

基于 NF- κ B 通路探讨阔叶十大功劳对急性溃疡性结肠炎小鼠的作用

龙 健^{1,2,3}, 智 慧^{1,2,3}, 涂 星³, 胡泽华^{1,3}, 杨 宝^{1,3}, 聂 娟^{1,3}, 胡雪黎^{1,3}, 刘可云^{1,2,3*}

(1. 湖北民族大学医学部, 湖北 恩施 445000; 2. 湖北民族大学风湿性疾病发生与干预湖北省重点实验室, 湖北 恩施 445000; 3. 湖北民族大学武陵山中药材检验检测中心, 湖北 恩施 445000)

摘要: **目的** 基于 NF- κ B 信号通路探讨阔叶十大功劳对溃疡性结肠炎 (UC) 小鼠结肠炎症反应的影响。**方法** 小鼠随机分为正常组、模型组、美沙拉嗪组和阔叶十大功劳低、中、高剂量组。除正常组外, 其余各组均自由饮用 2.5% 葡聚糖硫酸钠 (DSS) 建立 UC 小鼠模型, 每天记录小鼠体质量变化与 DAI 评分。给药结束后, 记录结肠长度, HE 染色观察结肠组织病理形态, ELISA 法检测结肠组织 TNF- α 、IL-10、IL-1 β 和 IL-6 水平, Western blot 法检测结肠组织 ZO-1、Occludin、Claudin-1 和 NF- κ B 蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 阔叶十大功劳组小鼠体质量、结肠长度增加 ($P<0.05$, $P<0.01$), DAI 和结肠组织病理评分降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 结肠组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平和胞核 NF- κ B 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), IL-10 水平和 ZO-1、Occludin、Claudin-1、胞浆 NF- κ B 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 阔叶十大功劳可改善由 DSS 诱发的 UC 小鼠结肠组织炎症反应, 其机制可能与调控 NF- κ B 信号通路有关。

关键词: 阔叶十大功劳; 溃疡性结肠炎; 炎症因子; NF- κ B; ZO-1; Occludin; Claudin-1

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)06-2026-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.06.042

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 属于炎症性肠病的范畴, 是好发于直肠和乙状结肠的慢性非特异性炎症, 为世界难治性疾病之一^[1-2]。临床上主要表现为腹痛、腹泻、黏液脓血便等^[3-4]。UC 的发病高峰为 20 岁至 49 岁, 目前我国 UC 患病率约为 11.6/10 万, 且患病率与发病率逐年升高^[5]。UC 临床病程难以预测, 特征为加重和缓解交替, 病因、发病机制尚不明确^[6], 发病因素包括遗传、环境等^[7-8]。目前西医临床主要采用以 5-ASA 类、皮质醇等西药治疗^[9]。中药具有从多途径、多靶点综合作用的特点^[10], 并且具有灵活多样、毒副作用较小等优点^[11-12]。《湖北恩施药用植物志》中记载, 阔叶十大功劳 *Mahonia bealei* (Fort.) Cart. 具有清虚热、燥湿解毒、活血消肿作用, 主治肺热咳血、湿热痢疾、黄疸肝炎等病症。现代药理研究发现, 阔叶十大功劳具有抗氧化、消炎、抗病毒、降血糖等药理活性^[13-14]。阔叶十大功劳在恩施民间常用来治疗痢疾、久痢等溃疡性结肠炎症状疾病, 且疗效显著, 但其对 UC 的药理作用未见文献报道。课题组前期进行了大量实验, 发现阔叶十大功劳对 UC 小鼠有着显著的保护作用, 故本研究通过观察阔叶十大功劳对 DSS 诱导 UC 小

鼠结肠组织的保护作用, 并基于 NF- κ B 信号通路探究其作用机制, 以期为阔叶十大功劳治疗溃疡性结肠炎的应用提供参考。

1 材料

1.1 动物 C57BL/6J 小鼠 48 只, SPF 级, 雌雄各半, 8 周龄, 体质量 (20 $\pm$ 2) g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (辽) 2020-0001]。实验动物的饲养按照国家卫生研究所对实验动物使用相关条例规定进行, 所涉及的方案及操作流程已获得湖北民族大学伦理委员会批准 [批准号 (2021) 47]。小鼠适应性饲养 7 d 后开始实验。

