

补骨脂素对溃疡性结肠炎小鼠肠道屏障及继发性肝损伤的改善作用

曹柳¹,唐晓晴¹,罗青¹,牛梦园¹,戴卫波^{2*}

¹广州中医药大学附属中山中医院;²中山市中医院,中山 528400

摘要:研究补骨脂素(psoralen, PSO)对溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)小鼠的肠道屏障及继发性肝损伤的改善作用。40只雄性C57BL/6J小鼠随机分为对照组(control, Con)、模型组(model, Mod)、阳性药柳氮磺吡啶组(sulfasalazine, SASP, 200 mg/kg)、PSO低剂量组(PSO-L, 20 mg/kg)和PSO高剂量组(PSO-H, 40 mg/kg),通过自由饮用2.25%的葡聚糖硫酸钠盐(dextran sulfate sodium salt, DSS)7d构建UC模型。实验期间记录小鼠的体重,疾病活动指数(disease activity index, DAI)。实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测结肠中带状闭合蛋白-1(zonula occludens-1, ZO1)、闭合蛋白-1(Claudin-1)和闭锁蛋白(Occludin)的表达。生化试剂盒检测肝脏中谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)含量。酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测肝脏脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)、C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、降钙素原(procalcitonin, PCT)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)以及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)含量。蛋白印迹(Western blot)法检测肝脏Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)、髓样分化因子88(myeloid differentiation primary response protein 88, MyD88)以及磷酸化核因子 κ B(phosphorylated nuclear factor kappa-B, p-NF- κ B)的表达。结果显示,与Mod组相比,经PSO治疗后,UC小鼠体重下降得到缓解、DAI评分下降、缓解了结肠长度的缩短;ZO1、Claudin-1和Occludin的mRNA的表达均上调;肝脏AST、ALT、AKP和LDH含量均下降;肝脏LPS、CRP、PCT、IL-6以及TNF- α 含量均下降;下调了肝脏TLR4、MyD88以及p-NF- κ B蛋白的表达。以上结果表明,PSO可以改善DSS诱导的小鼠肠道屏障功能,并通过抑制TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路改善继发性肝损伤。

关键词:补骨脂素;溃疡性结肠炎;肠道屏障;继发性肝损伤;炎症

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)7-1121-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.7.003

Improvement effect of psoralen on intestinal barrier and secondary liver injury in mice with ulcerative colitis

CAO Liu¹, TANG Xiao-qing¹, LUO Qing¹, NIU Meng-yuan¹, DAI Wei-bo^{2*}

¹Zhongshan Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine;

²Zhongshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhongshan 528400, China

Abstract: This study aims to investigate the potential of psoralen (PSO) in ameliorating intestinal barrier dysfunction and secondary liver injury in mice with ulcerative colitis (UC). Forty male C57BL/6J mice were randomly assigned into the following groups: control group (Con), model group (Mod), positive control group treated with sulfasalazine (SASP, 200 mg/kg), low-dose PSO group (PSO-L, 20 mg/kg), and high-dose PSO group (PSO-H, 40 mg/kg). Ulcerative colitis (UC) models were induced by freely drinking 2.25% dextran sulfate sodium salt (DSS) for seven days. During the experiment, the weight of mice and disease activity index (DAI) were recorded. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the expression of zonula occludens-1 (ZO1), Claudin-1 and Occludin in the colon. Biochemical assay kits were employed to measure the levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase

收稿日期:2023-12-14

接受日期:2024-05-11

基金项目:广东省自然科学基金(2023A1515011699);广东省医学科研基金(A2022479)

*通信作者 Tel:86-15014506263; E-mail:daiweibo007@163.com

(AKP) and lactate dehydrogenase (LDH) in the liver. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was conducted to quantify the levels of lipopolysaccharides (LPS), C-reactive protein (CRP), procalcitonin (PCT), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the liver. Western blot analysis was performed to assess the expression of Toll-like receptor 4 (TLR4), myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88) and phosphorylated nuclear factor kappa-B (p-NF- κ B) in the liver. The results showed that compared to the Mod group, after PSO treatment, the weight loss of UC mice was alleviated, DAI scores decreased, and colonic length shortening was relieved. The mRNA expression of ZO1, Claudin-1, and Occludin was upregulated. The levels of AST, ALT, AKP and LDH in the liver decreased; the levels of LPS, CRP, PCT, IL-6 and TNF- α in the liver decreased; and the expression of TLR4, MyD88 and p-NF- κ B proteins in the liver was downregulated. The above results indicate that PSO can improve intestinal barrier function in DSS-induced mice and ameliorate secondary liver injury by inhibiting the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway.

Key words: psoralen; ulcerative colitis; intestinal barrier; secondary liver injury; inflammation

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是以结直肠黏膜连续性、弥漫性炎症改变为特点的慢性非特异性肠道炎症性疾病, 其病因不明, 临床症状主要表现为腹泻、腹痛、黏液脓血便等^[1]。目前, 一些免疫抑制剂和抗炎药物, 如皮质类固醇、5-氨基水杨酸和柳氮磺吡啶 (sulfasalazine, SASP) 等, 是临床用于控制 UC 症状的主要药物^[2]。然而, 长期使用这些药物会导致严重的副作用, 极大地限制了其临床应用。因此, 仍然迫切需要开发一种高效、低副作用、多靶点的新药物来治疗 UC。

肠道黏膜屏障是人体一道重要的自然屏障, 构成机体与外源性物质接触的第一道防线^[3]。UC 的发生会导致肠道屏障蛋白缺失, 使得肠道通透性增加, 进而肠道细菌和其他的有害物质进入, 破坏肠道正常细胞。紧密连接是构成肠黏膜机械屏障的主要部分, 被广泛分布于相邻的肠上皮细胞之间。其中包括闭合蛋白 (Claudin)、闭锁蛋白 (Occludin) 以及带状闭合蛋白 (zonula occludens, ZO) 这三种跨膜蛋白。研究表明, 在肠黏膜损伤修复过程中, 这些关键蛋白的表达起着重要的作用^[4]。

