

## 连翘叶总黄酮对斑马鱼溃疡性结肠炎的作用研究

吕允珂<sup>1</sup>, 郑萱<sup>1</sup>, 张菊<sup>1\*</sup>,  
崔施展<sup>2</sup>, 王明雪<sup>2</sup>, 周春伶<sup>1</sup>, 贾东升<sup>2\*</sup><sup>1</sup>河北经贸大学生物科学与工程学院, 石家庄 050061; <sup>2</sup>河北省农林科学院经济作物研究所, 石家庄 050051

**摘要:** 研究连翘叶总黄酮 (*Forsythia suspensa* leaf total flavonoid, FSLF) 对 2,4,6-三硝基苯磺酸 (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS) 诱导斑马鱼溃疡性结肠炎的疗效作用。采用 D101 大孔树脂对 FSLF 分离纯化并使用超高效液相色谱-质谱联用仪 (UPLC-MS) 分析成分; 将 36 条野生斑马鱼分为空白组、模型组、FSLF 低、中、高剂量给药组 (10、20、40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、地塞米松组 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。除空白组外, 其余各组均用 160 mmol/L TNBS 肛门注射诱导斑马鱼溃疡性结肠炎模型, 使用苏木素-伊红、阿利新蓝染色法观察斑马鱼结肠组织病理和杯状细胞数量变化, 通过试剂盒检测斑马鱼结肠组织活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 含量和活性变化, 经荧光定量 PCR 法检测斑马鱼结肠组织中髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88)、肿瘤坏死因子相关因子 6 (TNF receptor associated factor 6, TRAF6)、核因子- $\kappa\text{B}$  (nuclear factor- $\kappa\text{B}$ , NF- $\kappa\text{B}$ ) p65、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) mRNA 表达量。结果显示, FSLF 30% 乙醇洗脱部位总黄酮含量最高, UPLC-MS 共鉴定出芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-葡萄糖鼠李糖苷、金丝桃苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、槲皮素、橙皮苷、山柰酚、紫云英苷 9 种黄酮类化学成分。与模型组相比 FSLF 可改善斑马鱼结肠组织结构, 提高杯状细胞数量 ( $P < 0.001$ ), 降低 ROS 含量 ( $P < 0.05$ ) 和 MyD88/TRAF6/NF- $\kappa\text{B}$ p65、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA 表达量, 升高 SOD 活性 ( $P < 0.01$ ) 和 IL-10 mRNA 表达量 ( $P < 0.05$ )。本研究表明 FSLF 对斑马鱼溃疡性结肠炎有明显治疗作用, 其作用机制可能与通过调节信号通路 NF- $\kappa\text{B}$ , 下调炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和上调 IL-10 mRNA 表达量有关。

**关键词:** 连翘叶; 总黄酮; 斑马鱼; 溃疡性结肠炎

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)8-1279-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.8.001

Effect of total flavonoids from *Forsythia suspensa* leaf on zebrafish ulcerative colitisLYU Yun-ke<sup>1</sup>, ZHENG Xuan<sup>1</sup>, ZHANG Ju<sup>1\*</sup>,  
CUI Shi-zhan<sup>2</sup>, WANG Ming-xue<sup>2</sup>, ZHOU Chun-ling<sup>1</sup>, JIA Dong-sheng<sup>2\*</sup><sup>1</sup>College of Biology Science and Engineering, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang 050061, China;<sup>2</sup>Institute of Cash Crop, Institute of Cash Crops, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China

**Abstract:** This study aims to investigate the impact of total flavonoids extracted from *Forsythia suspensa* leaf on zebrafish ulcerative colitis induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS). The FSLF was purified using D101 macroporous resin and its components were analyzed via UPLC-MS. Thirty-six wild zebrafish were divided into a control group, model group, low-dose FSLF group (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), medium-dose FSLF group (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), high-dose FSLF group (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and dexamethasone group (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Ulcerative colitis was induced in all groups except for the blank group by anal injection of 160 mmol/L TNBS. The colonic histopathology and goblet cell number of zebrafish were observed using hematoxylin-eosin and alcian blue staining. The levels of reactive oxygen species (ROS) and superoxide dismutase (SOD) in zebrafish colon tissue

收稿日期: 2024-04-07 接受日期: 2024-06-21

基金项目: 国家中药材产业体系-全草类药材岗位 (CARS-21); 河北省重点研发计划 (23372509D); 河北省现代农业产业技术体系项目 (HBCT2023080204); 河北省农林科学院科技创新专项 (2022KJCXZX-JZS-4)

\* 通信作者 E-mail: juzi437163804@163.com, jiads1@163.com

were assessed using a detection kit. Fluorescence quantitative PCR detected the presence of MyD88 and TNF receptor associated factor 6 (TRAF6) in the colon tissue of zebrafish. Additionally, mRNA expression of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and interleukin-10 (IL-10) was also observed. The highest concentration of total flavonoids was found in the 30% ethanol-eluting fraction of FSLF, UPLC-MS analysis identified nine flavonoids, including rutin, isoquercetin, kaempferol-3-glucorhamnoside, hypericin, kaempferin-3-O-rutinoside, quercetin, Hesperidin, kaempferol and porphyrin. Compared to the model group, FSLF demonstrates an improvement in the colonic structure of zebrafish, as evidenced by an increase in goblet cell number ( $P < 0.001$ ), a decrease in ROS content ( $P < 0.05$ ), downregulation of MyD88/TRAF6/NF- $\kappa$ Bp65, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  mRNA expression levels, and an increase in SOD activity ( $P < 0.01$ ) and IL-10 mRNA expression levels ( $P < 0.05$ ). This study indicates that FSLF exerts a significant therapeutic impact on zebrafish ulcerative colitis, potentially through the modulation of inflammatory factors TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , as well as the enhancement of IL-10 mRNA expression via regulation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**Key words:** *Forsythia suspensa* leaf; total flavonoids; zebrafish; ulcerative colitis