1.2 药物 阔叶十大功劳采自湖北省恩施自治州建始县, 并经湖北民族大学医学部中药教研室李厚聪博士鉴定为小檗科十大功劳属植物阔叶十大功劳 *Mahonia bealei* (Fort.) Cart. 的干燥茎。美沙拉嗪肠溶片 (葵花药业集团佳木斯鹿灵制药有限公司, 规格 0.25 g, 批号 201212)。

1.3 试剂 葡聚糖硫酸钠 (DSS) (美国 MP 生物医疗公司, 批号 LD3050-100g); 苏木素-伊红染色试剂盒 (上海吉至生化科技有限公司, 批号 A17133843); TNF- α 、IL-

收稿日期: 2022-12-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31860287, 81560703); 风湿性疾病发生与干预湖北省重点实验室开放基金项目 (PT022215); 湖北民族大学 2018 年度博士启动基金项目 (2018)

作者简介: 龙 健 (1993—), 男 (苗族), 硕士生, 从事民族药药效物质基础研究。Tel: 18372566206, E-mail: 1272164879@qq.com

* 通信作者: 刘可云 (1974—), 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事民族药药效物质基础研究。E-mail: liukeyun9777@163.com

网络出版日期: 2023-06-26

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20230625.1652.002.html>

1 β 、IL-6、IL-10 酶联检测试剂盒（上海酶联生物科技有限公司，批号 Dec2021）；大便隐血试剂盒（南京建成生物工程研究所，批号 C027-1-1）；全蛋白提取试剂盒（南京凯基生物科技发展有限公司，批号 202209605）；细胞核蛋白和胞浆蛋白制备试剂盒（北京普利莱基因技术有限公司，批号 202205305）；NF- κ B 抗体（美国 Signalway Antibody 公司，批号 2415）；Occludin、ZO-1、Claudin-1 抗体（上海碧云天生物技术有限公司，批号 040821211021、032421210827、040821211021）；PVDF 膜（北京索莱宝科技有限公司，批号 20211223）。

1.4 仪器 组织匀浆器（上海净信实业发展有限公司）；电泳仪（北京君意东方电泳设备有限公司）；离心机〔奥豪斯仪器（上海）有限公司〕；Milli-Q 型超纯水机（美国 Millipore 公司）；TC-120 型组织自动脱水机、TB-718E 型组织包埋机、R139 型轮转式切片机、TK-218II 型摊片机（湖北泰维科技实业股份有限公司）；显微镜（日本尼康公司）；电子天平〔赛多利斯科学仪器（北京）有限公司〕；KQ-500DE 型超声清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；酶标仪（美国赛默飞世尔科技有限公司）；化学发光成像分析仪（美国通用电气公司）；旋转仪水平摇床震荡器（杭州佑宁仪器有限公司）；旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂）；恒温水浴锅（常州诺基仪器有限公司）。

2 方法

2.1 药物制备 取适量阔叶十大功劳，粉碎，加 10 倍量 70% 乙醇浸泡 2 h，100 $^{\circ}$ C 水浴回流提取 3 h，双层纱布过滤；再向滤渣中加入 8 倍量 70% 乙醇，100 $^{\circ}$ C 水浴回流提取 2 h，双层纱布过滤，合并滤液，于旋转蒸发仪 60 $^{\circ}$ C 下浓缩至浸膏，于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内保存备用。将美沙拉嗪肠溶片研磨，研末过筛，给药剂量为 0.2 g/kg。

2.2 分组、造模与给药 小鼠随机分为正常组、模型组、美沙拉嗪组（0.2 g/kg，阳性对照）和阔叶十大功劳低、中、高剂量组（2.3、4.6、9.2 g/kg），每组 8 只。除空白组外，其余各组均自由饮用 2.5% DSS 建立 UC 小鼠模型，造模同时进行给药，阔叶十大功劳组和美沙拉嗪组灌胃给予相应剂量药液，空白组和模型组灌胃给予等量蒸馏水，灌胃体积 0.2 mL/10 g，每天 1 次，连续 10 d。

