

山姜素对葡聚糖硫酸钠诱导小鼠溃疡性结肠炎的保护作用及其作用机制研究

谭悦, 关雅迪, 郑长清*

中国医科大学附属盛京医院 第二消化内科, 辽宁 沈阳 110022

摘要: **目的** 探讨山姜素对葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎小鼠的保护作用及其作用机制。 **方法** C57BL/6 小鼠随机分为对照组、模型组和 25、50、100 mg/kg 山姜素组。模型组和治疗组每天给予 3% 葡聚糖硫酸钠溶液, 连续 7 d。治疗组每日 ip 生理盐水 0.5 mL + 25、50、100 mg/kg 山姜素, 对照组和模型组每天 ip 生理盐水 0.5 mL, 连续 7 d。观察小鼠体质量变化、结肠长度、疾病活动指数 (DAI) 评分、组织学损伤评分等炎症反应; 透射电镜观察肠上皮细胞间连接; 免疫组织化学法、Western blotting 法检测肠道紧密连接蛋白 claudin-2、occludin、ZO-1、STAT3、pSTAT3、IL-6 的表达和 STAT3/IL-6 信号通路的表达情况。 **结果** 与模型组比较, 山姜素能够显著缓解小鼠体质量减轻和肠管缩短, 降低 DAI 和组织学评分。山姜素可增强小鼠肠黏膜 occludin、ZO-1 表达, 减弱 claudin-2 表达, 并能够抑制 STAT3/IL-6 信号通路。 **结论** 山姜素能够上调葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎小鼠结肠组织 occludin、ZO-1 的表达, 下调 claudin-2 的表达, 通过调节紧密连接蛋白的表达, 保护肠上皮细胞屏障的完整性和通透性。通过抑制 IL-6/STAT3 通路, 减轻结肠炎症反应。

关键词: 山姜素; 溃疡性结肠炎; 保护作用; 肠上皮屏障; 紧密连接; STAT3/IL-6

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2018)06-1303-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.06.004

Protection of alpinetin on dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice and its mechanism

TAN Yue, GUAN Ya-di, ZHENG Chang-qing

Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110022, China

Abstract: Objective To study the protective effect of alpinetin on dextran sulfate sodium -induced ulcerative colitis in mice and explain its mechanism. **Methods** C57BL/6 mice were divided into control group, model group, and alpinetin (25, 50, and 100 mg/kg) groups. Mice in model and alpinetin groups were given 3% dextran sodium sulfate solution for 7 d. Mice in alpinetin groups were ip administered with normal saline 0.5 mL + 25, 50, 100 mg/kg alpinetin, while mice in control and model group were ip administered with normal saline 0.5 mL for 7 d. The body weight, intestinal length, disease activity index (DAI), and histological scores were observed. Epithelial tight junctions were observed by transmission electron microscope. Expression of tight junction claudin-2, occluding, ZO-1, STAT3, pSTAT3, IL-6 in mice and STAT3/IL-6 signaling pathway in the colon were determined by immunohistochemical method and Western blotting method. **Results** Compared with model group, alpinetin could significantly alleviate body weight loss and intestinal length shortening in mice, reduced DAI and histological scores. In the same time, alpinetin could enhance the expression of occludin and ZO-1 in intestinal mucosa, attenuate claudin-2 expression, and inhibit STAT3/IL-6 signaling pathway. **Conclusion** Alpinetin can up-regulate the expression of occludin and ZO-1 in the colon tissue of dextran sulfate sodium -induced ulcerative colitis in mice, down regulate the expression of claudin-2, and protect the integrity and permeability of the intestinal epithelial cell barrier by regulating the expression of tight junction. Alpinetin can reduce the colonic inflammatory reaction by inhibiting STAT3/IL-6 signaling pathways.

Key words: alpinetin; ulcerative colitis; protective effect; intestinal barrier; tight junction; STAT3/IL-6

收稿日期: 2018-02-23

基金项目: 辽宁省自然科学基金资助项目 (20170540529)

