

## • 实验研究 •

## 槲皮素通过调节 SIRT1/NLRP3 信号通路对实验性巨结肠大鼠肠损伤的影响

唐旭, 赵成鹏, 段永福, 周晓波

南阳市中心医院 小儿外科, 河南 南阳 473000

**摘要:** **目的** 探究槲皮素通过调节沉默信息调控因子 1 (SIRT1)/NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 信号通路对实验性巨结肠大鼠肠损伤的影响。**方法** 采用苯扎溴铵滴注法诱导建立大鼠实验性巨结肠模型, 并随机分为模型组, 槲皮素低(5 mg/kg)、高(50 mg/kg)剂量组, SIRT1 抑制剂(EX527)组, 槲皮素+EX527 组, 每组 15 只, 另取 15 只作为假手术组。各组大鼠连续给药 2 周, 1 次/d, 末次给药 12 h 后, 观察大鼠排便和腹胀情况, 开腹观察结肠变化。免疫荧光法检测肽能神经递质蛋白基因产物 9.5 (PGP9.5)、M2 型巨噬细胞标记抗体-CD206 表达水平。苏木精-伊红(HE)观察结肠病理变化, 免疫组化法检测乙酰胆碱酯酶(AChE)、NLRP3 阳性表达变化。Western blotting 检测结肠组织 SIRT1、NLRP3、炎症因子[肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 、白细胞介素(IL)-1 $\beta$ ]、促神经恢复相关蛋白[骨形成蛋白-2(BMP-2)、骨形成蛋白受体(BMPR)]、神经节细胞相关因子[乙酰胆碱(ACh)、神经巢蛋白(Nestin)]表达。**结果** 与假手术组相比, 模型组大鼠处理段结肠组织神经节细胞减少、结肠黏膜炎症损伤加重, SIRT1 以及 M2 型巨噬细胞介导的抗炎和促神经恢复蛋白表达降低, NLRP3 炎性反应升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比, 槲皮素 5、50 mg/kg 组大鼠结肠组织炎症损伤缓解, SIRT1 以及 M2 型巨噬细胞介导的抗炎和促神经恢复蛋白表达升高, NLRP3 炎性反应降低 ( $P < 0.05$ ), 且槲皮素高剂量组改善效果优于低剂量组 ( $P < 0.05$ ); EX527 组可减弱槲皮素的上述作用 ( $P < 0.05$ )。**结论** 槲皮素可通过上调 SIRT1 表达, 抑制 NLRP3 促炎反应, 提高 M2 型巨噬细胞介导的抗炎和促神经恢复作用, 改善实验性巨结肠大鼠结肠炎症损伤。

**关键词:** 槲皮素; 先天性巨结肠; 沉默信息调控因子 1; NOD 样受体蛋白 3; 肠损伤; 乙酰胆碱

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2022)04-0673-08

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.04.001

## Effects of quercetin on intestinal injury in experimental megacolon rats by regulating SIRT1/NLRP3 signaling pathway

TANG Xu, ZHAO Cheng-peng, DUAN Yong-fu, ZHOU Xiao-bo

Department of Pediatric Surgery, Nanyang Central Hospital, Nanyang 473000, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of quercetin on intestinal injury in experimental hirscholon rats through regulating silencing message modulator 1 (SIRT1)/Nod-like receptor protein 3 (NLRP3) signaling pathway. **Methods** Benzalkonium bromide infusion was used to induce the establishment of rat experimental megacolon models, and they were randomly divided into model group, quercetin low(5 mg/kg) and high (50 mg/kg) dose groups, SIRT1 inhibitor (EX527) group, quercetin + EX527 group, 15 per group, another 15 rats in the sham operation group. Rats in each group were administered for 2 weeks, once daily, 12 h after the last administration, the rat's defecation and abdominal distension were observed, and the abdomen was opened to observe changes in the colon. Immunofluorescence method was used to detect the expression levels of peptidergic neurotransmitter protein gene product 9.5 (PGP9.5) and M2 macrophage marker antibody-CD206. HE staining was used to observe the pathological changes of colon, immunohistochemical method was used to detect the positive expression of acetylcholinesterase (AChE) and NLRP3. Western blotting was used to detect the expression of SIRT1, NLRP3, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ , neurorestoration-related protein (BMP-2, BMPR), acetylcholine (ACh) and Nestin in colon tissues. **Results** Compared with the sham operation group, the rats in the model group had fewer ganglion cells in the treated colon tissue and more severe colonic mucosal inflammation, the activity of SIRT1 and the expression of anti-inflammatory and neurorestorative proteins mediated by M2 macrophages decreased, and the

收稿日期: 2021-12-20

基金项目: 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (LHGJ20200906)

作者简介: 唐旭 (1981—), 男, 主治医师, 硕士, 研究方向为小儿外科常见病、多发病。E-mail: m287960@163.com

inflammatory response of NLRP3 increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the inflammation in the colon tissue of rats in quercetin 5 and 50 mg/kg groups was alleviated, the activity of SIRT1 and the expression of anti-inflammatory and neurorestorative proteins mediated by M2 macrophages increased, and the inflammatory response of NLRP3 decreased ( $P < 0.05$ ), and the improvement effects of the high-dose quercetin group were better than those of the low-dose group ( $P < 0.05$ ). EX527 could attenuate the above-mentioned effects of quercetin ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Quercetin can up-regulate the expression of SIRT1, inhibit the pro-inflammatory response of NLRP3, enhance the anti-inflammatory and neurorestorative effects mediated by M2 macrophages, and improve the intestinal inflammatory injury in experimental hirscholon rats.