2.3 疾病活动指数（DAI）评分 造模给药期间，每天记录小鼠体质量、粪便性状及便血程度，并进行疾病活动指数（disease activity index, DAI）评分^[15]，评分标准见表 1。DAI 评分=体质量降低百分比评分+粪便性状评分+便血程度评分。

表 1 DAI 评分标准

评分/分	体质量降低%	大便秘状	便血
0	0	正常	正常
1	1~5	正常	正常
2	5~10	松散	隐性便血
3	10~15	松散	隐性便血
4	>15	腹泻	显性便血

2.4 结肠病理组织学观察及评分 末次给药后，小鼠禁食不禁水 24 h，颈椎脱臼处死，无菌操作下切取肛门至盲肠末端整个结肠和直肠段，测量并记录长度。切取一段结肠，于 4% 多聚甲醛溶液中固定，石蜡包埋，切片后行常规苏木素-伊红（HE）染色，封片后于显微镜下观察结肠组织病理变化，并参考文献〔15〕报道进行病理学评分，标准为正常形态且无炎症，记 0 分；小部分杯状细胞丢失及轻微炎症浸润，记 1 分；大面积的杯状细胞缺失及黏膜层中度炎症浸润，记 2 分；少量或部分隐窝缺失及黏膜肌层广泛的炎症浸润且伴有黏膜水肿增厚，记 3 分；大面积的隐窝缺失及黏膜下层广泛的炎症浸润，记 4 分。剩余结肠组织立即置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存，用于后续实验。

2.5 ELISA 法检测结肠组织炎症因子 TNF- α 、IL-10、IL-1 β 和 IL-6 水平 定量称取小鼠结肠组织，加入 PBS 匀浆后离心取上清液，严格按照 ELISA 试剂盒说明书检测结肠组织 TNF- α 、IL-10、IL-1 β 和 IL-6 水平。

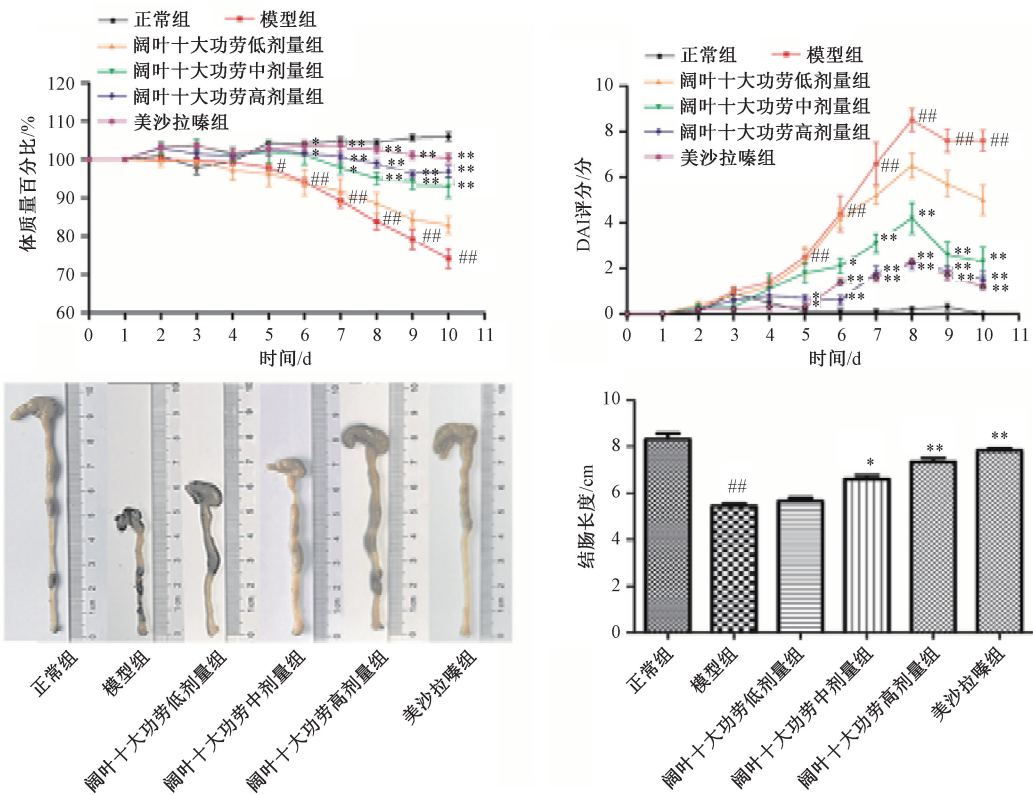
2.6 Western blot 法检测结肠组织 ZO-1、Occludin、Claudin-1 及胞浆和胞核 NF- κ B 蛋白表达 严格按照蛋白提取试剂盒说明书提取蛋白样品，另按试剂盒说明书提取胞浆和胞核蛋白，BCA 法测定蛋白浓度。经电泳、转膜、脱脂奶粉溶液封闭后，分别加入 ZO-1（1：1 000）、Occludin（1：1 000）、Claudin-1（1：1 000）及 NF- κ B（1：1 000）抗体，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，次日加入 HRP 标记的二抗（1：1 000），室温孵育 2 h，后加入等体积 ECL 化学发光 A 液和 B 液进行显色，采用凝胶成像系统行曝光、显影，通过 Image J 软件分析蛋白条带灰度值，ZO-1、Occludin、Claudin-1 及胞浆 NF- κ B 蛋白以 β -actin 为内参，胞核 NF- κ B 蛋白以 H3 为内参，计算各目的蛋白相对表达量。