作者简介: 谭悦, 女, 辽宁沈阳人, 主治医师, 博士, 研究方向为炎症性肠病基础与临床。E-mail: tanyue2006@163.com

*通信作者 郑长清, 男, 辽宁沈阳人, 教授, 博士, 研究方向为炎症性肠病基础与临床。E-mail: zhengchangqing88@163.com

溃疡性结肠炎是炎症性肠病的一个重要临床亚型,其发病机制尚不明确,通常认为是遗传因素、环境因素、免疫调节异常、肠道微生物等多种因素共同作用的结果^[1]。实验表明,肠上皮屏障功能障碍在溃疡性结肠炎发病中发挥重要作用^[2-4]。肠上皮屏障损伤能够引起肠黏膜通透性增加,导致肠腔内致病性抗原通过肠黏膜进入体内,进而引发肠道炎症及免疫反应^[3]。肠上皮屏障的功能主要由上皮细胞顶端的紧密连接调节^[4],紧密连接的完整性决定了肠上皮屏障的功能^[5-6]。溃疡性结肠炎患者肠道活检发现,上皮细胞间紧密连接 occludin、ZO-1 表达减弱^[7],而成孔蛋白 claudin-2 表达增强^[8]。免疫紊乱被认为是溃疡性结肠炎重要的发病机制,促炎细胞因子和抑炎细胞因子的表达失衡,免疫系统激活,造成肠黏膜损伤和上皮屏障功能障碍。IL-6 是一种多向性细胞因子,有广泛的生物学活性,在炎症性肠病患者的肠黏膜和血清中均显著升高,信号转导与转录激活因子(STAT)家族广泛参与机体复杂的炎症免疫反应。STAT3 是 STAT 家族的重要成员,体外 STAT3 主要由 IL-6 家族细胞因子通过酪氨酸激酶活化而特异性的激活,激活后的 STAT3 转入细胞核,与特异 DNA 序列结合,调节下游靶基因的转录。溃疡性结肠炎患者肠道固有层单核细胞和肠上皮细胞存在过多活化的 STAT3,且活化 STAT3 的增高水平与疾病严重程度正相关^[9]。研究显示,抑制 STAT3 信号通路可使 occludin 蛋白表达上调^[10],从而改善上皮屏障功能。山姜素来源于姜科植物草豆蔻,为黄酮类化合物,药理作用主要有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抑制血小板聚集、抑菌、抗病毒等,其毒性低、资源丰富、价格低廉,有潜在临床应用前景^[11]。山姜素治疗溃疡性结肠炎的具体机制尚未详尽阐明,且无对肠黏膜屏障作用的相关研究。因此本研究主要探讨山姜素对葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎小鼠肠上皮细胞间紧密连接蛋白表达的影响,以及对 IL-6/STAT3 信号通路的影响。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

PRIMO D-37520 高速微型冷冻离心机(德国 Heraeus 公司);TS-100 水平摇床(海门市其林贝尔公司);SE260 垂直电泳槽(美国 Hoefer 公司);BG-blotMiMi 转印(北京百晶生物科技有限公司);C300 化学发光成像分析系统(美国 Azure 公司);SE300-10A-1.0 垂直电泳仪(美国 Hoefer 公司);

GBOX-chemi HR-E 数码凝胶成像系统(美国 Syngene 公司);ULTRA-TURRAX T8 组织匀浆机(德国 IKA 公司);Synergy H1 多功能酶标仪(美国 BioTek 公司);NanoVne 紫外分光光度计(英国 GE Healthcare 公司);ABI 7500 PCR System 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);Geneamp 9700 PCR System 普通 PCR 仪(美国 ABI 公司);H-7650 透射电子显微镜(日本日立公司)。

葡聚糖硫酸钠(相对分子量 36 000~50 000,美国 MP 公司);山姜素(批号 110762-201405,中国食品药品检定研究院);兔抗 Claudin-2 多克隆抗体(货号 sc-133464)、兔抗 ZO-1 多克隆抗体(货号 sc-10804)、鼠抗 occludin 单克隆抗体(货号 sc-133256)、鼠抗 β -Actin 单克隆抗体(货号 sc-376421)、兔抗 STAT3 多克隆抗体(货号 sc-7179)、兔抗 pSTAT3 多克隆抗体(货号 sc-8001-R)、羊抗 IL-6 多克隆抗体(货号 sc-1265)均购自 Santa Cruz Biotechnology;免疫组化染色试剂盒(批号 SPN-9002,北京中杉金桥生物技术有限公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 P0012,碧云天生物技术研究所有)。

雄性 C57BL/6 小鼠,8~10 周,体质量 22~27 g,购自辽宁长生生物技术有限公司,许可证号 SYXK(辽)2010-0008。所有动物均在 SPF 级屏障中饲养,自由进食和饮水。昼夜节律 12 h(8:00~20:00)/12 h(20:00~8:00),室温(22±2)℃,相对湿度 50%~60%。购入后适应环境 7 d。本实验通过盛京医院伦理委员会审批。

1.2 实验分组和药物干预

小鼠随机分为对照组、模型组和 25、50、100 mg/kg 山姜素组,每组各 6 只。根据 Sun 等^[12]研究结果,本实验给小鼠 3%葡聚糖硫酸钠溶液自由饮用 7 d 造模,称取 3 g 葡聚糖硫酸钠粉剂溶于 100 mL 双蒸水,使其充分溶解至溶液透明,每 2 天配制一次新鲜的葡聚糖硫酸钠溶液。模型组和治疗组每天给予 3%葡聚糖硫酸钠溶液自由饮用,代替饮水,连续 7 d。根据 He 等^[13]研究,治疗组同时每日 ip 生理盐水 0.5 mL+25、50、100 mg/kg 山姜素,对照组和模型组每天 ip 生理盐水 0.5 mL,连续 7 d。

1.3 标本采集

实验期间,观察并记录各组小鼠每天的体质量变化、精神状态、体毛色泽、进食、活动、大便秘性状、便血、死亡情况。经禁食 12 h,造模第 8 天早

晨采用水合氯醛 ip 麻醉并处死。所获得肠管分为 3 份, 分别固定于 4%多聚甲醛、2.5%戊二醛或立即放入液氮, 后转移至-80℃超低温冰箱。

1.4 溃疡性结肠炎的评估

通过对小鼠体重变化、结肠长度、疾病活动指数 (DAI) 评分^[14]、组织学损伤评分来评估小鼠溃疡性结肠炎的病情和评价溃疡性结肠炎造模成败。取结肠组织固定在 4%多聚甲醛中 24 h 以上, 常规石蜡包埋, 4 μm 切片, HE 染色后在光学显微镜下观察肠黏膜变化, 参照 Dieleman 等^[15]的评分标准对各组小鼠结肠病理切片进行组织学损伤评分, 见表 1。每个切片随机选取 3 个以上高倍视野 (×400), 由两名经过培训的胃肠道病理科医师进行盲法评分, 取平均值作为最终结果。

