

# 基于 PPAR $\gamma$ /AMPK/NF- $\kappa$ B 信号通路研究对羟基苯甲醛对 TNBS 诱导的小鼠克罗恩病的治疗作用

许晓飞, 罗爱林, 徐笑天, 卢曦, 王宇晖\*, 段小群\*

桂林医学院药学院, 桂林 541199

**摘要:** 研究对羟基苯甲醛(*p*-hydroxybenzaldehyde, HD)对小鼠实验性克罗恩病(Crohn's disease, CD)的治疗作用及其作用机制。用50%的乙醇溶液(含有2.5 mg的TNBS)灌肠制备小鼠CD模型和10 ng/mL的TNF- $\alpha$ 诱导Caco-2细胞炎症模型;每天观察小鼠体重变化、疾病活动指数(DAI);给药7天后,处死小鼠,并测量结肠长度;利用H&E染色观察结肠组织形态;利用髓过氧化物酶(MPO)试剂盒测定结肠组织中MPO活性;利用ELISA试剂盒和qPCR测定结肠和Caco-2细胞中促炎因子(IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ )的蛋白质和mRNA表达水平;另外还通过Western blot法检测结肠和Caco-2细胞中p-NF- $\kappa$ B p65、p-AMPK和PPAR $\gamma$ 蛋白质表达水平。结果表明,与对照组比较,模型组小鼠出现明显的体重下降、腹泻和血便,说明造模成功;与模型组比较,HD高剂量组(40 mg/kg)和中剂量组(20 mg/kg)均能显著增加CD小鼠体重、降低小鼠DAI评分,改善结肠组织形态,降低结肠组织中MPO活力,其中HD(40 mg/kg)的作用效果最强;HD在蛋白质和mRNA水平上显著抑制CD小鼠肠道和Caco-2细胞中促炎因子(IL-6和TNF- $\alpha$ )的过表达,但对IL-1 $\beta$ 的表达无影响;另外,HD抑制p-NF- $\kappa$ B p65蛋白表达的同时还可以促进p-AMPK和PPAR $\gamma$ 的蛋白表达,且呈剂量依赖性。HD对克罗恩病具有改善作用且以40 mg/kg剂量组和30  $\mu$ mol/L浓度组为最佳,其机制可能与激活PPAR $\gamma$ /AMPK信号通路和抑制NF- $\kappa$ B信号通路从而调控促炎因子的释放有关。

**关键词:** 对羟基苯甲醛; 克罗恩病; 细胞核内转录因子- $\kappa$ B; AMP依赖的蛋白激酶; 过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$   
**中图分类号:** R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-6880(2022)6-0925-10  
**DOI:** 10.16333/j.1001-6880.2022.6.003

## Study on the therapeutic effect of *p*-hydroxybenzaldehyde on TNBS-induced Crohn's disease in mice based on PPAR $\gamma$ /AMPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway

XU Xiao-fei, LUO Ai-lin, XU Xiao-tian, LU Xi, WANG Yu-hui\*, DUAN Xiao-qun\*

School of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541199, China

**Abstract:** To investigate the therapeutic effect of *p*-hydroxybenzaldehyde (HD) on experimental Crohn's disease (CD) in mice and its mechanism of action. After anesthesia, mice were intrarectally perfused with 50% ethanol solution (containing 2.5 mg of TNBS) to prepare a CD model and 10 ng/mL TNF- $\alpha$ -induced Caco-2 cell inflammation model; mice were observed daily for weight change and disease activity index (DAI); after administration for 7 days, mice were executed and the length of the colon was measured; colon tissue morphology was observed using H&E; MPO activity in colon tissue was measured using myeloperoxidase (MPO) kit; The protein and mRNA expression levels of pro-inflammatory factors (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) in colon and Caco-2 cells were determined by ELISA kit and qPCR; In addition, the protein expression levels of p-NF- $\kappa$ B p65, p-AMPK and PPAR $\gamma$  in the colon and Caco-2 cells were detected by Western blot. The results showed that, compared with control group, mice in model group showed significant weight loss, diarrhea and blood in the stools, indicating successful modeling; Compared with model group, both HD high-dose group (40 mg/kg) and medium-dose (20 mg/kg) significantly increased the body weight, decreased the DAI score, improved the morphology of colonic tissue and decreased the MPO vitality in colonic tissue of CD mice, among which HD (40 mg/kg) had the strongest effect; HD significantly inhibited the overex-

pression of pro-inflammatory factors (IL-6 and TNF- $\alpha$ ) in the intestine of CD mice and Caco-2 cells at the protein and mRNA levels. In addition, HD inhibited p-NF- $\kappa$ B p65 protein expression and promoted p-AMPK and PPAR $\gamma$  protein expression in a dose-dependent manner. HD had an ameliorative effect on enteritis and was best in the 40 mg/kg dose group and 30  $\mu$ mol/L concentrate group. The mechanism may be related to the activation of PPAR $\gamma$ /AMPK signaling pathway and the inhibition of NF- $\kappa$ B signaling pathway to regulate the release of pro-inflammatory factors.