继发性肝损伤是 UC 常见的并发症之一^[5]。持续的炎症反应参与了 UC 的发病机制, 并过度产生了一系列的促炎细胞因子, 如白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α) 等。UC 的病理状态下, 会导致肠道黏膜受损, 肠道通透性增加, 肠道细菌及其有害物质, 如脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS)、TNF- α 、IL-6, 将通过门静脉进入肝脏, 会导致肝脏炎症反应和加重肝损伤^[6]。

补骨脂素 (psoralen, PSO) 是中药琴叶榕^[7]中的一种呋喃香豆素类化合物, 呋喃香豆素有多种的生理活性, 主要表现在抗肿瘤、抗 HIV、抗氧化、抗病原

微生物、抗炎镇痛、抗抑郁、光化学作用以及对药物代谢酶的影响等方面^[8]。在本实验室的前期研究中, 我们发现琴叶榕可以改善葡聚糖硫酸钠盐 (dextran sulfate sodium salt, DSS) 诱导的 UC 并改善继发性肝损伤。此外, Zhou^[9]发现 PSO 可以改善 DSS 诱导的 UC, 但尚未对其对肠道屏障和继发性肝损伤的改善效果进行系统研究。因此, 本研究旨在探讨 PSO 对 UC 及其引发的继发性肝损伤的改善作用, 以期在临床上利用中药单体治疗该疾病提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级健康雄性 C57BL/6J 小鼠 (年龄 8 ~ 10 周) 购自广东省医学实验动物中心 (合格证号: SCXK(粤)2022-0002)。饲养于广州中医药大学附属中山中医院动物房 (使用许可证: SYXK(粤)2020-0109), 采用标准饮食和水进行适应性喂养 (24 ~ 25 °C, 湿度 70% ~ 75%, 光/暗 12 h), 适应性饲养 7 d 后进行实验。本实验经广州中医药大学附属中山中医院动物伦理委员会审查批准 (批准号 AEW-2023048), 并严格遵守实验动物伦理相关规定进行操作。

1.2 药物与试剂

补骨脂素 (批号: CYR-B0044, 四川萃益润生物, 纯度 > 98%); 柳氮磺吡啶 (批号: #HY-14655, MCE); 葡聚糖硫酸钠盐 (批号: DW-40L508, MP Bio-medicals, 分子量 36 000 ~ 50 000)。

生化试剂盒: 谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) (批号: C010-2-1)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP) (批号: A059-2)、谷丙转氨酶 (alanine transaminase, ALT) (批号: C009-2-1) 和乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) (批号: A020-2) (南京建成生物工程研究所); 酶联免疫吸附实验试

剂盒 (enzyme-linked immunosorbent assay kit, ELISA kit): LPS (批号: 261230425)、C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) (批号: 232230823)、降钙素原 (procalcitonin, PCT) (批号: 694203082)、IL-6 (批号: 385230408) 和 TNF- α (批号: 569230408) (天津安诺瑞康公司); Trizol (批号: 423710, 美国 Ambion); Takara Premix 型反转录试剂 PrimeScriptTM RT Master Mix (Perfect Real Time) (批号: AM81836A, 宝日医生物技术公司); Takara 定量 PCR 试剂盒 TB Green[®] Premix Ex TaqTM (Tli RNaseH Plus) (批号: AN11016A, 宝日医生物技术公司)。

一抗: β -肌动蛋白 (β -actin) (批号: #12w2844)、髓样分化因子 88 (myeloid differentiation primary response protein 88, MyD88) (批号: #51f361)、Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) (批号: #16c507)、核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) (批号: #20k7668) (江苏亲科生物研究中心有限公司); 磷酸化核因子 κ B (phosphorylated nuclear factor kappa-B, p-NF- κ B) (批号: 19, 美国 Cell Signaling Technology); 二抗山羊抗兔 IgG-HRP (批号: 13, 美国 Cell Signaling Technology 公司); RIPA 裂解液 (批号: P00138)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号: No. 111922230522)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (批号: No. 101622231222); 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) (批号: GA21110062244)、PBST 漂洗缓冲液 (PBST washing buffered solution, PBST) (批号: GC2305005) (碧云天生物技术公司); 聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) (批号: 0000213259, 德国密理博有限公司)。

1.3 主要仪器

样品冷冻研磨仪 (广州露卡测序仪器有限公司, 型号: LUKYM-1); 多功能酶标仪 (珀金埃尔默仪器有限公司, 型号: HH3500); 倒置荧光显微镜 (E-CLIPSE, 型号: Ti2-A); PowerPacTM HC 高电流电泳仪电源 (Bio-Rad, 型号: HC); 化学发光成像系统 (Bio-Rad, 型号: ChemiDoc MP); CFX96 型实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.4 方法

1.4.1 药物制备

将 1 g 羧甲基纤维素钠 (carboxymethyl cellulose sodium, CMC-Na) 混匀于 200 mL 的蒸馏水中, 配制成 0.5% 基底溶液。使用 0.5% 的 CMC-Na 配制