表 1 组织学损伤评分表

Table 1 Histological grading of colitis

得分	炎症	病变深度	隐窝破坏	病变范围/%
0	无	无	无	
1	轻	黏膜下层	基底 1/3 隐窝破坏	1~25
2	重	肌层	基底 2/3 隐窝破坏	26~50
3		浆膜层	仅有完整表面上皮	51~75
4			全部隐窝和上皮破坏	75~100

1.5 透射电镜观察肠上皮细胞间连接

取 1 cm 结肠组织, 立即放入电镜, 用 2.5%戊二醛中固定。0.1 mmol/L 磷酸缓冲液漂洗 3 次, 后用 1%锇酸固定液固定 2 h, 再用 0.1 mmol/L 磷酸缓冲液漂洗 3 次。梯度酒精和丙酮脱水, EPON-812 包埋剂浸透过夜并包埋。35、45、60℃烘箱内各聚合 24 h。超薄切片机切片, 厚度 50 nm, 醋酸-枸橼酸铅双重染色, 透射电镜观察, 拍片。

1.6 免疫组织化学法检测肠道紧密连接蛋白 occludin、ZO-1 和 claudin-2 的表达

结肠组织固定于 4%多聚甲醛固定液中, 梯度乙醇溶液脱水、二甲苯透明后, 石蜡中浸蜡和包埋。65℃烤箱烤片, 过夜, 再经二甲苯和梯度乙醇溶液脱蜡。使用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 并用微波炉加热, 对切片进行抗原热修复, 3%双氧水封闭内源性过氧化物酶, 血清封闭非特异性抗原。加一抗: 兔抗 ZO-1 (1:75), 鼠抗 occludin (1:100), 兔抗 claudin-2 (1:100), 阴性对照组中加入磷酸盐缓冲液, 4℃过夜。后加入辣根过氧化物酶 (HRP)

标记的鼠兔通用二抗, 之后经 DAB 显色、苏木素复染、流水返蓝、梯度酒精溶液和二甲苯脱水, 盖玻片封片。显微镜下, 在 40 倍物镜下随机选择 3 个以上视野拍照。

1.7 蛋白质免疫印迹 (Western blotting) 法检测结肠 claudin-2、occludin、ZO-1、STAT3、pSTAT3、IL-6 的表达

实验第 8 天, 取小鼠结肠组织, 裂解后匀浆, 提取结肠组织蛋白质, BCA 法测定蛋白浓度, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 后将蛋白转移至 PVDF 膜, 转膜后在 5% BSA 中于室温下封闭 2 h。后 2% BSA 稀释一抗, 4℃孵育过夜。加入 HRP 标记的二抗稀释液, 室温孵育 1 h。ECL 法发光、显影, 拍照, 保存图片。Image J 软件分析结果。

蛋白含量=样本蛋白灰度值/同样本内参的灰度值

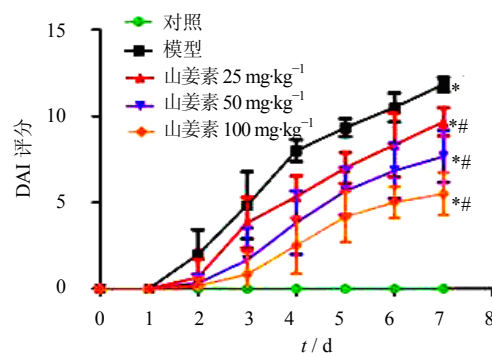
1.8 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 若存在统计学差异, 进一步应用 LSD 法进行两两比较。

2 结果

2.1 山姜素对溃疡性结肠炎小鼠 DAI、结肠长度和组织学改变的影响

造模第 7 天, 对照组、模型组和 25、50、100 mg/kg 山姜素组小鼠 DAI 评分依次为 0.00 ± 0.00 、 11.83 ± 0.41 、 9.67 ± 0.82 、 7.67 ± 0.65 、 5.50 ± 0.57 。与对照组比较, 模型组和各山姜素组小鼠 DAI 评分均显著增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 山姜素组 DAI 评分显著降低 ($P < 0.05$), 见图 1。



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

图 1 山姜素对溃疡性结肠炎小鼠 DAI 评分的影响

Fig. 1 Effects of apigenin on DAI score of ulcerative colitis mice

通过 HE 染色观察小鼠结肠组织学改变。对照组结肠壁结构清晰完整, 上皮完整, 腺体形态正常、排列规则, 隐窝正常, 杯状细胞丰富。模型组结肠壁明显增厚, 结构紊乱, 上皮脱落, 腺体、隐窝破坏甚至消失, 杯状细胞缺失, 以中性粒细胞、淋巴细胞为主的炎性细胞大量浸润至黏膜和黏膜下层,

