

## 辣木叶多糖对小鼠溃疡性结肠炎的防治与机制研究

Hosameldeen Mohamed Husien<sup>1,2,3†</sup>, 彭伟龙<sup>1,2†</sup>, 刘明江<sup>1,2</sup>, 伯若楠<sup>1,2</sup>, 李金贵<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>扬州大学兽医学院; <sup>2</sup>江苏省高校动物重要疫病与人畜共患病防控协同中心, 扬州 225009;<sup>3</sup>布尔塔那大学兽医学院, Rufaa 999129

**摘要:**探讨辣木叶多糖(*Moringa oleifera* leaf polysaccharide, MOLP)对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的小鼠溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)防治作用及其作用机制。50只BALB/c小鼠随机分为正常对照组(Con组)、模型对照组(DSS组)、MOLP-L(25 mg/kg)、MOLF-M(50 mg/kg)、MOLF-H(100 mg/kg)组,通过饮用4% DSS诱导小鼠UC模型。试验期间每日记录各组小鼠体重情况和疾病活动指数(DAI)变化;ELISA法检测血清中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-10、HMGB1和结肠组织MPO含量;HE染色观察结肠组织病理学变化;实时荧光定量PCR法检测结肠组织TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-10、HMGB1 mRNA表达水平;蛋白免疫印迹(Western blot)法检测结肠组织中TLR4、MyD88、P65、p-P65、I $\kappa$ B $\alpha$ 和p-I $\kappa$ B $\alpha$ 的表达;16S rRNA高通量测序探究小鼠肠道菌群的变化。结果显示,与Con组相比,DSS组小鼠一般状况下降,体重减轻,结肠长度缩短,DAI和病理切片损伤评分均显著增加( $P < 0.001$ );TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、HMGB1含量和MPO活性显著升高( $P < 0.001$ ),结肠组织中TLR4、MyD88、p-P65和p-I $\kappa$ B $\alpha$ 的蛋白表达水平显著上调( $P < 0.001$ )。与DSS组相比,不同剂量MOLP处理组明显改善上述病变和炎症指标,显著提升了IL-10的表达,作用结果具有剂量依赖性;并且MOLP可以改善UC小鼠肠道菌群多样性,恢复菌群平衡。研究结果提示MOLP可以通过抑制炎症反应,调节小鼠肠道菌群多样性、组成和相对丰度进而发挥防治UC的作用。

**关键词:**辣木叶多糖;溃疡性结肠炎;炎症因子;肠道菌群

中图分类号:S859.7

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)10-1659-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.10.002

## Protective effects and mechanism of *Moringa oleifera* leaf polysaccharide on ulcerative colitis in mice

Hosameldeen Mohamed Husien<sup>1,2,3†</sup>, PENG Wei-long<sup>1,2†</sup>, LIU Ming-jiang<sup>1,2</sup>,  
BO Ruo-nan<sup>1,2</sup>, LI Jin-gui<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Yangzhou University; <sup>2</sup>Jiangsu

Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and

Zoonoses, Yangzhou 225009, China; <sup>3</sup>College of Veterinary Medicine, Albutana University, Rufaa 999129, Sudan

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the preventive and therapeutic effects of *Moringa oleifera* leaf polysaccharide (MOLP) on ulcerative colitis (UC) in mice induced by dextran sodium sulfate (DSS). 50 BALB/c mice were randomly divided into normal Con group, DSS group, MOLP-L (25 mg/kg) group, MOLF-M (50 mg/kg) group, and MOLF-H (100 mg/kg) group. Mice were induced UC by drinking 4% DSS. During the experiment, the general condition and body weight of mice were recorded daily, and the changes in disease activity index (DAI) were observed; ELISA was used to measure the contents of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, HMGB1 in serum and MPO in colon tissue; HE staining was used to observe the pathological morphological damage of colon tissues; qPCR was used to detect TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 and HMGB1 mRNA expression levels in colon tissues; Western blot was used to measure TLR4, MyD88, P65, p-P65, I $\kappa$ B $\alpha$  and p-I $\kappa$ B $\alpha$  expression in colon tissues; 16S rRNA was showed the changes of intestinal microflora in mice. Compared with the Con group, mice in the DSS group had decreased general condition, weight loss, colon length was shortened, DAI and pathological section damage scores were signifi-

收稿日期:2023-04-17

接受日期:2023-08-25

基金项目:国家自然科学基金(32072911);江苏省高校优势学科建设工程项目(PAPD2018)

† 共同第一作者

\* 通信作者 Tel:86-018352762175; E-mail:jgli@yzu.edu.cn

cantly increased ( $P < 0.001$ ), TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , HMGB1 content and MPO activity were significantly increased ( $P < 0.001$ ), TLR4, MyD88, colon tissue. The protein expression levels of p-P65 and p-I $\kappa$ B $\alpha$  were significantly upregulated ( $P < 0.001$ ); Compared with the DSS group, the condition of mice in the different doses of MOLP treatment group was significantly improved, and significantly increased IL-10 expression, the results were dose-dependent. MOLP also could regulate the gut microbiota diversity significantly and restore the balance of intestinal bacteria. The results indicated that MOLP might inhibit inflammatory response and regulate the diversity, composition and relative abundance of gut microbiota in mice, which could play a positive role in preventing and treating UC.

**Key words:** *Moringa oleifera* leaf polysaccharide; ulcerative colitis; inflammatory factor; intestinal flora

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种病因极其复杂的非特异性、复发性结肠炎症疾病,常导致患者结肠黏膜溃疡和溃烂,出现频繁的腹痛、腹泻、便血等一系列临床症状<sup>[1]</sup>,因其反复发作,迁延难愈,严重影响了患者的正常生活,并且还会增加病人继发感染和患结肠癌的风险。Eric 等<sup>[2]</sup>研究表明,UC 发病机制与肠屏障功能的受损和肠道微环境的改变密切相关。当肠黏膜屏障受损时,肠道固有层中的免疫细胞暴露在外界抗原和病原体中,激活的免疫细胞在机体内产生炎症级联反应,引起 T 细胞亚群介导非特异性 Th2 免疫反应<sup>[3]</sup>,同时 TLR4 与衔接蛋白 MyD88 进行信号传导,导致 NF- $\kappa$ B 的激活,促进白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 等促炎因子的表达<sup>[4]</sup>,破坏肠道免疫稳态,进一步损伤肠腔上皮细胞。同时,肠道菌群的组成对免疫系统发育和功能具有重要影响<sup>[5]</sup>,当肠道内有益菌群和致病菌群数量比例失调时,导致毒素、肠腔细菌和抗原进入机体,加剧 UC 患者肠黏膜炎症和过度的氧化应激反应<sup>[6]</sup>。这提示针对炎性因子和肠道菌群进行干预是防治 UC 的有效靶点。

