

苦豆子总碱对溃疡性结肠炎小鼠结肠及肝组织中 FXR、TGR5、CYP7A1 蛋白表达的影响

肖莹, 华永丽*, 贾娅倩, 董嘉琪, 李芳, 魏彦明, 袁子文, 纪鹏

甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070

摘要:基于法尼醇 X 受体和 G 蛋白偶联胆汁酸受体 5 (farnesoid X receptor/ G protein-coupled bile acid receptor 5, FXR/TGR5) 通路探讨苦豆子总碱对小鼠溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 模型的治疗作用及其作用机制。将 60 只健康雄性 BALB/c 小鼠分空白对照组 (Con)、葡聚糖硫酸钠模型组 (DSS)、柳氮磺胺嘧啶阳性对照组 (SASP) 和苦豆子总碱治疗组 (TASA)。给予 BALB/c 小鼠 3.5% DSS 饮水使其连续自由饮用 7 天以建立小鼠急性 UC 模型, 建模的同时每天灌胃苦豆子总碱 (75 mg/kg) 进行治疗, 并以柳氮磺胺嘧啶 (450 mg/kg) 为阳性对照药物。试验期间对各组小鼠临床症状进行疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分。第 8 天观察结肠 HE 染色病理切片, 糖原 PAS 染色以及阿利新蓝染色观察结肠组织杯状细胞。酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测结肠组织匀浆上清液 IL-10、IL-23、IL-1 β 及 IL-17 的表达。蛋白质免疫印迹 (Western blot) 检测小鼠结肠和肝组织 FXR、TGR5、CYP7A1 的表达。结果显示, 经苦豆子总碱治疗后, 小鼠疾病活动指数、结肠组织病理学损伤及结肠长度明显改善 ($P < 0.01$), 结肠组织杯状细胞数量显著增加 ($P < 0.01$), 细胞因子 IL-10 显著升高 ($P < 0.01$); IL-23、IL-17、IL-1 β 显著降低 ($P < 0.01$), 血清胆汁酸含量显著升高 ($P < 0.01$), 结肠和肝脏组织 FXR、TGR5、CYP7A1 均不同程度上调。结果表明苦豆子总碱对 DSS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎有一定的治疗作用, 其主要通过抑制相关炎症因子来抑制结肠炎症的发展, 以及上调 FXR/TGR5 信号通路的相关蛋白的表达发挥其治疗作用。

关键词:苦豆子总碱; UC 模型; FXR; TGR5; CYP7A1

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)9-1452-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.9.002

Effect of total alkaloids from *Sophora alopecuroides* on FXR, TGR5, CYP7A1 protein expression in colon and liver tissues of mice with ulcerative colitis

XIAO Ying, HUA Yong-li*, JIA Ya-qian, DONG Jia-qi, LI Fang, WEI Yan-ming, YUAN Zi-wen, Ji Peng

College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: Based on FXR/TGR5 (farnesoid X receptor/ G protein-coupled bile acid receptor 5) pathway to explore the therapeutic effect and mechanism of action of total alkaloids from *Sophora alopecuroides* on 3.5% dextran sodium sulfate induced ulcerative colitis model in mice. Sixty healthy male BALB/c mice were divided into blank control group (Con), dextran sodium sulfate model group (DSS), sulfasalazine positive control group (SASP) and total alkaloids from *S. alopecuroides* treatment group (TASA). BALB/c mice were given 3.5% DSS water for continuous free drinking for 7 days to establish the mouse model of acute UC. During the modeling, *S. alopecuroides* extract (75 mg/kg) was given daily for treatment, and sulfasalazine (450 mg/kg) was used as the positive control drug. Clinical symptoms of mice in each group were scored by DAI during the experiment. Day eight, the pathological sections of colon were observed by HE staining, glycogen PAS staining and Alcian blue staining were used to observe the expression of goblet cells in colon tissue. The expressions of IL-10, IL-23, IL-1 β and IL-17 in serum and colon tissue homogenate supernatant were detected by ELISA. The expressions of FXR, TGR5 and CYP7A1 in liver and colon tissues of mice were detected by Western blot. The results showed that after total alkaloids from *S. alopecuroides* ex-

收稿日期: 2021-04-25 接受日期: 2021-08-17

基金项目: 甘肃省高等学校创新基金 (2020A-057); 国家自然科学基金 (31860717); 甘肃农业大学伏羲杰出人才培养计划 (Gaufx-03J01); 财政部和农业农村部; 国家现代农业产业技术体系资助 (CARS-37)

* 通信作者 Tel: 86-013919082038; E-mail: huayongli2004@163.com

tract treatment, the DAI, histopathological damage of colon and the length of colon were significantly improvement ($P < 0.01$), the number of goblet cells in colon tissue was significantly increased ($P < 0.01$), anti-inflammatory factor IL-10 was significantly increased ($P < 0.01$), pro-inflammatory factors IL-23, IL-17 and IL-1 β were significantly decreased ($P < 0.01$), serum bile acid content was significantly increased ($P < 0.01$), FXR, TGR5 and CYP7A1 in colon and liver were up-regulated. Results showed that the total alkaloids from *S. alopecuroides* had a certain therapeutic effect on DSS inducing UC in mice. It inhibited the development of colitis mainly by inhibiting the related inflammatory factors, and up-regulating the expression levels of related proteins of FXR/TGR5 signaling pathway.

Key words: total alkaloids from *Sophora alopecuroides*; ulcerative colitis; FXR; TGR5; CYP7A1

苦豆子 (*Sophora alopecuroides* L.) 是豆科槐属多年生草本植物, 主要分布在我国西北干旱半干旱荒漠草地、盐碱地、沙丘, 属耐盐碱沙生植物^[1]。具有清热解暑、除湿作用, 对胃肠道等疾病具有很好的治疗作用。生物碱是苦豆子的主要活性成分之一, 研究显示苦豆子生物碱对心肌炎、肝炎、溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 都具有良好的治疗效果^[2]。本课题组前期研究也证明苦豆子总碱对 UC 具有良好疗效。