**Key words:** *p*-hydroxybenzaldehyde; Crohn's disease; nuclear transcription factor- $\kappa$ B; AMP-dependent protein kinase; peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$

克罗恩病 (Crohn's disease, CD) 是一种慢性复发性胃肠道疾病, 是炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 的主要疾病之一, 其发病通常以腹泻、腹痛、直肠出血、发烧、体重减轻和疲劳等常见症状为特征<sup>[1]</sup>。在 CD 中, 炎症通过肠壁从黏膜延伸到浆膜, 这种疾病持续复发和缓解, 随着多次复发, CD 可以从最初的轻度至中度炎症发展为严重的穿透性 (瘻管形成) 或狭窄性疾病, 更严重者会导致癌变, 严重影响患者的生活质量<sup>[2]</sup>。另外, CD 患者还表现出许多肠外炎症, 如眼睛、肝脏、皮肤和关节中等炎症反应, 反映了这种疾病的全身性<sup>[3]</sup>。CD 的治疗包括一线治疗和其他治疗, 其中一线治疗包括类固醇、抗肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), 可快速缓解症状。其他治疗可能包括针对 IL-12/23 或整联蛋白  $\alpha 4\beta 7$  的单克隆抗体、免疫调节剂、联合疗法或手术<sup>[4]</sup>。然而, 这些药物的统一机制是免疫抑制, 长期使用会导致患者感染风险增加, 除此之外还伴随其他严重的副作用, 包括骨髓抑制、骨质疏松症和肝损伤<sup>[5]</sup>。因此, 迫切需要开发来自自然资源和功能性食品的替代药物来治疗 CD。

雷公菌 (*Nostoc commune*) 是一种蓝藻生物, 由于其营养全面丰富, 经常被用于预防和治疗疾病。近年来, 其提取物已被证明对肠道疾病有效<sup>[6]</sup>。我们在前期研究中发现, 雷公菌的主要活性成分对羟基苯甲醛 (*p*-hydroxybenzaldehyde, HD) 能通过抑制肠道炎症反应改善溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 疾病症状<sup>[7]</sup>。基于 UC 与 CD 的诸多相似性, 我们推测 HD 也许会有抗 CD 作用, 为了验证此假设, 我们使用 2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBS) 诱导建立小鼠 CD 模型和 TNF- $\alpha$  诱导的 Caco-2 细胞炎症模型, 探究 HD 对 CD 的保护作用及机制, 为富含 HD 的食物作为防治 IBD 的补充替代治疗提供科学依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 仪器

2-16KL 低温高速离心机 (Sigma-aldrich 公司); 80-2C 室温低速离心机 (常州市凯航仪器有限公

司); DSZ5000X 荧光倒置显微镜 (重庆澳浦光电技术有限公司); EPS 300 蛋白电泳、转膜系统 (北京原平皓生物技术有限公司); iMark 酶标仪、CFX Opus 96 PCR 仪 (Bio Rad 公司); ES-J120 分析天平 (天津市德安特传感技术有限公司); Tanon 6600 全自动化学发光图像分析检测系统 (上海天能科技有限公司); NanoDrop 2 000 分光光度计 (赛默飞世尔科技公司)。

### 1.2 药物与试剂

HD ( $C_7H_6O_2$ , 分子量为 122.12, 纯度  $\geq 98\%$ , 上海源叶生物科技有限公司, Lot:123-08-0); 柳氮磺胺吡啶 (SASP, 上海源叶生物科技有限公司, Lot:1346606-50-5); TNBS ( $C_6H_3N_3O_9S$ , 分子量为 293.17, 纯度  $\geq 5.0\%$  (w/v) 水溶液, 西亚化学科技有限公司, Lot:23407-1); TNF- $\alpha$ 、白介素 6 (IL-6)、白介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (武汉新启迪生物科技有限公司, Lot:06460、05884、05874); 髓过氧化物酶 (MPO) 活性测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所, Lot:044-1-1); Caco-2 细胞 (美国典型培养物保藏中心); 胎牛血清 (北京同立海源生物科技有限公司, Lot:07133)、DMEM (Gibco 公司, 8118251); 重组刺激因子 TNF- $\alpha$  (R&D Systems 公司, Lot:10291); anti-PPAR $\gamma$ 、anti-p-AMPK、anti-AMPK、anti-NF- $\kappa$ B p65、anti-p-NF- $\kappa$ B p65 和 anti- $\beta$ -actin (Bioworld 公司, Lot:4444、4457、1009、1256、4137、6007); RIPA 裂解液、5  $\times$  SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天生物技术有限公司, Lot:0013、0015、0012); Super ECL Plus 超敏发光液、Hi-script RT Super Mix 和 Ace Q-PCR SYBR Green Master Mix (南京诺唯赞生物科技股份有限公司, Lot:412-01、123-01、131-02)。

### 1.3 动物

本实验的所有程序均经过桂林医学院动物伦理委员会的严格审核和批准, 动物协议批准文号为 GLMC201904008。36 只 SPF 级健康雄性 Balb/c 小鼠, 7 周龄, 体重  $20 \pm 2$  g, 由湖南斯莱克景达实验动

物有限公司提供,许可证号:SCXK(湘)2016-0002。所有小鼠均在标准条件下(温度:22~25℃;湿度:45%~50%;12~12 h 光/暗循环),自由采食标准饲料和水。

## 1.4 方法

### 1.4.1 动物造模、分组及处理

根据我们前期研究发现剂量为 40 mg/kg 的 HD 可以显著改善小鼠 UC<sup>[7]</sup>,基于 CD 与 UC 具有一定的相似度,我们在 TNBS 诱导的小鼠 CD 模型上使用 40 mg/kg 的 HD 进行预实验,发现 HD 可以显著改善小鼠 CD,因此选择 40 mg/kg 作为高剂量组,并将剂量以倍数减少的方式分别选择 20 mg/kg 和 10 mg/kg 作为中剂量和低剂量。适应性喂养一周后,将小鼠随机分组正常组(N)、模型组(M)、HD 高剂量组(HD-H,40 mg/kg)、HD 中剂量组(HD-M,20 mg/kg)、HD 低剂量组(HD-L,10 mg/kg)和柳氮磺胺吡啶组(SASP,300 mg/kg),每组 6 只。如前所述<sup>[8]</sup>,使用 TNBS(250 mg/kg)诱导 CD 小鼠模型。