辣木 (*Moringa oleifera*), 原产于印度,其广泛种植于非洲、亚洲的热带和亚热带地区<sup>[7]</sup>,近年来大面积种植于我国的云南广西地区,于 2012 年被中国卫生部批准认定为新资源食品,也是我国重要的药食两用的食品资源。辣木叶的营养价值极高,长期服用辣木叶食品可以提高人体免疫力,同时具有一定疾病预防的作用<sup>[8]</sup>。其主要的生物活性成分为多酚、黄酮和多糖类物质,并发挥着显著的抗炎<sup>[9]</sup>、抗氧化和抗肿瘤作用。目前国内外对辣木叶多糖 (*Moringa oleifera* leaf polysaccharide, MOLP) 的相关报道较少,还局限于传统提取工艺的优化和化学组成分析,关于 MOLP 对结肠炎的防治效果尚不明确。因此,本试验采用 DSS 诱导建立 UC 小鼠模型,观察 MOLP 对急性结肠炎小鼠体内炎症反应和肠道菌群的改善效果,旨在明确 MOLP 对 UC 防治作用机制,

以期 MOLP 的药理学研究和临床疾病治疗提供思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

体重为 (20  $\pm$  2) g 的 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 50 只,购于扬州大学比较医学中心,实验动物生产许可证号为 SCXK[苏]2017-0009,实验动物使用许可证号为 SYXK[苏]2017-0044,合格证编号为 NO. 202206249,动物饲养于 SPF 级动物饲养室,饲养环境温度 (24  $\pm$  2)  $^{\circ}$ C,相对湿度 (60  $\pm$  10) %, 12 h 明暗循环。试验过程中小鼠均饲喂商品鼠粮,自由采食与饮水,实验程序符合扬州大学兽医学院实验动物伦理委员会的批准 (编号 YZUDWLL-202206-008)。

### 1.2 药物与试剂

辣木叶 (云南孺子牛生物科技有限公司, Lot NO: 210523); DSS (MW: 36 000-50 000, 美国 MP Biomedicals 公司, Lot NO: S6132); HE 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, Cat NO: G1120); RNA-easy isolation Reagent、HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+ gDNA wiper) (Lot NO: 11141ES60) 和 ChamQTM SYBR<sup>7</sup> qPCR Master Mix (南京诺唯赞生物科技有限公司, Lot NO: 11201ES08); 透析袋 (上海源叶生物科技有限公司, Cat NO: SP132594) 髓过氧化物酶 (MPO) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, Cat NO: A044-1-1); IL-1 $\beta$  (Cat NO: ck-E20174)、IL-10 (Cat NO: ck-E20162)、TNF- $\alpha$  (Cat NO: ck-E20852)、HMGB1 (Cat NO: ck-E20318) ELISA 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司); 抗体 TLR4 (14358s)、MyD88 (4283s)、P-I $\kappa$ B $\alpha$  (2859s)、I $\kappa$ B $\alpha$  (4812s)、P-p65 (3033s)、p65 (8242s)、 $\beta$ -actin (4970s) (Cell Signaling Technology 公司); FITC 标记羊抗兔 (A0562) 和 Cy3 标记的山羊抗兔二抗 (A0516) (北京碧云天生物技术有限公司)。

### 1.3 主要仪器

RM2125RTS 石蜡切片机 (Leica 公司); DM 正

置荧光显微镜(Leica 公司); 荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司); 恒温金属浴(卡尤迪生物科技有限公司); ChemiScope 化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司); 超纯水系统(Merck Millipore 公司); Epoch 酶标仪(Biotak 公司)。

## 1.4 方法

### 1.4.1 MOLP 的制备

辣木叶按照 Sharma 等<sup>[10]</sup> 研究报道的方法, 将新鲜辣木叶超微粉碎后, 在 70 °C 条件下加去离子水以 1:10 的比例提取辣木叶粗多糖三次, 每次 90 min, 经 4 000 r/min 离心 20 min, 将上清液合并后经旋转蒸发仪减压浓缩至 50 mL。随后用 300 mL 95% 乙醇沉淀多糖, 并在 4 °C 条件下静置过夜, 将沉淀复溶于去离子水中, 装入透析袋(截止分子量 3 500 Da)中 4 °C 透析 2 d 后使用 Sevage 法(Sevage 试剂: 多糖水溶液 = 1:4) 除去蛋白, 重复萃取 10 次直至茚三酮反应为阴性, 最后冷冻干燥得到 MOLP。经苯酚-硫酸法测得糖含量为 64.8%。

表 1 疾病活动指数评分标准

Table 1 The criterion for judgement of disease activity index

分数 Score	粪便性状 Stool trait	粪便隐血情况 Stool bleeding	体质量下降率 Weight loss
0	正常粪便	隐血试验阴性	0%
1	软便但成形	隐血试验弱阳性	1% ~ 5%
2	粪便呈糊状但肛门无粘附	隐血试验阳性	6% ~ 10%
3	膏状粪便, 肛门有粘附	隐血试验强阳性	11% ~ 20%
4	腹泻, 水样便	肛门四周带血	20% 以上

### 1.4.4 样本采集

试验结束后, 将小鼠通过异氟烷进行麻醉, 从小鼠眼眶静脉丛采集血液于 1.5 mL EP 管中, 3 000 r/min 离心 10 min, 吸取血清冷贮, 用于后续 ELISA 试验。待完全麻醉后用脱颈椎的方式处死小鼠, 剖开腹腔, 剪取距肛门 1 cm 处带有回盲瓣的结肠, 拍照观察结肠长度; 剪取距肛门 1 cm 处结肠组织约 2 cm 于 4% 多聚甲醛中固定, 用于后续 HE 染色和免疫荧光试验; 取 Con、DSS、MOLP-H 组小鼠结肠内的粪便至冻存管中, 待提取粪便中细菌的 DNA, 以供肠道菌群检测; 剩余各组结肠组织置于冻存管中, 液氮保存, 用于后续 qPCR 以及蛋白相关检测试验。

