 C57BL/6 小鼠连续饮用 7 d 3% 葡聚糖硫酸钠 (DSS), 建立溃疡性结肠炎模型, 探讨可可粉 (CP) 的抗炎作用及机制。20 只小鼠随机分成四组, 对照组 (常规饮水)、模型组 (3% DSS 饮水) 及 CP 低、高剂量处理组 (50、100 mg/(kg·d) 灌胃加 3% DSS 饮水)。结果发现, 与对照组相比, 模型组小鼠体重丢失增多, 结肠长度 (6.89 cm) 明显低于对照组 (9.85 cm), 而组织病理学评分 (5.20) 明显高于对照组 (0.60); 同时, 肠组织中促炎因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的 mRNA 和蛋白质表达水平分别增高了 9.72、7.08、7.39 倍和 0.93、0.44、0.52 倍, NF- κ B 信号通路关键蛋白 p65 的磷酸化水平增高了 4 倍, I κ B α 蛋白的磷酸化水平增高了 2.12 倍, 差异均具有统计学意义 ($p < 0.01$)。与模型组相比, 低、高剂量 CP 处理组小鼠体重丢失减少, 结肠长度缩短明显减少, 分别为 8.16 cm 和 9.19 cm, 组织病理评分分别降至 3.20 和 2.00, 促炎因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的 mRNA 表达水平分别降低了 0.64、0.72、1.05 倍和 2.03、2.27、2.07 倍, 蛋白表达水平分别降低了 0.22、0.14、0.18 倍和 0.58、0.37、0.68 倍, p65 蛋白和 I κ B α 蛋白的磷酸化水平也分别降低了 0.62、2.07 倍和 1.69、2.19 倍, 差异均具有统计学意义 ($p < 0.05$)。综上所述, CP 对 DSS 诱导的小鼠结肠炎有显著的抑制作用, 其分子机制与抑制 NF- κ B p65 信号通路活化有关。

关键词: 可可粉; 溃疡性结肠炎; 促炎因子

文章编号: 1673-9078(2022)05-16-23

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.5.0752

Inhibitory Effect and Molecular Mechanism of Cocoa Powder on Dextran Sulphate Sodium (DSS)-induced Colitis in Mice

SUN Jingjing, JI Ying, WANG Mian, MOU Mingjun, ZOU Jing, HUANG Yefei*

(School of Public Health, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China)

Abstract: A mouse model of ulcerative colitis was established through feeding C57BL/6 mice continuously 3% dextran sulfate sodium (DSS) for 7 days, to examine the anti-inflammatory effect of cocoa powder (CP) and its molecular mechanism. Twenty mice were randomly divided into four groups: control group (drinking water regularly), model group (3% DSS drinking water), and CP low and high dose treatment groups (50 and 100 mg/(kg·d) gavage plus 3% DSS drinking water). The results showed that compared with the control group, the model group lost more body weight, with its colon length (6.89 cm) significantly shorter than that of the control group (9.85 cm), and its histopathological score (5.20) significantly higher than that of the control group (0.60). In the meantime, the mRNA and protein expression levels of pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-1 β in the intestinal tissues of mice increased by 9.72 times, 7.08 times, 7.39 times and 0.93 times, 0.44 times and 0.52 times, respectively, while the phosphorylation levels of a key protein of the NF- κ B signaling pathway, p65, and I κ B α protein increased by 4 times and 2.12 times, respectively, with the differences being statistically significant ($p < 0.01$). Compared with the model group, the weight loss, colon length and histopathological score of the low-dose and high-dose CP-treated groups were significantly reduced,

引文格式:

孙晶晶,季影,王勉,等.可可粉对 DSS 诱导的小鼠结肠炎的抑制作用及分子机制[J].现代食品科技,2022,38(5):16-23

SUN Jingjing, JI Ying, WANG Mian, et al. Inhibitory effect and molecular mechanism of cocoa powder on dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(5): 16-23

收稿日期: 2021-07-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81703207); 江苏省高等学校大学生实践创新训练计划课题 (202010313069Y)

作者简介: 孙晶晶 (2000-), 女, 本科生, 研究方向: 公共卫生与预防医学, E-mail: 2432802829@qq.com

通讯作者: 黄叶飞 (1987-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 天然化学物的抗炎抗肿瘤作用及其机制, E-mail: huangyefei@xzhmu.edu.cn

with the colon lengths and histopathological scores being 8.16 cm and 9.19 cm, and 3.20 and 2.00, respectively. The mRNA expression levels of pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-1 β decreased by 0.64, 0.72 and 1.05 times, and 2.03, 2.27 and 2.07 times, respectively, the protein expression levels decreased by 0.22, 0.14 and 0.18 times, and 0.58, 0.37 and 0.68 times, respectively, and the phosphorylation levels of p65 and I κ B α proteins decreased by 0.62 and 2.07 times, and 1.69 and 2.19 times, respectively. All the differences were statistically significant ($p < 0.05$). In summary, CP exhibited a significant inhibitory effect against DSS-induced colitis in mice, and its molecular mechanism was related to the inhibition of NF- κ B p65 signaling pathway activation.