除正常组外,其余各组小鼠实验前均禁食不禁水 24 h,实验当天灌肠前挤出小鼠粪便,进一步排空,随后用戊巴比妥钠麻醉小鼠。将灌肠管连接在注射器上,用棉签蘸取花生油,涂抹在灌肠管上;将灌肠管从小鼠肛门插入 3.5 cm,之后缓缓注入 100  $\mu$ L 含有 2.5% TNBS 的 50% 乙醇溶液,同时向外拔出灌肠管,灌肠后将小鼠尾巴用胶带纸粘在桌边,保持倒吊状态 4 min,确保肛门无滴液后放回鼠笼。小鼠给予 TNBS 1 次后,SASP 组与 HD 组小鼠在模型组的基础上每天灌胃给予相应的治疗药物(0.1 mL/10 g),共给药 7 天。正常组和模型组小鼠给予水作为对照。第 7 天,给药 4 h 后,用戊巴比妥钠麻醉小鼠后,收集小鼠距离肛门边缘 3 cm 处的长度大约为 1 cm 的结肠组织。

### 1.4.2 疾病活动性指数(DAI)评分

每天记录小鼠体重变化、大便稠度及粪便隐血情况。DAI 评分为(体重减轻 + 大便稠度 + 大便隐血)/3<sup>[9]</sup>。评分见表 1。

表 1 DAI 评分表( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 1 DAI score sheet( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

分数 Score	体重减轻 Weight loss (%)	粪便性状 Stool trait	隐血情况 Occult blood condition
0	正常	正常	正常
1	1~5	介于两者之间	-
2	5~10	糊状便	隐血阳性
3	11~15	介于两者之间	-
4	>15	腹泻	肉眼可见出血

### 1.4.3 结肠组织病理观察

第 7 天处死所有小鼠,取出结肠,量取长度,纵向打开,用 PBS 冲洗干净。取部分结肠用 4% 多聚甲醛固定 24 h,经过脱水、石蜡包埋、切片(5  $\mu$ m)、苏木精-伊红染色(H&E),使用显微镜观察组织病变情况并拍照。并根据杯状细胞耗竭(存在=1,不存在=0)、隐窝脓肿(存在=1,不存在=0)、黏膜结构破坏(正常=1,中度=2,广泛=3)、肌肉增厚(正常=1,中度=2,广泛=3)和细胞浸润(正常=1,中度=2,透壁=3)<sup>[10]</sup>情况来量化结肠组织的损伤程度。

### 1.4.4 ELISA 检测结肠组织和细胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 蛋白表达

将结肠组织剪碎后,以 PBS 作为匀浆液将结肠

组织置于研磨管中充分研磨,制备结肠组织匀浆,在 4℃、12 000 r/min 条件下离心 10 min,分离上清,按照 ELISA 试剂盒说明书检测小鼠结肠组织匀浆上清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  的蛋白表达水平。另外,采用 10 ng/mL 的 TNF- $\alpha$  诱导 Caco-2 细胞模型进一步研究 HD 的抗克罗恩病作用。实验分为对照组(C,无 HD 和 TNF- $\alpha$ )、模型组(M,添加 10 ng/mL 的 TNF- $\alpha$ )、HD 低浓度组(HD-L,添加 10 ng/mL 的 TNF- $\alpha$  和 3  $\mu$ mol/L 的 HD)、HD 中浓度组(HD-M,添加 10 ng/mL 的 TNF- $\alpha$  和 10  $\mu$ mol/L 的 HD)、HD 高浓度组(HD-H,添加 10 ng/mL 的 TNF- $\alpha$  和 30  $\mu$ mol/L 的 HD)和柳氮磺胺吡啶组(SASP,添加 10 ng/mL 的 TNF- $\alpha$  和 30  $\mu$ mol/L 的 SASP)。化合物处理细胞 24 h 后,收集各组培养基并根据 ELISA 试剂

盒说明书检测细胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  的蛋白表达水平。

#### 1.4.5 结肠组织 MPO 活性检测

收集结肠组织,称重、剪碎匀浆后,按照试剂盒说明书操作,检测结肠组织中的 MPO 活性,该试剂盒以每克湿组织的重量为单位。

#### 1.4.6 小鼠结肠和 Caco-2 细胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$ 的 mRNA 表达

采用 Trizol 试剂从结肠组织和 Caco-2 细胞中提

取总 RNA。使用 Nano Drop 2000 分光光度计量化总 RNA。随后,用 Hi-script RT Super Mix 将 RNA 转录为 cDNA。以 cDNA 为模板,在 95  $^{\circ}\text{C}$ , 10 s 和 60  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s 的条件下,用 Ace Q-PCR SYBR Green Master Mix 和 MyiQ2 检测系统检测 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  的 mRNA 表达,共 40 个循环。目的基因的表达以 GAPDH 作为内参,数据分析使用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  方式计算,平行三次实验。引物序列及长度见表 2。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'→3')	引物大小 Primer size (bp)
Mouse TNF- $\alpha$	F:GAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCATG R:CTGGAGGCTGAACCCCGTCC	88
Mouse IL-6	F:ACTTTTCCCCCTAGTGTGTCTTGC R:TGTGCAATGTGACGTCTTTAGCAT	94
Mouse IL-1 $\beta$	F:TGCTCCACATTTTCAGAACCTATCTTCTT R:CATAAGCCTCGTTATCCCATGTGTC	105
Mouse GAPDH	F:AGGTCGGTGTGAACGGATTTG R:TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	123
Human TNF- $\alpha$	F:GTAGCCCATGTTGTAGCAAACC R:TATCTCTCAGCTCCACGCCA	100
Human IL-6	F:CCTTCTCCACAAGCGCCTTC R:TCTTCTCTGGGGTACTGG	97
Human IL-1 $\beta$	F:AGGCATGCCAGAAGTACCTG R:CCTGGAAGGAGCACTTCATCT	116
Human GAPDH	F:AATGGCCAGCCGTTAGGAAA R:GCCCAATACGACCAATCAGAG	166