### 1.4.5 HE 染色观察结肠组织病理学变化及病理损伤评分

取 4% 多聚甲醛溶液中固定的结肠组织经脱水

### 1.4.2 动物分组、造模及给药

50 只小鼠预饲养 3 d 后, 称重并随机分成正常对照组(Con 组)、模型对照组(DSS 组)、MOLP 25 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg 组(MOLP-L、MOLP-M、MOLP-H 组)。除 Con 组饮用蒸馏水外, 其余各组均饮用 4% DSS(W/V) 溶液 7 d, 建立小鼠 UC 模型。药物处理组自造模第一天开始给予相应药液进行灌胃, 每只 0.2 mL/d, 连续给药 7 d。

### 1.4.3 小鼠一般状况及疾病活动指数(DAI)评分

每天观察记录小鼠的体质量、粪便隐血情况和粪便状态等一般状况, 参照 Coope 等<sup>[11]</sup> 介绍的方法进行 DAI 评分, 详细 DAI 评分细则见表 1, 计算公式为:  $DAI = (\text{体质量下降率} + \text{粪便性状得分} + \text{粪便隐血得分}) / 3$ , 体质量下降率 =  $(\text{每日体质量} - \text{初始体质量}) / \text{初始体质量} \times 100\%$ ; 使用联苯胺冰醋酸法检测粪便是否隐血或带血, 当 DAI 评分达到 0.5 分以上时表示小鼠 UC 模型造模成功。

处理、透明、石蜡包埋、修蜡及切片等步骤经 HE 染色后置于显微镜下观察结肠组织病理形态学变化并拍照, 参照 Cai 等<sup>[12]</sup> 方法进行病理损伤评分, 标准如下: (1) 炎症严重程度: 0 分 = 无; 1 分 = 轻度; 2 分 = 中度; 3 分 = 重度。 (2) 损伤深度计分: 0 分 = 无; 1 分 = 黏膜; 2 分 = 黏膜及黏膜下层; 3 分 = 全层。 (3) 隐窝损伤评分: 0 分 = 无; 1 分 = 1/3 基底部隐窝破坏; 2 分 = 2/3 基底部隐窝破坏; 3 分 = 隐窝消失但上皮存在; 4 分 = 隐窝及上皮全部破坏。

### 1.4.6 血清中炎症因子的检测以及结肠组织中 MPO 含量测定

采用 ELISA 试剂盒检测各组小鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-10 和 HMGB1 的含量, 使用 MPO 试剂盒检测各组小鼠结肠组织中 MPO 含量。

#### 1.4.7 结肠组织中炎症因子的 mRNA 表达水平

取冻存的小鼠结肠组织 100 mg 于 EP 管中,按照 RNA 提取试剂盒说明书的方法提取 RNA,然后将其反转录成 cDNA 后,进行荧光定量 PCR 扩增,引物序列见表 2。按照荧光定量试剂盒说明书预混

20  $\mu$ L 反应体系,反应程序:95  $^{\circ}$ C 2 min 预变性;95  $^{\circ}$ C 变性 10 s,58  $^{\circ}$ C 反应 30 s,进行 40 个循环;然后 95  $^{\circ}$ C 反应 15 s,60  $^{\circ}$ C 反应 1 min,95  $^{\circ}$ C 反应 15 s。该实验用  $\beta$ -actin 为内参基因,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法对 Ct 值进行相对定量分析。

表 2 qPCR 引物序列  
Table 2 qPCR primer sequence

目的基因 Target gene	引物序列 Primer sequence(5'→3')	产物长度 Product length(bp)
$\beta$ -actin	F: TGCTGTCCTGTATGCCTCT R: TTTGATGTCACGCAGGATTT	224
IL-1 $\beta$	F: AGTTGACGGACCCCAAAAGAT R: GTTGATGTGCTGCTGCCAGA	100
TNF- $\alpha$	F: GGTCCCAACAAGGAGGAGAA R: CTCCTCTGCTTGCTGGTTTG	141
IL-10	F: CTCTTACTGACTGGCATGAGGAT R: GACTCGGTTAGCACTATGTTGT	176
HMGB1	F: GCATCCTGGCTTATCCATTGG R: GGCTGCTTGTCTATCTGCTG	63

#### 1.4.8 Western blot 法检测结肠组织 NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白表达情况

将 100 mg 冻存的结肠组织剪碎研磨后加入 RIPA 裂解液充分裂解,离心收集上清液,进行 BCA 蛋白浓度测定,然后将蛋白稀释至相同浓度后置于沸水中煮沸 10 min 使蛋白变性。每个样品取 10  $\mu$ L 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电转至 PVDF 膜后使用 5% 脱脂奶封闭 2 h,随后分别使用 TLR4、MyD88、P-I $\kappa$ B $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\alpha$ 、P-p65、p65、 $\beta$ -actin 抗体(稀释比例均为 1:1 000)4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日加入二抗(稀释比例为 1:5 000)室温孵育 2 h,经 TBST 洗膜三次后使用 ECL 显影仪检测蛋白表达情况。以  $\beta$ -actin 为内参,利用 Image J 软件分析蛋白灰度值。

#### 1.4.9 鼠粪便中细菌 DNA 的提取及测序

采用 CTAB 方法对各组小鼠结肠内容物样本的基因组 DNA 进行提取,利用 1% 琼脂糖凝胶电泳和超微量分光光度计检测 DNA 提取纯度和浓度,随后根据测序区域的选择,针对 16S rRNA 基因 V4-V5 可变区合成特异性引物并对引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增产物检测合格后,对目的条带使用 Qiagen 公司提供的胶回收试剂盒回收产物,然后进行文库构建。构建好的文库经过 Qubit 和 qPCR 定量,文库合格后,使用 NovaSeq6000 进行上机测序。

#### 1.4.10 数据统计学分析

采用 GraphPad Prism's one-way ANOVA 检测进行统计分析,试验结果均用平均值  $\pm$  标准误表示, $P$

<0.05 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MOLP 对 UC 小鼠一般状况以及 DAI 评分的影响