部分肌层中间亦有淋巴细胞浸润。各山姜素组结肠黏膜损伤程度较模型组均得到不同程度的改善, 腺体、隐窝破坏和炎性细胞浸润程度有所减轻, 杯状细胞增加。100 mg/kg 山姜素组改善明显, 肠壁略增厚, 肠组织结构基本完整, 腺体排列规则, 杯状细胞较多, 少量炎性细胞浸润, 见图 2。

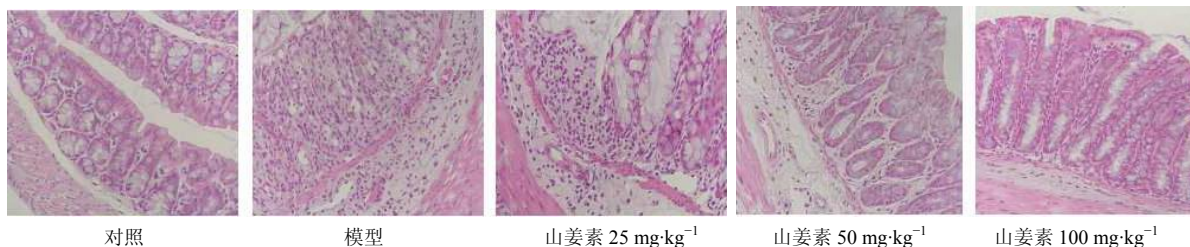


图2 山姜素对葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎小鼠组织学损伤的影响

Fig. 2 Effects of apigenin on histological injury of DSS induced ulcerative colitis mice

与对照组比较, 模型组小鼠肠管长度显著缩短 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 50、100 mg/kg 山姜素组肠管缩短程度显著减少 ($P < 0.05$), 见表 2。与对照组比较, 模型组组织学评分显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 山姜素组组织学评分显著降低 ($P < 0.05$), 见表 2。

表2 山姜素对溃疡性结肠炎小鼠肠管长度和组织学评分的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2 Effects of apigenin on intestinal length and histology score of ulcerative colitis mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肠管长度/cm	组织学评分
对照	—	6.38 ± 0.15	0.00 ± 0.00
模型	—	3.98 ± 0.23*	7.17 ± 1.17*
山姜素	25	4.08 ± 0.12	5.67 ± 0.52 [#]
	50	4.98 ± 0.18 [#]	3.83 ± 0.41 [#]
	100	5.43 ± 0.16 [#]	2.67 ± 0.82 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

2.2 山姜素对溃疡性结肠炎小鼠结肠上皮细胞间紧密连接的影响

紧密连接位于上皮细胞间顶端。对照组小鼠结肠上皮间紧密连接呈一条致密条带, 结构完整且连接牢固, 细胞桥粒清晰可见, 结构致密, 上皮细胞表面的微绒毛光滑、排列整齐, 细胞间隙狭窄, 提示结肠黏膜屏障完整。模型组小鼠肠上皮间紧密连接结构松散、模糊、密度降低, 桥粒结构消失, 微绒毛稀疏、短缩且长短不一, 细胞间隙增宽, 并见细菌因细胞间连接断裂侵入肠黏膜, 提示肠黏膜屏障损坏、通透性增加。山姜素组小鼠紧密连接的破坏情况较模型组有不同程度的改善, 且随着山姜素剂量的增加, 紧密连接密度逐渐增加, 细胞间隙逐渐缩窄。100 mg/kg 山姜素组见紧密连接清晰, 细胞间隙缩窄, 微绒毛排列整齐, 出现细胞桥粒。表明山姜素能够改善由葡聚糖硫酸钠造成的肠上皮细胞间连接的破坏, 特别是紧密连接的破坏, 且随着山姜素剂量的增加, 保护作用增强。见图 3。

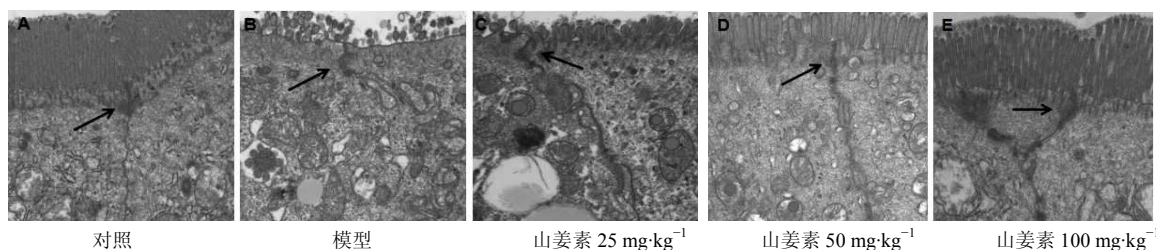


图3 透射电镜观察肠上皮细胞间紧密连接

Fig. 3 Transmission electron microscopy observes tight junction

2.3 山姜素对溃疡性结肠炎小鼠肠道紧密连接蛋白表达的影响

紧密连接蛋白 occludin 在对照组中呈阳性表达, 分布于肠上皮、腺上皮细胞顶端膜以及膜内近侧的胞质区, 见较多棕黄色染色; ZO-1 在对照组中呈阳性表达, 分布于肠上皮、腺上皮细胞近膜内侧