2.7 统计学分析 通过 SPSS 20 软件进行处理，计量资料以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD 法，方差不齐时用 Dunnett's T3 法。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 阔叶十大功劳对 DSS 诱导 UC 小鼠体质量、DAI 评分及结肠长度的影响 与正常组比较，模型组小鼠体质量随时间延长逐渐降低（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），DAI 评分随时间延长逐渐升高（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），结肠长度缩短（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，阔叶十大功劳中、高量组和美沙拉嗪组小鼠体质量随时间延长逐渐升高（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），DAI 评分随时间延长逐渐降低（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），结肠长度增加（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），见图 1。

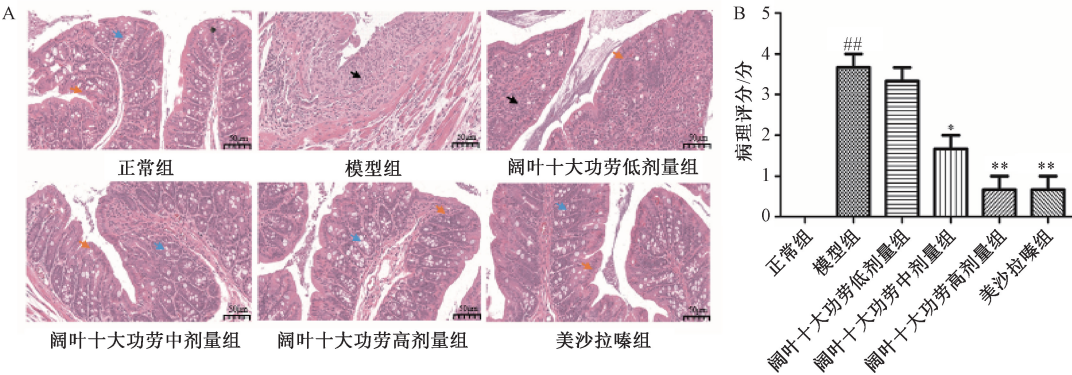
3.2 阔叶十大功劳对 DSS 诱导 UC 小鼠结肠组织病理形态的影响 正常组小鼠结肠黏膜上皮连续完整，排列规则，隐窝结构基本正常，未见中性粒细胞和淋巴细胞浸润；与正常组比较，模型组小鼠肠壁结构破坏严重，杯状细胞丢失，隐窝缺失，腺体受损，可见大量炎性细胞浸润，出现明显的病理损伤；阔叶十大功劳中、高剂量组和美沙拉嗪组小鼠结肠组织病理损伤逐渐恢复，炎性细胞浸润减少，



注：与正常组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图 1 阔叶十大功劳对 DSS 诱导 UC 小鼠体质量、DAI 评分及结肠长度的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