Con 组小鼠的饮食和状态正常,体重稳定增长,粪便呈麦粒状,DAI 评分为 0。DSS 组小鼠在第 3~4 d 开始出现被毛粗乱、精神状态变差、体重下降、粪便黏稠并且出现轻微糊肛现象;第 5~7 d 粪便带血严重、肛门处粪便黏连、畏寒、体重下降,结肠长度和 DAI 评分与 Con 组相比显著升高( $P < 0.001$ )。各用药组腹泻和血便情况明显减轻,精神状态得到改善,体重有不同程度的增长,MOLP-M 与 MOLP-H 组结肠长度和 DAI 评分与 DSS 组相比均显著降低( $P < 0.001$ ),详见表 3。

### 2.2 MOLP 对 UC 小鼠结肠组织病变及其形态结构

图 1A 为小鼠结肠 HE 染色 100 $\times$  所显示图片,来观察小鼠结肠组织学改变情况。Con 组的小鼠肠腺结构正常,杯状细胞数量多,隐窝完整、排列有序;DSS 组小鼠黏膜下层明显水肿(黑色箭头所示位置),肠隐窝结构被破坏、变形、排序紊乱(\*所示位置),黏膜层和黏膜下层有大量炎性细胞浸润,少数可达肌层(红色箭头所示位置);各剂量 MOLP 组能够改善炎症引起的组织学改变,但 MOLP-L 和 MOLP-M 组小鼠的结肠仍可见多处炎性细胞浸润,隐窝结构被破坏,MOLP-H 组改善效果最为明显,肠绒毛形态完整,腺体层次清晰可见,溃疡症状减轻。

表 3 各组小鼠平均体重变化率、疾病活动指数和结肠长度 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Average weight change rate, DAI and colon length of UC mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	平均体重变化率 Average rates of weight change (%)	疾病活动指数 DAI	结肠长度 Colon length (cm)
Con	116.15 ± 1.41	0	7.03 ± 0.23
DSS	82.49 ± 1.76 <sup>***</sup>	3.50 ± 0.22 <sup>***</sup>	4.57 ± 0.12 <sup>***</sup>
MOLP-L	90.25 ± 1.62 <sup>#</sup>	2.50 ± 0.22 <sup>#</sup>	5.18 ± 0.11
MOLP-M	97.46 ± 1.14 <sup>##</sup>	2.33 ± 0.21 <sup>#</sup>	5.40 ± 0.24 <sup>##</sup>
MOLP-H	108.72 ± 1.27 <sup>###</sup>	1.67 ± 0.33 <sup>###</sup>	6.25 ± 0.21 <sup>###</sup>

注:与 Con 组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ;与 DSS 组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ ,下同。  
 Note: Compared with Con group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; Compared with DSS group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ . The same below.

病理损伤评分情况:与 Con 组相比,DSS 组小鼠结肠组织病理损伤评分显著升高( $P < 0.001$ );相比于 DSS 组,经 MOLP 处理后小鼠的结肠损伤状况得

到明显改善,MOLP-M 和 MOLP-H 组小鼠结肠损伤评分显著降低( $P < 0.001$ )。

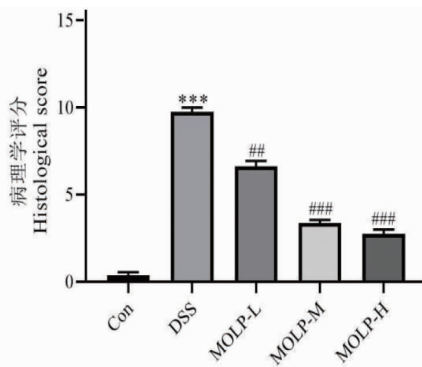
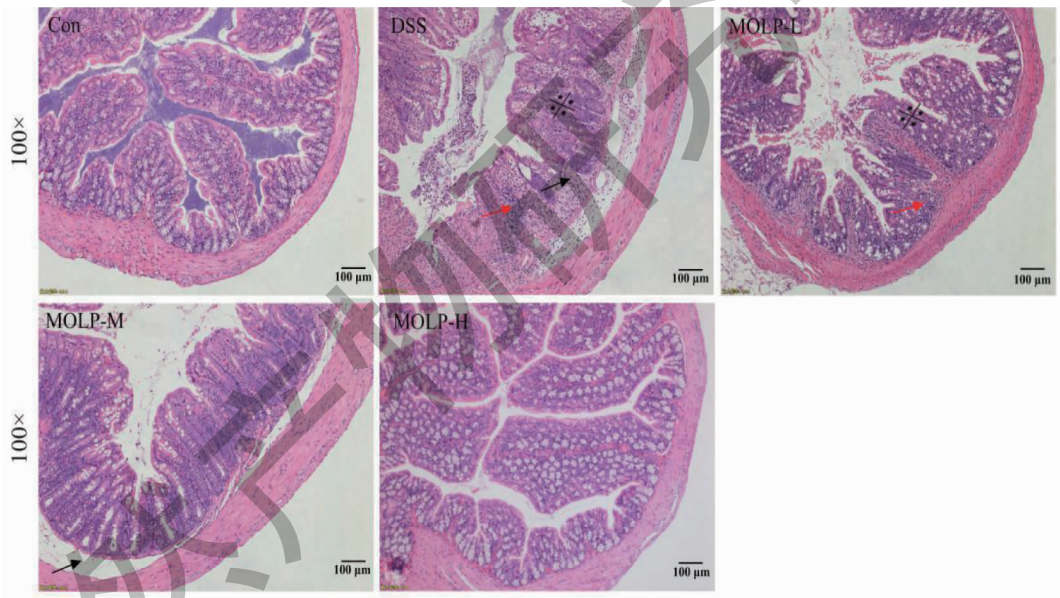


图 1 各组小鼠结肠组织病理学观察 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Histopathological observation of colon in mice of each group ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 2.3 MOLP 对 UC 小鼠血清中炎症因子和结肠组织 MPO 含量的影响

如表 4 所示,与 Con 组相比,DSS 组小鼠血清中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、HMGB1 和组织中 MPO 含量显著上升 ( $P < 0.001$ ),IL-10 含量显著降低 ( $P < 0.001$ );与

DSS 组相比,MOLP 处理组炎症因子和 MPO 的含量得到改善,尤其是 MOLP-H 组小鼠血清中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、HMGB1 和组织中 MPO 含量相比于 DSS 组均显著下降 ( $P < 0.001$ ),IL-10 含量显著上升 ( $P < 0.001$ )。