Key words: cocoa powder; ulcerative colitis; pro-inflammatory cytokines

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 与克罗恩病 (Crohn's disease, CD) 都是一组病因尚不十分清楚的慢性非特异性肠道炎症性疾病, 同属于炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD)^[1]。与 CD 不同, UC 病变连续, 主要累及直肠、结肠黏膜和黏膜下层, 临床主要表现为腹痛、腹泻、脓血便等^[1-3]; 此外, UC 腹泻不超过 6 周, 需要区别于传染性肠炎^[2]; UC 易反复发作且迁延不愈、极易诱发结肠肿瘤, 严重威胁着人类的健康^[3-5]。UC 在发达国家发病率较高, 近年来, 中国人群 UC 的发病率呈逐年升高的趋势, 亚洲国家中处于较高水平^[6,7]。目前 UC 的发病机制尚未明确, 受环境、遗传、感染等多种因素的影响, 但普遍认为是遗传、免疫、饮食、感染和菌群失调等因素之间相互作用的结果, 其中免疫系统因素是其发病的重要环节, 很大程度上与炎症因子的失衡和免疫反应的异常密切相关^[7,8]。现有治疗药物可分为氨基水杨酸类、肾上腺相关激素、免疫抑制剂以及一些生物制剂等, 虽然种类繁多, 但仍然缺乏安全有效的药物, 长期使用这些药物会导致严重的副作用, 如机会性感染、胃溃疡、胰腺炎、恶性肿瘤等^[9,10]。因此, 寻找新型安全、治疗有效的药物具有十分重要的意义。

植物化学物质在改善 UC 患者营养不良和减少不良反应方面具有独特优势, 如多途径、疗效好、副作用小等^[11]。研究表明, 可可消费与心血管疾病和全因死亡率的显著降低有关^[12]。可可粉 (CP) 含有生物碱、挥发性物质、脂类及丰富的酚类抗氧化剂, 研究发现抗氧化能力最高的 50 种食品中, 有 5 种是基于可可的^[13]。CP 富含黄酮类化合物, 特别是黄烷醇, 在可可中发现的主要黄烷醇是表儿茶素和儿茶素^[12]; 黄烷醇是一类天然植物化合物, 具有清除自由基、抗氧化、抗肿瘤、抗炎、保护心血管、降血脂等多种生物学功能^[12,14-16], 在可可中的黄烷醇含量最高^[14]。CP 可以有效地改变炎症过程, 从而有可能为动脉粥样硬化、心血管疾病和癌症危险因素较高的个体带来好处, 还可以保护神经免受损伤, 保护皮肤免受紫外线辐射的氧化损伤, 对饱腹感、认知功能和情绪呈现有益的影响^[12,17]。

葡聚糖硫酸钠盐 (DSS) 诱导的小鼠急性和慢性结肠炎模型是都是肠炎模型中应用最广的, 该模型症状表现与人类 UC 极为相似, 主要表现为腹泻、黏液样便、粪便潜血、肉眼血便、重量减轻、活动度减少, 毛色变差等, 是研究人类 UC 的理想模型。DSS 是一种高分子的水溶性硫酸多聚糖, 对肠道上皮细胞具有直接毒性, 通过有效抑制 DNA 合成, 破坏肠黏膜屏障, 改变结肠黏液层菌群变化, 还可以使结肠紧密连接蛋白基因表达能力下降, 同时可能发生肝素样作用, 导致急性结肠炎的发生^[18-20]。本实验建立 3% DSS 诱导小鼠急性溃疡性结肠炎模型, 通过给与 CP 灌胃治疗, 观察结肠炎小鼠的一般情况、结肠长度和病理损伤程度, 分析结肠组织中 NF- κ B p65 信号通路相关蛋白以及下游炎症因子的表达水平, 探讨 CP 对于小鼠溃疡性结肠炎的治疗作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用雌性 6~8 周龄 C57BL/6 小鼠 (18~22 g) 20 只, 购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司 (许可证号: SYXK(苏)2021-0038), 饲养条件为室温 21 $^{\circ}$ C, 相对湿度 45%, 明暗交替, 光照适度, 通风良好, 环境清洁卫生。在整个适应和研究期间, 所有动物均可自由获取食物和水。

1.2 药物及试剂

Navitas 无糖生可可粉 227 g, 购自乐淘美国酮人馆; 葡聚糖硫酸钠 (DSS, 分子量为 $(3.6\sim 5.0)\times 10^4$, 批号: 160110), MP Biomedicals 公司; RIPA 蛋白裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、ECL 化学发光液, 购自上海碧云天生物技术有限公司; 荧光定量 PCR 试剂盒, 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; I κ B α 、Phospho-I κ B α 、NF- κ B p65、Phospho-NF- κ B p65 (Ser536)、 β -tubulin 一抗, 购自美国 Cell Signaling Technology 公司, TNF- α 、IL-6、IL-1 β 一抗, 购自美国 Proteintech 公司。

1.3 主要仪器设备

RM2016石蜡切片机, 上海莱卡仪器有限公司; Eclipse Ci正置显微镜, 日本尼康; KZ-II高速组织研磨仪, 武汉塞维尔生物科技有限公司; Optima XPN-100超速冷冻离心机, 美国贝克曼库尔特公司; NanoDrop 2000超微量分光光度计, 美国赛默飞公司; Spark多功能酶标仪, 瑞士Tecan公司; ABI 7500实时荧光定量PCR仪, 美国赛默飞公司; BIO-RAD ChemiDocXRS+化学发光凝胶成像仪, 美国伯乐公司。