较模型组均有不同程度的改善，见图 2A。与正常组比较，模型组小鼠结肠组织病理评分升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，阔叶十大功劳中、高剂量组和美沙拉嗪组小鼠结肠组织病理评分降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见图 2B。



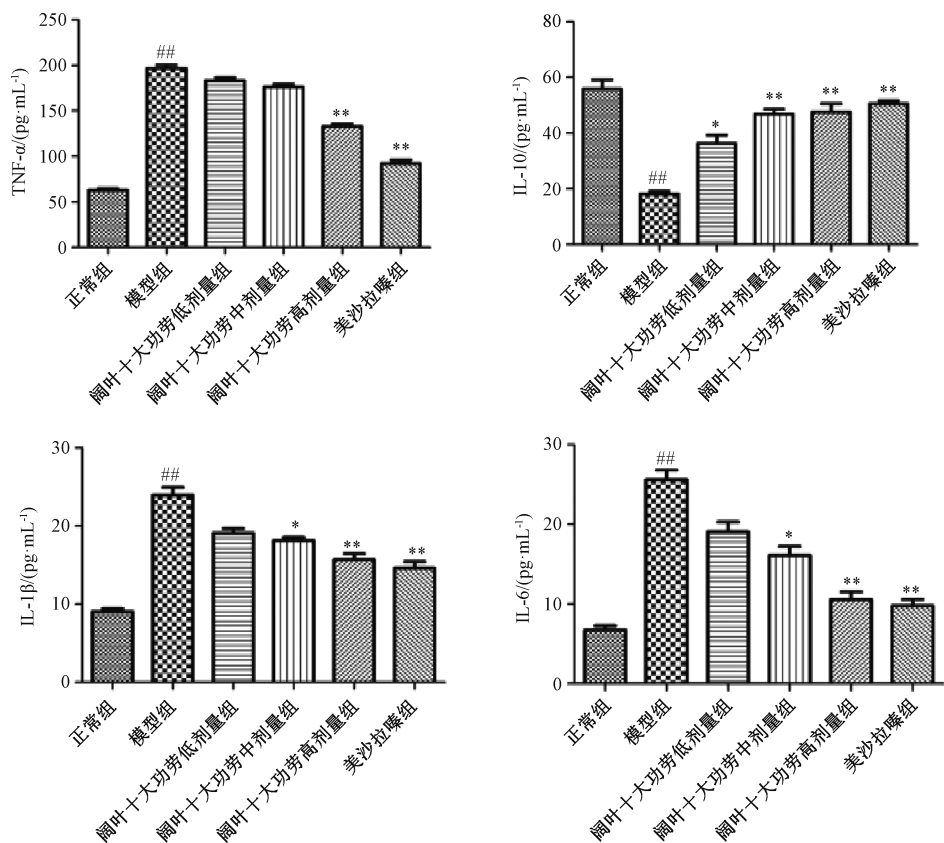
注：黑色箭头为炎症细胞浸润，蓝色箭头为结肠隐窝，橙色箭头为杯状细胞。与正常组比较，## $P<0.01$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图 2 阔叶十大功劳对 DSS 诱导 UC 小鼠结肠组织病理形态的影响 ($\times 200$, $\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.3 阔叶十大功劳对 DSS 诱导 UC 小鼠结肠组织炎症因子水平的影响 与正常组比较，模型组小鼠结肠组织促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平升高 ($P<0.01$)，抑炎因子 IL-10 水平降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，阔叶十大功劳各剂量组和美沙拉嗪组小鼠结肠组织 IL-10 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，中、高剂量组和美沙拉嗪组小鼠结肠组织 IL-1 β 和 IL-6 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，高剂量组和美沙拉嗪组小鼠结肠组织 TNF- α 水平降低 ($P<0.01$)，见图 3。