表 4 各组小鼠血清中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-10、HMGB1 和结肠组织 MPO 水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Table 4 Serum levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, HMGB1 and MPO in mice of each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	IL-1 $\beta$ (pg/mL)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	HMGB1 (pg/mL)	MPO (U/g)
Con	22.18 $\pm$ 0.65	74.59 $\pm$ 1.76	106.90 $\pm$ 2.52	25.05 $\pm$ 1.82	0.11 $\pm$ 0.02
DSS	36.51 $\pm$ 0.63***	117.8 $\pm$ 4.52***	84.08 $\pm$ 1.71***	41.75 $\pm$ 1.94***	0.54 $\pm$ 0.06**
MOLF-L	30.23 $\pm$ 0.91##	99.73 $\pm$ 3.32##	90.04 $\pm$ 2.16	38.15 $\pm$ 0.73	0.33 $\pm$ 0.03#
MOLF-M	26.18 $\pm$ 1.09###	88.84 $\pm$ 2.19###	99.12 $\pm$ 4.46#	37.65 $\pm$ 0.64	0.29 $\pm$ 0.08#
MOLF-H	24.65 $\pm$ 1.12###	84.77 $\pm$ 2.35###	114.1 $\pm$ 5.78###	27.52 $\pm$ 2.45###	0.15 $\pm$ 0.05##

### 2.4 MOLP 对 UC 小鼠结肠组织炎症因子 mRNA 表达量的影响

DSS 组小鼠结肠组织中促炎因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、HMGB1 的 mRNA 表达量与 Con 组相比均显著增加 ( $P < 0.001$ ),抗炎因子 IL-10 的 mRNA 表达量则显

著降低 ( $P < 0.001$ );使用 MOLP 干预后,IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、HMGB1 的 mRNA 表达量明显降低,IL-10 的 mRNA 表达量也有升高,且随着 MOLP 剂量的增加,作用效果更显著,与 DSS 组相比具有显著差异 ( $P < 0.1, P < 0.01, P < 0.001$ ) (见表 5)。

表 5 各组小鼠结肠组织 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-10、HMGB1 mRNA 表达量 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Table 5 The mRNA expression levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 and HMGB1 in colon tissue of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$	IL-10	HMGB1
Con	1.00 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.07
DSS	5.21 $\pm$ 1.12***	2.39 $\pm$ 0.37**	0.31 $\pm$ 0.09**	4.36 $\pm$ 0.91**
MOLF-L	3.82 $\pm$ 0.91	1.92 $\pm$ 0.29	0.51 $\pm$ 0.12	2.51 $\pm$ 0.53
MOLF-M	1.31 $\pm$ 0.31##	1.26 $\pm$ 0.14##	0.8 $\pm$ 0.11#	2.07 $\pm$ 0.8
MOLF-H	1.11 $\pm$ 0.53###	1.14 $\pm$ 0.18##	1.29 $\pm$ 0.17###	1.27 $\pm$ 0.51##

### 2.5 MOLP 对 UC 小鼠结肠组织中 NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白表达的影响

与 Con 组相比较,DSS 组小鼠结肠组织中 P65 和 I $\kappa$ B $\alpha$  的磷酸化增多并且 p-P65/P65 和 p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$  的比值显著增加 ( $P < 0.001$ ),TLR4、MyD88 蛋

白表达量也显著上升 ( $P < 0.001$ ) (见表 6);与 DSS 组相比较,MOLP-M 和 MOLP-H 组均能明显下调 TLR4、MyD88 蛋白的表达 ( $P < 0.1, P < 0.001$ ),其中 MOLP-H 组还可以显著下调 p-P65/P65 和 p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白的比值 ( $P < 0.1$ ) (见图 2)。

表 6 各组小鼠 TLR4、MyD88、p-P65/P65 和 p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达量 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Table 6 Expression of TLR4, MyD88, p-P65/P65 and p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$  proteins in colon tissue of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	TLR4/ $\beta$ -actin	MyD88/ $\beta$ -actin	p-P65/P65	p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$
Con	0.82 $\pm$ 0.03	1.61 $\pm$ 0.13	0.47 $\pm$ 0.02	0.39 $\pm$ 0.02
DSS	1.41 $\pm$ 0.05***	2.48 $\pm$ 0.07**	0.72 $\pm$ 0.05**	1.64 $\pm$ 0.06***
MOLF-L	1.23 $\pm$ 0.04	2.47 $\pm$ 0.06	0.67 $\pm$ 0.06	1.17 $\pm$ 0.07#
MOLF-M	1.15 $\pm$ 0.08#	2.27 $\pm$ 0.08#	0.55 $\pm$ 0.04	0.78 $\pm$ 0.08##
MOLF-H	0.98 $\pm$ 0.03###	1.66 $\pm$ 0.06###	0.51 $\pm$ 0.04#	0.68 $\pm$ 0.06##

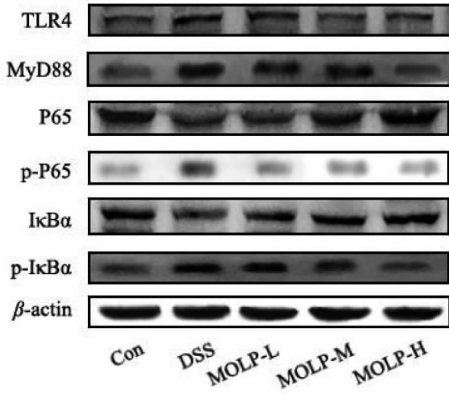


图2 各组小鼠结肠组织 TLR4、MyD88、P65、p-P65、IκBα、p-IκBα 蛋白表达

Fig. 2 Expression of TLR4, MyD88, P65, p-P65, IκBα and p-IκBα proteins in colon tissue of mice in each group

## 2.6 小鼠结肠粪便 16S rRNA 测序及多样性分析

稀释曲线可以直接反映测序数据量的合理性并反映样本中物种的丰富程度,当曲线趋于平坦时,说

明测序数据量渐进合理(见图 3A)。采用 Venn 图分析 OTUs (operational taxonomic unit) 数量及不同组之间共有或特有的 OTUs 数量, Con 组、DSS 组和 MOLP 组特有 OTUs 分别为 935、296、430 个,总 OTUs 分别为 3 109、2 628、2 714 个,共有 OTUs 为 1 526 个,占总 OTUs 的 18.06%。与 Con 组相比, DSS 组小鼠肠道菌群物种丰度降低,经 MOLP 处理后丰富度有所改善(见图 3B)。以 Observed species 和 Shannon 指数分析组间物种多样性差异是否显著,结果显示, DSS 组 Observed species 和 Shannon 指数与 Con 组相比显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 经 MOLP 处理后则明显升高 ( $P < 0.1$ ,  $P < 0.001$ ) (见图 3C、3D)。