**Key words:** quercetin; hirschsprung's disease; SIRT1; NLRP3; intestinal injury; ACh

实验性巨结肠是指用化学方法损伤肠神经系统, 诱导建立的胃肠动力功能异常及炎症异常反应性疾病, 又称肠神经节细胞缺乏症<sup>[1]</sup>。巨噬细胞炎性浸润, 引起的免疫炎性反应, 是引起肠黏膜神经细胞减少, 巨结肠疾病并发小肠结肠炎的关键原因<sup>[2]</sup>。NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 受体活化是介导巨噬细胞活化、炎症级联反应扩大的关键转录因子<sup>[3]</sup>。沉默信息调控因子 1 (SIRT1) 为 NLRP3 的上游调控因子, 可通过抑制 NLRP3 活化, 来改善炎性疾病的发生发展<sup>[4]</sup>。槲皮素为天然黄酮类成分, 具有较好的抗炎、抗氧化等多种药理作用<sup>[5]</sup>。已有研究发现其对结肠炎相关疾病有较好的改善作用<sup>[6]</sup>。本研究从 SIRT1/NLRP3 通路方面探究槲皮素对实验性巨结肠大鼠结肠炎性损伤的影响, 以期为该病的临床治疗提供新的思路。

## 1 材料及方法

### 1.1 材料

SD 新生大鼠 93 只, 健康、清洁级, 7~8 日龄, 体质量 20~22 g, 购自中国科学院上海药物研究所 [生产许可 SCXK (沪) 2020-0005]。本研究经本院动物伦理委员会批准同意, 批准号 IACAU-01 (2021010804), 试验符合 3R 原则。

槲皮素 (质量分数为 98%, 北京索莱宝科技有限公司, 货号 A0083); SIRT1 抑制剂 (EX527, 上海一研生物科技有限公司, 货号 EY-20097); 苏木精-伊红 (HE) 染色液 (北京伊塔生物科技有限公司, 货号 YT8310)。肽能神经递质蛋白基因产物 9.5 (PGP9.5, 货号 ab108986)、M2 型巨噬细胞活化标记抗体 CD206 (货号 ab64693)、乙酰胆碱酯酶 (AChE, 货号 ab97299)、NLRP3 (货号 ab263899)、SIRT1 (货号 ab189494)、肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ , 货号 ab183218)、IL-1 $\beta$  (货号 ab254360)、骨形成蛋白-2 (BMP-2, 货号 ab214821)、骨形成蛋白受体 (BMPR, 货号 ab175385)、乙酰胆碱 (ACh, 货号 ab259859)、神经巢蛋白 (Nestin, 货号 ab221660)

抗体均购自美国 Abcam 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验性巨结肠模型建立及分组、给药** 参照文献方法<sup>[7]</sup>, 将大鼠麻醉后, 于中下腹处开腹, 暴露降结肠并用纱布包裹, 每隔 5 min 在纱布上滴 1% 苯扎溴铵 20  $\mu$ L, 40 min 后移去纱布, 用温生理盐水冲洗结肠及腹腔后关腹, 术后 8 周观察大鼠排便及腹胀情况, 若大鼠出现腹胀及排便减少现象, 随机取 2 只大鼠, 开腹后取处理段结肠组织行 HE 染色观察, 发现出现神经节细胞胞质减少、细胞排列紊乱等类似于人类病理症状<sup>[8]</sup>, 视为造模成功 (共成功 75 只, 有 1 只大鼠在造模第 3 周死亡, 有 2 只大鼠在造模的 5~8 周死亡, 死亡大鼠结肠均出现条索状坏死现象)。将建模成功的大鼠随机分为模型组, 槲皮素低剂、高剂量 (5、50 mg/kg) 组, EX527 组, 槲皮素+EX527 组, 每组 15 只。另取 15 只大鼠, 开腹后于降结肠部位滴注等体积的温生理盐水后关腹, 8 周后作为假手术组。

各组均于造模成功后, 开始给药干预, 参照文献方法<sup>[9]</sup>设置槲皮素低、高剂量, 并 ig 给药 1 次/d (用生理盐水稀释成 0.5、5.0 mg/mL 的混悬液, 按 10 mL/kg 的体积给药), SIRT1 抑制剂 EX527 参照文献方法<sup>[9]</sup>设置剂量 5 mg/kg, 并 ip 给药 (生理盐水稀释成 0.50 mg/mL 的混悬液, 按 10 mL/kg 的体积给药); 槲皮素+EX527 组 ig 给予槲皮素 50 mg/kg 的同时 ip 给予 EX527。假手术组和模型组大鼠给予 10 mL/kg 的生理盐水。各组连续给药 2 周后, 进行后续试验。

**1.2.2 大鼠生存、一般状态、结肠外观形态变化检测** 大鼠于造模和给药期间记录死亡状况, 观察腹胀、排便、精神及行为状态变化。于给药结束后断头处死大鼠开腹, 观察结肠形态变化, 迅速取处理段结肠组织, 剪取约 1 cm 置于-80  $^{\circ}$ C 保存, 剩余组织于 4% 多聚甲醛中固定后, 制成厚为 5  $\mu$ m 的石蜡切片, 备用。

**1.2.3 结肠组织 HE 染色和炎症评分检测** 取部分石蜡切片,经脱蜡及水化处理,进行 HE 染色(按说明书方法进行)后封片,于显微镜下观察神经节细胞形态变化,并随机取 5 个视野,进行炎症评分:0 分,结肠黏膜正常;1~2 分,隐窝增大,每高倍镜下隐窝脓肿小于 2 个;3 分,隐窝脓肿大于 2 个;4 分,管腔内有纤维素样脓性坏死;5 分,肠壁全层坏死或穿孔<sup>[10]</sup>。

**1.2.4 免疫荧光法检测结肠组织中神经元细胞、M2 型巨噬细胞变化** 取部分结肠组织石蜡切片,脱蜡、水化及曲拉透化处理,分别滴加含荧光素标记的一抗 PGP9.5 和 M2 型巨噬细胞标记抗体 CD206(稀释倍数 1:100)孵育过夜后,滴加异硫氰酸荧光素(FITC)Rabbit Anti-Goat 标记的荧光 IgG 二抗(1:100)室温孵育 30 min,4',6'-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)核染 10 min 后封片,于荧光显微镜下观察拍照,Image Pro Plus 6.0 图像分析系统分析单位面积内阳性染色的平均光密度值,以阳性染色的平均光密度变化评估神经元细胞、M2 型巨噬细胞数目变化。