1.4 试验方法

DSS诱导的急性UC模型的建立: C57BL/6小鼠20只, 小鼠随机分成正常对照组(Control group)、模型组(DSS group)、低剂量可可粉组(DSS+low CP group)和高剂量可可粉组(DSS+high CP group), 每组5只小鼠。适应性喂养7 d后, 给与3% DSS连续饮水7 d, 然后继续正常饮水3 d。对照组小鼠一直饮用常规饮水, 模型组小鼠饮用水含3% DSS, 低剂量组小鼠在3% DSS饮水的基础接受50 mg/(kg·d)剂量的CP灌胃处理, 高剂量组小鼠在3% DSS饮水的基础上接受100 mg/(kg·d)剂量的CP灌胃处理, 两组小鼠接受CP治疗的时间都是持续10 d, 同时正常组和模型组小鼠灌胃同等剂量的溶剂(生理盐水)对照,

表2 靶基因引物

Table 2 Target gene primers

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
TNF- α	CACAGTGAAGTGCTGGCAAC	AGGAAGGCCTAAGGTCCAAC
IL-6	CTCAATATTAGAGTCTCAACCCCA	GAGAAGGCAACTGGACCGAA
IL-1 β	CAGAAGTACCTGAGCTCGCC	AGATTCGTAGCTGGATGCCG
GAPDH	GAGTCAACGGATTGGTCTGT	TGGGATTTCCATTGATGACA

1.6 RNA提取及qRT-PCR实验

取一小段小鼠结肠组织(约0.2 g)至含有1 mL TRIzol的2 mL EP管(已经去除RNase)中, 用KZ-II高速组织研磨仪(武汉塞维尔生物科技有限公司)进行匀浆, 频率: 70 Hz, 时间: 共180 s, 每60 s暂停30 s。TRIzol法提取总RNA, 核酸蛋白测定仪测定总RNA浓度, 每个样品上样总RNA量为0.5 μ g, 利用Applied Biosystems 7500 Fast实时荧光定量PCR系统, 按照HiScript II One Step qRT-PCR SYBR Green Kit步骤进行目的基因TNF- α 、IL-6和IL-1 β 的mRNA水平检测, 每份样品至少重复三次。目的基因mRNA的相对表达量用C_T值衡量, 并以GAPDH的C_T值作为内参, 应用2^{- Δ ACT}方法进行计算分析。引物由Thermo

实验过程中每天记录小鼠的体重。

实验结束, 小鼠麻醉后用脊椎脱臼方法处死, 剖开腹腔暴露结肠, 取下全结肠, 测量长度, 然后纵向剪开, 用PBS冲洗干净, 用于后续的结肠病理分析以及目的蛋白、mRNA等指标的检测, 剩余小鼠结肠组织于-80 $^{\circ}$ C保存备用。

1.5 结肠病理分析

造模完成取出小鼠全结肠后, 比较研究小鼠结肠(回盲连接部到肛门外缘)的长度, 取部分用PBS冲洗干净的结肠, 用4%多聚甲醛溶液固定过夜, 石蜡包埋切片, 苏木精-伊红(HE)染色, 显微镜下观察结肠组织黏膜损伤情况, 并由专业病理人员进行结肠组织病理学评分。结肠组织病理学评分=结肠上皮组织损伤评分+炎性浸润评分, 评分标准见表1。

表1 结肠组织病理学评分标准

Table 1 Colon histopathological scoring system

计分	结肠上皮组织损伤	炎性浸润
0	无损伤	无浸润
1	少量杯状细胞破坏	浸润至隐窝基底周围
2	大量杯状细胞破坏	浸润至黏膜基层
3	少量腺体破坏	黏膜基层广泛浸润并水肿增厚
4	大量腺体破坏	浸润至黏膜下层

Fisher公司构建, 序列见表2。

1.7 免疫印迹分析

取一小段小鼠结肠组织(约0.2 g)至含有500 μ L组织蛋白裂解液的2 mL EP管中, 用KZ-II高速组织研磨仪进行匀浆, 频率: 70 Hz, 时间: 共180 s, 每60 s暂停30 s。匀浆制备完成后置于冰上裂解0.5 h, 4 $^{\circ}$ C、12000 \times g离心15 min, 取上清, 用BCA测定蛋白浓度。然后制备10%的SDS-PAGE, 以40 μ g蛋白量上样电泳。恒压条件下, 浓缩胶电泳电压70 V, 分离胶电压为100 V。电泳结束后, 用湿法转膜至PVDF膜(250 mA, 90 min)。转膜完毕, 用5%脱脂奶粉室温封闭1 h, 接着与IkB α 、Phospho-IkB α 、NF- κ B p65、Phospho-NF- κ B p65(Ser536)抗体、TNF- α 、IL-6、IL-1 β

的一抗 (1:1000 稀释度) 在 4 °C 冰箱孵育过夜, 接着用 TBST 洗涤一抗 (5 次, 5 min/次), 与适当稀释的二抗在室温共孵育 1 h, 膜用同样的方法洗涤二抗 10 次, 最后用增强型化学发光试剂进行检测。条带灰度值使用 Image J 软件进行分析。

1.8 统计分析方法

所有实验均独立重复三次以上, 采用 SPSS 21.0 版本软件进行统计分析, 所有数据均采用均数±标准差 (x±s) 表示, 多组之间的比较采用单因素方差分析, 两两比较使用 *t* 检验方法分析, *p*<0.05 认为差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 CP 对结肠炎小鼠体重减轻的抑制作用