的胞质区, 见棕黄色染色。与对照组比较, 模型组和山姜素组的 occludin、ZO-1 表达降低; 山姜素组较模型组的 occludin、ZO-1 表达增强。claudin-2 在对照组中呈低表达, 腺体上皮细胞见少许棕黄色染色, 在模型组和山姜素组表达增强; 与模型组比较, 山姜素组 claudin-2 表达有降低趋势, 见图 4。

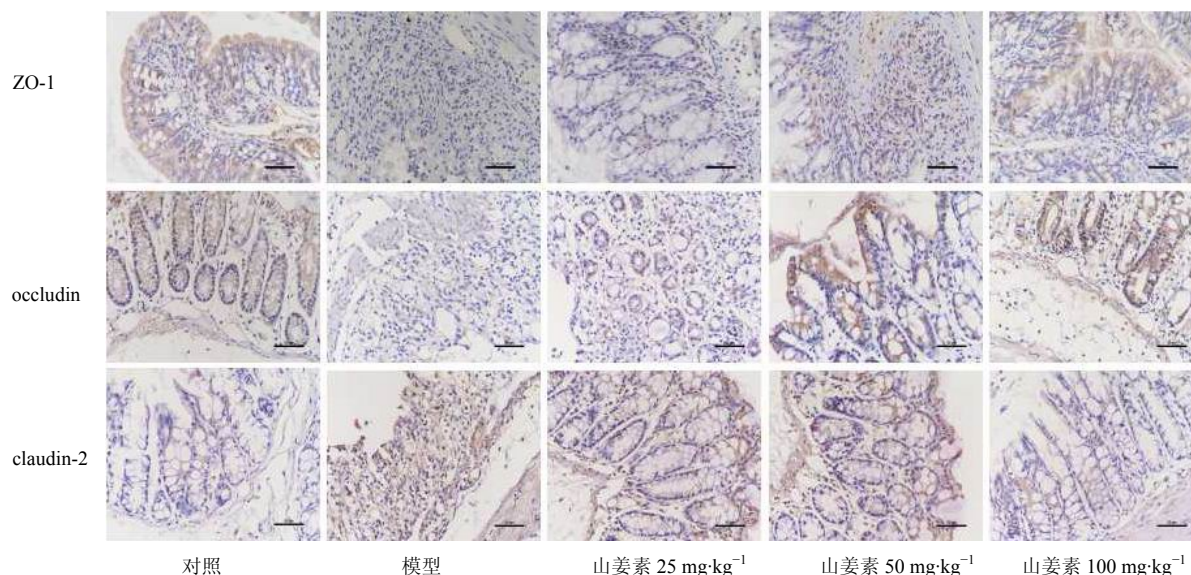


图4 山姜素对小鼠肠道紧密连接蛋白 occludin、ZO-1 和 claudin-2 表达的影响 (免疫组织化学法)

Fig. 4 Effects of apinectin on expression of tight junction occludin, ZO-1, and claudin-2 in mice (immunohistochemical method)

2.4 山姜素对溃疡性结肠炎小鼠肠道紧密连接 occludin、ZO-1、claudin-2 和 STAT3/IL-6 通路蛋白的相对表达的影响

与对照组比较, 模型组 occludin、ZO-1 蛋白表达明显下降 ($P<0.05$); 与模型组比较, 山姜素组 occludin、ZO-1 蛋白表达增强 ($P<0.05$)。claudin-2

在对照组中呈低表达, 在模型组中表达增加 ($P<0.01$); 与模型组比较, 50、100 mg/kg 山姜素组 claudin-2 表达逐渐降低 ($P<0.05$)。与对照组比较, 模型组 pSTAT3、IL-6 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$); 山姜素能够下调 pSTAT3、IL-6 表达增高 ($P<0.05$)。STAT3 的表达在各组无显著差异。见图 5、表 3。

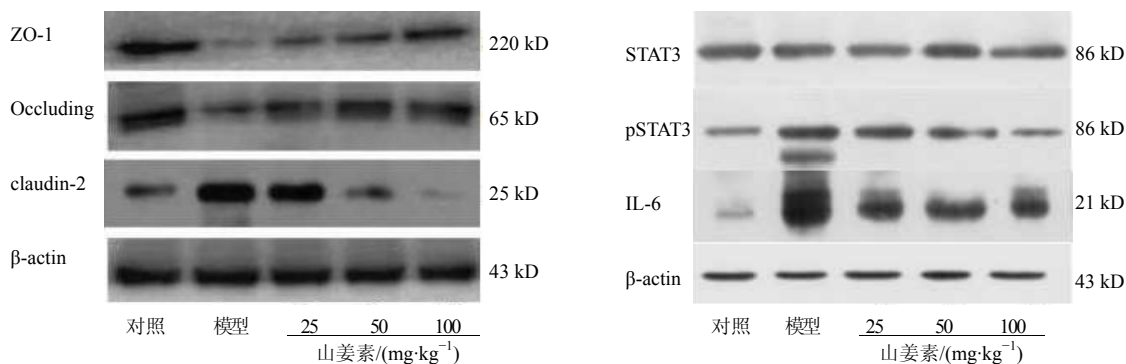


图5 山姜素对小鼠肠道紧密连接蛋白 occludin、ZO-1、claudin-2 和 STAT3、pSTAT3、IL-6 蛋白相对表达 (Western blotting)