**1.2.5 免疫组化法检测结肠组织 AChE、NLRP3 阳性表达变化** 取部分石蜡切片,脱蜡、水化、抗原修复、曲拉通破膜透化处理,4 °C 分别滴入一抗抗体(AChE、NLRP3, 1:200)孵育过夜,加入二抗 IgG(1:300)室温孵育 30 min,二氨基联苯胺(DAB)显色处理及封片后,光镜下观察拍照,用 Image Pro Plus 6.0 图像分析系统分析单位面积内棕褐色区域光密度值。

**1.2.6 Western blotting 法检测结肠组织经恢复通路蛋白、神经节细胞相关蛋白及 SIRT1/NLRP3 通路蛋白表达** 取冰冻结肠组织,4 °C 解冻后,剪碎、匀浆并提取蛋白,BCA 法测定蛋白总浓度,取 60 μg 蛋白行电泳、转膜反应,室温下用 5%脱脂奶粉封闭 2 h 后,滴加 1:400 的一抗抗体(SIRT1、NLRP3、TNF-α、IL-1β、BMP-2、BMPR、Ach、Nestin)及 1:600 的内参 β-actin 抗体,4 °C 孵育过夜后,滴入 1:800 的生物素 HRP 二抗室温孵育 50 min,增强化学发光法显色及曝光处理后拍照,用 Image-J 软件分析蛋白条带相对灰度值。

### 1.3 统计学分析

实验数据用 SPSS 22.0 软件统计,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较及组间多重比较,分别用单因素方差分析及 SNK-*q* 检验,两组间单独比较用 *t*

检验, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 槲皮素对大鼠生存、一般状态 and 肠外观形态变化的影响

假手术组大鼠给药干预期间无死亡,大鼠无腹胀和便秘现象,结肠外观形态正常。模型组和槲皮素+EX527 组大鼠造模后给药干预的 8~10 周内,均死亡 2 只,大鼠生存率为 86.67% (13/15),且大鼠腹胀如鼓现象较多,排便较少,死亡大鼠解剖后,结肠均出现点状及条索状坏死现象,成活大鼠解剖后观察可见远段结肠痉挛、细小,处理段结肠扩张,肠腔内有大量呈褐色的干结粪便。槲皮素 5、50 mg/kg 组大鼠在给药干预期间无死亡,远段结肠痉挛、细小及处理段结肠扩张等外观形态变化缓解,腹胀及便秘症状减轻。EX527 组大鼠在给药干预的第 8~10 周内死亡 5 只,生存率为 66.67% (10/15),腹胀、便秘及结肠肠腔形态变化最严重,可见脓血性坏死。

### 2.2 槲皮素对大鼠结肠组织病理损伤及炎症损伤评分的影响

假手术组大鼠可见结肠肠壁内有正常神经丛,神经节细胞胞质丰富、核圆居中,数量正常,结肠黏膜形态正常。模型组可见肠管肌间及黏膜下神经丛内神经节细胞形态较小,核仁不明显,胞质稀松,神经丛增粗且排列紊乱,结肠黏膜隐窝脓肿、增大,炎症损伤评分高于假手术组( $P < 0.05$ )。槲皮素 5、50 mg/kg 剂量组大鼠肠管肌间及黏膜下神经丛内神经节细胞形态逐渐恢复正常,神经丛排列趋于整齐,结肠黏膜隐窝脓肿减少,炎症评分低于模型组( $P < 0.05$ ),且槲皮素 50 mg/kg 组对结肠病理损伤的改善效果优于槲皮素 5 mg/kg 组。EX527 组大鼠肠管肌间及黏膜下神经丛内神经节细胞减少,核仁消失不见,神经丛增粗及排列紊乱严重,结肠黏膜隐窝脓肿增多,炎症评分高于模型组( $P < 0.05$ )。槲皮素+EX527 组大鼠结肠病理损伤较槲皮素 5、50 mg/kg 剂量组严重,炎症损伤评分高于槲皮素 5、50 mg/kg 剂量组( $P < 0.05$ ),见图 1、表 1。

### 2.3 槲皮素对大鼠结肠组织神经元细胞、M2 型巨噬细胞活化的影响

绿色荧光标记的 PGP9.5 可代表结肠肌层神经元;红色荧光标记的 CD206 可代表 M2 型巨噬细胞。免疫荧光染色显示,模型组大鼠 PGP9.5、CD206 荧光染色强度均低于假手术组( $P < 0.05$ ),预示结

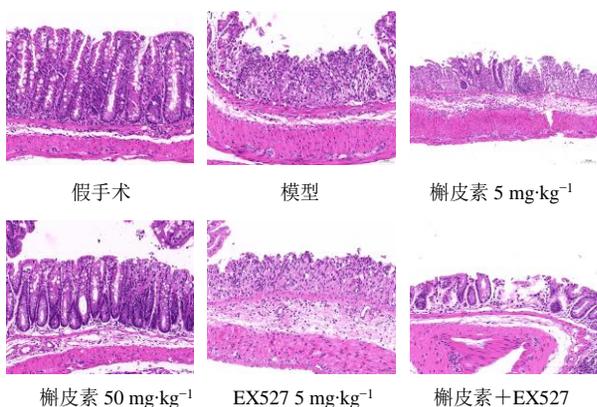


图 1 大鼠结肠组织处理段 HE 染色图 (×400)

Fig. 1 HE staining of treated section of rat colon tissue (×400)

表 1 大鼠结肠组织炎症损伤评分比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of inflammatory injury scores in rat colon tissue ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | n/只 | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 炎症损伤评分                   |
|-----------|-----|---------------------------|--------------------------|
| 假手术       | 15  | —                         | 0.00±0.00                |
| 模型        | 13  | —                         | 3.55±0.32*               |
| 槲皮素       | 15  | 5                         | 2.83±0.22#               |
|           | 15  | 50                        | 1.92±0.15 <sup>#Δ</sup>  |
| EX527     | 10  | 5                         | 4.79±0.43 <sup>#Δ▲</sup> |
| 槲皮素+EX527 | 13  | 50+5                      | 3.50±0.36 <sup>Δ▲</sup>  |