UC 是一种病因尚未明确的非特异性结肠炎症, 病变主要累及结肠黏膜和黏膜下层^[3], 与遗传、环境、肠道微生态和免疫失衡等等多种因素有关^[4], 这些因素导致肠道内环境紊乱、肠黏膜上皮功能障碍、黏膜免疫反应异常, 最后导致肠道反复炎症, 引起 UC 的发生发展^[5,6]。近年研究已证实胆汁酸与肠道疾病有密切关系^[7], 其 UC 的产生原因为肠道菌群失衡、上皮功能障碍和异常的免疫应答, 而胆汁酸通过多种途径都参与这些过程^[8]。本课题组前期研究也发现苦豆子总碱可以降低 UC 小鼠血清中的总胆汁酸 (TBA) 和总胆固醇 (T-CHO) 水平, 胆汁酸靶向代谢组学结果显示血清中 α -鼠胆酸 (α -muricholic acid, α -MCA)、 β -鼠胆酸 (β -muricholic acid, β -MCA)、 ω -鼠胆酸 (ω -muricholic acid, ω -MCA) 和胆酸 (cholic acid, CA) 在模型组显著升高, 而苦豆子总碱治疗后显著下降^[9]。胆汁酸在胃肠道中主要通过两个受体影响其功能, 分别为法尼醇 X 受体 (farnesoid X receptor, FXR) 和 G 蛋白偶联胆汁酸受体 5 (G protein-coupled bile acid receptor 5, TGR5), FXR 和 TGR5 因发现其在肝脏和结肠大量表达, 并在炎症调节中有非常重要的作用, 可能成为治疗 UC 非常有价值的靶^[10,11]。UC 的主要标志就是黏膜炎症, FXR 可以调节结肠黏膜内的促炎细胞因子的产生^[12], 其水平可有效反映溃疡性结肠炎的病情严重程度^[13]。肝脏和肠道有着密切的联系^[14], 胆固醇在肝细胞内通过滑面内质网上胆固醇 7 α -羟化酶

CYP7A1 (cholesterol 7 α -hydroxylase) 启动的中性 (或经典) 途径, 合成胆汁酸^[15,16], 胆汁酸在体内作为一种信号分子, 通过激活 FXR、TGR5 受体调控机体代谢。前期研究发现苦豆子总碱虽然可以影响血清胆汁酸的变化, 但是胆汁酸合成通路受 FXR/TGR5 的调控, 具体苦豆子总碱如何通过 FXR/TGR5 通路影响血清胆汁酸的变化还不明确。因此, 本研究以苦豆子总碱为研究对象, 采用葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 诱导小鼠急性溃疡性结肠炎模型, 分析苦豆子总碱对小鼠结肠和肝脏组织 FXR、TGR5、CYP7A1 蛋白的表达影响, 以探讨苦豆子总碱对 DSS 诱导的急性 UC 小鼠 FXR/TGR5 通路的影响及作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

60 只雄性 BALB/c 小鼠 (8 周龄, 18 ~ 20 g), 购自中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心, 动物许可证号: SCXK (甘) 20200006。动物购进适应性饲养 3 天开始实验, 小鼠饲养条件: 温度 24 \pm 2 $^{\circ}$ C、湿度 50% \pm 5%、12 h 明暗循环。全价配合饲料以及纯净水供小鼠自由摄取。动物实验程序与福利均符合实验动物伦理学要求 (伦理批准编号: GSAU-AEW-2020-0911)。

1.2 药物与试剂

苦豆子采自宁夏沙漠边缘, 由甘肃农业大学魏彦明教授鉴定。柳氮磺胺嘧啶 (salazosulfapyridine, SASP) 肠溶片, 国药准字 H31020557, 购自上海信谊天平药业有限公司; 葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) (M. W. = 36 000 ~ 50 000) 购自 MP 公司; 白介素-10 (Interleukin-10, IL-10)、IL-23、IL-17、IL-1 β 小鼠 ELISA 试剂盒均购于欣博盛生物科技有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 500 微孔购自北京索莱宝科技有限公司, 货号 PC0020; 总胆固醇 TCH 试剂盒 (货号 A111-1-1)、总胆汁酸 TBA 试剂盒 (货号 E003-2-1) 购自南京建成生物工程研究所;

Rabbit Polyclonal Antibody: FXR/NR1H4、CYP7A1 购自北京博奥森生物技术有限公司; TGR5/GPBAR1 购自 CUSABIO 生物技术有限公司; beta Actin、HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG(H + L) 购自 Proteintech 生物技术有限公司。RIPA 裂解液、上样 Loading Buffer、SDS、TEMED、BIS-ACR、SDS-PAGE 分离胶/浓缩胶缓冲液、Tris、甘氨酸、吐温 80、PVDF 膜、脱脂奶粉均购自北京索莱宝科技有限公司。ECL 发光液购自南京诺维赞生物技术有限公司。

1.3 仪器

美国 MD 光吸收酶标仪, SpectraMaxPlus84/190/Versamax/340PC; Olympus DP-71 显微照相系统, 日本 Olympus 公司; 冷冻型高通量组织研磨机; Bio-Rad 小型垂直板电泳槽、小型转印槽、电泳仪均购自美国伯乐公司; 紫外分光光度计。

1.4 药物制备

称取 20 g 苦豆子, 研磨并用 20 目筛子筛选后以 50% 乙醇提取溶剂, 提取 3 次, 提取时间分别为 12、8、4 h, 加入提取剂的量分别为 12、10 及 8 倍。混合三次滤液, 浓缩, 并制成干膏, 4 °C 保存备用。

总生物碱含量测定: 称取 0.025 g 苦豆子溶于 5

mL 乙醇, 吸出 30 μ L 挥发溶剂后分别加 6 mL 溴麝香草酚蓝和氯仿振荡混匀, 静置 2 h, 紫外分光光度计 420 nm 处测得总生物碱含量为 246 mg/g。

1.5 动物造模与药物治疗

将 60 只 BALB/c 小鼠随机分为空白对照组 (control group, Con)、葡聚糖硫酸钠模型组 (dextran sulfate sodium model group, DSS)、阳性对照组 (salazosulfapyridine group, SASP)、苦豆子总碱组 (total alkaloids from *Sophora alopecuroides* group, TA-SA), 每组 15 只。实验前适应性饲养 3 天。除空白对照组给予蒸馏水外, 其余组给予 BALB/c 小鼠 3.5% DSS 饮水使其连续自由饮用 7 天以建立小鼠急性 UC 模型, 造模的同时每天灌胃苦豆子总碱 (75 mg/kg) 进行治疗, 根据课题组前期实验选择苦豆子总碱最佳治疗浓度^[9], 并以柳氮磺胺嘧啶 (450 mg/kg) 为阳性对照药物, 每天早晨更换新鲜 DSS 水溶液, 小鼠灌胃体积均为 0.015 mL/g。

1.6 疾病活动指数评分

实验期间每天记录各组小鼠体重、粪便性状及便血程度, 疾病活动指数评分判断标准见表 1^[17]。

表 1 疾病活动指数评分判断标准

Table 1 The score scales for the disease activity index

体重下降百分比 Weight loss percentage	粪便性状 Fecal property	便血程度 Hematochezia degree	评分 Score
无变化	正常粪球	粪便潜血阴性	0
下降 1% ~ 5%	粪便成形但易粘附	粪便潜血阳性 (浅黄绿色)	1
下降 5% ~ 10%	粪便半成形/稀软	粪便潜血阳性 (显蓝绿色)	2
下降 10% ~ 20%	粪便成稀浆状但不粘附于肛门	粪便潜血阳性 (显深蓝绿色)	3
下降 > 20%	腹泻粘附于肛门	肉眼可见显性/黏脓血便	4