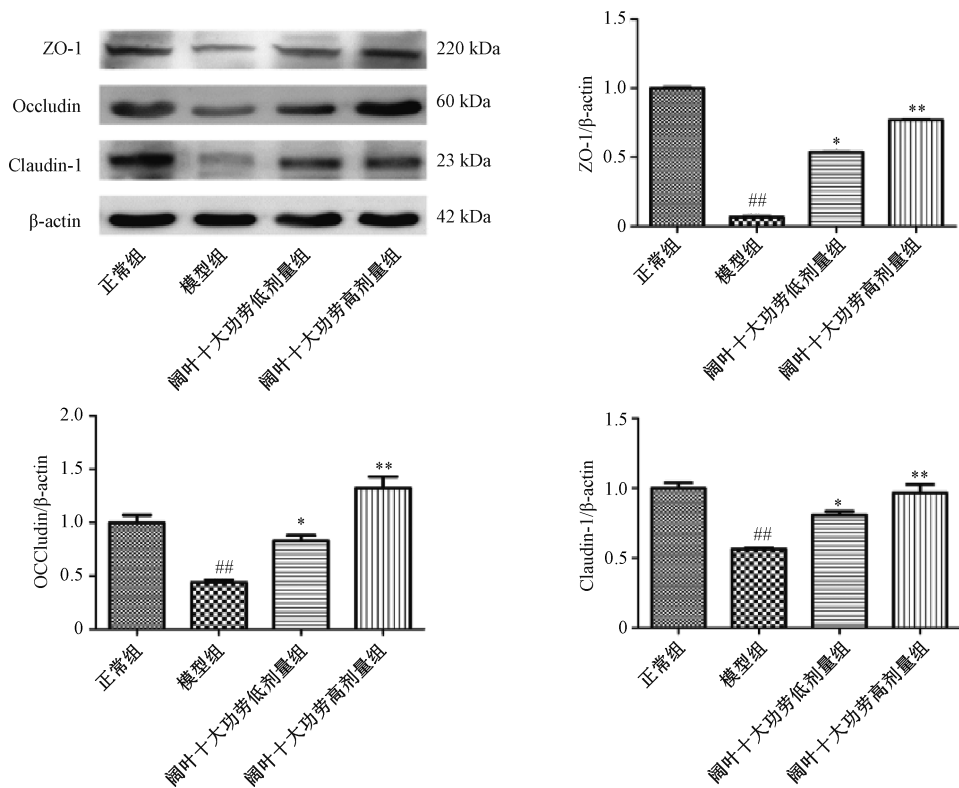
3.4 阔叶十大功劳对 DSS 诱导 UC 小鼠结肠组织 ZO-1、Occludin、Claudin-1 蛋白表达的影响 与正常组比较，模型组小鼠结肠组织 ZO-1、Occludin、Claudin-1 蛋白表达降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，阔叶十大功劳各剂量组小鼠结肠组织 ZO-1、Occludin、Claudin-1 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见图 4。

3.5 阔叶十大功劳对 DSS 诱导 UC 小鼠结肠组织 NF- κ B 核转位的影响 与正常组比较，模型组小鼠结肠组织胞浆 NF- κ B 蛋白表达降低 ($P<0.01$)，胞核 NF- κ B 蛋白表达升



注：与正常组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，^{*}*P*<0.05，^{**}*P*<0.01。

图 3 阔叶十大功劳对 DSS 诱导 UC 小鼠结肠组织炎症因子水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=8)