PSO 分别为 20 mg/kg 和 40 mg/kg 的混悬液, 使用 0.5% 的 CMC-Na 配制 SASP 为 200 mg/kg 的混悬液。

1.4.2 动物造模与给药方法

将 40 只 C57BL/6J 雄性小鼠按体重随机分为 5 组, 每组 8 只, 即对照组 (control, Con)、模型组 (model, Mod)、阳性药柳氮磺吡啶组 (SASP, 200 mg/kg)、补骨脂素低剂量组 (PSO-L, 20 mg/kg)、补骨脂素高剂量组 (PSO-H, 40 mg/kg)。除 Con 组给予蒸馏水外, 其余组均给予 2.25% DSS 溶液, 自由饮用 7 d^[6], 同时 SASP 组、PSO-L 组和 PSO-H 组小鼠灌胃相应剂量药物, Con 组和 Mod 组小鼠灌胃 0.2 mL 0.5% CMC-Na 溶液, 每天给药 1 次, 连续 7 d。每天观察小鼠的精神状态、粪便黏稠度、便血程度和体重下降情况。

1.4.3 疾病活动指数

疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分依据体重下降百分比 (减轻 0% ~ 1%, 0 分, 减轻 1% ~ 5%, 1 分, 减轻 5% ~ 10%, 2 分, 减轻 10% ~ 15%, 3 分, 减轻 15% 以上, 4 分)、粪便黏度 (正常, 0 分, 软便, 1 分, 松软较湿, 2 分, 腹泻, 3 分, 重度腹泻, 4 分)、粪便出血 (无, 0 分, 隐血, 1 分, 隐血较多, 2 分, 少量出血, 3 分, 大量出血, 4 分)^[6]。DAI 评分为三者评分的均值, 计算公式为: DAI = (体重下降评分 + 粪便黏度评分 + 粪便出血评分) / 3。

1.4.4 小鼠结肠长度、结肠及肝病理学检测

将小鼠麻醉后颈椎脱臼处死, 解剖结肠和肝脏, 测量各组小鼠结肠长度并拍照记录。将小鼠的部分结肠和肝组织固定在 4% 的多聚甲醛中, 使用甲醛及梯度乙醇脱水, 石蜡包埋、切片, 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色, 封片, 并在显微镜下观察各组小鼠结肠和肝的病理学变化。

1.4.5 生化试剂盒检测小鼠肝组织中 AST、AKP、ALT 及 LDH 水平

肝组织样本匀浆提取: 称取 20 mg 肝组织, 加入 200 μ L PBS 溶液 (含 1% 蛋白酶抑制剂), 冷冻研磨机研磨, 4 $^{\circ}$ C 静置 2 h 让其充分溶出, 1 000 r/min, 离心 10 min, 获得上清液后使用 BCA 试剂盒进行定量, 并根据 AST、AKP、ALT 及 LDH 试剂盒说明书进行生化分析。

1.4.6 ELISA 试剂盒检测小鼠肝脏中 LPS、CRP、PCT、IL-6 和 TNF- α 水平

肝组织样本匀浆提取: 称取 20 mg 肝组织, 加入 200 μ L PBS 溶液 (含 1% 蛋白酶抑制剂), 冷冻研磨

机研磨,4 ℃ 静置 2 h 让其充分溶出,1 000 r/min,离心 10 min,获得上清液后使用 BCA 试剂盒进行定量,并根据 LPS、CRP、PCT、IL-6 和 TNF- α 试剂盒说明书进行生化分析。

1.4.7 实时荧光定量聚合酶链式反应检测结肠组织 ZO1、Occludin、Claudin-1 mRNA 的表达

称取结肠组织 30 mg 于研磨管中,使用 Trizol 法提取 RNA,之后进行变性、冷却;根据 Takara 逆转录扩增试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA,逆转录反应条件为:37 ℃ 15 min(反转录反应),85 ℃ 5 s(反转录酶的失活反应),4 ℃。再根据 Takara 定量 PCR 试剂盒说明书,加入反转录反应液于 PCR 反应仪进行退火、延伸、失活。PCR 反应条件:95 ℃ 10 min 预变性,95 ℃ 10 s,55 ℃ 20 s,72 ℃ 40 s,40 个循环。以 β -actin 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对目的基因进行相对定量分析。引物序列列表见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')
ZO1	F:TAAAGCTGTCCCTGTGAGTCCTTC R:TCTATGGAACCTCAACACACCACCA
Claudin-1	F:AGTCTTCGACTCCTTGTGAATCT-3' R:ATCCACATCTTCTGCACCTCATCA-3'
Occludin	F:5'-CTCCTCCAATGGCAAAGTGAATGG-3' R:CATCCACACTCAAGTCCAGAGGAA-3'
β -actin	F:5'-CAACGCTCCGGGATGTC-3' R:AGTCCTTCTGACCCATTTCCCA-3'

1.4.8 Western blot 法检测肝脏组织中 TLR4/NF- κ B 信号通路相关蛋白表达

称取小鼠肝脏组织 20 mg 于研磨管中,按 1:10 加入预冷的 RIPA 裂解液(含 1% 的蛋白酶抑制剂和 1% 的磷酸酶抑制剂),冷冻研磨仪研磨后,冰上裂

解 30 min,10 000 r/min,4 ℃ 离心,10 min,BCA 法检测上清液中蛋白浓度。将样本加入 PBS 和 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液稀释至同一浓度,在金属浴中 100 ℃ 蛋白变性 10 min。变性后上机进行恒压电泳,电泳结束后 0.30 A 恒流将蛋白转至 PVDF 膜上,PBST 洗膜三次(5 min/次)使用快速封闭液封闭 15 min,PBST 洗膜三次,加入一抗(NF- κ B、p-NF- κ B、TLR4、MyD88、 β -actin),4 ℃ 孵育过夜。次日 PBST 洗膜三次,加入二抗,孵育 1.5 h,PBST 洗膜三次,显影,使用化学发光成像系统显色并使用 ImageJ 软件进行条带灰度值分析,并定量。