选取在门 (Phylum) 水平上最大丰度排名前十的各组小鼠肠道菌群结构组成进行分析发现, DSS 组弯曲菌门 (Campylobacterota) 相对丰度 (10.49%) 高于 Con 组 (2.69%), 经 MOLP 处理后则明显降低

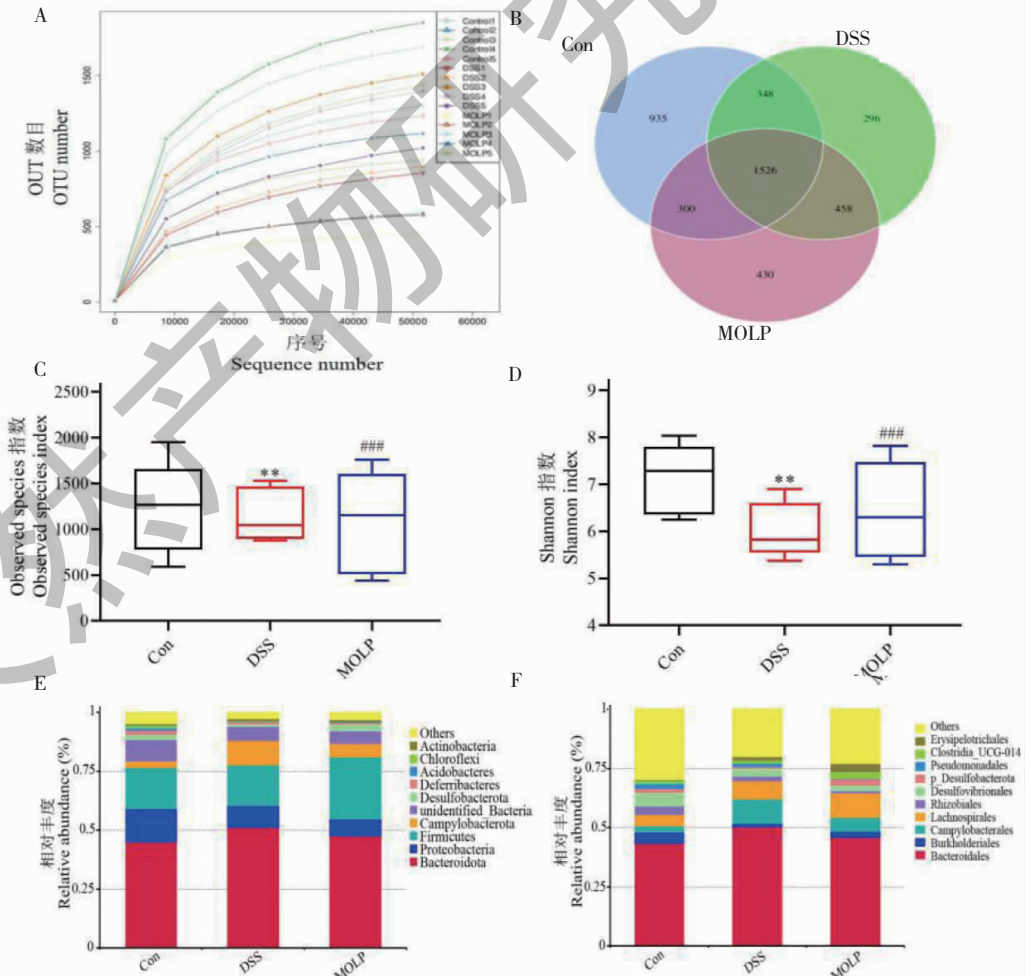


图3 各组小鼠肠道菌群多样性分析 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Fig. 3 Diversity analysis of intestinal microflora of mice in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

(5.58%); 拟杆菌门 (Bacteroidetes) 相对丰度经 MOLP 处理后 (48.05%) 比 DSS 组 (51.79%) 低且接近于 Con 组 (44.94%); 而 MOLP 组厚壁菌门 (Firmicutes) 相对丰度 (25.58%) 明显高于 Con 组 (17.51%) 和 DSS 组 (16.49%) (见图 3E)。

在目 (Order) 水平分析各组小鼠的肠道菌群结构, 拟杆菌目 (Bacteroidales) 的相对丰度最高, DSS 组为 50.76%, MOLP 组与 Con 组接近, 分别为 46.39% 和 43.18%; 弯曲菌目 (Campylobacterales) 的相对丰度在各组中占比趋势与拟杆菌目相似, 经 MOLP 处理后 (5.85%) 相比于 DSS 组有所降低 (10.49%), 接近于 Con 组 (2.69%); 同时毛螺菌目 (Lachnospirales) 相对丰度 (9.27%) 明显高于 Con 组 (4.58%) 和 DSS 组 (6.49%) (见图 3F)。

### 3 讨论与结论

近年来, UC 在全世界的发病率呈现逐年升高的趋势, 相比于欧洲国家, 中国的 UC 发病率增长更快。现代医学在临床治疗过程中多用糖皮质激素、水杨酸制剂和免疫抑制剂来对 UC 进行干预治疗<sup>[13]</sup>, 但停药后易复发和严重的药物副作用使其成为医学界棘手的问题。随着临床应用的不断深入, 纯天然来源的植物多糖以其安全性、可及性、抗炎活性和高效的免疫增强功效受到关注<sup>[14]</sup>。辣木叶多糖作为辣木叶中有效活性成分之一, 对它的功能活性研究主要集中在降血脂、降血糖、抗肿瘤和抗氧化<sup>[15]</sup>等方面, 为了探究 MOLP 对肠炎的防治作用, 本试验应用 DSS 建立 UC 模型并予以治疗。结果显示, 造模后小鼠出现腹泻、血便、体重下降等症状, DAI 评分升高, 结肠长度变短等现象, 提示造模成功, 效果较为明显。经 MOLP 处理后可以显著改善 UC 小鼠的体重下降情况, 降低 DAI 评分, 减轻结肠黏膜受损和炎性浸润, 下调小鼠血清和结肠中促炎因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、HMGB1 的水平, 上调抗炎因子 IL-10 的水平, 同时抑制 P65 和 I $\kappa$ B $\alpha$  的磷酸化, 防止 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的过度激活, 维持肠道菌群稳态, 通过抑制机体炎症反应和调节小鼠肠道菌群结构来发挥对 UC 的防治作用。