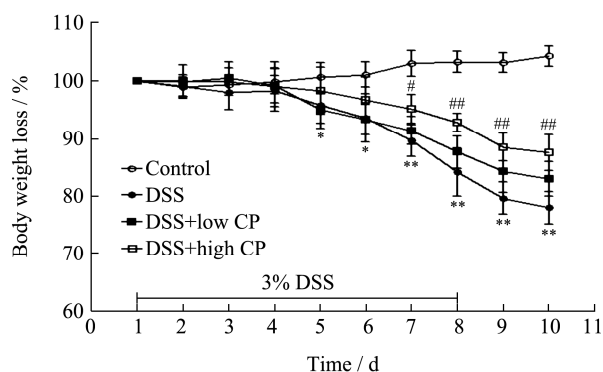


图 1 CP 对结肠炎小鼠体重减轻的抑制作用

Fig.1 Inhibitory effect of CP on body weight loss of mice with colitis

注: 对照组、DSS 组、DSS+低 CP 组、DSS+高 CP 组的体重丢失率。*是指与对照组相比, **p*<0.05, ***p*<0.01, #是指与 DSS 组相比, #*p*<0.05, ###*p*<0.01。

研究报道^[21], 有 18%~62% 的 UC 患者有体重下降的临床表现, 这可能与长期腹泻、血便导致的继发营养不良有关。观察 CP 对 DSS 诱导的急性溃疡性结肠炎小鼠体重的影响, 结果见图 1。正常对照组小鼠体重增加, 精神状态良好, 饮水、饮食、活动及大便等性状正常, 体毛柔软光亮。各造模组小鼠在给与 DSS 后, 体重开始下降, 开始出现精神萎靡、活动量减少、进食量下降、毛发灰暗凌乱无光泽等现象, 模型组小鼠在给与 DSS 3 d 后开始出现稀便、血便、体重减轻、懒动、厌食及毛发干枯等 UC 急性期症状, 说明造模成功, 到第 10 d, 模型组小鼠的平均体重仅为初始平均体重的 76.81%, 而低、高剂量 CP 组小鼠平均体重

分别为初始平均体重的 83.02% 和 87.58%。与模型组相比, CP 处理组小鼠的体重丢失明显减少, 且高剂量处理组小鼠的体重丢失也要少于低剂量组, 同时, 处理组小鼠的进食、体重、活动度都有所改善。大量人群和动物实验已经证实, 可可即使在慢性毒性和致癌实验中没有出现毒副作用^[22,23]。实验结果提示, CP 能够有效的抑制 DSS 诱导的结肠炎小鼠的体重丢失, 这对改善 UC 炎症期间营养不良可能具有较好的作用。

2.2 CP 对结肠炎小鼠结肠长度缩短的抑制作用

取各组小鼠完整结肠, 观察 CP 对结肠炎小鼠结肠长度的影响, 结果如图 2 所示。与正常对照组 (9.85 cm) 相比, 模型组 (6.89 cm) 小鼠结肠长度明显缩短 (*p*<0.01), CP 低剂量 (8.16 cm) 和高剂量组 (9.19 cm) 小鼠结肠长度缩短明显少于模型组, 差异具有统计学意义 (*p*<0.05), 且随着 CP 剂量增加, 结肠长度缩短进一步减少。结肠炎症期间, 伴有组织水肿, 结肠长度缩短^[24], CP 能减少 DSS 诱导所致的结肠长度缩短, 表明其对 DSS 诱导的小鼠 UC 炎症反应具有一定的抑制作用。