1.4.9 统计学分析

所得数据均使用 SPSS 27.0 软件进行分析,数据均使用平均值 \pm 标准误(Mean \pm SEM)表示,采用 One-Way ANOVA 检验或非参数检验。当各组样本量 ≤ 5 时采用非参数检验,其中组间采用 Kruskal-Wallis 检验,两组之间采用 Mann-Whitney U 秩和检验;当各组样本量 > 5 时且满足正态分布时,采用 One-Way ANOVA,否则采用非参数检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义,使用 GraphPad Prism 8 软件绘图。

2 结果

2.1 PSO 对小鼠体重及 DAI 评分的影响

如图 1 所示,与 Con 组相比,Mod 组小鼠体重从第 4 d 持续下降,第 7 d 呈现显著性差异($P < 0.001$)。同时,从第 4 d 开始,DAI 评分也明显上升,持续升高至第 7 d,呈现显著性差异($P < 0.001$),说明模型建立成功。经药物治疗后,各给药组小鼠体重下降得到缓解,且第 7 d PSO-H 缓解体重下降最明显($P < 0.01$)。此外,各给药组在第 7 d 的 DAI 评分相比 Mod 组呈现明显下降,其中 PSO-H 组的 DAI 评分下降最为显著($P < 0.01$)。

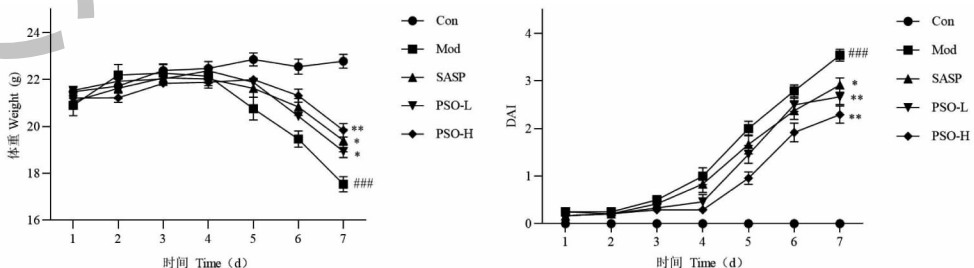


图 1 PSO 对小鼠体重及 DAI 评分的影响(Mean \pm SEM, $n = 8$)

Fig. 1 Effect of PSO on mouse body weight and DAI score (Mean \pm SEM, $n = 8$)

注:与 Con 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$;与 Mod 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$,下同。Note:Compared with Con group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$;Compared with Mod group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$,the same below.

2.2 PSO 对小鼠结肠长度及病理变化的影响

如图 2 所示,Mod 组小鼠结肠长度相对于 Con 组小鼠结肠长度显著缩短($P < 0.001$),经药物治疗后,给药组小鼠结肠长度均得到一定的恢复,且 PSO-H 组小鼠结肠长度恢复较 Mod 组更显著($P < 0.001$)。

通过病理学观察发现,Con 组小鼠结肠黏膜上

皮完整,腺体结构完整,Mod 组小鼠由 DSS 引起结肠隐窝破坏严重,杯状细胞丢失,并出现大量炎症浸润,肠道屏障被破坏。经药物治疗后,结肠结构得到恢复,隐窝破坏度减小,杯状细胞得到恢复,炎症浸润减少,整体 UC 病理改善较 Mod 组得到明显逆转,且 PSO-H 组改善更为显著。

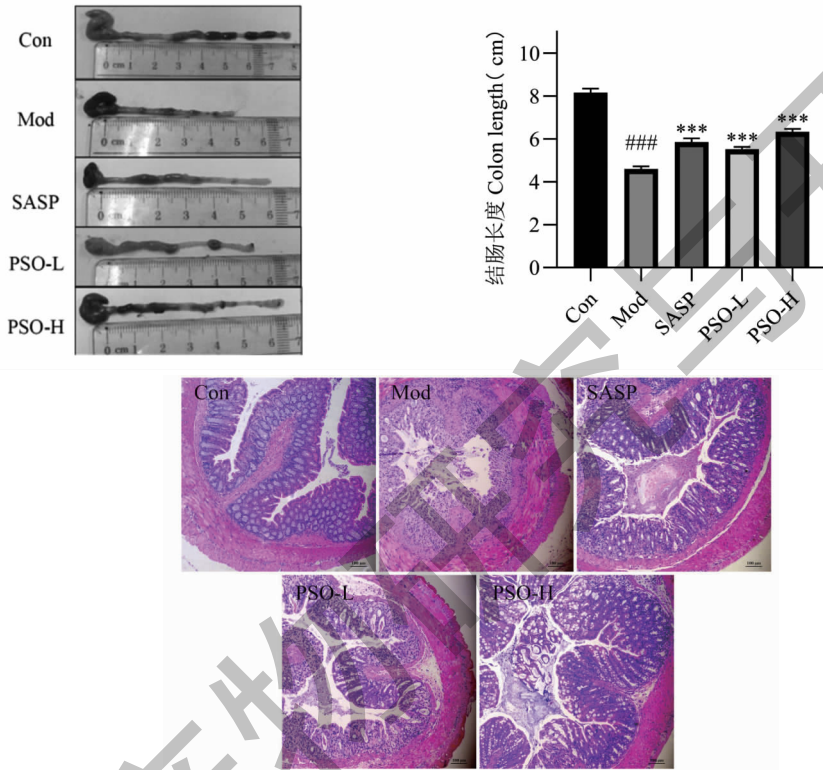


图 2 PSO 对小鼠结肠长度 (Mean ± SEM, n = 8) 及病理变化的影响 (HE, × 100)

Fig. 2 Effect of PSO on mouse colon length (Mean ± SEM, n = 8) and pathological changes (HE, × 100)

2.3 PSO 对小鼠结肠中 ZO1、Claudin-1 和 Occludin mRNA 表达的影响

ZO1、Claudin-1 和 Occludin 在维持肠道屏障中

起到重要作用,本文通过检测其 mRNA 表达水平判断肠道屏障的受损情况。如图 3 所示,实时荧光定量聚合酶链式反应(real-timequantitativepolymerasechain