1.7 样品采集

实验结束后, 摘眼球采血法收集血液于 1.5 mL EP 管中, 室温静置 2 ~ 3 h 后 3 000 rpm 离心 10 min, 分离血清, 存于 -80 °C 备用。采血后颈椎脱臼法处死小鼠, 采集小鼠结肠并量取长度, 后分段采集各组小鼠结肠 (结前、结后)、回肠以及肝脏组织 (3 份), 冻存于 -80 °C 备用。每组随机抽取 3 只老鼠的结肠组织于 10% 甲醛溶液、中性甲醛固定液、多聚甲醛固定液中, 分别用于苏木精-伊红 (HE) 染色、阿利新蓝染色、过碘酸雪夫氏染色 (schiff periodic acid

shiff, PAS)。

1.8 HE 染色法观察结肠组织病理学变化

用结肠长度以及组织学损伤来评估小鼠的溃疡性结肠炎的治疗情况和是否成功构建溃疡性结肠炎模型。每组抽取 3 只小鼠结肠组织固定于 10% 甲醛溶液, 后依次进行常规石蜡包埋、切片、脱蜡、HE 染色、后拍照 (Leica DFC 显微拍照系统) 观察结肠组织病变情况。组织病理学评分被用于量化结肠组织损伤程度, 主要包括肠上皮细胞损伤程度和炎症浸润程度两个方面。评分标准见表 2^[17]。

表 2 结肠组织病理学评分判断标准

Table 2 The score scales for the colonic histopathology

指标 Index	评分 Score
正常形态且无炎症	0
小部分杯状细胞丢失及轻微炎症浸润	1
大面积的杯状细胞丢失及黏膜层中度炎症浸润	2
少量/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	3
大面积的隐窝缺失及黏膜下层广泛的炎症浸润	4

1.9 糖原 PAS、阿利新蓝染色检测结肠组织中杯状细胞

小鼠结肠组织切片常规脱蜡至水依次自来水洗和蒸馏水洗;高碘酸氧化液 10~20 min;蒸馏水洗 2 次;Schiff 液染色 10 min;流水冲洗 5 min;苏木素复染 2~3 min;0.5% 盐酸乙醇分化;无水酒精、二甲苯透明,中性树胶封固。采用济南丹吉尔电子有限公司生产的 Panoramic 250 数字切片扫描仪对切片进行图像采集,每张切片先于 40 倍下观察全部组织,选择要观察的区域采集 400 倍图片,观察具体表达情况。

1.10 结肠组织中细胞因子的检测

ELISA 试剂盒检测每组小鼠结肠中 IL-10、IL-23、IL-17、IL-1 β 的含量,另取每组小鼠结肠组织匀浆上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书分别测定结肠中 IL-10、IL-23、IL-17、IL-1 β 的含量。

1.11 血清中总胆汁酸与总胆固醇的检测

总胆固醇 TCH 试剂盒和总胆汁酸 TBA 试剂盒分别检测每组小鼠中总胆固醇和总胆汁酸的含量。

1.12 Western blot 法检测小鼠肝脏组织和结肠组织蛋白的表达

取每组小鼠结肠前段组织和肝脏组织,分别称重,结肠组织约 0.025 0 g 左右,肝脏组织约 0.030 0 g 左右,后剪碎以 20 mg 组织加 200 μ L RIPA 高效裂解液的比例加入裂解液,后每个样加入两颗铁珠子,再将每个样放入冷冻型高通量组织研磨机充分裂解 15~20 min,此过程均采用冰上操作,以提取蛋白。BCA 法测定所得蛋白浓度,10% 的 SDS-PAGE 分离蛋白,在此期间于分离胶第一孔加入 PageRuler Prestained Protein Ladder 用于参考,电泳 1 h 30 min 后采用 0.22 μ m PVDF 膜进行转膜,转膜时间 1 h,转膜后在 5% 的脱脂奶粉中室温封闭 2 h,后将膜于以 5% 脱脂奶粉稀释的一抗中 4 度孵育过夜,一抗兔多克隆抗体 Rabbit Polyclonal Antibody:FXR/NR1H4(1

:1 000 稀释)、TGR5/GPBARI (1:1 000 稀释)、CYP7A1 (1:3 000 稀释)、beta Actin (1:5 000 稀释),一抗孵育结束后,TBST 缓冲液洗膜(5 min 一次,8~10 次),加入带有 HRP 标记的 II 抗稀释液,室温孵育 1 h,二抗:HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (1:5 000 稀释),二抗孵育结束后,TBST 缓冲液洗膜(5 min 一次,8~10 次),后加入 ECL 化学发光液,于 Amersham Imager 600 化学发光仪进行化学发光的信号采集与拍照,保存图片,ImageJ 软件对每组图片进行灰度值分析。

1.13 FXR、TGR5、CYP7A1 蛋白表达与总胆汁酸、炎症因子的相关性分析

采用 SPSS 25.0 软件分析 FXR、TGR5、CYP7A1 蛋白表达与总胆汁酸、炎症因子的相关性 (Pearson)。R 值 = 0.8~1.0 极度相关,0.6~0.8 强相关,0.4~0.6 中等程度相关。

1.14 统计学分析

数据均采用 SPSS 25.0 软件和 GraphPad Prism 5.0 软件进行分析,各组之间的统计学差异采用单因素方差分析 (one-way ANOVN) 进行组间比较,数据均采用均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示,假设检验均采用双侧检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 苦豆子总碱对急性 UC 小鼠体重、疾病活动指数、结肠长度的影响

DSS 诱导的小鼠急性溃疡性结肠炎模型成功复制,主要表现为便血腹泻、体重下降、结肠缩短等明显的临床症状。给予小鼠 DSS 后第 3 天即可以看见粪便变软,有少量出血,造模第 6 天除空白对照组其余组小鼠均开始严重的便血,且体重开始下降,DAI 也持续升高,而苦豆子总碱治疗组对体重下降和 DAI 升高有一定的抑制作用,第 7 天开始相比空白对照组,DSS 诱导的模型组体重显著降低 ($P < 0.01$) (见图 1A),DAI 显著升高 ($P < 0.01$) (见图