与假手术组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ; 与槲皮素 5 mg·kg<sup>-1</sup> 组比较: <sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ; 与槲皮素 50 mg·kg<sup>-1</sup> 组比较: <sup>▲</sup> $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs sham operation group; # $P < 0.05$  vs model group; <sup>Δ</sup> $P < 0.05$  vs quercetin 5 mg·kg<sup>-1</sup> group; <sup>▲</sup> $P < 0.05$  vs quercetin 50 mg·kg<sup>-1</sup> group

肠组织神经元细胞数目及 M2 型巨噬细胞活化数目减少。与模型组相比, 槲皮素 5、50 mg/kg 剂量组大鼠结肠组织 PGP9.5、CD206 荧光染色强度升高 ( $P < 0.05$ ), 且呈剂量相关性; EX527 组大鼠结肠组织 PGP9.5、CD206 荧光染色强度降低 ( $P < 0.05$ )。与槲皮素 5、50 mg/kg 剂量组相比, 槲皮素+EX527 组 PGP9.5、CD206 荧光染色强度降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 2、表 2。

#### 2.4 槲皮素对大鼠 AChE、NLRP3 表达的影响

AChE、NLRP3 阳性染色呈棕褐色。免疫组化染色结果显示, 假手术组大鼠可见肠管肌间及黏膜下层 AChE、NLRP3 阳性染色较弱。模型组大鼠肠管肌间及黏膜下层 AChE、NLRP3 阳性染色强于假手术组 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比, 槲皮素 5、50 mg/kg 剂量组大鼠肠管肌间及黏膜下层 AChE、NLRP3 阳性染色强度降低 ( $P < 0.05$ ), 且呈剂量相关性; EX527 组 AChE、NLRP3 阳性染色强度升高 ( $P < 0.05$ )。与槲皮素 5、50 mg/kg 剂量组相比, 槲皮素+EX527 组 AChE、NLRP3 阳性染色强度升高 ( $P < 0.05$ ), 见图 3、表 3。

#### 2.5 槲皮素对大鼠结肠组织促神经恢复通路蛋白、神经节细胞相关因子蛋白表达的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠 BMP-2、BMPR、Ach、Nestin 蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比, 槲皮素 5、50 mg/kg 剂量组大鼠 BMP-2、BMPR、Ach、Nestin 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ ), 且呈剂量相关性; EX527 组大鼠 BMP-2、BMPR、Ach、Nestin

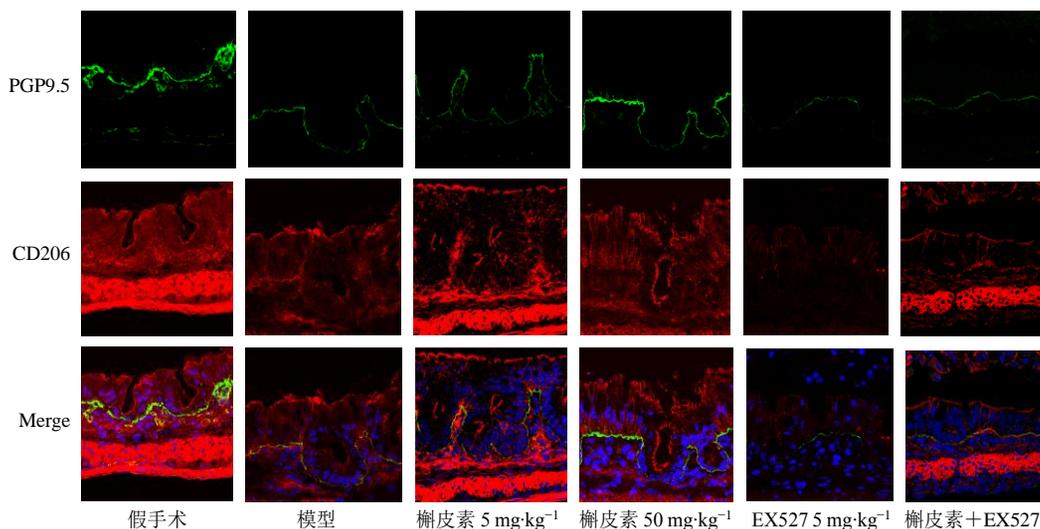


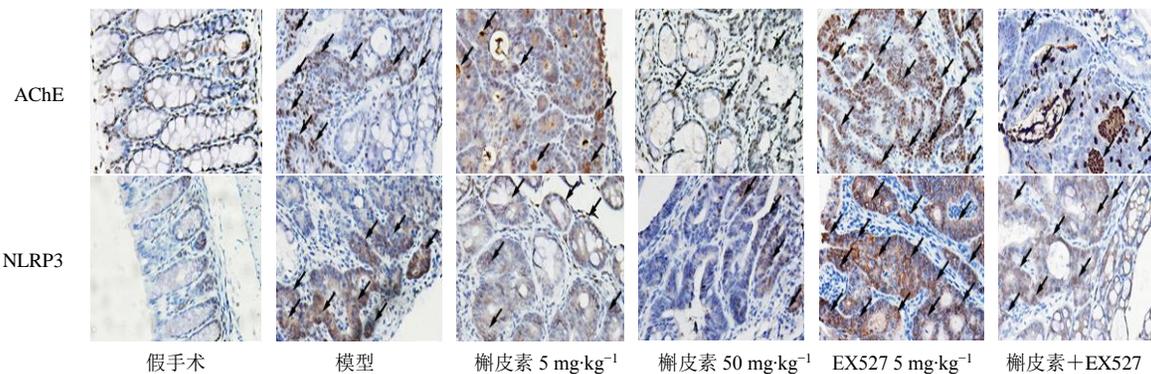
图 2 大鼠结肠组织处理段 PGP9.5、CD206 荧光染色图

Fig. 2 Fluorescence staining of PGP9.5 and CD206 in the treated section of rat colon tissue