#### 1.4.7 小鼠结肠中 PPAR $\gamma$ /AMPK/NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白表达

结肠组织用 PBS 清洗后,用滤纸吸干水分,准确称量 40 mg 样品,使用含有 PMSF 的 RIPA 裂解液提取组织和 Caco-2 细胞总蛋白。根据制造商的方案,使用 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白总浓度。制备 10% 的电泳凝胶,将等量蛋白样品加到凝胶中,然后通过 80 V, 30 min 和 120 V, 50 min 的电泳条件进行蛋白分离。根据目标蛋白的分子量,将所需蛋白转移到 PVDF 膜上。然后在添加 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液中室温封闭膜 2 h。随后, PVDF 膜与一抗在 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下孵育过夜。次日,用 TBST 缓冲液冲洗后,室温下用二抗避光孵育 1.5 h。通过 ECL

系统检测免疫反应性蛋白质,用全自动化学发光图像分析检测系统下收集图片。 $\beta$ -actin 用作蛋白标准化对照。最后,通过 Quantity One 软件量化条带中的蛋白质强度。

#### 1.4.8 统计分析

采用统计软件进行数据分析,数据以至少 3 个独立实验的均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。使用单因素方差分析和 Tukey 的事后检验来评估数据的重要性。 $P$  值  $< 0.05$ , 差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HD 对 TNBS 诱导的 CD 小鼠体重、腹泻、隐血和结肠长度的影响

为了确定 HD 是否具有改善 TNBS 诱导的小鼠

克罗恩病疾病症状的作用,我们对克罗恩病小鼠灌胃 HD 治疗 7 天,并以 SASP 为阳性药物。结果如图 1 所示,与正常组相比,使用 TNBS 可以导致小鼠体重出现明显减轻、严重的腹泻和血便,说明建模成功。然而给予 HD 干预后,大大阻止小鼠体重降低

(见图 1A)、DAI 评分升高(见图 1B)以及结肠缩短(见图 1C)。同时研究发现,HD(40 mg/kg)的作用优于 SASP(100 mg/kg),说明 HD 具有改善 CD 小鼠结肠疾病症状的作用。

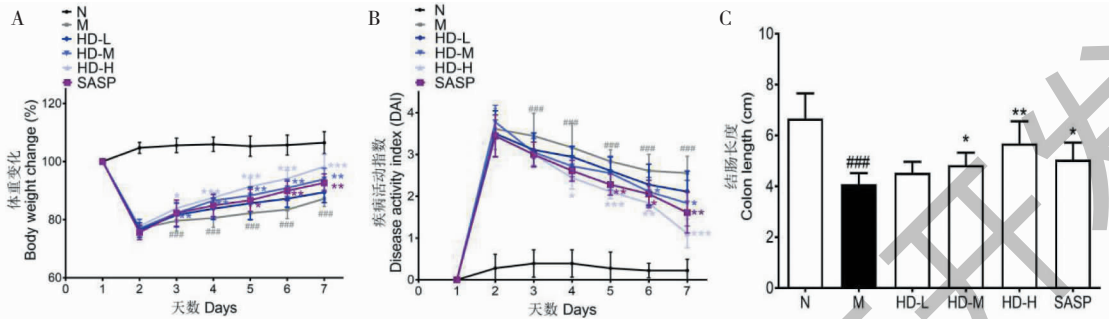


图 1 HD 对 TNBS 诱导的 CD 小鼠体重、腹泻、潜血和结肠长度的影响

Fig. 1 Effect of HD on body weight, diarrhea, occult blood and colonic length in TNBS-induced CD mice

注:与正常组比较,### $P < 0.001$ ;与模型组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ 。下同。Note:Compared with normal group,### $P < 0.001$ ;Compared with model group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ . The same below.

## 2.2 各组小鼠结肠组织形态学变化

为了研究 HD 对各组小鼠结肠组织形态学变化的影响,显微镜下观察各组小鼠结肠组织形态学,结果如图 2 所示,正常组小鼠结肠表现为黏膜和杯状细胞形态正常,未见炎性细胞浸润与溃疡。模型组小鼠结肠组织黏膜上皮出现缺失,大量杯状细胞被破坏,黏膜下层明显增厚水肿,血管增生,黏膜层及

黏膜下层可见较多的炎症细胞浸润,另外淋巴组织增生,黏膜层有裂隙状溃疡形成,并且部分溃疡可深达肠壁肌层。然而,HD 组发现小鼠的黏膜上皮较为完整,少见炎性细胞浸润,杯状细胞多数表现为完整,腺体排列较为规则,黏膜下层增厚减轻,组织水肿减少。以上说明 HD 具有改善小鼠结肠病理情况。