1B)。造模后模型组小鼠较空白对照组结肠显著缩短($P < 0.01$),苦豆子总碱治疗组能够显著增加结

肠长度($P < 0.01$) (见图 1C),说明苦豆子总碱可以改善由溃疡性结肠炎引起的小鼠结肠缩短。

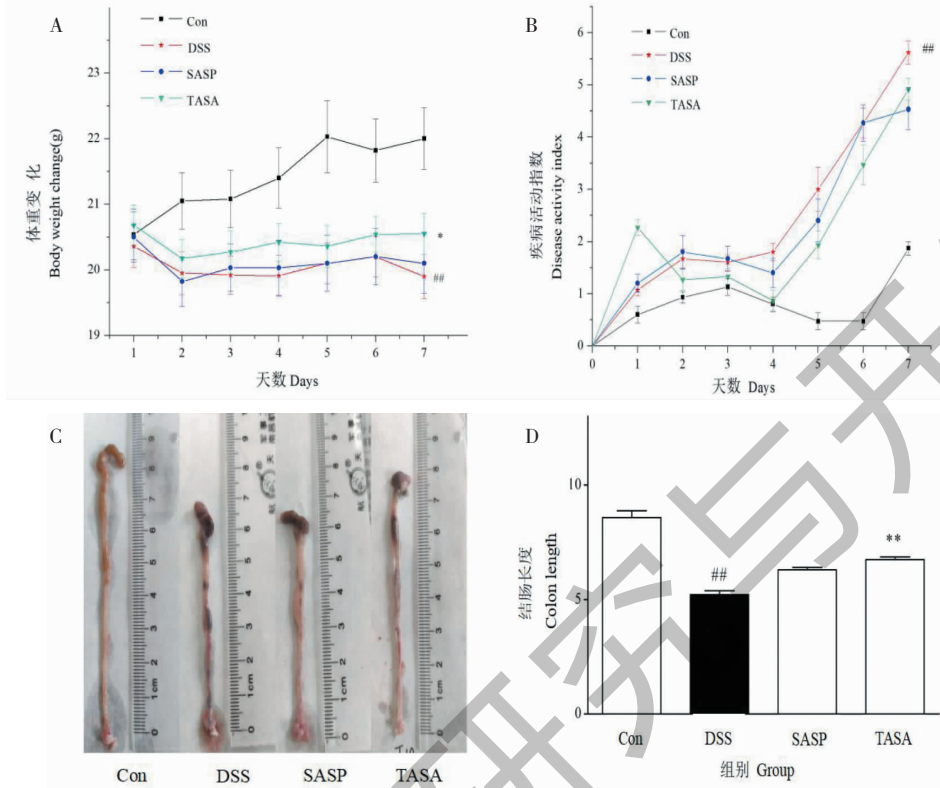


图 1 苦豆子总碱对于溃疡性结肠炎小鼠体重、疾病活动指数、结肠长度的影响

Fig. 1 Effects of total alkaloid from *S. alopecuroides* on body weight, disease activity index and colonic length in acute ulcerative colitis mice

注:与空白对照组比较,## $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$,下同。Note:Compared with Con,## $P < 0.01$;Compared with DSS,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,the same below.

2.2 苦豆子总碱对急性 UC 小鼠结肠组织病理学影响及评分

HE 染色观察小鼠结肠组织病理学变化,由图 2 可见,空白对照组小鼠结肠镜下结构完整,肠绒毛整

齐排列,肠隐窝完整,杯状细胞丰富,无炎症,无组织学异常,DSS 诱导的模型组肠绒毛脱落,结构模糊,肠隐窝缺失,肠腺溶解,肠腺腺口打开,大量炎性细胞浸润,有局部病变灶,肠上皮增生,苦豆子总碱治

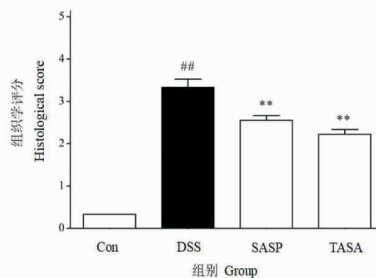
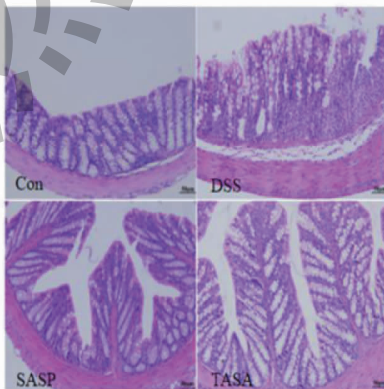


图 2 苦豆子总碱对急性 UC 小鼠结肠组织病理学影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 2 Effects of total alkaloid from *S. alopecuroides* on colonic histopathology in acute ulcerative colitis mice (HE, $\times 200$)

疗组和阳性对照组均能不同程度改善炎症引起的组织学改变,可见肠绒毛结构恢复,肠腺分泌功能亢进,炎性细胞被吸收,治疗效果明显($P < 0.01$)。

2.3 苦豆子总碱对急性 UC 小鼠杯状细胞的影响

通过对小鼠结肠组织光镜下观察,确定 PAS(见图 3A)和阿利新蓝法(见图 3C)染色后杯状细胞的

数量,杯状细胞分泌黏液(PAS 染色阳性),对肠上皮有润滑和保护作用,PAS 染色和阿利新蓝染色均表现为 DSS 诱导的模型组杯状细胞数量较空白对照组显著降低($P < 0.01$),但经苦豆子总碱治疗后杯状细胞明显增多($P < 0.05$)(见图 3B、D)。

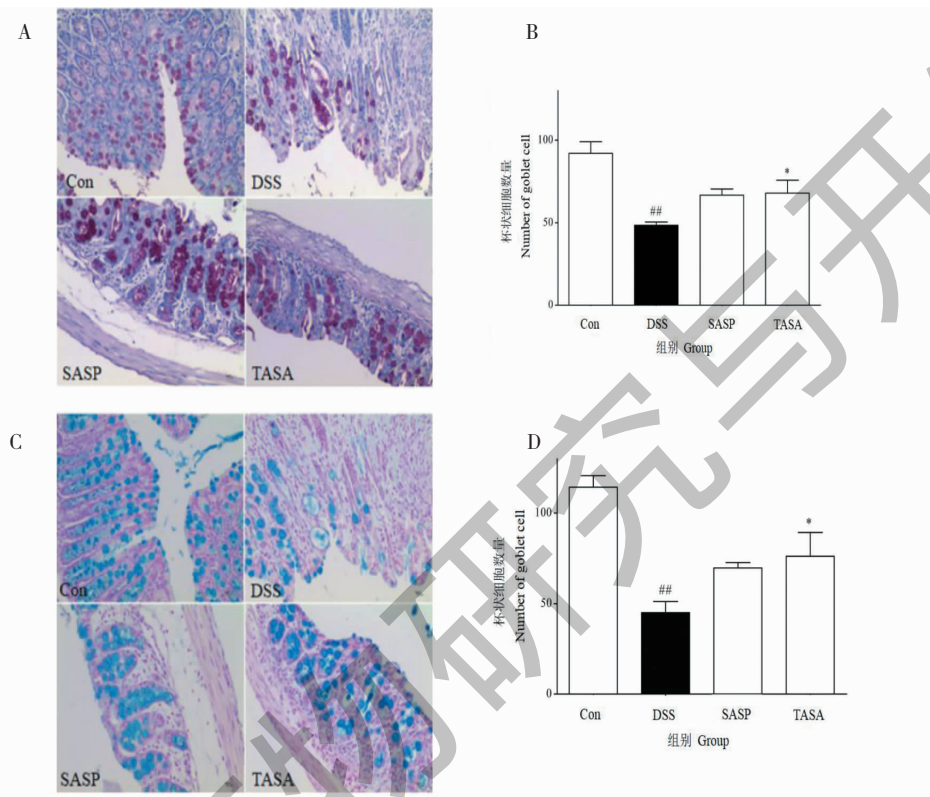


图3 苦豆子总碱对急性 UC 小鼠杯状细胞的影响(PAS 和阿利新蓝, $\times 400$)