表 2 大鼠结肠组织 PGP9.5、CD206 荧光染色比较 ( $\bar{x} \pm s$ )Table 2 Comparison of PGP9.5 and CD206 fluorescence staining in rat colon tissue ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | n/只 | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | PGP9.5 荧光强度/mm <sup>2</sup> | CD206 荧光强度/mm <sup>2</sup> |
|-----------|-----|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 假手术       | 15  | —                         | 1.80±0.18                   | 1.68±0.16                  |
| 模型        | 13  | —                         | 0.55±0.02*                  | 0.44±0.04*                 |
| 槲皮素       | 15  | 5                         | 0.93±0.09 <sup>#</sup>      | 0.79±0.07 <sup>#</sup>     |
|           | 15  | 50                        | 1.62±0.15 <sup>#Δ</sup>     | 1.42±0.15 <sup>#Δ</sup>    |
| EX527     | 10  | 5                         | 0.11±0.01 <sup>#Δ▲</sup>    | 0.19±0.03 <sup>#Δ▲</sup>   |
| 槲皮素+EX527 | 13  | 50+5                      | 0.57±0.06 <sup>Δ▲</sup>     | 0.47±0.04 <sup>Δ▲</sup>    |

与假手术组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与槲皮素 5 mg·kg<sup>-1</sup> 组比较: <sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ; 与槲皮素 50 mg·kg<sup>-1</sup> 组比较: <sup>▲</sup> $P < 0.05$   
<sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs sham operation group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group; <sup>Δ</sup> $P < 0.05$  vs quercetin 5 mg·kg<sup>-1</sup> group; <sup>▲</sup> $P < 0.05$  vs quercetin 50 mg·kg<sup>-1</sup> group



箭头所示为棕黄色阳性染色细胞

Arrows indicate brown-yellow positive stained cells

图 3 大鼠结肠组织处理段 AChE、NLRP3 免疫组化染色图

Fig. 3 Immunohistochemical staining of AChE and NLRP3 in treated sections of rat colon tissue

表 3 大鼠结肠组织 AChE、NLRP3 阳性染色强度比较 ( $\bar{x} \pm s$ )Table 3 Comparison of positive staining intensity of AChE and NLRP3 in rat colon tissue ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | n/只 | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | AChE 阳性染色强度/mm <sup>2</sup> | NLRP3 阳性染色强度/mm <sup>2</sup> |
|-----------|-----|---------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 假手术       | 15  | —                         | 0.10±0.01                   | 0.18±0.01                    |
| 模型        | 13  | —                         | 1.35±0.12*                  | 1.44±0.14*                   |
| 槲皮素       | 15  | 5                         | 0.90±0.09 <sup>#</sup>      | 0.70±0.07 <sup>#</sup>       |
|           | 15  | 50                        | 0.22±0.02 <sup>#Δ</sup>     | 0.23±0.02 <sup>#Δ</sup>      |
| EX527     | 10  | 5                         | 1.71±0.17 <sup>#Δ▲</sup>    | 1.79±0.16 <sup>#Δ▲</sup>     |
| 槲皮素+EX527 | 13  | 50+5                      | 1.33±0.13 <sup>Δ▲</sup>     | 1.39±0.14 <sup>Δ▲</sup>      |

与假手术组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与槲皮素 5 mg·kg<sup>-1</sup> 组比较: <sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ; 与槲皮素 50 mg·kg<sup>-1</sup> 组比较: <sup>▲</sup> $P < 0.05$   
<sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs sham operation group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group; <sup>Δ</sup> $P < 0.05$  vs quercetin 5 mg·kg<sup>-1</sup> group; <sup>▲</sup> $P < 0.05$  vs quercetin 50 mg·kg<sup>-1</sup> group

蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ )。与槲皮素 5、50 mg/kg 剂量组相比, 槲皮素+EX527 组大鼠的 BMP-2、BMPR、Ach、Nestin 蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 4、表 4。

**2.6 槲皮素对 SIRT1/NLRP3 通路蛋白表达的影响**  
 与假手术组相比, 模型组大鼠 SIRT1 蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ ), NLRP3、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  蛋白表达

升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比, 槲皮素 5、50 mg/kg 剂量组大鼠 SIRT1 蛋白表达升高, NLRP3、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ ), 且呈剂量相关性; EX527 组大鼠 SIRT1 蛋白表达显著降低, NLRP3、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ )。与槲皮素 5、50 mg/kg 剂量组相比, 槲皮素+EX527 组 SIRT1 蛋白表达显著降低, NLRP3、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  蛋白表

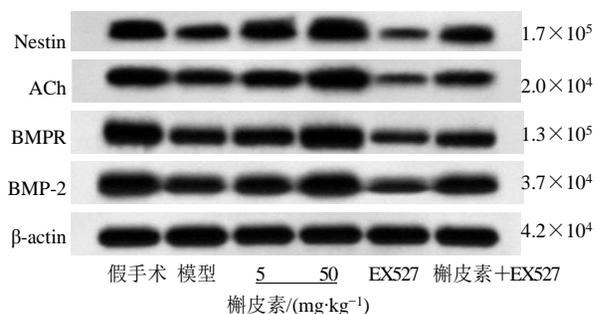


图 4 大鼠处理段结肠组织 BMP-2、BMPR、ACh、Nestin 蛋白表达免疫印迹图

Fig. 4 Immunoblotting of BMP-2, BMPR, ACh and Nestin protein expression in colon tissue of treated segment of rats