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种慢性免疫介导的炎症性肠病, UC 发病机制复杂, 被认为与长期暴露于危险环境而导致遗传易感个体对肠道共生微生物产生不适当的免疫反应等因素有关<sup>[1]</sup>。在临床诊断上, 其主要表现为直肠出血、腹泻、腹痛、体重变轻等症状<sup>[2]</sup>。近年来, 全球 UC 发病率一直在增加, 考虑到 UC 发病率和死亡率, 医疗保健和社会成本是巨大的。因此, 控制 UC 进展显得尤为重要。目前, 主要的治疗药物是抗炎和免疫抑制剂, 如氨基水杨酸盐、柳氮磺吡啶和糖皮质激素等<sup>[3]</sup>, 现有的药物仅可缓解部分症状, 但仍难以完全治愈, 且长期使用有一定的毒副作用和耐药性。因此, 探究更安全、更有效的治疗药物是目前研究的热点领域。中药具有多成分、多靶点、毒性小等作用特点, 为 UC 治疗提供了新途径<sup>[4]</sup>。

连翘作为我国传统中药, 连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl. 为木犀科 (Oleaceae) 连翘属 *Forsythia* Vahl. 植物的干燥果实。据《本草纲目》记载, 连翘具有清热解毒、消肿散结的功效。现代药理研究表明连翘提取物具有较好的抗炎活性<sup>[5,6]</sup>。研究发现, 连翘叶具有与连翘类似的化学成分<sup>[7]</sup>, 其作为产业链副产物, 是食品、替抗产品、药品的天然原料, 来源广泛、价格低廉, 黄酮作为连翘叶主要活性成分之一, 具有抗菌<sup>[8]</sup>、抗炎<sup>[9]</sup>、抗氧化<sup>[10]</sup>等作用。目前, 未见连翘叶总黄酮 (*Forsythia suspensa* leaf total flavonoid, FSLF) 抗 UC 报道。因此, 本研究采用 2, 4, 6-三硝基苯磺酸 (2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS) 构建斑马鱼 UC 模型, 探究 FSLF 对 UC 斑马鱼作用研究, 以期为进一步深入研究连翘叶的药用价值提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

野生型 AB 系斑马鱼 3~6 月龄 (购自于南京一树梨花生物科技有限公司; 合格证号: 苏 ICP2023046901 号-1); 将斑马鱼在水温 ( $28 \pm 5$ ) $^{\circ}\text{C}$ 、每 12 h 喂 1 次丰年虾、光照 14 h 黑暗 10 h 下喂养 1 周。

#### 1.1.2 药品与试剂

连翘叶 (2023 年 7 月份采于河北省农林科学院种质资源圃), 经河北省农林科学院温春秀研究员鉴定为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的叶片。标本存放于河北省药用植物工程技术研究中心, 编号为 2023071601。

芦丁 (西安东峰生物科技有限公司, 批号: DF20220420, 纯度 (98%)); Bouin's 固定液 (飞净生物科技有限公司, 批号: LA0916); 二甲苯 (批号: 20230316, 纯度 (99%))、石油醚 (批号: 20230302)、无水乙醇 (批号: 20230904, 纯度 (99.7%)) (天津市北辰方正试剂厂); TNBS (美国 Sigma-Aldrich 公司, 批号: SLCK4178, 纯度 5.0% (W/V)); 苏木素-伊红 (批号: 20220416)、阿利新蓝 (批号: 20220422) (北京索莱宝有限公司); 地塞米松 (郑州卓峰制药有限公司, 批号: 230420284); RNA 抽提试剂盒 (上海生工生物工程有限公司, 批号: B511321); 逆转录试剂盒 (批号: KR118)、荧光定量预混试剂 (批号: FP205) (天根生化科技 (北京) 有限公司); 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号: 20231216); 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 试剂盒 (滁州仕诺达生物科技有限公司, 批号: 202311)。

#### 1.1.3 仪器

FDS-2000 冷冻干燥机 (日本 EYELA 东京理化

公司);H1850R 高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);101-1AB 电热鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司);HS-3345 全自动切片机(金华市华速科技有限公司);MK3 酶标仪;GENE-SYS 10S UV-VIS 紫外分光光度计;Thermo Orbitrap Exploris120 超高效液相色谱-质谱联用仪(UPLC-MS)(美国 Thermo Fisher Science 公司);C1000 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-rad 公司);B-510LD4 OPTIKA 正置显微镜(北京博为高科生物科技有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 FSLF 的制备

将连翘叶自然晒干,粉碎过筛后(40 目)备用。精密称取连翘叶粉末 50 g,加入 250 mL 石油醚超声处理 1 h,重复进行 2 次,抽滤,将滤渣中的石油醚挥发干燥。加 500 mL 70% 乙醇回流提取 1 h 重复进行 2 次,抽滤,合并滤液,旋转蒸发浓缩,冷冻干燥。参考文献<sup>[11]</sup>方法,选用 D-101 大孔树脂对连翘叶总黄酮进行分离纯化,使用蒸馏水冲洗 3~4 倍柱体积除去水溶性杂质后,依次用同体积的 10%、20%、30%、40%、50% 乙醇梯度洗脱,收集洗脱液并减压浓缩,冷冻干燥后分别测定各组分总黄酮含量。

### 1.2.2 FSLF 含量的测定

采用亚硝酸钠-硝酸铝显色法测定连翘叶总黄酮含量<sup>[12]</sup>,使用 70% 乙醇配制 1 mg/mL 芦丁对照品溶液,精确量取芦丁对照品溶液 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL 于 10 mL 容量瓶中,补加 70% 乙醇使所有溶液成 5 mL,分别加入 5% 亚硝酸钠 0.4 mL,摇匀静置 6 min,加入 10% 硝酸铝 0.4 mL,摇匀静置 6 min,加入 4% 氢氧化钠 4.0 mL,使用蒸馏水定容至 10 mL,摇匀静置 15 min,于 510 nm 处测定吸光度,70% 乙醇空白参比。以芦丁质量浓度(mg/mL)为横坐标  $X$ ,吸光度为纵坐标  $Y$ ,绘制标准曲线。分别精密移取提取液 1 mL 于 10 mL 容量瓶中,按上述方法在 510 nm 处测其吸光度值,以 70% 乙醇为空白调零,根据标准曲线计算总黄酮含量。