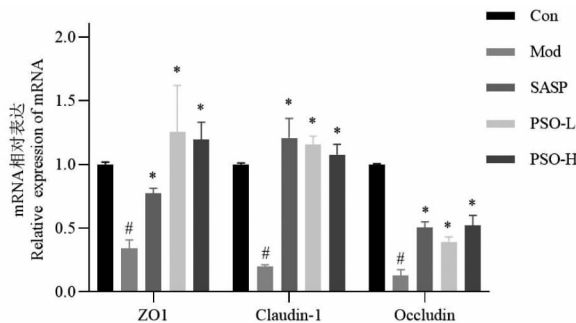


图 3 PSO 对小鼠结肠中 ZO1、Claudin-1 和 Occludin 的 mRNA 表达的影响 (Mean ± SEM, n = 3)

Fig. 3 Effect of PSO on the mRNA expression of ZO1, Claudin-1 and Occludin in the mouse colon (Mean ± SEM, n = 3)

reaction, RT-qPCR) 结果显示, 与 Con 组相比, Mod 组 ZO1、Claudin-1 和 Occludin 的 mRNA 表达显著下调 ($P < 0.05$), 说明 DSS 损伤了小鼠肠黏膜屏障, 经药物治疗后, PSO-L 和 PSO-H 组小鼠结肠组织中 ZO1、Occludin、Claudin-1 的表达相对于 Mod 组显著性上调 ($P < 0.05$)。

2.4 PSO 对小鼠肝组织及病理学的影响

如图 4 所示, Con 组小鼠肝脏光滑, 表面颜色呈

鲜红色, 经 DSS 诱导后的 Mod 组小鼠, 肝脏表面颜色灰黄暗淡, 经 PSO 治疗后肝组织表面恢复鲜红色。通过病理学观察, Con 组肝细胞排列整齐, 肝细胞沿中央静脉呈放射状排列, 细胞边界清晰, 细胞核完整, 可清晰看见肝索。与 Con 相比, Mod 组小鼠肝细胞排列紊乱, 出现脂质空泡, 细胞边界模糊。经 SASP 和 PSO 治疗后, 细胞空泡减少, 肝细胞排列整齐。

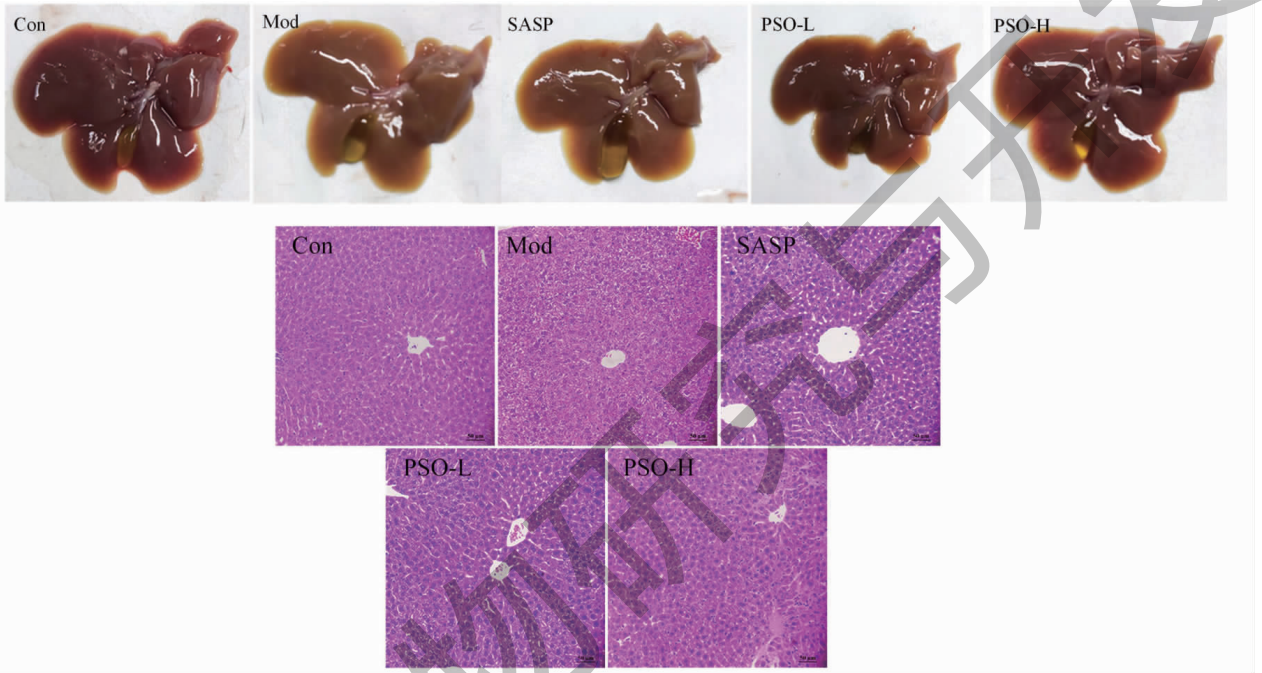


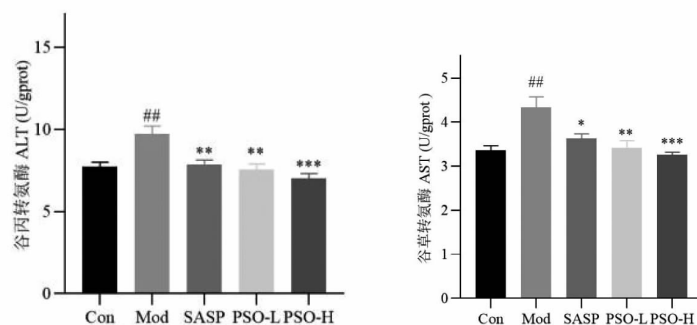
图 4 PSO 对小鼠肝组织及病理学的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 4 Effect of PSO mouse liver tissues and pathology (HE, $\times 200$)