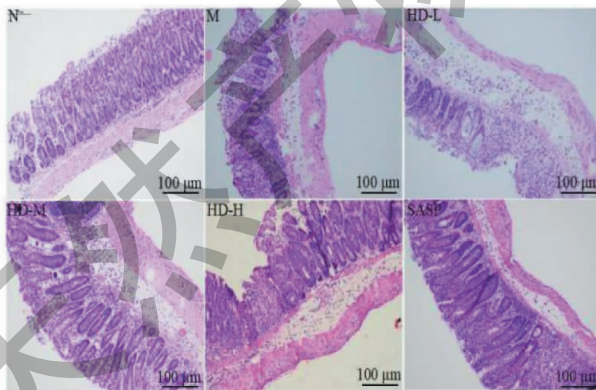


图 2 HD 对各组小鼠结肠组织形态学变化的影响( $\times 200$ )

Fig. 2 Effect of HD on histomorphology changes in the colon of various groups of mice ( $\times 200$ )

## 2.3 HD 对结肠炎症反应的影响

为了证明促炎因子在克罗恩病的炎症反应中发挥重要作用,我们研究了促炎因子在 TNBS 诱导的小鼠 CD 中的表达。如表 3 和 4 所示,相对于对照组,TNBS 增加了结肠中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  蛋白质和 mRNA 的表达。HD 干预后,显著抑制 TNF- $\alpha$

和 IL-6 蛋白质和 mRNA 的表达,且呈剂量依赖性,然而不影响 IL-1 $\beta$  的表达。研究还发现,HD(40 mg/kg)几乎可以使 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达恢复到正常水平。另外,体外实验也进一步证明了 HD 的抗结肠炎症作用。以上表明,HD 的抗 CD 作用与其抑制促炎因子的表达密切相关。

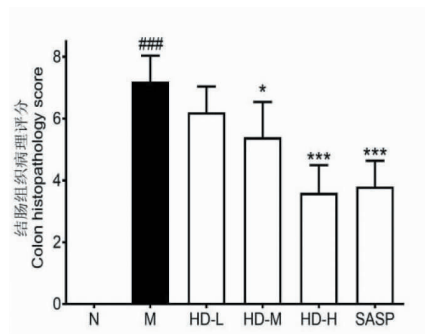


表3 HD对TNBS诱导的CD小鼠结肠组织中促炎因子mRNA表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=4$ )Table 3 Effect of HD on the mRNA expression of pro-inflammatory factors in colon tissue of TNBS-induced CD mice( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

分组 Group	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-1 $\beta$ (pg/mL)
N	1.1 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.1
M	6.1 $\pm$ 0.4 <sup>###</sup>	8.5 $\pm$ 0.7 <sup>###</sup>	11.7 $\pm$ 1.3 <sup>###</sup>
HD-L	5.9 $\pm$ 0.6	7.6 $\pm$ 0.9	11.2 $\pm$ 1.4
HD-M	5.2 $\pm$ 0.3 <sup>*</sup>	7.0 $\pm$ 0.7 <sup>*</sup>	11.3 $\pm$ 1.8
HD-H	3.4 $\pm$ 0.5 <sup>***</sup>	5.0 $\pm$ 0.7 <sup>***</sup>	10.2 $\pm$ 0.8
SASP	4.49 $\pm$ 0.68 <sup>**</sup>	6.05 $\pm$ 0.48 <sup>***</sup>	8.85 $\pm$ 0.47 <sup>**</sup>

注:与正常组比较,<sup>###</sup> $P < 0.001$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ,<sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ 。下同。

Note:Compared with normal group,<sup>###</sup> $P < 0.001$ ;Compared with model group,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ,<sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ . The same below.

表4 HD对TNBS诱导的CD小鼠结肠组织中促炎因子蛋白质表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=4$ )Table 4 Effect of HD on the protein expression of pro-inflammatory factors in colon tissue of TNBS-induced CD mice( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

分组 Group	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-1 $\beta$ (pg/mL)
N	34.8 $\pm$ 4.2	72.0 $\pm$ 8.5	42.5 $\pm$ 7.2
M	113.9 $\pm$ 9.9 <sup>###</sup>	182.5 $\pm$ 9.9 <sup>###</sup>	162.5 $\pm$ 9.4 <sup>###</sup>
HD-L	96.2 $\pm$ 7.8	175.5 $\pm$ 6.4	163.7 $\pm$ 9.2
HD-M	77.2 $\pm$ 6.2 <sup>*</sup>	161.0 $\pm$ 8.1 <sup>*</sup>	158.5 $\pm$ 9.8
HD-H	56.2 $\pm$ 4.6 <sup>***</sup>	106.7 $\pm$ 10.5 <sup>***</sup>	151.0 $\pm$ 10.8
SASP	76.4 $\pm$ 6.9 <sup>*</sup>	158.8 $\pm$ 9.7 <sup>*</sup>	134.0 $\pm$ 8.2 <sup>**</sup>

表5 HD对TNF- $\alpha$ 诱导的Caco-2细胞炎症模型中促炎因子mRNA表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=4$ )Table 5 Effect of HD on the mRNA expression of pro-inflammatory factors in TNF- $\alpha$ -induced Caco-2 cells( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

分组 Group	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-1 $\beta$ (pg/mL)
C	1.0 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.4
M	5.7 $\pm$ 1.0 <sup>###</sup>	7.8 $\pm$ 1.1 <sup>###</sup>	10.0 $\pm$ 1.0 <sup>###</sup>
HD-L	5.1 $\pm$ 0.6	7.3 $\pm$ 0.9	9.8 $\pm$ 0.6
HD-M	4.2 $\pm$ 0.6 <sup>*</sup>	5.5 $\pm$ 0.9 <sup>*</sup>	7.3 $\pm$ 1.3
HD-H	3.1 $\pm$ 0.6 <sup>**</sup>	4.7 $\pm$ 0.9 <sup>**</sup>	9.2 $\pm$ 0.8
SASP	4.0 $\pm$ 0.6 <sup>**</sup>	5.8 $\pm$ 0.9 <sup>**</sup>	7.6 $\pm$ 0.7 <sup>**</sup>