### 1.2.3 UPLC-MS 成分分析

液相条件:色谱柱:Hyperil Gold AQ(100 mm × 2.1 mm,1.9 μm);柱温:35 °C,进样量:5 μL。流动相:甲醇溶液(A)-0.1% 甲酸水(B),梯度洗脱:0~2 min(95% B);2~40 min(95% → 30% B);40~40.1 min(30% → 95% B);40.1~43 min(95% B);流速 0.3 mL/min。质谱条件:采集模式为正、负离子模式;扫描范围: $m/z$  100~1 000,分辨率:120 000;ESI

源条件:离子源温度 350 °C;正、负离子模式电压分别为 3.5 和 2.5 kV;鞘气流量:30 Arb;辅助气体流量:6 Arb;吹扫气体流量:1 Arb。

### 1.2.4 分组与给药

选取 36 条野生型斑马鱼,实验前禁食 24 h,将斑马鱼随机分为 6 组:空白组(control, Con)、模型组(model, Mod)、FSLF 低剂量(low dose FSLF, L-FSLF, 10 μg/mL)、中剂量(medium dose FSLF, M-FSLF, 20 μg/mL)、高剂量(high dose FSLF, H-FSLF, 40 μg/mL)给药组、地塞米松组(dexamethasone, DEX, 50 μg/mL),每组 6 条,空白组不做任何处理,其余 5 组均用 160 mmol/L TNBS 肛门注射 8 h,建立 UC 斑马鱼模型,造模完成后给药组浸泡相应的药物 72 h,每 24 h 换一次药。

### 1.2.5 结肠组织病理学观察

将剥离出的斑马鱼肠道使用 Bouin's 固定液固定 24 h,无水乙醇、95%、85%、75% 乙醇逐级脱水,石蜡包埋切片,烘片,使用苏木素-伊红(HE)、阿利新蓝(AB-PAS)染色,中性树胶封片后,使用显微镜 Cap Studio-SC2000C 软件测量斑马鱼肠道肠绒毛长度,显微镜下观察肠道组织结构和杯状细胞数量变化。

### 1.2.6 结肠组织 ROS、SOD 含量和活性的测定

所检测抗氧化指标:ROS、SOD 均按照相应试剂盒操作说明书进行测定和计算,每个样本均为重复 3 次。

### 1.2.7 荧光定量 PCR 检测信号通路及相关基因表达量

荧光定量 PCR 检测结肠组织中髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)、肿瘤坏死因子相关分子 6(TNF receptor associated factor 6, TRAF6)、核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB) p65、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)mRNA 表达量,其基因序列均来源于 NCBI 数据库,使用 Primer 6.0 软件设计特异性引物,使用 NCBI Primer BLAST 对产物进行验证,合成基因序列均由天根生化科技(北京)有限公司合成,具体引物序列见表 1。称取 25~30 mg 斑马鱼肠道组织,加入 500 μL Triozol,液氮研磨匀浆提取 RNA,使用反转录试剂盒逆转录为 cDNA,反应条件为:95 °C 15 min,1 个循环;95 °C 10 s,60 °C 30 s,40 个循环,总反应体系为 20 μL,每个样本均为重复 3 次。β-actin 作为内参基因,依据  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算 mRNA 相对表达量。

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

目的基因 Target gene	引物序列 Primer sequence(5'→3')
$\beta$ -actin	F:ATGGATGAGGAAATCGCTGCC R:CTCCCTGATGCTGGGTCCG
MyD88	F:GACAGAGACGTCCITCCTGG R:GACGACAGGGATTAGCCGTT
TRAF6	F:GCACATGCGTTACATGGCTGAGTT R:GAGGCTCCACGATCATCTGAGGAC
NF- $\kappa$ Bp65	F:GGTACTATGAGGCAGAT R:CCACATCCTTCTTCTCAC
TNF- $\alpha$	F:GACCCAGGGCAATCAACAAG R:CAAGCCACCTGAAGAAAAGCC
IL-1 $\beta$	F:TGGACTTCGCAGCACAAAATG R:TTCACCTCACGCTTTGGATG
IL-10	F:GACCATTCTGCCAACAGCTC R:GACCCCTTTTCCCTTCATCTTT

### 1.2.8 数据处理

采用 GraphPad Prism 9.1.0 软件进行数据分析及绘图,实验数据均以平均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。