2.5 PSO 对小鼠肝损伤指标 AST、ALT、AKP、LDH 含量的影响

如图 5 所示, 与 Con 组相比, Mod 组小鼠肝组织的 AST ($P < 0.01$)、ALT ($P < 0.01$)、AKP ($P < 0.001$) 和 LDH ($P < 0.01$) 含量均显著上升; 经药物治疗后, 与 Mod 组相比, PSO-L 组小鼠肝组织中,

AST ($P < 0.01$)、ALT ($P < 0.01$)、AKP ($P < 0.001$) 和 LDH ($P < 0.01$) 均显著性下降, PSO-H 组小鼠肝组织中, AST ($P < 0.001$)、ALT ($P < 0.001$)、AKP ($P < 0.001$) 和 LDH ($P < 0.01$) 均显著性下降, 且 PSO-H 组变化最显著。



续图 5 (Continued Fig.5)

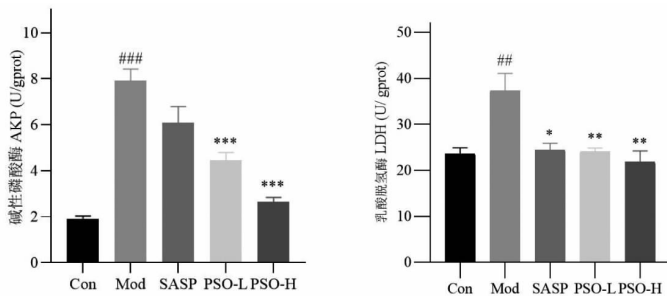


图5 PSO对小鼠肝损伤指标AST、ALT、AKP、LDH的影响(Mean ± SEM, n = 8)

Fig. 5 Effect of PSO on liver damage indicators AST, ALT, AKP and LDH in mice (Mean ± SEM, n = 8)

2.6 PSO对肝组织中LPS、CRP、PCT、IL-6以及TNF-α表达水平的影响

如图6所示,与Con组相比,Mod组小鼠肝组织中的LPS(P < 0.01)、CRP(P < 0.001)、PCT(P < 0.001)、IL-6(P < 0.001)以及TNF-α(P < 0.001)水平均显著性升高;经药物治疗后,与Mod组相比,

PSO-L组小鼠肝组织中的LPS(P < 0.01)、CRP(P < 0.01)、PCT(P < 0.001)、IL-6(P < 0.001)以及TNF-α(P < 0.01)水平均显著性降低,PSO-H组小鼠肝组织中LPS(P < 0.01)、CRP(P < 0.001)、PCT(P < 0.001)、IL-6(P < 0.001)以及TNF-α(P < 0.001)水平均显著性降低,且PSO-H的变化最显著。

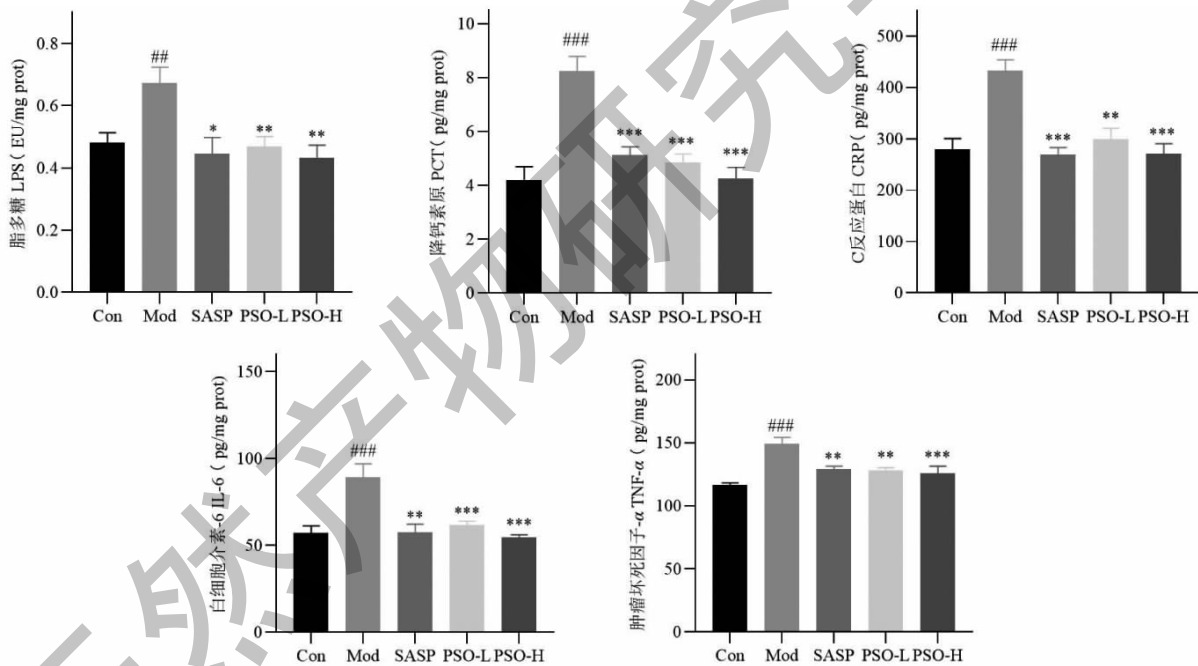


图6 PSO对肝组织中LPS、CRP、PCT、IL-6以及TNF-α表达水平的影响(Mean ± SEM, n = 8)

Fig. 6 Effect of PSO on the expression levels of LPS, CRP, PCT, IL-6 and TNF-α in liver tissues (Mean ± SEM, n = 8)