Fig. 5 Effects of apinectin on relative expression of tight junction (occludin, ZO-1, and claudin-2) and STAT3/ IL-6 protein in mice (Western blotting method)

表3 山姜素对小鼠肠道紧密连接蛋白 occludin、ZO-1、claudin-2 和 STAT3、pSTAT3、IL-6 蛋白相对表达量

Table 3 Effects of apinetin on relative expression level of tight junction(occludin, ZO-1, and claudin-2) and STAT3/IL-6

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	occludin/β-actin	ZO-1/β-actin	claudin-2/β-actin	STAT3/β-actin	pSTAT3/β-actin	IL-6/β-actin
对照	—	1.45±0.36	1.56±0.09	0.49±0.09	1.04±0.32	0.62±0.11	0.57±0.10
模型	—	0.56±0.13*	0.43±0.03*	1.62±0.50*	0.99±0.19	1.44±0.29*	1.40±0.32*
山姜素	25	0.92±0.22 [#]	0.70±0.21 [#]	1.02±0.36 [#]	0.98±0.24	1.24±0.28	0.96±0.14 [#]
	50	1.07±0.29 [#]	0.96±0.24 [#]	0.89±0.27 [#]	1.04±0.27	0.99±0.19 [#]	0.84±0.16 [#]
	100	1.31±0.29 [#]	1.14±0.23 [#]	0.62±0.30 [#]	1.13±0.23	0.77±0.16 [#]	0.69±0.06 [#]

与对照组比较: **P* < 0.05; 与模型组比较: [#]*P* < 0.05**P* < 0.05 vs control group; [#]*P* < 0.05 vs model group

3 讨论

溃疡性结肠炎是以反复发作的腹泻、黏液脓血便伴腹痛、里急后重为临床特点。近年来, 溃疡性结肠炎发病率在世界范围内呈显著上升趋势, 尤其在亚太地区和东欧地区^[16], 严重危害人们的健康和生活质量。溃疡性结肠炎具有不能治愈、反复发作的特点, 目前的治疗药物包括氨基水杨酸制剂、糖皮质激素、免疫抑制剂和生物制剂等, 长期服用存在较多的副作用, 并有增加感染和诱发肿瘤发生的风险^[17]。因此寻找毒副作用小的新型治疗或辅助治疗药物具有重要意义。

本实验采用实验室经典溃疡性结肠炎造模方法即葡聚糖硫酸钠化学诱导法建造小鼠溃疡性结肠炎模型^[18]。根据造模后小鼠便血、体质量变化、DAI评分以及组织学等方面改变, 判断造模是否成功。造模后, 模型组小鼠出现明显消瘦、便血、DAI评分和组织学评分均呈显著上升趋势。HE染色发现, 模型组小鼠结肠管壁增厚, 腺体、隐窝破坏或消失, 杯状细胞明显减少, 中性粒细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞等炎性细胞浸润于黏膜层和黏膜下层, 均符合溃疡性结肠炎组织学改变。以上结果表明, 成功建立了小鼠溃疡性结肠炎模型。

本研究主要探讨山姜素对葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎小鼠肠上皮屏障的作用及机制。山姜素能够减少促炎因子 TNF-α、IL-6、IL-1β 等的产生, 并能抑制 MAPK、NF-κB 等信号通路的激活, 从而减轻炎症反应^[19]。结果显示, 山姜素能够显著改善葡聚糖硫酸钠造模引起的小鼠的便血、体质量减轻、结肠缩短, 并能降低 DAI 评分和组织学评分增加等情况, 并随着剂量增加, 效果越显著。结果表明, 山姜素可以减轻葡聚糖硫酸钠所引起的小鼠结肠炎症反应, 在 25~100 mg/kg 剂量内, 对小鼠结肠炎的治疗效果与剂量呈正比。

肠上皮屏障主要有机械屏障、免疫屏障、化学屏障和生物屏障构成, 各类屏障之间相互协作, 维持肠道及机体内稳态。作为上皮屏障的重要组成部分, 机械屏障由肠上皮细胞、黏液层和细胞间连接等构成。细胞间连接从顶端到基膜主要包括紧密连接、粘附连接桥粒和缝隙链接等, 其中紧密连接最为重要。肠上皮屏障的完整性和通透性与紧密连接的完整性关系密切^[20], 紧密连接表达异常, 上皮屏障破坏, 引起病原微生物通过上皮细胞间隙进入黏膜固有层, 引起肠黏膜的炎症和免疫反应。肠上皮屏障通透性升高可发生于炎症性肠病复发之前或疾病早期阶段^[8], 非活动期的炎症性肠病患者如出现上皮通透性增高, 则复发几率显著提高^[21]。Gong等^[22]研究表明, 应用葡聚糖硫酸钠诱导的 Balb/c 小鼠炎症性肠病模型中, 肠上皮屏障完整性被破坏, 肠黏膜通透性增高, 可能与肠上皮细胞间 occludin、claudin-1、ZO-1 为代表的紧密连接蛋白显著降低相关。通过透射电镜观察发现, 山姜素能够改善紧密连接的破坏, 使其密度增加, 细胞间隙缩窄, 且随着剂量的增加, 效果越显著。提示山姜素能够修复由葡聚糖硫酸钠引起的肠上皮细胞间连接, 特别是紧密连接的破坏, 且随着山姜素剂量的增加, 保护作用增强。