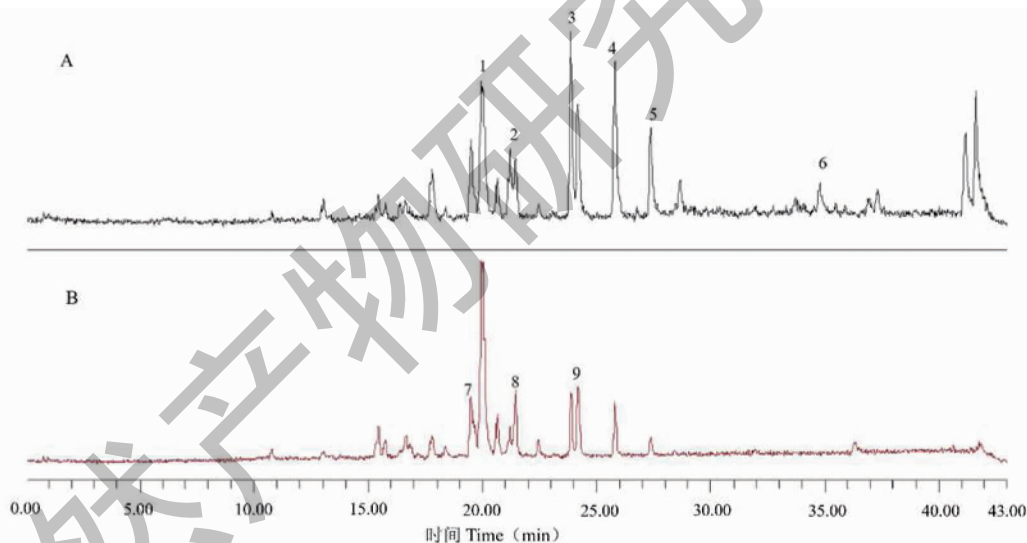


图 1 FSLF 总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of FSLF

注:A:正离子模式;B:负离子模式。1:芦丁;2:异槲皮苷;3:山柰酚-3-葡萄糖鼠李糖苷;4:金丝桃苷;5:山柰酚-3-O-芸香糖苷;6:槲皮素;7:橙皮苷;8:山柰酚;9:紫云英苷。Note:A:Positive ion mode;B:Negative ion mode. 1:Rutin;2:Isoquercitrin;3:Kaempferol 3-glucorhamnoside;4:Hyperside;5:Kaempferol-3-O-rutinoside;6:Quercetin;7:Hesperidin;8:Kaempferol;9:Astragalin.

### 2.3 FSLF 对斑马鱼结肠组织病理学变化

由图 2 所示,Con 组肠道组织结构完好,肠隐窝形态清晰,细胞排列整齐;Mod 组肠绒毛缩短并出现破损,细胞排列紊乱,肠隐窝和肠固有层消失。经 L-FSLF、M-FSLF、H-FSLF、DEX 组处理后,斑马鱼肠道结构出现不同程度好转,肠绒毛变长( $P < 0.001$ ),

采用单因素方差分析(ANOVA)和  $t$  检验法比较各组间差异。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 FSLF 含量

按“1.2.2”方法可得,芦丁标准样品回归方程为  $Y = 6.6739X + 0.0549$ ,  $R^2 = 1.0000$ 。其浓度在  $0 \sim 0.4$  mg/mL 线性范围内良好,70%乙醇提取物总黄酮含量为 91.86 mg/g,将其进一步经 D101 大孔树脂纯化后,结果显示 10%、20%、30%、40%、50%乙醇总黄酮含量分别为 27.28、114.19、271.37、33.57、67.74 mg/g。30%乙醇洗脱部位总黄酮含量最高,故选用 30%乙醇洗脱部位进行后续实验。

### 2.2 UPLC-MS 成分鉴定

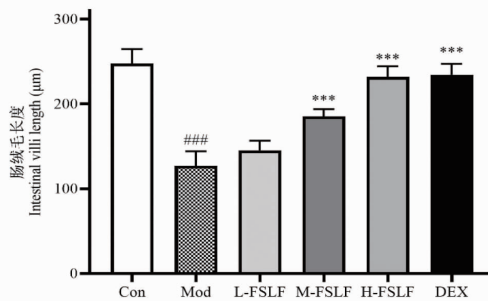
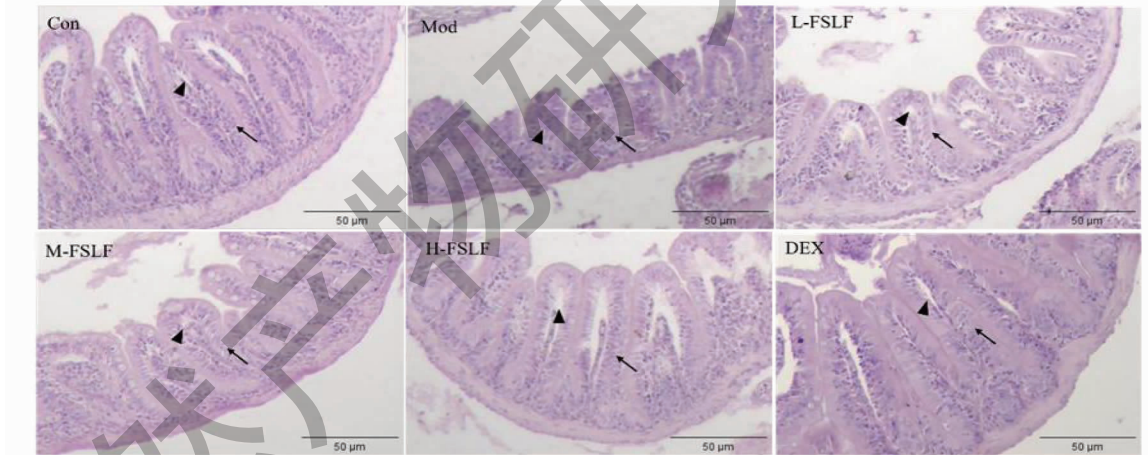
通过 UPLC-MS 对 FSLF 成分进行了分析,FSLF 总离子流图(见图 1),根据样品组分质谱数据与 MassLists、ChemSpider、mzCloud 和 mzVault 数据库匹配结果,共鉴定出 9 种黄酮类化合物,具体信息见表 2。

细胞排列出现轻微紊乱,肠隐窝和肠固有层清晰。由图 3 可知,与 Con 组相比,Mod 组杯状细胞耗竭,经 L-FSLF、M-FSLF、H-FSLF、DEX 处理后杯状细胞出现不同程度的恢复( $P < 0.001$ )。说明 FSLF 可一定程度改善 UC 斑马鱼结肠组织。