表 4 大鼠结肠组织 BMP-2、BMPR、ACh、Nestin 蛋白相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Comparison of BMP-2, BMPR, ACh, Nestin protein expression in rat colon tissue ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | n/只 | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | BMP-2/ $\beta$ -actin  | BMPR/ $\beta$ -actin   | ACh/ $\beta$ -actin  | Nestin/ $\beta$ -actin   |
|-----------|-----|---------------------------|--|--|--|--|
| 假手术       | 15  | —                         | 1.17 $\pm$ 0.11  | 1.18 $\pm$ 0.10  | 1.19 $\pm$ 0.09  | 1.14 $\pm$ 0.07  |
| 模型        | 13  | —                         | 0.31 $\pm$ 0.02*   | 0.37 $\pm$ 0.03*   | 0.41 $\pm$ 0.04*   | 0.48 $\pm$ 0.04*   |
| 槲皮素       | 15  | 5                         | 0.60 $\pm$ 0.06 <sup>#</sup>   | 0.64 $\pm$ 0.06 <sup>#</sup>   | 0.70 $\pm$ 0.07 <sup>#</sup>   | 0.66 $\pm$ 0.06 <sup>#</sup>   |
|           | 15  | 50                        | 1.02 $\pm$ 0.10 <sup>#<math>\Delta</math></sup>                            | 1.09 $\pm$ 0.09 <sup>#<math>\Delta</math></sup>                            | 1.11 $\pm$ 0.02 <sup>#<math>\Delta</math></sup>                            | 1.00 $\pm$ 0.08 <sup>#<math>\Delta</math></sup>                            |
| EX527     | 10  | 5                         | 0.11 $\pm$ 0.01 <sup>#<math>\Delta</math><math>\blacktriangle</math></sup> | 0.15 $\pm$ 0.01 <sup>#<math>\Delta</math><math>\blacktriangle</math></sup> | 0.16 $\pm$ 0.01 <sup>#<math>\Delta</math><math>\blacktriangle</math></sup> | 0.19 $\pm$ 0.01 <sup>#<math>\Delta</math><math>\blacktriangle</math></sup> |
| 槲皮素+EX527 | 13  | 50+5                      | 0.36 $\pm$ 0.03 <sup>#<math>\Delta</math><math>\blacktriangle</math></sup> | 0.39 $\pm$ 0.03 <sup>#<math>\Delta</math><math>\blacktriangle</math></sup> | 0.43 $\pm$ 0.03 <sup>#<math>\Delta</math><math>\blacktriangle</math></sup> | 0.49 $\pm$ 0.04 <sup>#<math>\Delta</math><math>\blacktriangle</math></sup> |

与假手术组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与槲皮素 5 mg·kg<sup>-1</sup> 组比较:  <sup>$\Delta$</sup>  $P < 0.05$ ; 与槲皮素 50 mg·kg<sup>-1</sup> 组比较:  <sup>$\blacktriangle$</sup>  $P < 0.05$   
<sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs sham operation group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group;  <sup>$\Delta$</sup>  $P < 0.05$  vs quercetin 5 mg·kg<sup>-1</sup> group;  <sup>$\blacktriangle$</sup>  $P < 0.05$  vs quercetin 50 mg·kg<sup>-1</sup> group

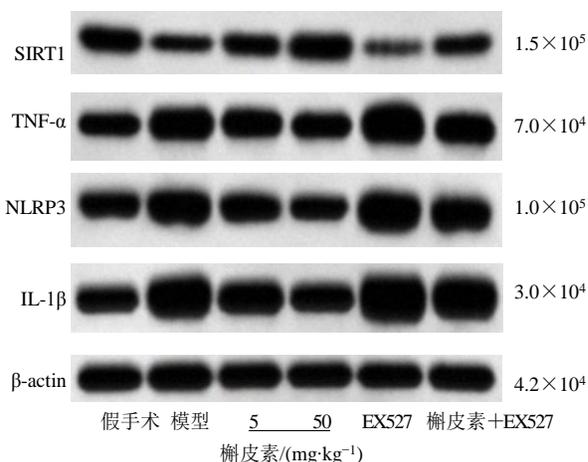


图 5 大鼠处理段结肠组织 SIRT1、NLRP3、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  蛋白表达免疫印迹图

Fig. 5 Western blotting of SIRT1, NLRP3, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  protein expression in colon tissue of rat treated segment

近来研究发现, 实验性巨结肠结肠神经节的缺失, 可促进 AchE 活性增加, 并降解神经递质 Ach

达升高 ( $P < 0.05$ ), 见图 5、表 5。

### 3 讨论

胃肠蠕动、营养吸收等胃肠生理活动, 需要肠神经节细胞及肠神经系统来协调完成<sup>[11]</sup>。而先天性巨结肠患儿在经历无神经节肠手术切除术、健康神经节组织移植术等术前及术后过程中, 均会发生小肠结肠炎, 并导致急性腹胀、腹泻、发烧, 甚至败血症、器官衰竭等症状的产生, 而危及生命<sup>[12]</sup>。实验性巨结肠可模拟人类先天巨结肠症状, 但实验性巨结肠肠神经节支配的神经信号异常、肠黏膜表型改变及微生物失调等小肠结肠炎发生的潜在机制并不完全清楚。

的产生, 使 Ach 介导的肠道生理功能、促进肠道免疫功能及抗肠道炎症反应等作用减弱, 而导致结肠炎、肠梗阻等发生<sup>[13]</sup>。研究发现, 儿科巨结肠患者无神经节结肠组织的肌间和黏膜下神经丛、直肠乙状结肠中均表现出 AchE 活性、巨噬细胞浸润、炎症因子如 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等的增加, 证实 AchE 活性增加, 与先天性巨结肠结肠炎症发生呈正相关<sup>[3]</sup>。PGP9.5 是肠神经节细胞的标志蛋白, Ach 和 Nestin 与神经节生长及发育关系密切<sup>[14]</sup>。本研究发现, 模型组大鼠处理段结肠组织中神经节细胞减少 (PGP9.5 阳性表达减少, Ach 和 Nestin 蛋白表达减少)、结肠隐窝增大、肿胀及黏膜层炎症损伤等病理损伤明显, AchE 活性及大鼠腹胀、排便较少、粪便颗粒减少等便秘症状严重, 提示造模成功。