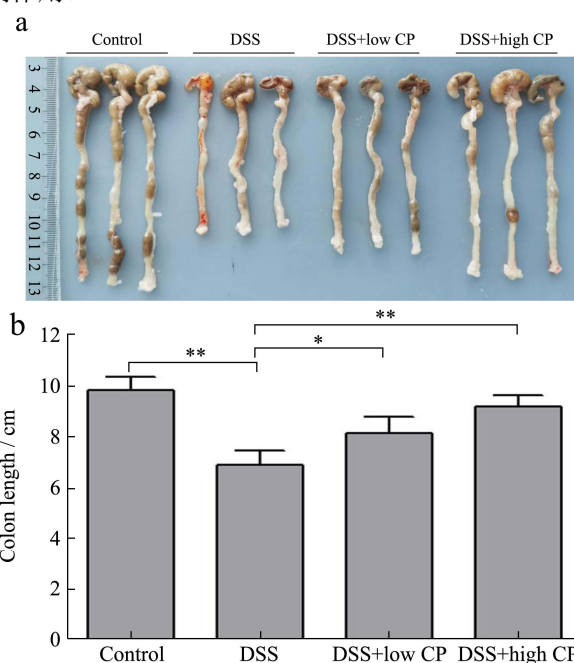


图 2 CP 对结肠炎小鼠结肠长度缩短的抑制作用

Fig.2 Inhibitory effect of CP on colon shortening in mice with colitis

注: a: 小鼠结肠的代表性图像; b: 小鼠结肠长度的直条图。**p*<0.05, ***p*<0.01。

2.3 CP 对结肠炎小鼠结肠黏膜损伤的抑制作用

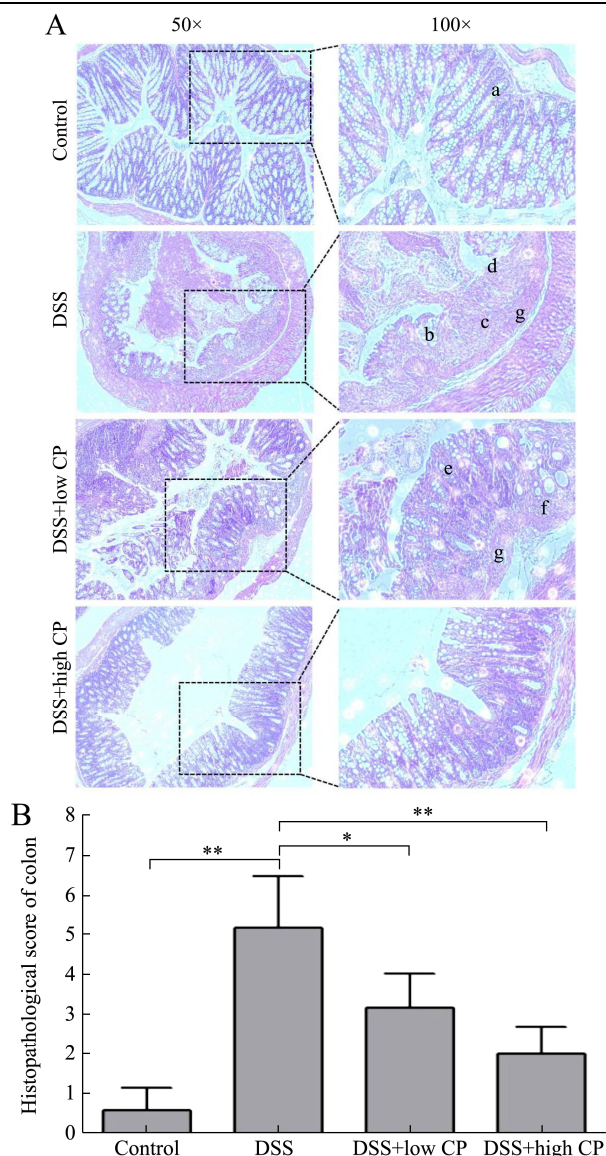


图3 CP对结肠炎小鼠结肠黏膜损伤的抑制作用

Fig.3 Inhibitory effect of CP on colon mucosa damage in mice with colitis

注: A: 结肠组织典型 H&E 染色图像(放大 50、100 倍), 其中 a: 正常肠隐窝, b: 肠杯状细胞破坏或减少, c: 大量散在的炎症细胞, d: 肠上皮破坏及肠隐窝消失, e: 肠隐窝上移, f: 少量炎症细胞, g: 肠黏膜水肿; B: 结肠组织病理学评分的直条图。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

通过小鼠结肠 HE 染色病理分析, 考察 CP 对结肠炎小鼠结肠黏膜损伤的影响, 结果如图 3 所示。与正常对照组小鼠(结肠组织病理学评分, 0.60)相比, 模型组小鼠(5.20)结肠组织病理学评分明显增高($p < 0.01$), 镜下正常对照组小鼠肠腺清晰、排列整齐、无明显炎性细胞浸润、绒毛排列整齐、无明显断裂, 而模型组小鼠肠黏膜结构遭到严重破坏、可见大量炎性细胞浸润、绒毛排列杂乱无序、可见明显断裂、绒毛长度缩短, 局部有轻重度坏死, 坏死处成纤维细胞

增生, 黏膜下层水肿。与模型组相比, CP 低剂量(3.20)和高剂量组(2.00)小鼠结肠组织病理学评分明显降低($p < 0.05$), 低剂量组小鼠结肠黏膜结构明显改善, 高剂量组小鼠结肠黏膜结构基本恢复正常, 上皮结构较完整, 几乎没有炎症细胞浸润。可是抗氧化剂的丰富来源, 含有大量表儿茶素及黄酮类化合物^[13], Zhang 等^[25]发现表儿茶素能够明显减轻 DSS 诱导的小鼠体重下降、结肠黏膜损伤、结肠缩短和隐窝损害, 与本研究的发现是一致的。研究表明 CP 能够减轻 DSS 诱导的结肠黏膜损伤, 抑制炎症的严重程度, 从而有效改善 DSS 诱导的结肠炎症病变。

2.4 CP对结肠炎小鼠肠组织中促炎因子表达的抑制作用

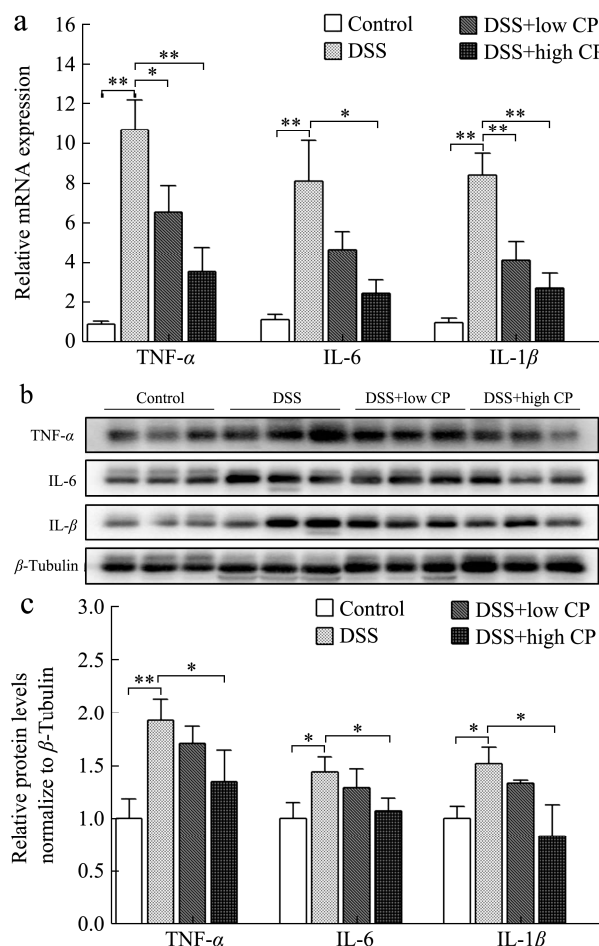


图4 CP对结肠炎小鼠肠组织中促炎因子表达的抑制作用
Fig.4 Inhibitory effect of CP on the relative expression of pro-inflammatory cytokines in colon tissues