表 2 FSLF 成分结构鉴定结果

Table 2 Structural characterization of FSLF

编号 No.	$t_R$ (min)	离子模式 Ion mode	$m/z$		误差 Error ( $\times 10^{-6}$ )	分子式 Molecular formula	MS/MS 碎片离子 MS/MS fragment ion	鉴定结果 Identification
			测量值 Measured value	实际值 Calculated value				
1	19.92	$[M+H]^+$	611.145 9	611.146 1	0.28	$C_{27}H_{30}O_{16}$	243.030 1, 255.030 2, 300.027 8, 301.035 2	芦丁 Rutin
2	21.23	$[M+H]^+$	465.102 8	465.102 7	0.12	$C_{21}H_{20}O_{12}$	85.028 5, 145.049 8, 303.050 1	异槲皮苷 Isoquercitrin
3	23.97	$[M+H]^+$	595.151 3	595.151 1	0.29	$C_{27}H_{30}O_{15}$	227.035 3, 255.030 2, 284.033 0, 285.040 6	山柰酚-3-葡萄糖鼠李糖苷 Kaempferol 3-glucorhamnoside
4	25.85	$[M+H]^+$	465.102 6	465.102 7	0.09	$C_{21}H_{20}O_{12}$	61.028 4, 127.038 7, 303.049 7	金丝桃苷 Hyperoside
5	27.34	$[M+H]^+$	595.152 9	595.151 1	0.20	$C_{27}H_{30}O_{15}$	151.004 1, 227.034 9, 284.032 5	山柰酚-3-O-芸香糖苷 Kaempferol-3-O-rutinoside
6	34.77	$[M+H]^+$	303.049 9	303.049 9	0.09	$C_{15}H_{10}O_7$	153.018 5, 229.049 6, 285.040 2, 303.050 1, 101.024 3, 131.053 1,	槲皮素 Quercetin
7	19.43	$[M-H]^-$	609.189 6	609.182 4	-0.17	$C_{28}H_{34}O_{15}$	191.056 4 609.182 8	橙皮苷 Hesperidin
8	21.41	$[M-H]^-$	285.055 0	285.055 0	0.15	$C_{15}H_{10}O_6$	153.018 5, 258.052 0, 287.055 2	山柰酚 Kaempferol
9	24.32	$[M-H]^-$	447.106 7	447.107 8	-0.58	$C_{21}H_{20}O_{11}$	227.034 9, 255.028 9, 284.032 6	紫云英苷 Astragalin

图 2 不同剂量 FSLF 对 UC 斑马鱼肠道组织结构的影响 (HE,  $\times 100$ ) ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )Fig. 2 Effects of different doses of FSLF on the intestinal organization of UC zebrafish (HE,  $\times 100$ ) ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注: ▲肠固有层, ◄肠绒毛。与 Con 组相比, ###  $P < 0.001$ ; 与 Mod 组相比, \*\*\*  $P < 0.001$ 。Note: ▲Lamina propria intestinalis, ◄ Intestinal reces. Compared with Con group, ###  $P < 0.001$ ; Compared with Mod group, \*\*\*  $P < 0.001$ .

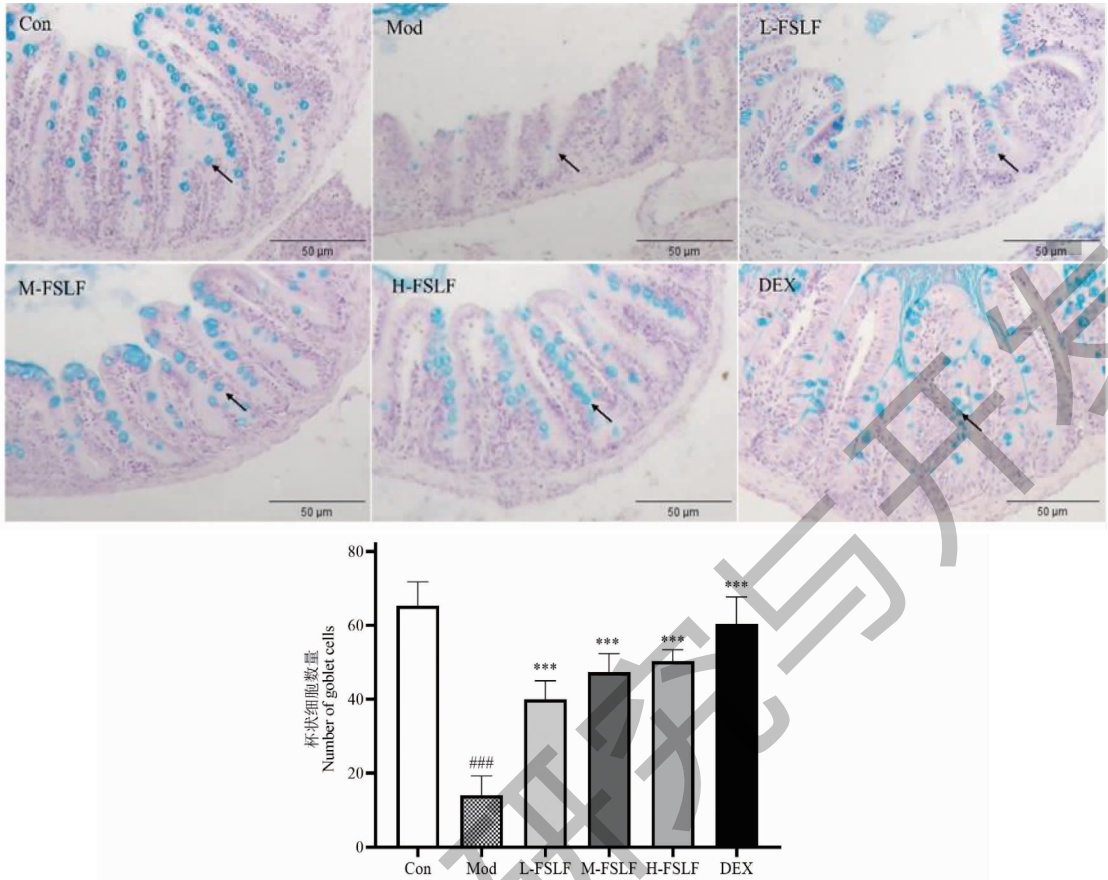


图3 不同剂量 FSLF 对 UC 斑马鱼杯状细胞数量变化 (AB-PAS,  $\times 100$ ) ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 3 Changes of the number of cup cells in UC Zebrafish induced by FSLF at different doses (AB-PAS,  $\times 100$ ) ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