2.7 PSO对小鼠肝组织中TLR4/NF-κB信号通路相关蛋白表达的影响

如图7所示,Western blot结果显示,与Con组相比,Mod组TLR4、MyD88蛋白的表达显著性上调(P < 0.05),NF-κB的磷酸化增多,并且p-NF-κB/NF-κB比值显著性增加(P < 0.05);经过药物治疗后,各给药组相对于Mod组TLR4、MyD88显著性下

调(P < 0.05),p-NF-κB/NF-κB比值显著性下调(P < 0.05)。

3 讨论与结论

溃疡性结肠炎(UC)是一种病因不明的慢性、非特异性的炎症性肠病。UC除了肠道慢性非特异性的改变外,还会引发其他的肠外并发症,累及多器官,如肝脏、皮肤和关节等,其肠外并发症的发生率

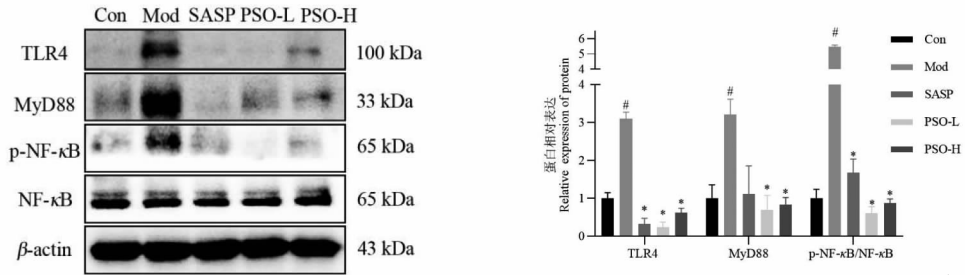


图7 PSO对小鼠肝组织中TLR4、MyD88、p-NF-κB/NF-κB蛋白表达水平的影响(Mean ± SEM, n = 3)

Fig. 7 Effect of PSO on the protein expression levels of TLR4, MyD88 and p-NF-κB/NF-κB in mouse liver tissues (Mean ± SEM, n = 3)

为21%~47%^[3,10]。目前临床上主要采用氨基水杨酸类、糖皮质激素和免疫抑制剂等治疗,尽管这些药物在治疗初期可以减轻症状,但在停药后易复发,并且常伴随明显的不良反应,整体治疗效果尚不理想^[2]。近年来,研究表明多种中药在治疗UC方面具有疗效,并且副作用相对较小,引起了人们对中药在UC治疗中的价值的关注。本实验室前期研究发现琴叶榕可以改善DSS诱导的UC,并改善继发性肝损伤^[11]。琴叶榕为桑科榕属植物,富含三萜类、黄酮类、香豆素类、酚酸类等活性成分^[7]。PSO是中药琴叶榕的主要成分之一,属于呋喃香豆素类化合物,具有抗炎的药理作用,呋喃香豆素类成分被人体吸收后,会快速分布于体内各个脏器,尤其是在心、肝、脾、肺和肾等脏器中含量较高^[12]。已有研究发现,PSO具有减缓肝细胞炎症损伤和抗抑郁的药理作用;PSO对乙酰胆碱酶抑制剂诱导的肝HepG2细胞损伤具有保护作用^[13];此外,PSO还可以改善四氯化碳导致的小鼠急性肝损伤^[14]。因此,本实验通过DSS诱导小鼠构建UC模型,进一步研究补骨脂素对UC小鼠的肠道屏障和继发性肝损伤的改善作用。

DSS诱导的小鼠结肠炎的主要症状是体重迅速下降、DAI评分升高、结肠长度变短等^[11]。在本研究中,PSO能够有效地减缓DSS诱导的UC小鼠体重下降,降低DAI评分,减少结肠长度的变短。这些结果表明,PSO可能有助于改善DSS诱导的小鼠结肠炎的主要症状。肠道黏膜是人体一道重要的自然屏障,构成机体与外源性物质接触的第一道防线^[3]。肠黏膜上皮细胞主要由吸收性肠细胞、杯状细胞、潘氏细胞以及肠内分泌细胞组成,其中黏蛋白主要由杯状细胞产生,黏蛋白是黏液层的关键,UC患者的黏液层受损后,肠道屏障被破坏,导致细菌等

有害物质进入到肠道,引发肠道疾病^[15]。本研究通过HE染色发现Mod组小鼠的隐窝破坏严重,杯状细胞丢失,并出现大量炎症浸润。经过PSO治疗后,杯状细胞得到恢复,炎症因子浸润减少。肠道屏障功能在正常情况下,能够有效阻止细菌和毒素侵入机体内环境,保护机体免受病原微生物和毒素的侵害。紧密连接蛋白主要由Claudin、Occludin以及ZO_s构成,它们在维持正常的肠黏膜屏障功能中发挥关键作用^[4]。紧密连接蛋白的低表达可导致肠黏膜屏障功能受损,从而影响肠黏膜的通透性。受损的肠黏膜屏障使得肠道细菌、内毒素和炎性介质等进入内环境,触发更多的炎性介质释放,激活全身炎症反应综合征的过程^[16]。本研究通过RT-qPCR结果发现Mod组小鼠的ZO1、Claudin-1、Occludin的mRNA水平显著下调,但是经过PSO治疗后,ZO1、Claudin-1、Occludin的mRNA的水平逆转了上述结果。表明PSO可以改善DSS诱导的UC小鼠的肠道屏障通透性。