巨噬细胞是重要的免疫细胞, 在杀灭肠道菌群、促进组织修复方面有重要作用。巨噬细胞 M1 型促炎反应表型转换, 释放的 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等促炎因子, 在杀灭肠道微生物的同时, 也会损伤肠道黏

表 5 大鼠结肠组织 SIRT1、NLRP3、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  蛋白相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )Fig. 5 Immunoblot of SIRT1, NLRP3, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  protein expression in colon tissue of treated segment of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | n/只 | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | SIRT1/ $\beta$ -actin              | NLRP3/ $\beta$ -actin              | TNF- $\alpha$ / $\beta$ -actin     | IL-1 $\beta$ / $\beta$ -actin      |
|-----------|-----|---------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 假手术       | 15  | —                         | 1.19 $\pm$ 0.11                    | 1.08 $\pm$ 0.10                    | 1.09 $\pm$ 0.09                    | 1.14 $\pm$ 0.07                    |
| 模型        | 13  | —                         | 0.34 $\pm$ 0.03*                   | 2.07 $\pm$ 0.20*                   | 1.99 $\pm$ 0.19*                   | 2.48 $\pm$ 0.24*                   |
| 槲皮素       | 15  | 5                         | 0.62 $\pm$ 0.05#                   | 1.64 $\pm$ 0.06#                   | 1.60 $\pm$ 0.15#                   | 1.86 $\pm$ 0.16#                   |
|           | 15  | 50                        | 1.03 $\pm$ 0.11# $\Delta$          | 1.29 $\pm$ 0.12# $\Delta$          | 1.21 $\pm$ 0.12# $\Delta$          | 1.30 $\pm$ 0.13# $\Delta$          |
| EX527     | 10  | 5                         | 0.12 $\pm$ 0.01# $\Delta$ $\Delta$ | 2.85 $\pm$ 0.21# $\Delta$ $\Delta$ | 2.66 $\pm$ 0.22# $\Delta$ $\Delta$ | 2.99 $\pm$ 0.24# $\Delta$ $\Delta$ |
| 槲皮素+EX527 | 13  | 50+5                      | 0.37 $\pm$ 0.03 $\Delta$ $\Delta$  | 2.00 $\pm$ 0.20 $\Delta$ $\Delta$  | 1.90 $\pm$ 0.20 $\Delta$ $\Delta$  | 2.40 $\pm$ 0.23 $\Delta$ $\Delta$  |

与假手术组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ; 与槲皮素 5 mg·kg<sup>-1</sup> 组比较:  $\Delta P < 0.05$ ; 与槲皮素 50 mg·kg<sup>-1</sup> 组比较:  $\Delta\Delta P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs sham operation group; # $P < 0.05$  vs model group;  $\Delta P < 0.05$  vs quercetin 5 mg·kg<sup>-1</sup> group;  $\Delta\Delta P < 0.05$  vs quercetin 50 mg·kg<sup>-1</sup> group

膜层神经组织<sup>[15]</sup>。而结肠组织中 M2 型巨噬细胞可促进肠道分泌 BMP-2, 并与肠神经元细胞膜上的 BMPR 结合, 发挥促肠道神经生长发育、纠正胆碱能神经元丢失、缩短结肠传输等作用, 从而改善胃肠道功能紊乱<sup>[15-16]</sup>。但巨结肠患者 AChE 在降低 ACh 分泌, 干扰神经生长发育的同时, 还可能干扰巨噬细胞向 M2 型抗炎表型转换, 导致受损结肠修复减弱, 肠神经毒性反应加重<sup>[3]</sup>。本研究发现, 巨结肠模型大鼠结肠组织中巨噬细胞 M2 型数量减少, BMP-2、BMPR 表达水平也明显降低。

黄酮类成分槲皮素具有较好的抗炎作用<sup>[17]</sup>, 已有研究证实, 其能促进巨噬细胞向 M2 型转换来修复脊髓炎性损伤<sup>[18]</sup>。另外, 槲皮素也被证实是缓解结肠炎性损伤的重要成分之一<sup>[19]</sup>。本研究发现, 槲皮素剂量越高, 先天性巨结肠大鼠结肠组织中 M2 型巨噬细胞数量越高, 促神经恢复蛋白 BMP-2、BMPR 表达水平越高, 神经节细胞减少、结肠隐窝增大、肿胀及黏膜层炎性浸润等病理损伤改善越好, AChE 活性升高及腹胀、便秘症状改善越显著, 证实槲皮素可能为纠正先天性巨结肠肠神经节减少、改善结肠炎性损伤的潜在治疗药物。

SIRT1 不仅可参与巨噬细胞极化过程, 且能调控下游信号 NLRP3 活化, 来参与炎性疾病发生发展过程。已有研究证实 M1 型巨噬细胞活化后, SIRT1 表达降低, 但外源性促进 M2 型巨噬细胞活化后, SIRT1 活性增强<sup>[20]</sup>。Zhang 等<sup>[20]</sup>发现特异性敲除巨噬细胞中 SIRT1 基因, M1 型巨噬细胞促炎活性增强, 证实 SIRT1 活化, 在巨噬细胞极化过程中发挥重要作用。NLRP3 活化后可募集凋亡相关斑点样蛋白, 来诱导炎性因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等成熟分泌, 介导巨噬细胞向损伤部位趋化、浸润而介导炎性疾病的发生<sup>[21]</sup>。但 NLRP3 的活性却受 SIRT1