Fig. 3 Effects of total alkaloid from *S. alopecuroides* on goblet cell in acute ulcerative colitis mice(PAS and Alcian blue, $\times 400$)

2.4 苦豆子总碱对急性 UC 小鼠结肠组织炎性细胞因子的影响

如图 4 所示,与空白对照组相比,DSS 诱导的模型组小鼠结肠中抗炎因子 IL-10 显著降低($P < 0.01$)(见图 4A),促炎因子 IL-23、IL-17、IL-1 β 显著升高($P < 0.01$)(见图 4B、D),表明 DSS 造模后小鼠体内有明显的炎症反应。与模型组相比,苦豆子总碱治疗组 IL-10 一定程度的升高,表明治疗后对抗炎因子有一定的正向调节作用,而苦豆子总碱治疗组 IL-23、IL-17、IL-1 β 显著降低($P < 0.01$),且苦豆子总碱治疗组的促炎因子降低较阳性对照组更明显,要优于阳性对照药物的效果。表明经苦豆子总碱治疗后能显著抑制促炎因子,对炎症的发生有明显的抑制作用。

2.5 苦豆子总碱对急性 UC 小鼠血清中总胆汁酸与总胆固醇含量的影响

如图 5 所示,与空白对照组相比,DSS 诱导的模型组小鼠血清中总胆汁酸含量显著升高($P < 0.01$),经苦豆子总碱和阳性对照药治疗后其含量都显著降低($P < 0.01$)(见图 5A),但苦豆子总碱治疗组治疗效果更优。与空白对照组相比,DSS 诱导的模型组小鼠血清中总胆固醇含量降低,但不具有统计学差异,而苦豆子总碱和阳性对照组胆固醇含量显著升高($P < 0.01$)(见图 5B)。

2.6 苦豆子总碱对急性 UC 小鼠肝脏组织和结肠组织相关蛋白表达的影响

如图 6 所示,与空白对照组相比,DSS 诱导的模型组小鼠肝组织中 FXR、TGR5、CYP7A1 蛋白的表

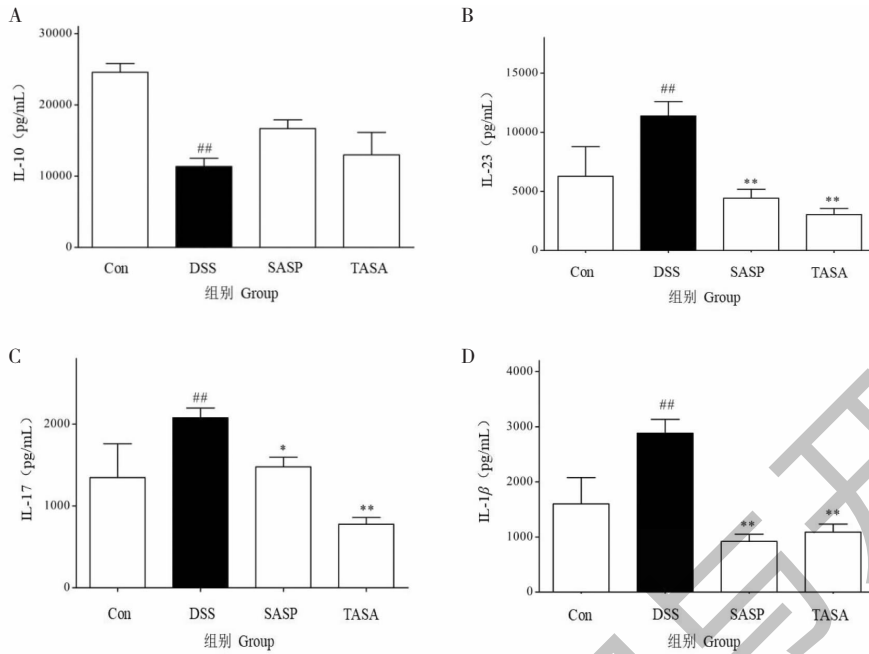


图4 苦豆子总碱对急性 UC 小鼠结肠组织炎症细胞因子的影响

Fig. 4 Effects of total alkaloid from *S. alopecuroides* on colon cytokines in UC mice

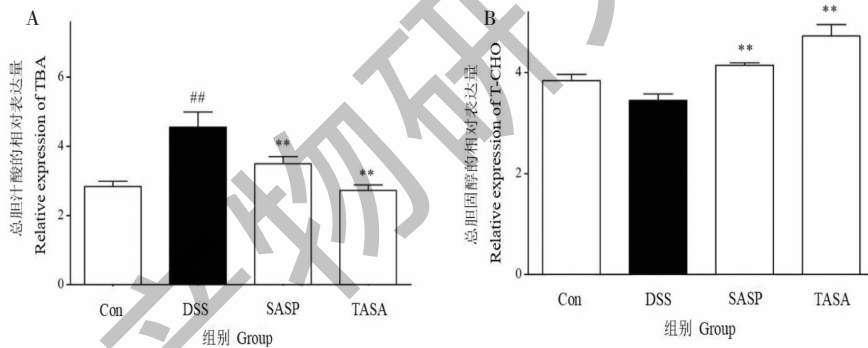


图5 苦豆子对急性 UC 小鼠血清中总胆汁酸与总胆固醇的影响

Fig. 5 Effects of total alkaloid from *S. alopecuroides* on serum TBA and T-CHO in UC mice

达量均显著降低($P < 0.01$);与 DSS 诱导的模型组相比,阳性对照组小鼠肝组织中 CYP7A1 显著升高($P < 0.01$),苦豆子总碱治疗组中 CYP7A1 变化无统计学意义,苦豆子总碱治疗组和阳性对照组小鼠肝组织中 FXR 和 TGR5 表达量有升高趋势,但无统计学意义(见图 6A~C)。

如图 7 所示,与空白对照组相比,DSS 诱导的模型组小鼠结肠组织中 FXR 和 CYP7A1 蛋白的表达量均显著降低($P < 0.01$),TGR5 蛋白的表达量变化无统计学意义;与 DSS 诱导的模型组相比,苦豆子总碱治疗组小鼠结肠组织中 FXR 显著升高($P < 0.05$),CYP7A1 和 TGR5 蛋白表达的变化虽有所升