表6 HD对TNF- $\alpha$ 诱导的Caco-2细胞炎症模型中促炎因子(TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ )蛋白质表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=4$ )Table 6 Effects of HD on the protein expression of pro-inflammatory factors (TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ ) in TNF- $\alpha$ -induced Caco-2 cells( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

分组 Group	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-1 $\beta$ (pg/mL)
C	29.7 $\pm$ 6.5	59.5 $\pm$ 9.4	32.7 $\pm$ 9.2

续表 6 (Continued Tab. 6)

分组 Group	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-1 $\beta$ (pg/mL)
M	92.5 $\pm$ 7.7 <sup>###</sup>	152.5 $\pm$ 10.7 <sup>###</sup>	124.9 $\pm$ 8.9 <sup>###</sup>
HD-L	86.2 $\pm$ 7.8	143.0 $\pm$ 11.9	116.2 $\pm$ 9.7
HD-M	72.5 $\pm$ 8.4 <sup>*</sup>	132.3 $\pm$ 10.5 <sup>*</sup>	117.3 $\pm$ 9.6
HD-H	51.2 $\pm$ 7.4 <sup>**</sup>	96.8 $\pm$ 10.4 <sup>** **</sup>	109.5 $\pm$ 9.2
SASP	66.5 $\pm$ 7.4 <sup>**</sup>	123.8 $\pm$ 9.8 <sup>**</sup>	101.5 $\pm$ 8.1 <sup>**</sup>

## 2.4 HD 对 TNBS 诱导的 CD 小鼠结肠 MPO 活性的影响

MPO 是由中性粒细胞嗜酸性颗粒表达的一种血液蛋白,通常被用作中性粒细胞的标记物。为了探究 HD 对 CD 小鼠结肠 MPO 含量表达的影响,通过试剂盒检测小鼠结肠中 MPO 的表达水平。结果发现,与正常组相比,TNBS 处理导致小鼠结肠 MPO 活性升高( $P < 0.01$ )。而 HD 干预后,可以显著抑制 MPO 的活力,且呈剂量依赖性。HD(40 mg/kg)抑制 MPO 作用优于 SASP(见图 3)。以上说明 HD 可以抑制中性粒细胞在 CD 小鼠结肠的浸润。

## 2.5 HD 对 PPAR $\gamma$ /AMPK/NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白表达的影响

为了检测 HD 是否通过 PPAR $\gamma$ /AMPK/NF- $\kappa$ B 信号通路改善小鼠克罗恩病,通过蛋白免疫印迹法检测小鼠结肠中 PPAR $\gamma$ /AMPK/NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白表达。结果发现(见图 4),与正常组相比,模型组小鼠结肠组织中 PPAR $\gamma$ 、p-AMPK 蛋白表达水平显著降低( $P < 0.01$ ),p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平

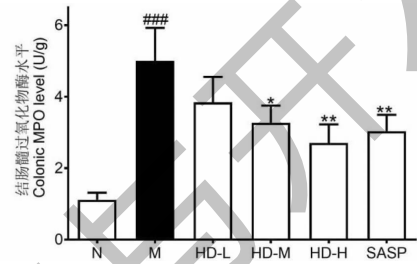


图 3 HD 对 TNBS 诱导的 CD 小鼠结肠 MPO 活性的影响  
Fig. 3 Effect of HD on colonic MPO activity in TNBS-induced CD mice

显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组相比,SASP 和 HD 均可以使结肠组织中 PPAR $\gamma$ 、p-AMPK 蛋白表达水平显著升高( $P < 0.01$ ),p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平显著降低( $P < 0.01$ ),其中对 HD(40 mg/kg)效果最佳。另外,在 TNF- $\alpha$  诱导的 Caco-2 细胞炎症模型中发现,HD 对 PPAR $\gamma$ /AMPK/NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白表达的影响与动物实验结果相一致(见图 5)。以上结果表明,HD 通过激活 PPAR $\gamma$  促进 AMPK 磷酸化抑制 NF- $\kappa$ B 活化,进而改善小鼠 CD 症状。

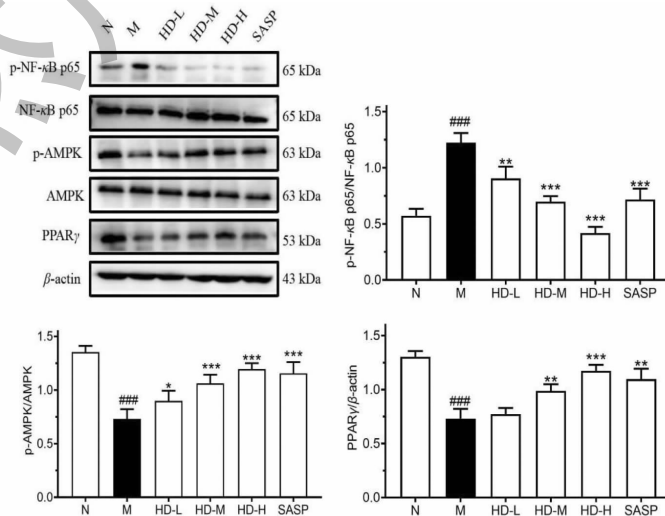


图 4 HD 对结肠中 PPAR $\gamma$ /AMPK/NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of HD on the expression of proteins related to the PPAR $\gamma$ /AMPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway in colon