炎性细胞因子在 UC 发生发展过程中是不可缺少的一部分, 它由免疫细胞产生, 通过免疫细胞间的相关作用, 刺激抗原特异性效应细胞的增殖以及介导局部和全身炎症<sup>[16]</sup>。正常情况下, 巨噬细胞对炎

症信号应答较弱, 在免疫抑制的细胞中较少促进其产生<sup>[17]</sup>, 然而在 UC 发病期间, 活化的巨噬细胞和树突状细胞分泌各种细胞因子如 TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-10 等用于调控炎症反应, 这些细胞因子浓度的上调或者过度激活都会导致 T 细胞失调和 Treg/Th1、Th2、Th17 失衡<sup>[18]</sup>, 促进中性粒细胞在炎性部位的积累, 减少上皮细胞中电解质的分泌, 增加膜的通透性, 进一步加剧炎症反应。用于治疗 UC 的药物和天然产物可有效的缓解炎性因子浓度和表达水平的失调, Xiao 等<sup>[19]</sup>研究发现苦豆子总碱可通过调节 UC 小鼠体内促炎因子 IL-1 $\beta$ 、IL-23、IL-17 水平, 升高抗炎因子 IL-10 水平来缓解炎症。本研究通过对 UC 小鼠血清中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、HMGB1 和 IL-10 的检测发现, MOLP 可以明显抑制促炎因子的表达, 上调抗炎因子的水平, 同时通过实时荧光定量 PCR 技术对组织炎性因子的检测结果显示, MOLP 还可有效缓解 UC 小鼠结肠组织中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、HMGB1 mRNA 的表达, 增加 IL-10 mRNA 的表达。此外 MPO 是中性粒细胞的特征性酶, 由中性粒细胞或某些组织的巨噬细胞分泌的血红蛋白酶, 是血红素过氧化物酶家族成员<sup>[20]</sup>, 我们可以通过检测小鼠结肠组织中 MPO 的活性来评判组织中中性粒细胞的浸润程度。结果显示 MOLP 可以显著抑制 UC 小鼠 MPO 的活性, 减少中性粒细胞在结肠组织中的数量。上述炎性因子的生成和 MPO 活性的升高与 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的核心地位密不可分, TLR4 在天然免疫中识别病原微生物和控制获得性免疫反应中起着重要的作用<sup>[21]</sup>, 当 TLR4 被激活后由衔接蛋白 MyD88 进行信号转导, 诱导 I $\kappa$ B 磷酸化并泛素化和降解, 释放 NF $\kappa$ B p50/p65 二聚体<sup>[22]</sup>, 活化的二聚体进入细胞核, 立即启动多种细胞因子的转录, 导致 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等数量增加, 使炎症持续并不断扩大。Zhang 等<sup>[23]</sup>发现 UC 小鼠结肠部位 NF- $\kappa$ B 信号通路被过度激活, 靶向抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路激活的治疗方法来缓解 UC 是有效的。本研究发现, 相比于 Con 组, DSS 组小鼠结肠组织 MPO 活性明显升高, TLR4、MyD88 蛋白表达显著增加, p-P65 和 p-I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白上调, p-P65/P65 和 p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$  的比值也随之增加, 使用 MOLP 处理后上述异常表达情况得到有效抑制, 这提示 MOLP 可以通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的过度激活从而抑制炎症因子的异



常表达来发挥对 UC 的防治作用。

在正常情况下,肠道具有完善的屏障功能,肠道菌群同肠上皮层、黏液层、肠道淋巴系统一起构成肠黏膜机械、化学和生物屏障<sup>[24]</sup>,能防止肠腔内致病性抗原侵入机体,维持机体正常运行,当肠道发生炎症时,肠道菌群失调,肠屏障被破坏,肠道通透性增加,进而有害菌及其代谢产物内毒素等会被吸收入血,进一步加重黏膜上皮细胞的损伤和黏膜屏障的破坏,由此形成恶性循环,导致 UC 反复发作<sup>[25]</sup>。本研究通过 16S rRNA 基因测序探究 MOLP 对 UC 小鼠肠道菌群的影响,发现 MOLP 可以提高 UC 小鼠肠道菌群的多样性,恢复 Campylobacterota 和 Bacteroidetes 比例,调节不同菌群的相对丰度,促进肠道菌群结构向正常水平恢复。消化系统中最常见两大菌门为 Firmicutes 和 Bacteroidetes,有研究发现肠炎小鼠 Firmicutes 和 Bacteroidetes 会明显减少<sup>[26]</sup>,而经 MOLP 处理后则明显缓解了两大优势菌群失调的状态,这与 Sun 等<sup>[27]</sup>报道紫甘薯多糖可以缓解由于 DSS 造模引起的 UC 小鼠 Firmicutes 和 Bacteroidetes 比值降低的结果类似,提示增加该两种优势菌群的比例可能对肠炎小鼠有保护作用。进一步的研究分析表明,丁酸盐可提供肠道内的酸性环境从而抑制有害菌的生长,维持电解质的平衡,促进黏膜炎症的修复<sup>[28]</sup>。丁酸盐在体内主要由肠道中的 Firmicutes 细菌产生,增加 Firmicutes 的数量对肠道炎症具有保护作用,本研究发现 MOLP 可以促进 UC 小鼠中 Firmicutes 数量的增多,激发有益菌的微生物活性来抑制致病菌的生长。

本试验结果表明,在 DSS 诱导的 UC 小鼠模型中,MOLP 可以明显缓解 UC 小鼠的结肠缩短、体重下降、DAI 评分升高现象,降低 UC 小鼠血清和结肠组织中促炎因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、HMGB1 的水平,调节 TLR4/NF- $\kappa$ B 的过度激活并调节 UC 小鼠肠道菌群的多样性、组成和相对丰度,从而发挥对 UC 预防保护作用。今后下一步将会从化学屏障、免疫屏障等方面多角度探讨 MOLP 对 UC 的作用,本研究以期为辣木叶的开发利用以及 MOLP 的抗炎效果提供新的思路。