高,但无统计学意义(见图 7A~C)。

2.7 FXR、TGR5、CYP7A1 蛋白表达与总胆汁酸、炎症因子的相关性分析结果

FXR、TGR5、CYP7A1 蛋白表达与总胆汁酸、炎症因子的相关性结果见表 3。由表 3 可知,结肠 FXR、CYP7A1 与总胆汁酸呈显著负相关($P < 0.05$),相关系数 $r = -0.459$,与 IL-10 呈极显著正相关($P < 0.01$), $r = 0.553$;结肠 TGR5 与 IL-1β、IL-23、IL-17 呈显著负相关($P < 0.05$), $r = -0.450$ 、 -0.509 、 -0.407 ;肝脏 FXR、TGR5、CYP7A1 与 IL-10 呈极显著正相关($P < 0.01$), $r = 0.616$ 、 0.700 、 0.591 。

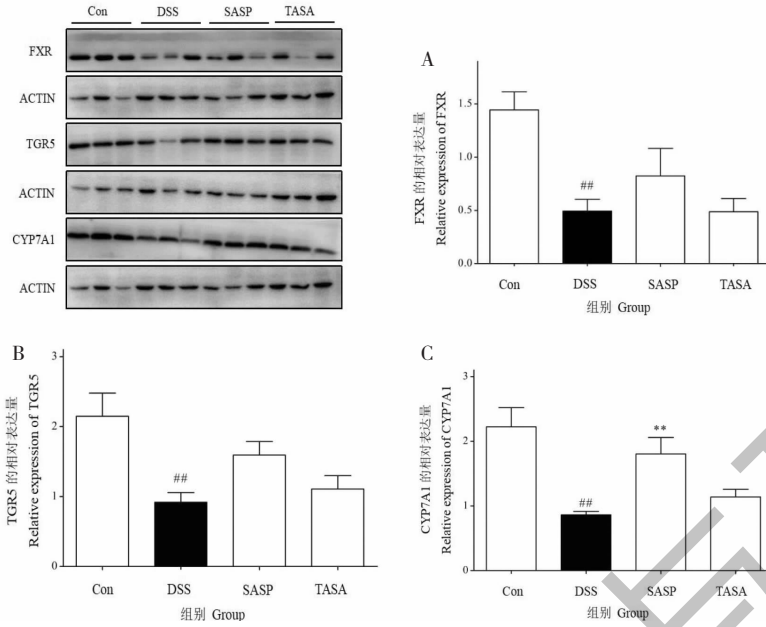


图 6 苦豆子总碱对急性 UC 小鼠肝脏组织相关蛋白表达的影响

Fig. 6 Effects of total alkaloid from *S. alopecuroides* on the expression of related proteins in liver of acute UC mice

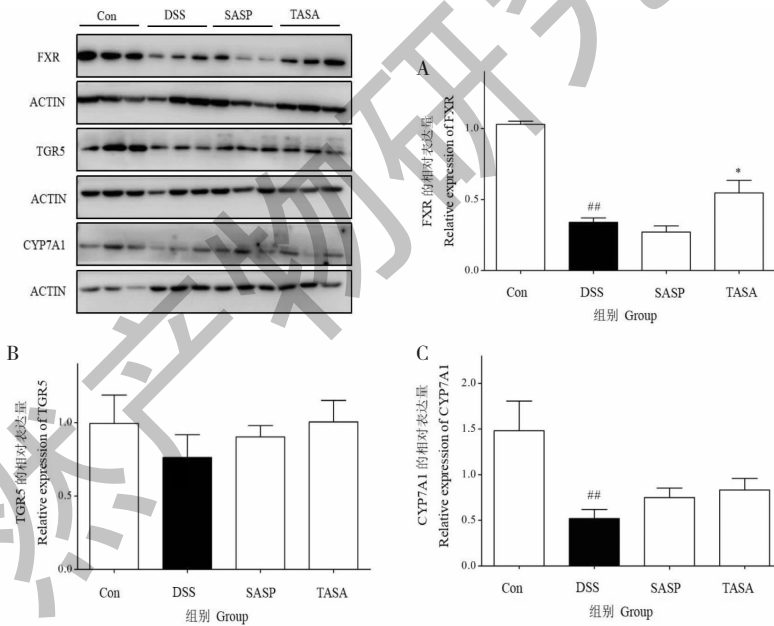


图 7 苦豆子总碱对急性 UC 小鼠结肠组织相关蛋白表达的影响

Fig. 7 Effects of total alkaloid from *S. alopecuroides* on the expression of related proteins in colon of acute UC mice

表 3 相关性分析结果

Table 3 The results of correlation analysis

维度 Dimension	结肠 Colon			肝脏 Liver		
	FXR	TGR5	CYP7A1	FXR	TGR5	CYP7A1
总胆汁酸 Total bile acid	-0.459 *	-0.321	-0.497 *	-0.385	-0.352	-0.357
IL-10	0.553 **	0.204	0.472 *	0.616 **	0.700 **	0.591 **

续表 3 (Continued Tab. 3)

维度 Dimension	结肠 Colon			肝脏 Liver		
	FXR	TGR5	CYP7A1	FXR	TGR5	CYP7A1
IL-1 β	-0.022	-0.450 *	-0.261	-0.004	0.033	-0.218
IL-23	-0.059	-0.509 *	-0.273	0.021	0.069	-0.075
IL-17	-0.088	-0.407 *	-0.365	-0.153	0.136	-0.280

注: * 在 0.05 级别(双尾),相关性显著; ** 在 0.01 级别(双尾)相关性显著。

Note: * Significant correlation at 0.05 level (double tail), ** Significant correlation at 0.01 level (double tail).

3 讨论与结论

溃疡性结肠炎 UC 是一种累及结肠及结肠黏膜的炎症性肠病,因其发病机制复杂,在肠道内蔓延区域广、容易反复发作、且无特效药、难以彻底治愈,被世界卫生组织列为现代难治病之一^[18]。

本研究采用 3.5% DSS 诱导急性 UC 小鼠模型,相比其他造模方法,该方法操作简单,易于复制,适用于药物疗效以及作用机制的研究^[19]。结果表明, DSS 诱导的模型组小鼠便血严重,小鼠体重下降, DAI 评分明显上升,结肠长度明显缩短,结肠组织病理学观察黏膜脱落,隐窝消失,以上指标表明本实验造模成功。经过苦豆子总碱治疗后,上述指标均得到不同程度的改善,表明苦豆子总碱对 DSS 诱导的急性 UC 小鼠模型有一定的治疗作用。