注: a: mRNA 相对表达水平(以内源性 GAPDH 的表达水平作为标准参照); b: 免疫印迹分析图像; c: 蛋白质相对表达水平(以 β 微管蛋白的表达水平为标准参照)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

UC 的发生与炎症因子的失衡和免疫反应的异常密切相关, UC 患者结肠组织中促炎因子的水平会增高, 产生免疫功能紊乱, 最终导致 UC 的发展^[7,8]。与对照组相比, 模型组小鼠结肠组织中的促炎因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的 mRNA 表达水平分别升高了 9.72、7.08 和 7.39 倍 ($p<0.01$); 与模型组相比, 低、高剂量 CP 组小鼠 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的 mRNA 水平分别降低了 0.64、0.72、1.05 倍和 2.03、2.27、2.07 倍, 差异具有统计学意义 ($p<0.05$); 与对照组相比, 模型组小鼠结肠组织中的促炎因子 TNF- α 的蛋白表达水平升高了 0.93 倍 ($p<0.01$), IL-6 和 IL-1 β 的蛋白表达水平分别升高了 0.44 和 0.52 倍 ($p<0.05$); 与模型组相比, 低剂量 CP 组小鼠 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的蛋白表达水平分别降低了 0.22、0.14 和 0.18 倍, 高剂量 CP 组小鼠则分别降低了 0.58、0.37 和 0.68 倍, 差异具有统计学意义 ($p<0.05$)。大量的人群和动物模型研究显示, IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 等炎症因子在维持 UC 慢性炎症反应中发挥重要的作用^[26]。因此, CP 可能通过抑制 DSS 诱导的 UC 小鼠结肠组织中促炎因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的表达从而减轻炎症反应的严重程度。

2.5 CP 对结肠炎小鼠结肠组织中 NF- κ B 信号活化的抑制作用

核因子 kappa B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 是一类细胞核转录调节因子, 其在炎症、应激反应、细胞分化和增殖以及细胞凋亡过程中都发挥重要作用^[27,28]。同时, 在 UC 患者结肠黏膜中, 存在着 NF- κ B p65 的高表达^[29], NF- κ B 信号通路激活后, 诱导其下游炎症因子 (如 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β) 的转录和表达, 并促进这些炎症因子迁移、黏附及与肠上皮细胞(IECs) 的相互作用^[30-32]。观察 CP 对结肠炎小鼠结肠组织中 NF- κ B 的活化影响, 结果如图 5 所示。每个泳道代表一只小鼠, 每组选取了三只不同的小鼠, 与正常对照组相比, 模型组小鼠结肠组织中 NF- κ B p65 蛋白 S536 位点的磷酸化水平增高了 4.00 倍 ($p<0.01$); 与模型组相比, 低、高剂量 CP 组小鼠结肠组织中 NF- κ B p65 蛋白 S536 位点的磷酸化水平分别下降了 0.62 倍和 2.07 倍, 差异具有统计学意义 ($p<0.05$); 同时, NF- κ B p65 总蛋白的表达水平在各组之间的差异无统计学意义。Park 等^[33]已经发现, NF- κ B p65 蛋白 S536 位点的磷酸化可能会增强蛋白质之间的相互作用, 从而影响二级结构的构象变化激活 NF- κ B p65, 活化后的 p65 经过核转位最终介导靶基因的转录, 从而直接或间接

的调控炎症因子的表达。I κ B 是调节 NF- κ B 活性的重要蛋白, 而 I κ B α 是 I κ B 蛋白家族中最常见的成员, Wang 等^[34]的研究表明, 几乎所有 I κ B α 磷酸化修饰都促进 NF- κ B 活化, 同样, I κ B α 的去磷酸化对于抑制 NF- κ B 的激活至关重要。本实验结果发现, 与正常对照组相比, 模型组小鼠结肠组织中 I κ B α 蛋白的磷酸化水平增高了 2.12 倍 ($p<0.01$); 与模型组相比, 低、高剂量 CP 组小鼠结肠组织中 I κ B α 蛋白的磷酸化水平分别下降了 1.69 倍和 2.19 倍, 差异具有统计学意义 ($p<0.01$); 同时, I κ B 总蛋白的表达水平在各组之间的差异无统计学意义。综上所述, CP 可能通过抑制 NF- κ B p65 信号通路的活化, 进一步减少相关促炎细胞因子的分泌, 从而减轻 DSS 诱导的 UC 炎症反应。

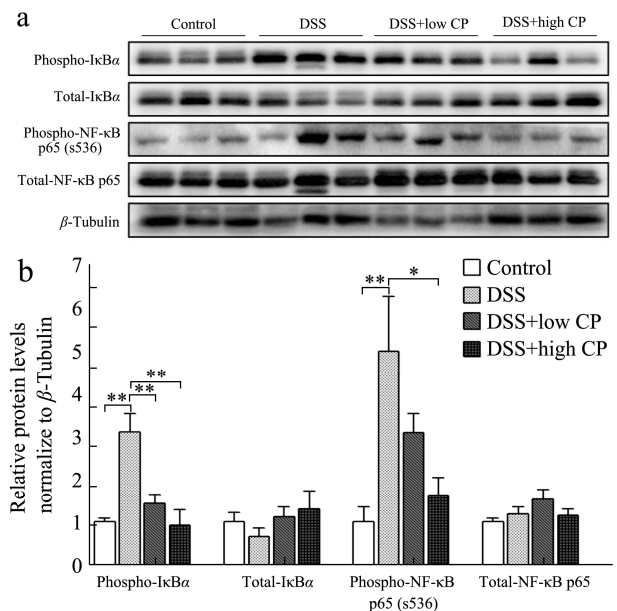


图 5 CP 对结肠炎小鼠结肠组织中 NF- κ B 信号活化的抑制作用

Fig.5 Inhibitory effect of CP on the activation of NF- κ B signaling in the colon tissues of mice with colitis