调控, 陆大浩等<sup>[22]</sup>研究发现, SIRT1 上调后抑制神经炎性反应作用, 与抑制 NLRP3 活化有关。本研究发现, 先天性巨结肠大鼠结肠组织中 SIRT1 表达降低, M2 型巨噬细胞数目降低, NLRP3 促炎活性升高, 进一步抑制先天性巨结肠大鼠中 SIRT1 表达后, M2 型巨噬细胞数目及促神经恢复蛋白 BMP-2、BMPR 表达进一步被抑制, NLRP3 促炎反应进一步增强, 先天性巨结肠大鼠肠神经节减少、结肠炎性损伤进一步加重。槲皮素也可通过干预 SIRT1/NLRP3 通路活性, 来参与疾病的发展<sup>[6]</sup>。本研究发现, 槲皮素剂量越高, SIRT1 活性升高越明显, NLRP3 活性抑制作用越显著, 而使用 SIRT1 抑制剂 EX527 后, 槲皮素的促 M2 型巨噬细胞活化及促神经恢复蛋白表达水平被削弱, 而其纠正大鼠肠神经节减少、改善结肠炎性损伤的作用也被明显减弱, 证实槲皮素治疗巨结肠大鼠症状作用, 可能与干预 SIRT1/NLRP3 通路活性有关。

综上所述, 槲皮素可通过上调 SIRT1 表达, 抑制 NLRP3 促炎反应活化, 提高 M2 型巨噬细胞抗炎、促神经恢复作用, 改善实验性巨结肠大鼠结肠炎性损伤, 为槲皮素治疗先天性巨结肠的可能机制提供一定参考。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 徐纪荣, 金先庆, 陈小章. 实验性巨结肠大鼠模型的建立及其生物学特性 [J]. 重庆医科大学学报, 2005(4): 594-597.
- [2] Keck S, Galati-Fournier V, Kym U, et al. Lack of mucosal cholinergic innervation is associated with increased risk of enterocolitis in Hirschsprung's disease [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2021, 12(2): 507-545.
- [3] Shi Y, Lv Q, Zheng M, et al. NLRP3 inflammasome inhibitor INF39 attenuated NLRP3 assembly in

- macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 92: 107358.
- [4] Wang T, Wang J, Sun T, *et al.* Amelioration of Juglanin against LPS-Induced activation of NLRP3 inflammasome in chondrocytes mediated by SIRT1 [J]. *Inflammation*, 2021, 44(3): 1119-1129.
- [5] 黄海艳, 邹彦芬. 槲皮素抗氧化作用研究新进展 [J]. 中国中西医结合皮肤性病杂志, 2020, 19(1): 104-106.
- [6] 蔡剑辉, 任约翰, 厉金雷, 等. 槲皮素调控白细胞介素-6/信号转导及转录激活蛋白 3 信号通路在结肠炎性相关结肠癌小鼠模型的机制研究 [J]. 中国药物与临床, 2020, 20(6): 896-899.
- [7] 蒙信尧, 焦春雷, 颀孙迪迪, 等. 先天性巨结肠动物模型研究进展 [J]. 中华小儿外科杂志, 2019, 40(7): 656-660.
- [8] 孔萌, 刘秀美, 张士松, 等. 神经导向因子-2 及受体在先天性巨结肠中的表达 [J]. 中华实验外科杂志, 2021, 38(9): 1784-1787.
- [9] 杨荣培, 刘增长. 槲皮素通过调节 SIRT1/NF- $\kappa$ B 通路抑制压力超负荷大鼠左心室肥厚 [J]. 重庆医科大学学报, 2020, 45(4): 429-435.
- [10] 陈绪勇, 夏雪, 韦佳, 等. 巨噬细胞活化在先天性巨结肠相关性小肠结肠炎发病中的作用 [J]. 中华小儿外科杂志, 2015, 36(9): 661-665.
- [11] Seguela L, Gulbransen B D. Enteric glial biology, intercellular signalling and roles in gastrointestinal disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(8): 571-587.
- [12] 李付奎, 王建伟, 马沛, 等. 腹腔镜下巨结肠根治术治疗小儿先天性巨结肠的安全性及并发症发生率分析 [J]. 黑龙江中医药, 2019, 48(5): 169-170.
- [13] Yoshimaru K, Matsuura T, Yanagi Y, *et al.* Reevaluation of concurrent acetylcholinesterase and hematoxylin and eosin staining for Hirschsprung's disease [J]. *Pediatr Int*, 2021, 63(9): 1095-1102.
- [14] 张倩倩, 郑松柏. 结肠肌间神经丛随增龄的形态学变化研究 [J]. 胃肠病学, 2020, 25(4): 208-213.
- [15] 吴琳, 韩娟, 徐珊. 先天性巨结肠患儿结肠组织巨噬细胞表型变化及巨噬细胞活化与发病的相关性分析 [J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19(4): 369-373.
- [16] Huang S, Wang Y, Luo L, *et al.* BMP2 is related to Hirschsprung's disease and required for enteric nervous system development [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 523.
- [17] 王叶情, 王宇红, 邹蔓姝, 等. 槲皮素及其糖苷衍生物抗抑郁作用及其机制的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(5): 1548-1557.
- [18] 卢桃利, 霍芳芳, 翟中杰, 等. 槲皮素促进小鼠脊髓损伤后巨噬细胞表型转变及功能恢复 [J]. 基础医学与临床, 2018, 38(5): 686-691.
- [19] 刘涛, 陈新怡, 朱晓彤, 等. 溃疡性结肠炎的关键致病基因及治疗中药活性成分筛选 [J]. 山东医药, 2021, 61(18): 33-38.
- [20] Zhang Z, Xu J, Liu Y, *et al.* Mouse macrophage specific knockout of SIRT1 influences macrophage polarization and promotes angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation [J]. *J Genet Genomics*, 2018, 45(1): 25-32.
- [21] Qiao S, Lv C, Tao Y, *et al.* Arctigenin disrupts NLRP3 inflammasome assembly in colonic macrophages via downregulating fatty acid oxidation to prevent colitis-associated cancer [J]. *Cancer Lett*, 2020, 491: 162-179.
- [22] 陆大浩, 戴晨, 王骁颖, 等. SIRT1 在电针减轻大鼠脑卒中后中枢性痛中的作用:与 NLRP3 的关系 [J]. 中华麻醉学杂志, 2021, 41(4): 482-485.

[责任编辑 高源]