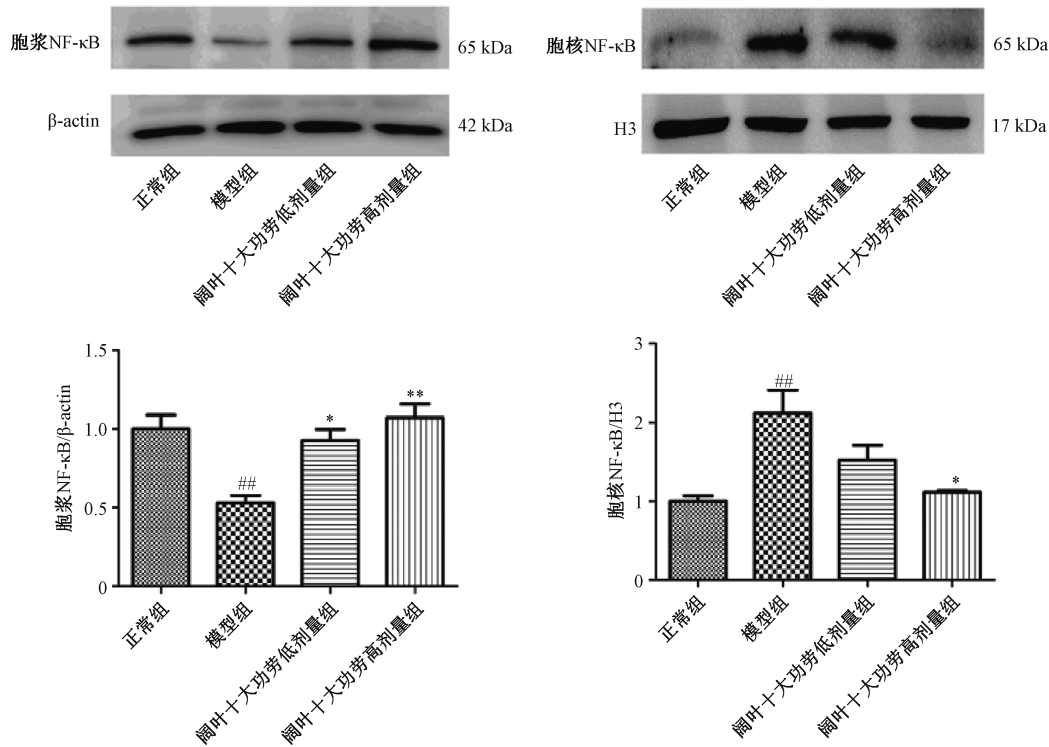


注：与正常组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，^{*}*P*<0.05，^{**}*P*<0.01。

图 4 阔叶十大功劳对 DSS 诱导 UC 小鼠结肠组织 ZO-1、Occludin、Claudin-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

高 ($P<0.01$)；与模型组比较，阔叶十大功劳各剂量组小鼠结肠组织胞浆 NF- κ B 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，

高剂量组胞核 NF- κ B 蛋白表达降低 ($P<0.05$)，见图 5。



注：与正常组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

图 5 阔叶十大功劳对 DSS 诱导 UC 小鼠结肠组织 NF- κ B 核转位的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

4 讨论

溃疡性结肠炎在中医中归属于“泄泻”“痢疾”等范畴^[16]。阔叶十大功劳在恩施地区常用来治疗痢疾等疾病，且疗效显著^[17-18]。本研究发现，模型组小鼠体质量降低，结肠长度缩短，DAI 评分升高，结肠出现病理损伤且病理评分升高，与文献报道一致^[19]。经过阔叶十大功劳或美沙拉嗪干预后，小鼠体质量降低和结肠长度缩短等体征均得到改善，DAI 评分降低，结肠病理损伤得到修复。紧密连接蛋白为肠上皮屏障的重要组成部分^[20]。本研究发现，DSS 诱导的 UC 小鼠结肠黏膜组织结构被破坏，结肠组织 ZO-1、Occludin、Claudin-1 蛋白表达降低，与文献报道一致^[21]；经阔叶十大功劳干预后，小鼠结肠组织 ZO-1、Occludin、Claudin-1 蛋白表达均有不同程度的升高。本研究结果表明，DSS 诱导 UC 小鼠模型复制成功；阔叶十大功劳干预可改善 DSS 诱导的 UC 小鼠结肠组织病理损伤，对结肠组织黏膜屏障有明显的保护作用。

UC 发病过程中促炎与抑炎因子的失衡是导致肠道炎症的重要基础^[22]。本研究发现，模型组小鼠结肠组织促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平升高，而抑炎因子 IL-10 水平降低。经阔叶十大功劳或美沙拉嗪干预后，小鼠结肠组织 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平降低，IL-10 水平升高，表明阔叶十大功劳能够增强 UC 小鼠的抗炎能力，改善肠道炎症环境。有研究显示，炎症因子的产生与 NF- κ B 通路密切相关^[3]。p50 和 p65 两个亚基构成的异二聚体是 NF- κ B 最常