注: a: 免疫印迹分析图像; b: 磷酸化 NF- κ B p65 (S536)、I κ B α 蛋白表达的直条图。* $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。

3 结论

UC 的临床治疗效果不佳, 容易反复发作, 而且具有多种副作用, CP 含有许多生物活性化学物质, 虽然其抗炎机制还不是十分清楚, 但是其抗炎和无毒副作用的优点决定了其用作 UC 治疗药物的前景。综上所述, 本实验发现 CP 可以显著抑制 UC 引发的体重减少和结肠缩短、减轻肠黏膜组织损伤破坏和炎性细胞浸润, 降低促炎细胞因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的表达水平, 其减轻炎症的机制可能与抑制 NF- κ B p65 炎症信号通路有关。上述研究为深入探索 UC 的发病机制及制定 UC 患者营养支持策略提供了一定的理论基础。

参考文献

- [1] 胡品津. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2012年·广州) 解读[J]. 胃肠病学, 2012, 17(12): 709-711
HU Pinjin. Interpretation of consensus opinions on diagnosis and treatment of inflammatory bowel disease (2012 · Guangzhou) [J]. Gastroenterology, 2012, 17(12): 709-711
- [2] Harbord M, Eliakim R, Bettenworth D, et al. Third European evidence-based consensus on diagnosis and management of ulcerative colitis. Part 2: current management [J]. J Crohns Colitis, 2017, 11: 1512
- [3] Ungaro R, Mehandru S, Allen P B, et al. Ulcerative colitis [J]. Lancet, 2017, 389(10080): 1756-1770
- [4] Flores B M, O'Connor A, Moss A C. Impact of mucosal inflammation on risk of colorectal neoplasia in patients with ulcerative colitis: a systematic review and meta-analysis [J]. Gastrointest Endosc, 2017, 86(6): 1006-1011
- [5] Zhou Q, Shen Z F, Wu B S, et al. Risk of colorectal cancer in ulcerative colitis patients: a systematic review and meta-analysis [J]. Gastroenterol Res Pract, 2019: 5363261
- [6] Ng S C, Shi H Y, Hamidi N, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies [J]. Lancet, 2017, 390(10114): 2769-2778
- [7] Olfatifar M, Zali M R, Pourhoseingholi M A, et al. The emerging epidemic of inflammatory bowel disease in Asia and Iran by 2035: a modeling study [J]. BMC Gastroenterol, 2021, 21(1): 204
- [8] 龚建萍, 李倩. 免疫因素在溃疡性结肠炎发病机制中的研究进展[J]. 现代消化及介入诊疗, 2020, 25: 1676-1679
GONG Jianping, LI Qian. Research progress of immune factors in the pathogenesis of ulcerative colitis [J]. Modern Digestion and Interventional Diagnosis and Treatment, 2020, 25: 1676-1679
- [9] Long M D, Smith T W, Dibonaventura M, et al. Real-world effectiveness of advanced therapies among patients with moderate to severe ulcerative colitis in the United States [J]. Inflamm Bowel Dis, 2020, 26(6): 941-948
- [10] Kucharzik T, Koletzko S, Kannengiesser K, et al. Ulcerative colitis-diagnostic and therapeutic algorithms [J]. Dtsch Arztebl Int, 2020, 117(33-34): 564-574
- [11] Hossen I, Hua W, Ting L, et al. Phytochemicals and inflammatory bowel disease: a review [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2020, 60(8): 1321-1345
- [12] Katz D L, Doughty K, Ali A. Cocoa and chocolate in human health and disease [J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 15(10): 2779-2811
- [13] Halvorsen B L, Carlsen M H, Phillips K M, et al. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States [J]. Am J Clin Nutr, 2006, 84: 95-135
- [14] 张燕, 熊波, 易娜, 等. 黄烷醇类化合物的药理活性研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6: 1055-1060
ZHANG Yan, XIONG Bo, YI Na, et al. Advances in research on pharmacological activities of flavanol compounds [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2015, 6: 1055-1060
- [15] Ullah A, Munir S, Badshah S L, et al. Important flavonoids and their role as a therapeutic agent [J]. Molecules, 2020, 25(22): 5243
- [16] Sartor L, Pezzato E, Dell'aica I, et al. Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design [J]. Biochem Pharmacol, 2002, 64(2): 229-37
- [17] Ramiro-Puig E, Castell M. Cocoa: antioxidant and immunomodulator [J]. Br J Nutr, 2009, 101: 931-940
- [18] Pei L, Ke Y, Zhao H, et al. Role of colonic microbiota in the pathogenesis of ulcerative colitis [J]. BMC Gastroenterol, 2019, 19(1): 10
- [19] Nunes N S, Kim S, Sundby M, et al. Temporal clinical, proteomic, histological and cellular immune responses of dextran sulfate sodium-induced acute colitis [J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(38): 4341-4355
- [20] Shah Y M. The role of hypoxia in intestinal inflammation [J]. Mol Cell Pediatr, 2016, 3(1): 1
- [21] 朱峰, 钱家鸣, 韦军民. 炎症性肠病 [J]. 中国临床营养杂志, 2008, 16(2): 67-69
ZHU Feng, QIAN Jiaming, WEI Junmin. Inflammatory bowel disease [J]. Chinese Journal of clinical nutrition, 2008, 16(2): 67-69
- [22] Tarka S M Jr. The toxicology of cocoa and methylxanthines: a review of the literature [J]. Crit Rev Toxicol, 1982, 9(4): 275-312
- [23] Goya L, Martín M Á, Sarriá B, et al. Effect of cocoa and its flavonoids on biomarkers of inflammation: studies of cell culture, animals and humans [J]. Nutrients, 2016, 8(4): 212
- [24] Griffel L H, Das K M. Ulcerative colitis: pathogenesis, diagnosis, and current treatment [J]. J Assoc Acad Minor Phys, 1996, 7(3): 63-69
- [25] Zhang H, Deng A, Zhang Z, et al. The protective effect of epicatechin on experimental ulcerative colitis in mice is