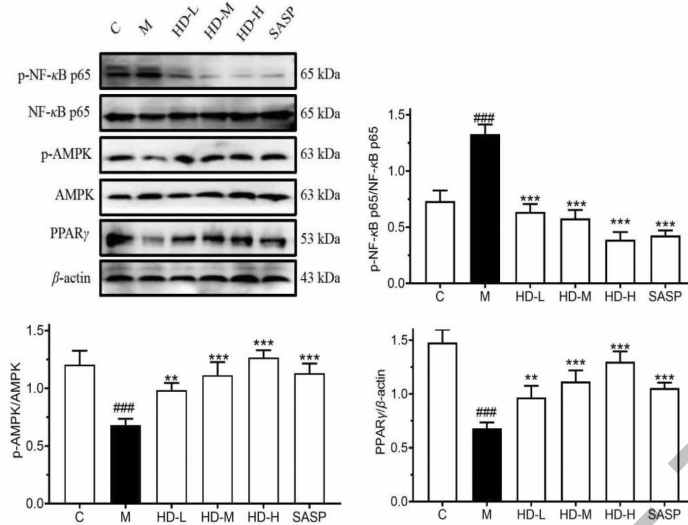


图5 HD对细胞中PPAR $\gamma$ /AMPK/NF- $\kappa$ B信号通路相关蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of HD on the expression of proteins related to the PPAR $\gamma$ /AMPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway in cells

### 3 讨论与结论

CD是一种病因不明的特发性慢性炎症性疾病,易复发,累及口腔到肛门的整个消化道。在欧洲和北美人群的发病率最高,但近年来亚洲人群的发病率急剧上升<sup>[11]</sup>。研究发现,CD的发病机制与肠黏膜免疫反应失调引起的肠道炎症密切相关<sup>[12]</sup>。多项研究表明,改善肠道炎症反应可以显著缓解CD。例如,沙利度胺通过恢复TH17/Treg细胞的失衡和改变促炎和抗炎细胞因子的平衡减轻炎症反应来改善小鼠CD<sup>[13]</sup>。马基多酚提取物通过下调COX-2和iNOS的表达抑制肠道炎症改善小鼠CD<sup>[14]</sup>。以上说明抑制肠道炎症反应是治疗CD的一个主要手段。一致地,我们发现HD可以通过抑制炎症反应来改善TNBS诱导的CD。

炎症是IBD发病的主要诱因,引起IBD肠组织损伤。作为重要的炎症生物标志物,相关细胞因子包括TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6和IL-17,它们在炎症反应中起重要作用,抑制其过表达可以改善CD的肠道炎症反应<sup>[15]</sup>。例如LB可以抑制TNBS诱导的小鼠肠道IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 的过表达改善克罗恩病<sup>[16]</sup>。丁酸钠在TNBS诱导的炎症性肠病小鼠模型中抑制炎症并维持上皮屏障完整性<sup>[10]</sup>。以上研究均表明抑制促炎细胞因子的产生对CD具有治疗作用。在这项研究中,TNBS会诱发小鼠出现肠道严重炎症反应。然而,HD治疗后减轻了结肠炎症细胞浸润,并且在动物和细胞水平上均显著下调了这些炎性细胞因子水平,说明HD可以抑制炎症反应改善小鼠

CD。

NF- $\kappa$ B是IBD炎症细胞因子转录的重要信号转导途径,负责调节促炎细胞因子(TNF- $\alpha$ 和IL-6)的转录<sup>[17]</sup>。作为NF- $\kappa$ B家族成员之一,p65一旦被激活可以转位到细胞核中上调促炎细胞因子的转录表达<sup>[18]</sup>。研究发现,通过抑制NF- $\kappa$ B信号通路可以减轻TNBS模型中的炎症<sup>[15]</sup>。在本研究中,TNBS的诱导使CD小鼠结肠中NF- $\kappa$ B p65的磷酸化蛋白表达增多,而HD的干预导致NF- $\kappa$ B p65的磷酸化蛋白表达降低。另外,HD还可以抑制TNF- $\alpha$ 诱导的Caco-2细胞中NF- $\kappa$ B p65的磷酸化蛋白表达的升高。说明HD通过抑制NF- $\kappa$ B信号通路改善结肠炎症反应。

AMPK是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,在葡萄糖和脂质代谢、细胞生长和凋亡、自噬和炎症中发挥重要作用<sup>[19]</sup>。研究发现,AMPK通过抑制NF- $\kappa$ B的激活来实现抗炎作用<sup>[20]</sup>。Xu等<sup>[21]</sup>发现AMPK的激活可以抑制NF- $\kappa$ B通路进而抑制缺氧和复氧过程中的炎症反应。Chen等<sup>[22]</sup>发现,使用化合物C(AMPK抑制剂)可以阻止红景天苷抑制NF- $\kappa$ B信号通路改善AGEs诱导的内皮炎症和氧化应激。同样,本研究发现HD具有促进AMPK磷酸化的作用,且呈剂量依赖性。以上说明HD通过激活AMPK抑制NF- $\kappa$ B通路从而改善TNBS诱导的炎症反应。

PPAR $\gamma$ 是一种转录因子,在抗炎、抗氧化和吞噬细胞介导的清除过程中起重要作用,在结肠上皮中高度表达<sup>[23]</sup>。许多研究表明,PPAR $\gamma$ 是AMPK