注: \(\blacktriangleright\) 杯状细胞; 与 Con 组相比,  $### P < 0.001$ ; 与 Mod 组相比,  $*** P < 0.001$ 。Note: \(\blacktriangleright\) Goblet cell; Compared with the Con group,  $### P < 0.001$ ; Compared with the Mod group,  $*** P < 0.001$ 。

#### 2.4 FSLF 对 UC 斑马鱼结肠组织 ROS、SOD 含量和活性的影响

与 Con 组相比, Mod 组斑马鱼结肠组织 ROS 含量升高 ( $P < 0.001$ ); SOD 活性降低 ( $P < 0.001$ )。与 Mod 相比 H-FSLF、DEX 组 ROS 含量降低 ( $P <$

$0.05$ ;  $P < 0.001$ ), L-FSLF、M-FSLF 组 ROS 含量与 Mod 组相比无显著性差异; L-FSLF、M-FSLF、H-FSLF、DEX 组 SOD 活性升高 ( $P < 0.05$ ;  $P < 0.001$ ) (见图 4)。结果表明 FSLF 能显著改善 UC 斑马鱼 ROS、SOD 含量和活性。

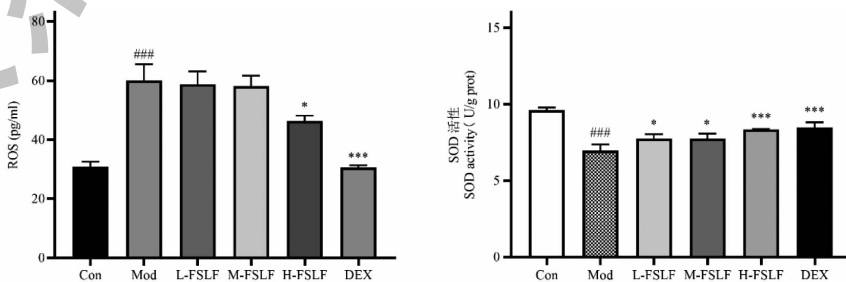


图4 不同剂量 FSLF 对 UC 斑马鱼 ROS、SOD 含量和活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 4 Effects of different doses of FSLF on ROS, SOD content and activity of UC Zebrafish ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

注: 与 Con 组相比,  $### P < 0.001$ ; 与 Mod 组相比,  $* P < 0.05$ ,  $*** P < 0.001$ 。Note: Compared with the Con group,  $### P < 0.001$ ; Compared with the Mod group,  $* P < 0.05$ ,  $*** P < 0.001$ 。

## 2.5 FSLF 对 UC 斑马鱼结肠组织相关通路及相关基因表达的影响

如图 5 所示,与 Con 相比,Mod 组斑马鱼肠道组织中 MyD88、TRAF6、NF- $\kappa$ Bp65、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA 表达量显著上调( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ); IL-10 mRNA 表达量显著下调( $P < 0.01$ );与 Mod 组相比 M-FSLF、H-FSLF、DEX 组 MyD88、TRAF6 mRNA 表达量显著下调( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ),L-FSLF 无显著性差异;L-FSLF、M-FSLF、H-FSLF、DEX 组

NF- $\kappa$ Bp65 mRNA 表达量显著下调( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )、IL-1 $\beta$  mRNA 表达量显著下调( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ );H-FSLF 和 DEX 组 TNF- $\alpha$  mRNA 表达量显著下调( $P < 0.001$ ),L-FSLF、M-FSLF 无显著性差异。M-FSLF、H-FSLF 和 DEX 组 IL-10 mRNA 表达量显著上调( $P < 0.05$ ),L-FSLF 组无显著性差异。表明连翘叶总黄酮能显著改善 UC 斑马鱼 NF- $\kappa$ B 通路及 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-10 的表达。

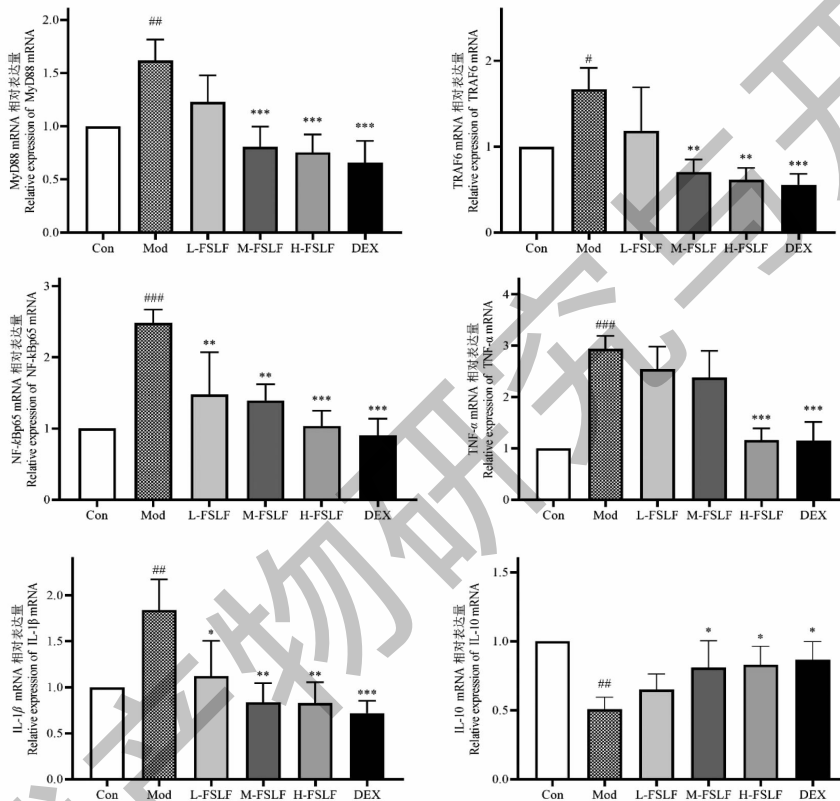


图 5 不同剂量 FSLF 对 UC 斑马鱼相关信号通路及基因表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 5 Effects of different doses of FSLF on related signaling pathways and gene expression in UC Zebrafish( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注:与 Con 组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ ;与 Mod 组相比 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。Note: Compare with Con group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ ; Compared with the Mod group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