已有研究表明,在许多肠道炎症性疾病中,黏膜屏障功能的破坏,与大量细胞因子的释放而引起的杯状细胞和黏液层的损耗有关^[20,21],本实验采用 PAS 和阿利新蓝特殊染色法观察每组小鼠结肠杯状细胞,发现 DSS 诱导的模型组杯状细胞数量显著降低,苦豆子总碱治疗组数量明显增加。有文献报道,炎症反应具有促进 UC 发生发展的作用,其中 IL-17、IL-23、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等促炎因子水平明显升高,IL-10 等抗炎因子水平明显降低,导致促炎因子/抗炎因子失衡引起肠道炎症反应^[22]。本实验采用 ELISA 检测了细胞因子的含量,发现 DSS 诱导的模型组小鼠促炎因子 IL-23、IL-1 β 、IL-17 的含量均显著增加,苦豆子总碱治疗组显著降低;另外发现 DSS 诱导的模型组小鼠抗炎因子 IL-10 含量显著降低,苦豆子总碱治疗组有所提升。以上结果表明苦豆子总碱可以通过调节小鼠体内炎症因子以及杯状细胞的含量,进而起到抑制炎症的作用,进一步激活小鼠体内的抗炎机制,从而改善结肠炎症,达到治疗效果。为临床治疗 UC 提供一定的理论依据和方法,但炎症因子和杯状细胞如何改善肠道黏膜屏障功能有待进一步研究。

FXR、TGR5 高表达于肝脏和结肠组织,参与体内各项生理活动,在调节炎症、胆汁酸代谢、改善肠黏膜机械屏障、维持稳态等方面起着重要作用^[23]。李彦希等研究发现藏药二十五味松石丸对肝损伤的保护作用机制可能通过介导 FXR 信号通路,调控其下游基因及下游蛋白,抑制胆汁酸过量分泌及合成,使胆汁酸的代谢趋于稳态后改善胆汁淤积,而对胆汁酸的转化过程无影响^[23]。Wei 等^[24] 研究表明 FXR 在 UC 患者结肠黏膜中的表达明显下降,而 TGR5 表达无明显差异,这些研究结果与本研究结果相符。有研究表明肠过氧化物酶体增植物激活受体 (PPAR α)-UDP-葡萄糖醛酸转移酶 (UGTs) 信号是胆汁酸稳态的重要决定因素。而在肠炎患者中过氧化物酶体增植物激活受体 (PPAR α) 被激活,细胞内胆汁酸的减少导致 FXR-FGF15 通路被抑制,进一步导致肝脏 CYP7A1 的上调,从而促进从头开始的胆汁酸合成持续上升,打破了原有胆汁酸的稳态^[25]。FXR 可通过诱导小分子异源二聚体伴侣 (SHP) 抑制 CYP7A1 负反馈调节胆汁酸的合成^[26,27]。本实验检测了小鼠血清总胆固醇和总胆汁酸的含量,发现 DSS 诱导的模型组小鼠总胆汁酸含量显著升高,总胆固醇有所降低,苦豆子总碱治疗组总胆汁酸含量显著降低,总胆固醇含量显著升高。WB 结果表明, DSS 诱导的模型组小鼠肝脏和结肠组织 FXR、TGR5、CYP7A1 均显著下调,苦豆子总碱治疗组肝脏组织中 FXR、TGR5、CYP7A1 有所上调但不显著;结肠组织 FXR 显著上调, TGR5 和 CYP7A1 有所上调。以上结果提示 UC 小鼠体内 FXR、TGR5、CYP7A1 的下调明显加剧了炎症的发生与发展,而苦豆子总碱可以激活结肠内 FXR 表达,从而降低血清中总胆汁酸的含量,减轻由于胆汁酸堆积引起的炎症,减轻其炎症反应,对 UC 起到一定的治疗和保护作用。炎症因子的检测结果提示, FXR 也可能通过抑制促炎因子的表达减轻炎症反应。

FXR、TGR5、CYP7A1 蛋白表达与总胆汁酸、炎症因子的相关性分析发现,UC 小鼠结肠组织 FXR、CYP7A1 与总胆汁酸均呈负相关,而与 IL-10 均呈正相关,TGR5 与促炎因子 IL-23、IL-1 β 、IL-17 均呈负相关,提示苦豆子总碱通过激活结肠 FXR、TGR5、CYP7A1 治疗 UC 小鼠的同时其血清总胆汁酸含量和促炎因子含量降低,而抗炎因子 IL-10 含量升高,推测其可能通过促炎因子降低及抗炎因子 IL-10 的升高减轻炎症反应。与之前结果一致,进一步验证了苦豆子总碱治疗溃疡性结肠炎可能通过调控胆汁酸代谢途径改善炎症。此外,苦豆子总碱虽然对 TGR5 的激活有一定的上调作用但不明显,其也有可能起到抑制炎症的作用,有待进一步的研究。

本研究通过给予 BALB/c 小鼠 3.5% DSS 饮水使其连续自由饮用 7 天建立小鼠急性 UC 模型,评价并证实了苦豆子总碱能够减少 DSS 诱导的小鼠结肠炎的组织损伤及炎症症状。苦豆子总碱治疗后血清总胆汁酸含量下降,结肠 FXR、CYP7A1、TGR5 蛋白均有不同程度的上调。苦豆子总碱可能通过增加小鼠结肠杯状细胞和抑炎因子 IL-10 的含量,降低促炎因子 IL-23、IL-1 β 、IL-17 含量,以及激活 FXR/TGR5 通路相关蛋白的表达治疗小鼠溃疡性结肠炎。