见的形态，通常情况下位于胞浆内，受到刺激后会进行系列的磷酸化、泛素化，使得 NF- κ B 蛋白发生核转位，然后与 DNA 上特异序列的结合，大量编码炎症基因，加剧炎症反应^[15]。本研究发现，模型组小鼠结肠组织胞浆 NF- κ B 蛋白表达降低，而胞核中 NF- κ B 蛋白表达升高，NF- κ B 蛋白核转位增强；阔叶十大功劳干预后，小鼠结肠组织胞浆 NF- κ B 蛋白表达升高，胞核 NF- κ B 蛋白表达降低。上述结果表明，阔叶十大功劳通过抑制 NF- κ B 蛋白核转位，维持炎症因子的平衡，对 UC 小鼠进行肠道保护，这可能是其作用机制之一。

综上所述，阔叶十大功劳可能通过抑制 UC 小鼠结肠组织 NF- κ B 蛋白的核转位，减少炎症反应，从而保护肠道黏膜。本研究为中药治疗 UC 提供了实验依据。

参考文献：

[1] 刘 峰, 刘 林, 王垂杰. 溃疡性结肠炎病因病机及治疗进展[J]. 山东中医药大学学报, 2021, 45(1): 143-147.
[2] 贾 媛, 王真真, 李秀敏, 等. 基于数据挖掘中药治疗溃疡性结肠炎的用药规律分析[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(10): 2594-2600.
[3] 甄建华, 黄光瑞. 溃疡性结肠炎病因和发病机制的现代医学研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2019, 27(4): 245-251.
[4] 吴 昊, 章从恩, 于小红, 等. 甘草炮制雷公藤对 DSS 诱导溃疡性结肠炎小鼠的抗炎及免疫调节作用[J]. 中国中药

杂志, 2019, 44(16): 3435-3440.

[5] 彭 昊,董 筠. 中西医结合治疗溃疡性结肠炎研究进展[J]. 河南中医, 2021, 41(3): 448-453.

[6] Ungaro R, Mehandru S, Allen P B, *et al.* Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10080): 1756-1770.

[7] Jostins L, Ripke S, Weersma R K, *et al.* Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease[J]. *Nature*, 2012, 491(7422): 119-124.

[8] Sánchez de Medina F, Romero-Calvo I, Mascaraque C, *et al.* Intestinal inflammation and mucosal barrier function [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2014, 20(12): 2394-2404.

[9] 辛学永. 中西医结合治疗溃疡性结肠炎的研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2020, 39(9): 167-168.

[10] 李 彤,刘 芬,张新悦,等. 基于网络药理学解析葛根芩连汤治疗溃疡性结肠炎的配伍机制[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(13): 3619-3628.

[11] 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.

[12] 麦尔哈巴·米吉提,王佳佳,迟 莉,等. 中医药治疗溃疡性结肠炎研究进展[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(3): 669-671.

[13] 蒲忠慧,代 敏,韩荣祥,等. 星点-响应面法优选阔叶十大功劳叶中小檗碱的提取工艺[J]. 成都医学院学报, 2019, 14(2): 174-177.

[14] 钟 宇,郑学宝,叶 华,等. 芍药汤对溃疡性结肠炎大鼠TLR4/NF-κB 通路的影响[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(7): 1450-1456.

[15] Yuan Z W, Yang L H, Zhang X S, *et al.* Huang-Lian-Jie-Du Decoction ameliorates acute ulcerative colitis in mice *via* regulating NF-κB and Nrf2 signaling pathways and enhancing intestinal barrier function [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1354.

[16] 许昌泰,郭学刚,潘伯荣. 炎症性肠病研究现状[J]. 天津医药, 2002, 30(6): 382-384.

[17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 1088.

[18] 方志先,廖朝林. 湖北恩施药用植物志[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2006: 332-334.

[19] 陈 健,张梁坤,谷文超,等. 半夏泻心汤对右旋葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群的影响[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(11): 2871-2880.

[20] Zhang Z C, Li Y X, Shen P, *et al.* Administration of geniposide ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice *via* inhibition of inflammation and mucosal damage[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 49: 168-177.

[21] Lee S H. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases [J]. *Intest Res*, 2015, 13(1): 11-18.

[22] 娄 余,肖运婷,朱 莹,等. 基于 NF-κB 信号通路的溃结宁膏穴位敷贴对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜炎症反应的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(4): 75-80.