#### 参考文献

1 Wu JZ, Li XQ, Mo SM, et al. Effects of compound dandelion

- and *Periplaneta americana* extracts on intestinal microflora of rats with ulcerative colitis[J]. Chin J Vet Med(中国兽医杂志),2023,59:126-133.
- 2 Brown E, Taylor CT. Hypoxia-sensitive pathways in intestinal inflammation[J]. J Physiol,2018,596:2985-2989.
- 3 Xie JR, Chen ST, Liu ZW. Research progress on pathogenesis of ulcerative colitis[J]. J Hainan Med Univ(海南医学院学报),2022,28:1835-1840.
- 4 Vargas-Robles H, Castro-Ochoa KF, Citalán-Madrid AF, et al. Beneficial effects of nutritional supplements on intestinal epithelial barrier functions in experimental colitis models *in vivo*[J]. World J Gastroenterol,2019,25:4181-4198.
- 5 Wang T, Wu KN, Wu DZ, et al. Effect of indigo on intestinal flora in mice with ulcerative colitis induced by sodium dextran sulfate[J]. Chin J Microecol(中国微生态学杂志),2022,34:1374-1382.
- 6 Fu YP, Li CY, Peng X, et al. Pectic polysaccharides from *Acronitum carmichaelii* leaves protects against DSS-induced ulcerative colitis in mice through modulations of metabolism and microbiota composition [J]. Biomed Pharmacother,2022,155:113767.
- 7 Xu M, Zhao SJ, Song H, et al. Advances in knowledge of *Moringa oleifera*[J]. Food Sci(食品科学),2016,37:291-301.
- 8 Arora S, Arora S. Nutritional significance and therapeutic potential of *Moringa oleifera*: the wonder plant[J]. J Food Biochem,2021,45:e13933.
- 9 Li Q. Study on Preparation and anti-inflammatory activity of fermentation broth rich in gamma-aminobutyric acid from *Moringa oleifera* leaves [D]. Guangdong: Guangdong Ocean University(广东海洋大学),2019.
- 10 Sharma K, Kumar M, Waghmare R, et al. *Moringa (Moringa oleifera Lam.)* polysaccharides: extraction, characterization, bioactivities, and industrial application[J]. Int J Biol Macromol,2022,209:763-778.
- 11 Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis [J]. Lab Invest,1993,69:238-249.
- 12 Cai X, Han Y, Gu M, et al. Dietary cranberry suppressed colonic inflammation and alleviated gut microbiota dysbiosis in dextran sodium sulfate-treated mice [J]. Food Funct,2019,10:6331-6341.
- 13 Liu S, Cao Y, Ma L, et al. Oral antimicrobial peptide-EGCG nanomedicines for synergistic treatment of ulcerative colitis [J]. J Control Release,2022,347:544-560.

- 14 Bo R, Liu X, Wang J, et al. Polysaccharide from *Atractylodes macrocephala* Koidz binding with zinc oxide nanoparticles: characterization, immunological effect and mechanism [J]. *Front Nutr*, 2022, 9:992502.
- 15 Ma GM, Liu J, Jiang X, et al. Protective effect of *Moringa oleifera* polysaccharide on oxidative damage of bovine mammary epithelial cells induced by hydrogen peroxide [J]. *Chin J Anim Nutr* (动物营养学报), 2021, 33:350-358.
- 16 Kweon DY, Song HJ, Kim JE, et al. Therapeutic effects of *Alloe saponaria* against ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2023, 45:1483-1499.
- 17 Hassanshahi A, Moradzad M, Ghalamkari S, et al. Macrophage-mediated inflammation in skin wound healing [J]. *Cells*, 2022, 11:2953.
- 18 Kmiec Z. Cytokines in inflammatory bowel disease [J]. *Arch Immunol Ther Exp*, 1998, 46:143-155.
- 19 Xiao Y, Hua YL, Jia YQ, et al. Effect of total alkaloids from *Sophora alopecurides* on FXR, TGR5, CYP7A1 protein expression in colon and liver tissues of mice with ulcerative colitis [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2021, 33:1452-1462.
- 20 Lin X, Guo X, Qu L, et al. Preventive effect of *Atractylodis Rhizoma* extract on DSS-induced acute ulcerative colitis through the regulation of the MAPK/NF- $\kappa$ B signals *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 292:115211.
- 21 Zhu CF, An MP, Huang HJ, et al. Based on TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway to explore the mechanism of Tuoli Xiaodu powder in the treatment of radiation proctitis [J]. *Acta Univ Med Anhui* (安徽医科大学学报), 2020, 55:1367-1373.
- 22 Zhao YP, Kang DC, Du M, et al. Expression of NF- $\kappa$ B signaling pathway related genes in Mongolian horse immune tissues [J]. *Chin J Anim Sci* (中国畜牧杂志), 2022, 58:78-81.
- 23 Zhang X, Deng QH, Deng JH, et al. Lovastatin derivative dehydrolovastatin ameliorates ulcerative colitis in mice by suppressing NF- $\kappa$ B and inflammatory cytokine expression [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2020, 24:137-147.
- 24 Ma Q, Dong J, Weng YJ, et al. Effects of Shenling Baizhu powder on gut microbiota of ulcerative colitis mice based on 16S rDNA sequencing [J]. *Chin J Vet Sci* (中国兽医学报), 2022, 42:1230-1240.
- 25 Xiong XJ, Li XM, He YM, et al. Effect of total triterpenoids of *Chaenomeles speciosa* on PPAR $\gamma$ /SIRT1/NF- $\kappa$ Bp65 signaling pathway and intestinal mucosal barrier of ulcerative colitis induced by DSS in mice [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2018, 43:4295-4304.
- 26 Guo C, Wang Y, Zhang S, et al. *Crataegus pinnatifida* polysaccharide alleviates colitis via modulation of gut microbiota and SCFAs metabolism [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 181:357-368.
- 27 Sun J, Chen H, Kan J, et al. Anti-inflammatory properties and gut microbiota modulation of an alkali-soluble polysaccharide from purple sweet potato in DSS-induced colitis mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 153:708-722.
- 28 Zhong HP, Zheng HB. The function overview of butyrate in the ulcerative colitis [J]. *Clin J Chin Med* (中医临床研究), 2011, 3:113-115.