## 3 讨论与结论

UC 是一种以肠屏障损伤为特征的炎症性疾病,其发病机制复杂,病因尚未明确,目前治疗方案很难完全逆转<sup>[13]</sup>。研究发现,连翘提取物对 UC 有明显治疗作用<sup>[14]</sup>,而连翘叶总黄酮对 UC 斑马鱼治疗作用尚未明确。因此,本实验采用 D101 大孔树脂分离纯化连翘叶总黄酮,UPLC-MS 分析结果显示共鉴定出 9 种黄酮类化合物,分别为芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-葡萄糖鼠李糖苷、金丝桃苷、山柰酚-3-芸

香糖苷、槲皮素、橙皮苷、山柰酚、紫云英苷,其中槲皮素<sup>[15]</sup>、金丝桃苷<sup>[16]</sup>、芦丁<sup>[17]</sup>已被证明具有治疗 UC 的作用,而各成分之间是否能够协同发挥治疗作用,增强治疗效果,还有待进一步深入研究。

TNBS 作为一种半抗原剂可以在数小时内引起肠黏膜屏障破坏和免疫细胞大量涌入,进而引起结肠炎<sup>[18]</sup>。有研究显示,使用 320 mmol/L TNBS 直肠注射 6 h 构建的 UC 斑马鱼模型中肠上皮结构破坏,杯状细胞数量减少,嗜酸性粒细胞浸润<sup>[19]</sup>。本实验

前期采用 160、320 mmol/L TNBS 肛门注射构建 UC 斑马鱼模型,注射 8 h 后,320 mmol/L 出现大批死亡,故后期采用 160 mmol/L 浓度进行诱导,注射 8 h 后结肠组织出现细胞排列紊乱、肠绒毛缩短、杯状细胞数量减少,表明 UC 斑马鱼模型构建成功。

氧化应激在肠炎发展中起重要作用,研究表明,氧化应激可引起炎症反应并加重疾病负担,外源性致癌物或氧化物可引起体内氧化应激,导致膜脂过氧化引起损伤,产生大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)、ROS 的过度释放和体内氧化应激的不断积累会破坏基因,削弱免疫系统并引起炎症性肠病<sup>[20]</sup>。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是抗氧化系统中的关键酶,可以抑制外界刺激对机体造成的氧化损伤动态调控 ROS 水平,来反映机体抗炎反应的程度<sup>[21]</sup>。研究表明,肠炎与活性氧和抗氧化活性之间的失衡有关,可通过调节 ROS、SOD 水平降低氧化应激损伤而缓解 UC<sup>[22]</sup>。本研究结果显示连翘叶总黄酮能降低 ROS 含量,提高 SOD 活性,表明改善肠炎损伤的原因与氧化应激有一定联系。氧化应激在 UC 发展中还会导致氧化还原信号失调,刺激肠道上皮细胞 TNF- $\alpha$  炎症细胞因子的表达,进而促进炎症和癌变的发生,而这些炎症因子多由 NF- $\kappa$ B 调控表达<sup>[23]</sup>。基于 UC 与氧化应激的关系,我们进一步探讨了连翘叶总黄酮调控 UC 斑马鱼 NF- $\kappa$ B 相关信号通路及炎症因子分子机制。

NF- $\kappa$ B 信号通路被认为是 UC 发生的机制之一,在肠炎过程中,Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)作为先天免疫受体之一,通过识别肠道内病原相关分子模(pathogen associated molecular patterns, PAMPs)而受到刺激,发生构象改变和二聚化,随后相关受体髓分化因子 88(MyD88)被募集<sup>[24]</sup>,活化的 MyD88 可诱导白细胞介素-1 受体相关激酶(IL-1 receptor associated kinase, IRAKs)磷酸化,进而激活胞质内的 TNF 受体关联因子 6( TRAF6),进而导致 NF- $\kappa$ B 激活<sup>[25]</sup>,特别是 NF- $\kappa$ Bp65 的表达明显增加<sup>[26]</sup>,NF- $\kappa$ B 的激活则在另一方面提高了炎症的表达,主要是通过增加促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和降低抗炎因子 IL-10 等的表达,它们则进一步刺激细胞增殖而促进肠炎发展<sup>[27]</sup>。本实验结果发现,经连翘叶总黄酮干预后能够降低 UC 斑马鱼 MyD88、TRAF6、NF- $\kappa$ Bp65、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和升高 IL-10 mRNA 表达量。表明连翘叶总黄酮可通过调控 NF- $\kappa$ B 信号通路,从而抑制炎症因子的表达来发挥对 UC

的防治作用。

综上所述,连翘叶总黄酮可通过调节氧化应激水平,抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路,降低促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和升高抗炎因子 IL-10 的表达水平,从而发挥对 UC 斑马鱼的治疗作用。后续实验可采用代谢组学技术进一步深入研究连翘叶总黄酮治疗 UC 的相关代谢通路和具体作用机制。

## 参考文献

- 1 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.
- 2 D'Amico F, Fasulo E, Jairath V, et al. Management and treatment optimization of patients with mild to moderate ulcerative colitis[J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2023, 20:277-290.
- 3 Guo FH, Tsao R, Li CY, et al. Green pea (*Pisum sativum* L.) Hull polyphenol extracts ameliorate DSS-induced colitis through Keap1/Nrf2 pathway and gut microbiota modulation[J]. *Foods*, 2021, 10:2765.
- 4 Li XR, Chen HJ, Gao YH, et al. Study on the mechanism of Tibetan medicine *Myricaria germanica* on ulcerative colitis[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2024, 36:206-217.
- 5 Kwon Y, Kang YJ, Kwon J, et al. *Forsythia velutina* Nakai extract; a promising therapeutic option for atopic dermatitis through multiple cell type modulation[J]. *Allergy*, 2023, 79:1242-1257.
- 6 Jeong YH, Hwang YH, Kim TI, et al. *Forsythia* fruit prevents fulminant hepatitis in mice and ameliorates inflammation in murine macrophages[J]. *Nutrients*, 2021, 13:2901.
- 7 Zhou MY, Huo JH, Sun GD, et al. Chemical composition analysis of *Forsythia* leaf based on UPLC-Q-TOF-MS technique[J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2019, 42:2582-2587.
- 8 Ma L, Qi T, Zhou HL, et al. Study on the antibacterial activity of total extracts of *Forsythiae Fructus* and total extracts of *Forsythia suspensa* leaves and their intestinal flora transformation liquid against *Staphylococcus epidermidis*[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2021, 36:6760-6763.
- 9 Mou Y, Liu B, Zhang X, et al. Analysis of constituents in different parts of *Forsythia suspensa* by UPLC-Q-TOF-MS and evaluation of their anti-inflammatory activity[J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2024, 49:968-980.
- 10 Zhao H, Du HZ. Extraction of total flavonoids from different