的激活因子,而 PPAR $\gamma$  的抗炎作用是通过激活 AMPK 来实现。例如,PPAR $\gamma$  激动剂(噻唑烷二酮药物)可以通过 AMPK $\alpha$  的磷酸化激活 AMPK 抑制肠道病理性炎症<sup>[24]</sup>。而 GW9662、T0070907 和 PPAR $\gamma$  siRNA 可阻止羟基积雪草酸激活 AMPK 恢复 Th17/Treg 平衡来改善结肠炎<sup>[25]</sup>。本研究发现 HD 具有 PPAR $\gamma$  激动剂作用,说明 HD 通过激活 PPAR $\gamma$  抑制 CD 的炎症反应。

综上所述,HD 可有效减缓 TNBS 诱导的小鼠 CD 炎症反应,其机制可能与 PPAR $\gamma$ /AMPK/NF- $\kappa$ B 信号通路介导的炎症反应有关。我们的研究表明,在日常生活中补充雷公菌不仅可以防治 UC,对 CD 也有一定的防治作用,在 IBD 发病率逐年增高以及当前治疗药物诸多局限的大背景下,我们的研究为富含 HD 的食物作为防治 IBD 的补充替代治疗提供科学依据。

#### 参考文献

- 1 Veauthier B, Homecker JR. Crohn's disease: diagnosis and management[J]. Am Fam Physician, 2018, 98:661-669.
- 2 Cao G, Lungaro L, Caputo F, et al. Nutritional treatment in Crohn's disease[J]. Nutrients, 2021, 13(5):1628.
- 3 Schmitt H, Neurath MF, Atreya R. Role of the IL23/IL17 pathway in Crohn's disease[J]. Front Immunol, 2021, 12:622934.
- 4 Cushing K, Higgins PDR. Management of Crohn disease: a review[J]. Jama, 2021, 325(1):69-80.
- 5 Wark G, Samochoa-Bonet D, Ghaly S, et al. The role of diet in the pathogenesis and management of inflammatory bowel disease: a review[J]. Nutrients, 2020, 13(1):135.
- 6 Guo M, Li Z. Polysaccharides isolated from *Nostoc commune* Vaucher inhibit colitis-associated colon tumorigenesis in mice and modulate gut microbiota[J]. Food Funct, 2019, 10:6873-6881.
- 7 Xu X, Luo A, Lu X, et al. p-Hydroxybenzoic acid alleviates inflammatory responses and intestinal mucosal damage in DSS-induced colitis by activating ER $\beta$  signaling[J]. J Funct Foods, 2021, 87:104835.
- 8 Liu TJ, Shi YY, Wang EB, et al. AT1R blocker losartan attenuates intestinal epithelial cell apoptosis in a mouse model of Crohn's disease[J]. Mol Med Rep, 2016, 13:1156-1162.
- 9 Charlet R, Bortolus C, Sendid B, et al. *Bacteroides thetaio-tamicron* and *Lactobacillus johnsonii* modulate intestinal inflammation and eliminate fungi via enzymatic hydrolysis of the fungal cell wall[J]. Sci Rep, 2020, 10(1):11510.
- 10 Chen G, Ran X, Li B, et al. Sodium butyrate inhibits inflammation and maintains epithelium barrier integrity in a TNBS-induced inflammatory bowel disease mice model[J]. EBio-Medicine, 2018, 30:317-325.
- 11 Oh SH, Kim KM. Current issues of pediatric inflammatory bowel disease in Korea[J]. Korean J Pediatr, 2014, 57:465-471.
- 12 Wang J, Chen H, Wang Y, et al. Therapeutic efficacy of a mutant of keratinocyte growth factor-2 on trinitrobenzene sulfonic acid-induced rat model of Crohn's disease[J]. Am J Transl Res, 2016, 8:530-543.
- 13 Chen X, Hu H, Luo L, et al. Thalidomide prevented and ameliorated pathogenesis of Crohn's disease in mice via regulation of inflammatory response and fibrosis[J]. Front Pharmacol, 2019, 10:1486.
- 14 Ortiz T, Argüelles-Arias F, Illanes M, et al. Polyphenolic maqui extract as a potential nutraceutical to treat TNBS-induced Crohn's disease by the regulation of antioxidant and anti-inflammatory pathways[J]. Nutrients, 2020, 12(6):1752.
- 15 Hu Z, Yang M, Ye Q, et al. Tou Nong San attenuates inflammation in TNBS-IBD model by inhibiting NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. Evid-based Compl Alt Med, 2018, 2018:6929307.
- 16 Sun X, Wen K, Xu Z, et al. Effect of loureirin B on Crohn's disease rat model induced by TNBS via IL-6/STAT3/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. Chin Med, 2020, 15:2.
- 17 Qasem A, Elkamel E, Naser SA. Anti-MAP triple therapy supports immunomodulatory therapeutic response in Crohn's disease through downregulation of NF- $\kappa$ B activation in the absence of MAP detection[J]. Biomedicines, 2020, 8(11):513.
- 18 Sun XL, Qiao LC, Gong J, et al. Proteomics identifies a novel role of fibrinogen-like protein 1 in Crohn's disease[J]. World J Gastroenterol, 2021, 27:5946-5957.
- 19 Wang L, Yin Y, Hou G, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR $\gamma$ ) plays a protective role in cigarette smoking-induced inflammation via AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling[J]. Med Sci Monit, 2018, 24:5168-5177.
- 20 Xiang HC, Lin LX, Hu XF, et al. AMPK activation attenuates inflammatory pain through inhibiting NF- $\kappa$ B activation and IL-1 $\beta$  expression[J]. J Neuroinflamm, 2019, 16(1):34.
- 21 Chen X, Li X, Zhang W, et al. Activation of AMPK inhibits inflammatory response during hypoxia and reoxygenation through modulating JNK-mediated NF- $\kappa$ B pathway[J]. Metabolism, 2018, 83:256-270.