参考文献

- Su YX, Guo R, Li GZ, et al. Advance progress on anti-inflammation and resource utilization of *Sophora alopecuroides*[J]. Chin Wild Plant Res(中国野生植物资源), 2020, 39(10): 67-73.
- Zhang JM, Zhu YB, Deng X, et al. Mechanism of sophocarpine in treating experimental colitis in mice[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2015, 40:3081-3087.
- Zhao YN, Li Y, Zhang Y, et al. Establishment of ulcerative colitis model in mice by different drug delivery methods of dextran sodium sulfate[J]. Lab Anim Comp Med(实验动物与比较医学), 2021, 41(1): 33-39.
- Ma KL, Han ZJ, Pan M, et al. Therapeutic effect of cinnamaldehyde on ulcerative colitis in mice induced by dextran sulfate sodium with *Candida albicans* colonization and its effect on dectin-1/TLRs/NF- κ B signaling pathway[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2020, 45:3211-3219.
- Huppertz-Hauss G, Hoivik ML, Jelsness-Jorgensen LP, et al. Fatigue in a population-based cohort of patients with inflammatory bowel disease 20 years after diagnosis: The IBSen study[J]. Scand J Gastroenterol, 2017, 52:351-358.
- Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, et al. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2008, 7:678-693.
- Yang ZJ, Zhu MJ, Wang FF, et al. Progress in understanding relationship between bile acid metabolic disorder and gut diseases[J]. World Chin J Digestol(世界华人消化杂志), 2019, 27(3):183-189.
- Hu JY. Research of the mechanism of Qing-Chang-Hua-Shi formula for ulcerative colitis treatment based on the host-microbiota metabolism of bile acids[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine(南京中医药大学), 2020.
- Jia YQ, Yuan ZW, Zhang XS, et al. Total alkaloids of *Sophora alopecuroides* L. ameliorated murine colitis by regulating bile acid metabolism and gut microbiota[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 255(3):112775.
- Fu XM, Yang C, Liu J, et al. The role of FXR in ulcerative colitis[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2019, 30:750-755.
- Lee F Y, Lee H, Hubbert M L, et al. FXR, a multipurpose nuclear receptor[J]. Trends Biochem Sci, 2006, 31(10):572-580.
- Ding LL, Yang L, Wang ZT, et al. Bile acid nuclear receptor FXR and digestive system diseases[J]. Acta Pharm Sin B, 2015, 5:135-144.
- Chen S, Wang B, Xu Y, et al. Preventive effects of chitoooligosaccharides on dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2020, 32:1295-1301.
- Miura K, Ohnishi H. Role of gut microbiota and Toll-like receptors in nonalcoholic fatty liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20:7381-7391.
- Li YX, Li XP, Gu J, et al. Study on protective mechanism of Tibetan medicine Ershiwuwei Songshi Pills on cholestatic liver injury in rats based on FXR signaling pathway[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2020, 45:5273-5279.
- Liu X, Li LZ, Guang WK, et al. Research progress on intestinal microflora mediated animal bile acid FXR/TGR5 signaling pathway[J]. Chin J Anim Sci(中国畜牧杂志), 2020, 56(12):13-19.
- Yuan ZW. Therapeutic effect and mechanism of Huang-lian-jie-du Decoction on acute ulcerative colitis in mice[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University(甘肃农业大学), 2020.
- Mahmoud TN, El-Maadawy WH, Kandil ZA, 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.
- 19 Sun AN, Ren GY, Deng C, et al. Effects and mechanisms of vitexin against ulcerative colitis in mice [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2014, 30:1677-1681.
- 20 Alipour M, Zaidi D, Valcheva R, et al. Mucosal barrier depletion and loss of bacterial diversity are primary abnormalities in paediatric ulcerative colitis [J]. *J Crohns Colitis*, 2016, 10:462-471.
- 21 Zhu CL, Mu JJ, Xu JW, et al. Repair effect of purple sweet potato anthocyanin on intestinal barrier injury in mice with ulcerative colitis induced by DSS [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2020, 36:1844-1853.
- 22 Li Y, Liu Y, Yan SG, et al. Effect of the classical three prescriptions for regulating intestinal function on cytokines as IL-17, IL-23, IL-6, IL-10 and TNF- α in colonic of ulcerative colitis rat [J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med* (现代中西医结合杂志), 2017, 26:920-924.
- 23 Vavassori P, Mencarelli A, Renga B, et al. The bile acid receptor FXR is a modulator of intestinal innate immunity [J]. *J Immunol*, 2009, 183:6251-6261.
- 24 Wei M, Cheng WF, Ping J, et al. Expressions of bile acid receptor FXR and TGR5 in patients with ulcerative colitis [J]. *Chin J Gastroenterol* (胃肠病学), 2017, 22:465-468.
- 25 Zhou X, Cao L, Jiang C, et al. PPAR α -UGT axis activation represses intestinal FXR-FGF15 feedback signalling and exacerbates experimental colitis. *Nat Commun*, 2014, 5:4573.
- 26 Lee YK, Schmidt DR, Cummins CL, et al. Liver receptor homolog-1 regulates bile acid homeostasis but is not essential for feedback regulation of bile acid synthesis [J]. *Mol Endocrinol*, 2008, 22:1345-1356.
- 27 Chen F, Ma L, Dawson PA, et al. Liver receptor homolog-1 mediates species- and cell line-specific bile acid-dependent negative feedback regulation of the apical sodium-dependent bile acid transporter [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278:19909-19916.

(上接第 1625 页)

- 49 Akiko S, et al. Increase of tumor infiltrating $\gamma\delta$ T-cells in pancreatic ductal adenocarcinoma through remodeling of the extracellular matrix by a hyaluronan synthesis suppressor, 4-methylumbelliferone [J]. *Pancreas*, 2019, 48:282-301.
- 50 Pibuel MA, et al. 4-Methylumbelliferone as a potent and selective anti-tumor drug on a glioblastoma model [J]. *Glycobiology*, 2020, 22:227-241.
- 51 McKallip R, et al. Treatment with the hyaluronic acid synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone suppresses LPS-induced lung inflammation [J]. *Inflammation*, 2015, 38:382-399.
- 52 McKallip R, et al. Treatment with the hyaluronic acid synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone suppresses SEB-induced lung inflammation [J]. *Toxins*, 2013, 5:422-436.
- 53 Li F, et al. Effects of 4-methylumbelliferone and high molecular weight hyaluronic acid on the inflammation of corneal stromal cells induced by LPS [J]. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2017, 255:1121-1136.
- 54 Andreichenko I, et al. 4-Methylumbelliferone prevents liver fibrosis by affecting hyaluronan deposition, FSTL1 expression and cell localization [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20:832-849.
- 55 Karry A, et al. Inhibition of IL-6 release *in vitro* by *in vivo* administration of an IKK inhibitor in mice with lung fibrosis induced by poly I; C [J]. *J Allergy Clin Immun*, 2017, 139:320-336.
- 56 Piccioni F, et al. 4-Methylumbelliferone inhibits hepatocellular carcinoma growth by decreasing IL-6 production and angiogenesis [J]. *Glycobiology*, 2015, 25:1055-1064.
- 57 Ban H, et al. Hyaluronic acid inhibitor 4-methylumbelliferone activates the intrinsic apoptosis pathway in K562 chronic myelogenous leukemia cells [J]. *Anticancer Res*, 2015, 35:145-150.
- 58 Rilla K, et al. The hyaluronan synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone prevents keratinocyte activation and epidermal hyperproliferation induced by epidermal growth factor [J]. *J Invest Derm*, 2004, 123:66-76.
- 59 Su ZC, et al. Enhancement of skin wound healing with decellularized scaffolds loaded with hyaluronic acid and epidermal growth factor [J]. *Mater Sci Eng*, 2014, 44:99-110.
- 60 McLaughlin JE, et al. Inhibition of hyaluronic acid synthesis decreases endometrial cell attachment, migration and invasion [J]. *Reprod Sci*, 2020, 27:110-123.
- 61 Yoon Y, et al. 4-Methylumbelliferone suppresses hyaluronan and adipogenesis in primary cultured orbital fibroblasts from Graves' orbitopathy [J]. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2020, 258:223-238.
- 62 Terabe K, et al. Chondroprotective effects of 4-methylumbelliferone and hyaluronan synthase-2 overexpression involve changes in chondrocyte energy metabolism [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294:1102-1115.