- mediated by increasing antioxidation and by the inhibition of NF- κ B pathway [J]. *Pharmacol Rep*, 2016, 68(3): 514-520
- [26] Soufli I, Toumi R, Rafa H, et al. Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immuno-pathogenesis of inflammatory bowel diseases [J]. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*, 2016, 7(3): 353-360
- [27] Hariharan A, Hakeem A R, Radhakrishnan S, et al. The role and therapeutic potential of NF-kappa-B pathway in severe COVID-19 patients [J]. *Inflammopharmacology*, 2021, 29(1): 91-100
- [28] Zhang Q, Lenardo M J, Baltimore D. 30 years of NF- κ B: a blossoming of relevance to human pathobiology [J]. *Cell*, 2017, 168(1-2): 37-57
- [29] Sheng Y, Wu T, Dai Y, et al. 6-gingerol alleviates inflammatory injury in DSS-induced ulcerative colitis mice by regulating NF- κ B signaling [J]. *Ann Palliat Med*, 2020, 9(4): 1944-1952
- [30] He Z, Zhou Q, Wen K, et al. Huangkui Lianchang decoction ameliorates DSS-induced ulcerative colitis in mice by inhibiting the NF-kappa-B signaling pathway [J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019: 1040847
- [31] 刘博,张传凤,马克龙,等.基于 STAT-3/NF- κ B/ICAM-1 通路探讨丹皮酚缓解小鼠结肠炎相关性结直肠癌的作用机制[J].*安徽中医药大学学报*,2021,40:88-92
- LIU Bo, ZHANG Chuanfeng, MA Kelong, et al. Based on STAT-3/NF- κ B/ICAM-1 pathway, the mechanism of paeonol relieving colitis-related colorectal cancer in mice was discussed [J]. *Journal of Anhui University of Traditional Chinese Medicine*, 2021, 40: 88-92
- [32] Mahmoud T N, El-Maadawy W H, Kandil Z A, et al. *Canna x generalis* L.H. Bailey rhizome extract ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis via modulating intestinal mucosal dysfunction, oxidative stress, inflammation, and TLR4/NF- κ B and NLRP3 inflammasome pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 269: 113670
- [33] Park M H, Hong J T. Roles of NF- κ B in cancer and inflammatory diseases and their therapeutic approaches [J]. *Cells*, 2016, 5(2): 15
- [34] Wang X, Peng H, Huang Y, et al. Post-translational modifications of I κ B α : the state of the art [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 574706

(上接第 173 页)

- [28] Beikzadeh S, Akbarinejad A, Swift S, et al. Cellulose acetate electrospun nanofibers encapsulating lemon myrtle essential oil as active agent with potent and sustainable antimicrobial activity [J]. *Reactive and Functional Polymers*, 2020, 157: 104769
- [29] Bonan R F, Bonan P R F, Batista A U D, et al. Poly (lactic acid)/ poly (vinyl pyrrolidone) membranes produced by solution blow spinning: structure, thermal, spectroscopic, and microbial barrier properties [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2017, 134(19): 9
- [30] Li Y Q, Han Q, Feng J L, et al. Antibacterial characteristics and mechanisms of epsilon-poly-lysine against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. *Food Control*, 2014, 43: 22-27
- [31] 张伟娜. ϵ -聚赖氨酸的抑菌特性及对猪肉保鲜效果研究[D]. 济南:齐鲁工业大学,2013
- ZHANG Weina. Antibacterial properties of ϵ -poly lysine and its effects on the preservation of fresh pork [D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2013
- [32] 王梓源,李欣颖,吕俊阁,等. ϵ -聚赖氨酸对大肠杆菌的抑菌机制[J].*食品与发酵工业*,2020,46(21):34-41
- WANG Ziyuan, LI Xinying, LYU Junge, et al. The antimicrobial mechanism of ϵ -poly-L-lysine against *Escherichia coli* [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(21): 34-41
- [33] 杨萍萍,郭思琪,侯温甫,等. ϵ -聚赖氨酸/聚乙烯醇复合膜的抑菌活性及其对生鲜鸭肉的保鲜作用[J].*现代食品科技*, 2020,36(3):113-119,98
- YANG Pingping, GUO Siqi, HOU Wenfu, et al. Antibacterial of ϵ -poly-L-lysine/polyvinyl alcohol composite film and its preservation effect on fresh duck meat [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2020, 36(3): 113-119, 98