本研究选择跨膜蛋白 occludin、claudin-2 和外周膜蛋白 ZO-1 3 种代表性的紧密连接蛋白作为研究对象。occludin 可封闭相邻细胞间隙, 调控物质的细胞旁转运, 正常表达于肠上皮细胞、腺体细胞的表面、胞浆, 偶见细胞核。occludin 通过招募不同的信号转导分子聚集于紧密连接, 调节紧密连接结构变化。实验表明, 沉默 occludin 基因后会导致大分子物质的细胞旁路通透性增加^[23]。实验结果表明, 3%葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎小鼠较对照组结肠组织 occludin 表达显著降低, 紧密连

接稳固性降低,当同时给予山姜素干预治疗时,occludin的表达增强。claudin 蛋白家族是紧密连接的重要跨膜蛋白。claudin 家族成员在不同组织的屏障形成和选择性通透作用调节中起到了关键作用。其中 claudin-2 蛋白被称为成孔蛋白,其表达增加可降低紧密连接的稳固性。claudin-2 在隐窝上皮细胞膜少量表达,负责细胞旁路的阳离子转运。本研究中,葡聚糖硫酸钠造模后小鼠结肠组织 claudin-2 表达显著增加,导致紧密连接稳固性下降,当给予山姜素治疗时,claudin-2 表达较模型组显著下调,表明山姜素可通过下调 claudin-2 的表达来调节紧密连接,改善上皮屏障功能。ZO-1 属于一种外周膜蛋白,在上皮细胞中,其一端与胞质内的 occludin、claudin-1 等紧密连接蛋白连接,另一端与细胞骨架成分结合,将胞质蛋白和细胞骨架系统稳定的连接在一起。由于 ZO-1 结构和功能与其他紧密连接蛋白关系密切,如 ZO-1 发生改变,紧密连接复合体的功能多随之变化,故 ZO-1 常被用来作为观察各种组织屏障功能和通透作用的指标。实验结果显示,葡聚糖硫酸钠造模后 ZO-1 蛋白表达显著降低,若同时给与山姜素治疗,ZO-1 的表达较模型组明显增强,表明山姜素可以上调紧密连接蛋白 ZO-1 的表达,改善上皮屏障功能。

肠黏膜免疫失调被认为是溃疡性结肠炎最重要的发病机制。肠上皮细胞位于固有层免疫细胞与肠腔内微生物区之间,完整的肠上皮屏障能将肠腔内细菌和毒素等病原微生物与肠黏膜固有层免疫细胞隔离,上皮细胞间紧密连接可抵御病原微生物和大分子物质侵入黏膜,防止后者激活肠黏膜固有层免疫系统所引起炎症性肠病的发生。肠道免疫系统的激活,促炎细胞因子和抑炎细胞因子的表达失衡是炎症性肠病发病的重要环节^[24]。IL-6 是经典的多向性细胞因子,具有广泛的生物学活性,能够引发细胞内炎症级联反应,促进炎症因子释放,使炎症反应持续进行^[25]。IL-6 在炎症性肠病中表达增加,其水平可反映炎症性肠病的炎症程度,抑制 IL-6 信号通路可以延缓炎症性肠病的进展^[26]。IL-6 还能引起 ZO-1 移位,破坏紧密连接,增加肠上皮通透性^[27]。实验结果表明,葡聚糖硫酸钠造模后小鼠结肠组织 IL-6 的蛋白和基因表达显著增加,而山姜素能够显著抑制其表达。STAT 家族在机体多种器官系统的炎症及免疫反应中发挥作用,体外 STAT3 主要由 IL-6 家族细胞因子通过酪氨酸激酶

活化后激活。IL-6 是一种多效能细胞因子,其与可溶性 IL-6 受体(IL-6R α)结合形成 IL-6/IL-6R α 复合物,能够活化细胞膜表面的糖蛋白 130(gp130),继而诱导 STAT3 活化,即 IL-6/STAT3 信号转导。STAT3 磷酸化(p-STAT3)后转入细胞核,与特异 DNA 序列结合,调节下游靶基因的转录,产生大量的炎症因子,进而将炎症反应扩大化^[28]。研究发现,溃疡性结肠炎患者肠黏膜活化的 STAT3 表达显著增强,并与炎症分级正相关^[9]。有研究揭示,山姜素还可以通过调控 TLR4/NF- κ B 信号通路减轻乳腺炎小鼠的炎症反应^[29],还可以通过抑制 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等促炎细胞因子的表达来缓解急性肺损伤。本实验结果表明,葡聚糖硫酸钠造模后 pSTAT3、IL-6 表达显著增高,而随着山姜素干预的剂量逐渐增大,pSTAT3 和 IL-6 显著下降。