研究表明,UC可能导致肝损伤,有调查显示高达30%的炎症性肠病患者的肝功能指标异常^[17]。肝脏ALT、AST、AKP、LDH水平的升高是肝损伤的可靠指标^[18]。CRP和PCT是两种与炎症过程相关的生物标志物,它们在体内的升高通常与炎症反应有关。肝脏在炎症或损伤状态下产生CRP,肝脏在炎症状态下也是PCT的主要合成和释放地^[19,20]。本研究发现Mod组小鼠的ALT、AST、AKP、LDH、CRP以及PCT的含量显著性增加,表明DSS诱导的UC小鼠的肝脏发生肝损伤。给予PSO治疗后,ALT、AST、AKP、LDH、CRP以及PCT含量恢复至正常水平。表明PSO可以改善DSS诱导的UC小鼠的继发性肝损伤。

LPS是一种来自革兰氏阴性菌的内毒素,在正

常生理状态下仅微量穿透肠道黏膜,而在病理状态下,肠道屏障通透性增加,大量 LPS 通过门静脉进入肝脏,刺激 TLR4 等 toll 样受体来增加促炎细胞因子的水平^[21]。一旦 TLR4 被 LPS 激活,将启动细胞信号转导,下游靶基因 MyD88 和 NF- κ B 将被激活, NF- κ B 被磷酸化后,能入核作为转录因子,调控下游促炎因子 IL-6 和 TNF- α 的分泌,从而促进炎症的发生。本实验结果显示,相比于 Con 组, Mod 组小鼠的肝脏中 LPS 含量显著性升高, TLR4、p-NF- κ B 以及 MyD88 蛋白的表达显著性上调,增加促炎因子 IL-6 和 TNF- α 的分泌,导致肝脏炎症的发生^[11,22]。给予 PSO 治疗后,逆转了这一趋势,表明 PSO 可降低 LPS 的含量,阻止 LPS 激活 TLR4,抑制 MyD88 表达,阻止 NF- κ B 磷酸化,进而抑制 IL-6、TNF- α 的水平异常升高,最终抑制炎症反应的发生。表明 PSO 是通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路抑制 DSS 诱导的 UC 小鼠的继发性肝损伤。

综上所述, PSO 对 UC 的肠道屏障和继发性肝损伤具有改善作用,其机制可能是通过增加 UC 小鼠肠道紧密连接蛋白的 mRNA 水平,改善肠道屏障通透性,减少 LPS 由门静脉进入肝脏,抑制肝组织 TLR4/NF- κ B 信号通路降低促炎因子的分泌,改善炎症诱发的继发性肝损伤。本研究以期对 PSO 的开发利用以及对肠道屏障和继发性肝损伤改善效果研究提供新的思路。

参考文献

- Keshteli AH, Madsen KL, Dieleman LA. Diet in the pathogenesis and management of ulcerative colitis; a review of randomized controlled dietary interventions[J]. *Nutrients*, 2019, 11:1498.
- Salice M, Rizzello F, Calabrese C, et al. A current overview of corticosteroid use in active ulcerative colitis[J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 13:557-561.
- Duan SN. Protective effect and mechanism of vitexin on liver injury in mice with ulcerative colitis[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine(广州中医药大学), 2021.
- Zhang B, Xie JR, Sun T. Effects of Changyuning Decoction on protein expression of claudin-1, ZO-1 and occludin in colonic tissue of rats with ulcerative colitis[J]. *Chin J Gen Pract(中华全科医学)*, 2021, 19:1447-1450.
- Restellini S, Chazouillères O, Frossard J L. Hepatic manifestations of inflammatory bowel diseases[J]. *Liver Int*, 2017, 37:475-489.
- Zhan XY, Peng WJ, Wang ZQ, et al. Polysaccharides from garlic protect against liver injury in DSS-induced inflammatory bowel disease of mice via suppressing pyroptosis and oxidative damage[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022:2042163.
- Zhang SY, Zhuang YH, Yang QN, et al. Identification of *Ficus pandurata* Hance and its related species based on ITS2 sequences and HPLC fingerprint[J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2023, 35:640-647.
- Xiong YJ, Yang YM, Jang S, et al. Research progress on coumarin compounds and their pharmacological effects[J]. *Chin Tradit Pat Med(中成药)*, 2010, 32:1764-1770.
- Zhou ZX. The screening of active ingredients and the underlying mechanism in *Psoraleae Fructus* treatment of ulcerative colitis[D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University(沈阳药科大学), 2020.
- Hou PB, Dong DF, Ling L. Progress in the diagnosis treatment and common extraintestinal manifestations of enteritis enteropathy[J]. *Chin Comm Doc(中国社区医师)*, 2020, 36:8-10.
- Dai WB, Zhan XY, Peng WJ, et al. *Ficus pandurata* Hance inhibits ulcerative colitis and colitis-associated secondary liver damage of mice by enhancing antioxidation activity[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021:2617881.
- Wang K, Liu X, Xu HR, et al. Research progress in pharmacology, pharmacokinetics and toxicity of natural furanocoumarins[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol(中国药理学与毒理学杂志)*, 2021, 35:312-320.
- Cho H, Jun JY, Song EK, et al. Bakuchiol: a hepatoprotective compound of *Psoralea corylifolia* on tacrine-induced cytotoxicity in HepG2 cells[J]. *Planta Med*, 2001, 67:750-751.
- Zhang Y, Jang ZZ, Zhang LY. Ameliorative effect of psoralen on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice[J]. *J China Pharm Univ(中国药科大学学报)*, 2021, 52:596-602.
- Liang LS. Mechanism of MMP-8 regulating intestinal barrier in colitis mice through NF- κ B signaling pathway[D]. Guangzhou: Southern Medical University(南方医科大学), 2023.
- Liu C. The influence and mechanism of intestinal alkaline phosphatase on the function of intestinal mucosal barrier[D]. Liaoning: China Medical University(中国医科大学), 2021.
- Song Y. Effect of β -carotene on ulcerative colitis and liver damage in mice[D]. Changchun: Jilin Agricultural University(吉林农业大学), 2021.