- parts of *Forsythia suspensa* with deep eutectic solvents and its anti-inflammatory and antioxidant activities [J]. *J Shanxi Univ; Nat Sci*(山西大学学报:自科版), 2023, 46:689-698.
- 11 Sun KF, Chen YR, Xu WF, et al. Optimization of separation and purification process of total flavonoids from *Laportea bulbifera* macroporous adsorption resin [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2022, 44:2619-2623.
  - 12 Liu S, Yang KM, Li YL, et al. Variance analysis on polysaccharide, total flavonoids and total phenols of *Lycium barbarum* leaves from different production areas [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2019, 44:1774-1780.
  - 13 Du LL, Ha C. Epidemiology and pathogenesis of ulcerative colitis [J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2020, 49:643-654.
  - 14 Chao LM, Lin J, Zhou J, et al. Polyphenol rich *Forsythia suspensa* extract alleviates DSS-induced ulcerative colitis in mice through the Nrf2-NLRP3 pathway [J]. *Antioxidants*, 2022, 11:475.
  - 15 Kottakis G, Kambouri K, Giatromanolaki A, et al. Effects of the antioxidant quercetin in an experimental model of ulcerative colitis in mice [J]. *Medicina*, 2022, 59:87.
  - 16 Yu XP, Cai YQ, Zhou SY, et al. Therapeutic effect of hyperoside in rats with ulcerative colitis and its mechanism [J]. *Immunol J*(免疫学杂志), 2021, 37:417-424.
  - 17 Chu XF, Wang XN, Fan QL, et al. Role of rutin in dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice and the mechanism underlying its effects [J]. *J China Med Univ*(中国医科大学学报), 2020, 49:788-792.
  - 18 Silva I, Solas J, Pinto R, et al. Chronic experimental model of TNBS-induced colitis to study inflammatory bowel disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23:4739.
  - 19 Uyttebroek L, Pype C, Hubens G, et al. Effect of TNBS-induced colitis on enteric neuronal subpopulations in adult zebrafish [J]. *Eur J Histochem*, 2020, 64:209-217.
  - 20 Wan Y, Yang L, Jiang S, et al. Excessive apoptosis in ulcerative colitis: crosstalk between apoptosis, ROS, ER stress, and intestinal homeostasis [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2021, 28:639-648.
  - 21 Li QL, Li HN, Guo JK, et al. Ameliorative effect of orally administered nano-superoxide dismutase liposomes on ulcerative colitis in mice [J]. *Food Sci*(食品科学), 2023, 44:166-174.
  - 22 Wu JZ, Zhang Z, Wu QM, et al. Antioxidative effect of *Periplaneta americana* extract on dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis through activation of the Nrf2 signal [J]. *Pharm Biol*, 2023, 61:949-962.
  - 23 Ghasemi-Dehnoo M, Lorigooini Z, Amini-Khoei H, et al. Quinic acid ameliorates ulcerative colitis in rats, through the inhibition of two TLR4-NF- $\kappa$ B and NF- $\kappa$ B-INOS-NO signaling pathways [J]. *Immun Inflamm Dis*, 2023, 11:e926.
  - 24 Rashidian A, Muhammadnejad A, Dehpour A, et al. Atorvastatin attenuates TNBS-induced rat colitis: the involvement of the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Inflammopharmacology*, 2016, 24:109-118.
  - 25 Qiao CX, Zhao G, Zhang LZ, et al. Interrelation mechanism of electroacupuncture in rats with ulcerative colitis: an analysis based on the Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88/nuclear factor-kappa B signaling pathway [J]. *Acupunct Res*(针刺研究), 2020, 45:180-187.
  - 26 Ye RH, Guo QY, Huang JQ, et al. *Eucommia ulmoides* polysaccharide modified nano-selenium effectively alleviated DSS-induced colitis through enhancing intestinal mucosal barrier function and antioxidant capacity [J]. *J Nanobiotechnol*, 2023, 21:222.
  - 27 Husien HM, Peng WL, Liu MJ, et al. Protective effects and mechanism of *Moringa oleifera* leaf polysaccharide on ulcerative colitis in mice [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2023, 35:1659-1668.
- 
- (上接第 1306 页)
- 16 Otter CJ, Fausto A, Tan LH, et al. Infection of primary nasal epithelial cells differentiates among lethal and seasonal human coronaviruses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120:e2218083120.
  - 17 Short KR, Kasper J, van der Aa S, et al. Influenza virus damages the alveolar barrier by disrupting epithelial cell tight junctions [J]. *Eur Respir J*, 2016, 47:954-966.
  - 18 Li X, Jamal M, Guo P, et al. Irisin alleviates pulmonary epithelial barrier dysfunction in sepsis-induced acute lung injury via activation of AMPK/SIRT1 pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118:109363.
  - 19 Wolk K, Witte E, Witte K, et al. Biology of interleukin-22 [J]. *Semin Immunopathol*, 2010, 32:17-31.
  - 20 Wolk K, Witte E, Wallace E, et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis [J]. *Eur J Immunol*, 2006, 36:1309-1323.