综上所述,山姜素能够上调葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎小鼠结肠组织 occludin、ZO-1 的表达,下调 claudin-2 的表达,通过调节紧密连接蛋白的表达,保护肠上皮细胞屏障的完整性和通透性,因此山姜素可能是通过抑制 IL-6/STAT3 通路,减轻结肠炎症反应。

参考文献

- [1] Kaistha A, Levine J. Inflammatory bowel disease: the classic gastrointestinal autoimmune disease [J]. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 2014, 44(11): 328-334.
- [2] Quetglas E G, Mujagic Z, Wigge S, et al. Update on pathogenesis and predictors of response of therapeutic strategies used in inflammatory bowel disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(44): 12519-12543.
- [3] Ordas I, Eckmann L, Talamini M, et al. Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2012, 380(9853): 1606-1619.
- [4] Oshima T, Miwa H, Joh T. Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, Suppl 2: S146-S150.
- [5] Ivanov A I, Parkos C A, Nusrat A. Cytoskeletal regulation of epithelial barrier function during inflammation [J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(2): 512-524.
- [6] Lee S H. Intestinal permeability regulation by tight

- junction: implication on inflammatory bowel diseases [J]. *Intest Res*, 2015, 13(1): 11-18.
- [7] Ivanov A I, Nusrat A, Parkos C A. The epithelium in inflammatory bowel disease: potential role of endocytosis of junctional proteins in barrier disruption [J]. *Novartis Found Symp*, 2004, 263: 115-124.
- [8] Du J, Chen Y, Shi Y, *et al.* 1, 25-Dihydroxyvitamin D protects intestinal epithelial barrier by regulating the myosin light chain kinase signaling pathway [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2015, 21(11): 2495-2506.
- [9] Nguyen P M, Putoczki TL, Ernst M. STAT3-activating cytokines: A therapeutic opportunity for inflammatory bowel disease? [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2015, 35(5): 340-350.
- [10] Tong L C, Wang Y, Wang Z B, *et al.* Propionate ameliorates dextran sodium sulfate-Induced colitis by improving intestinal barrier function and reducing inflammation and oxidative stress [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 253.
- [11] 乔春峰, 徐珞珊, 王峥涛, 等. 山姜素和豆蔻明的研究概况 [J]. *中国野生植物资源*, 2001, 20(6): 11-13.
- [12] Sun Y, Lin L J, Lin Y, *et al.* Gingko biloba extract (Ginaton) ameliorates dextran sulfate sodium (DSS)-induced acute experimental colitis in mice via reducing IL-6/STAT3 and IL-23/IL-17 [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(10): 17235-17247.
- [13] He X, Wei Z, Wang J, *et al.* Alpinetin attenuates inflammatory responses by suppressing TLR4 and NLRP3 signaling pathways in DSS-induced acute colitis [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28370.
- [14] Ito R, Shin-Ya M, Kishida T, *et al.* Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice [J]. *Clin Exp Immunol*, 2006, 146(2): 330-338.
- [15] Dieleman L A, Palmen M J, Akol H, *et al.* Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines [J]. *Clin Exp Immunol*, 1998, 114(3): 385-391.
- [16] Molodecky N A, Soon I S, Rabi D M, *et al.* Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(1): 46-54.
- [17] Löwenberg M, D'Haens G. Novel targets for inflammatory bowel disease therapeutics [J]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2013, 15(2): 311.
- [18] Kolios G. Animal models of inflammatory bowel disease: how useful are they really? [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2016, 32(4): 251-257.
- [19] He X, Wei Z, Wang J, *et al.* Alpinetin attenuates inflammatory responses by suppressing TLR4 and NLRP3 signaling pathways in DSS-induced acute colitis [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28370.
- [20] Lee S H. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases [J]. *Intest Res*, 2015, 13(1): 11-8.
- [21] Poritz L S, Garver K I, Green C, *et al.* Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. The Journal of surgical research [J]. *J Surg Res*, 2007, 140(1): 12-19.
- [22] Gong Y, Li H, Li Y. Effects of *Bacillus subtilis* on epithelial tight junctions of mice with inflammatory bowel disease [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2016, 36(2): 75-85.
- [23] Lee S H. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases [J]. *Intest Res*, 2015, 13(1): 11-18.
- [24] Strober W, Fuss I J. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases [J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(6): 1756-1767.
- [25] Park S Y, Neupane G P, Lee S O, *et al.* Protective effects of Pogostemon cablin Bentham water extract on inflammatory cytokine expression in TNBS-induced colitis in rats [J]. *Arch Pharm Res*, 2014, 37(2): 253-262.
- [26] Moriasi C, Subramaniam D, Awasthi S, *et al.* Prevention

- of colitis-associated cancer: natural compounds that target the IL-6 soluble receptor [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2012, 12(10): 1221-1238.
- [27] Huo M, Chen N, Chi G, *et al.* Traditional medicine alpinetin inhibits the inflammatory response in Raw 264.7 cells and mouse models [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 12(1): 241-248.
- [28] Hillmer E J, Zhang H, Li H S, *et al.* STAT3 signaling in immunity [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2016, 31: 1-15.
- [29] Chen H, Mo X, Yu J, *et al.* Alpinetin attenuates inflammatory responses by interfering toll-like receptor 4/nuclear factor kappa B signaling pathway in lipopolysaccharide-induced mastitis in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17(1): 26-32.