

低聚葡萄籽原花青素对葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠溃疡性结肠炎的影响及作用机制

全 帅^{1,2}, 吕开原^{1,2}, 李新宇^{1,2}, 刘岱琳^{1,2*}, 胡 骁^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 武警后勤学院, 天津 300309

摘要: 目的 探讨低聚葡萄籽原花青素(GSPE)对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的小鼠溃疡性结肠炎(UC)的影响及作用机制。方法 将 SPF 级 C57 小鼠随机分为对照组、模型组、阳性药组(柳氮磺吡啶组)及 GSPE 低、中、高剂量(125、250、500 mg/kg)组, 对照组给予正常饮用水, 其他组均自由饮用 3% DSS 水溶液, 连续饮用 7 d, 诱导小鼠 UC 模型, 每天记录小鼠体质量、便血、便型等症状变化, 药物干预治疗 7 d 后断头取血, 收集结肠和脾脏, 记录结肠长度、脾脏质量变化情况。HE 染色评估小鼠结肠黏膜组织病理变化, ELISA 法检测血清和结肠组织中炎症因子白细胞介素-6(IL-6)、IL-1 β 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及细胞因子一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平, 免疫组化分析结肠组织上皮细胞中血红素加氧酶-1(HO-1)、核转录因子- κ B(NF- κ B)、转录因子 E2 相关因子 2(Nrf2)及 Keap-1 蛋白表达水平。结果 与模型组比较, GSPE 中、高剂量组小鼠体质量下降相对缓慢, 小鼠腹泻、便血症状改善明显; 给药后小鼠血清及结肠组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、NO、MDA 水平较模型组显著降低, SOD 水平则显著升高($P < 0.01$); 病理组织切片分析发现, GSPE 高剂量组小鼠结肠黏膜病理损伤显著降低。免疫组化分析结果显示 GSPE 低、中、高剂量可显著降低 NF- κ B 及 Keap-1 蛋白表达水平, 升高 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平($P < 0.01$)。结论 GSPE 能够有效改善 DSS 诱导的 UC 症状, 通过调节氧化应激相关蛋白 Nrf2、HO-1 和炎症通路蛋白 NF- κ B 的表达, 进而影响氧化应激指标 SOD、MDA 和炎症因子的变化, 降低结肠组织的病理损伤, 对 UC 的治疗与预防具有重要的价值。

关键词: 低聚葡萄籽原花青素; DSS; 溃疡性结肠炎; 氧化应激; 炎症

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)01-0149-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.01.020

Effect of oligomeric grape seed proanthocyanidins on DSS-induced ulcerative colitis in mice and its mechanism

QUAN Shuai^{1,2}, LV Kai-yuan^{1,2}, LI Xin-yu^{1,2}, LIU Dai-lin^{1,2}, HU Xiao²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Logistics University of People's Armed Police Force, Tianjin 300309, China

Abstract: Objective To investigate the effect of oligosaccharide grape seed proanthocyanins (GSPE) on dextran sulphate sodium salt (DSS)-induced ulcerative colitis (UC) in mice and its mechanisms. **Methods** SPF-class C57 mice were randomly divided into normal group, model group, positive group (sulfasalazine group), and GSPE groups (125, 250, 500 mg/kg). The normal group was given pure water, and the other groups were free to drink 3% DSS aqueous solution for 7 d to induce the model of UC in mice. The changes of body weight, hematochezia and stool type were recorded every day. After seven days of treatment, blood, colons and spleens were collected, and the length of the colon and the weight of the spleen were recorded. HE staining was used to evaluate the pathological changes of colonic mucosa in mice. The expression of interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), and tumor necrosis factor TNF- α in serum and colon tissues and the levels of NO, MDA, and SOD were detected by ELISA. The changes of HO-1, NF- κ B, and Nrf2 in colonic epithelial cells were analyzed by immunohistochemistry. **Results** Compared with the model group, the body weight of mice in GSPE

收稿日期: 2019-09-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81673693); 武警后勤学院创新团队基金项目(2018); 武警后勤学院博士启动金(WHB201710)

作者简介: 全 帅, 男, 硕士研究生, 研究方向为天然产物活性成分研究。E-mail: quanshuai2017@163.com

*通信作者 刘岱琳, 女, 教授, 研究方向为天然产物活性成分研究。

胡 骁, 男, 讲师, 研究方向为天然产物活性成分研究。

groups (250, 500 mg/kg) decreased relatively slowly, and the symptoms of diarrhea and hematochezia were improved significantly. The content of IL-1 β , IL-6, TNF- α , NO, and MDA in serum and colon tissues was much lower in the administration groups than those in the model group, while the content of SOD was significantly higher ($P < 0.01$). The pathological tissue analysis showed that the pathological damage of colonic mucosa in the high dose group of GSPE was obviously decreased. Immunohistochemical analysis showed that GSPE groups significantly decreased the expression of NF- κ B and increased the expression of Nrf2 and HO-1 ($P < 0.01$). **Conclusion** GSPE could effectively improve the symptoms of UC induced by DSS, and regulate the expression of oxidative stress-related proteins Nrf2, HO-1 and inflammatory pathway protein NF- κ B, and then affect the changes of oxidative stress indicators SOD, MDA and inflammatory factors. Therefore, GSPE plays an important role in the treatment and prevention of UC.

Key words: oligosaccharide grape seed proanthocyanins; dextran sulphate sodium salt; ulcerative colitis; oxidative stress; inflammation

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种发病机制尚不明确, 主要以腹痛、腹泻、血便等为主要临床表现的慢性非特异性免疫性炎症性肠病^[1]。疾病发展后期会波及大段肠腔, 引发中毒性结肠炎以及结肠癌^[2], 还有可能发生肠外并发症^[3], 临床治愈率低。目前临床上治疗 UC 主要以糖皮质激素、生物制剂和免疫抑制剂为主, 这些药物会对肝脏、神经系统产生毒副作用, 且会使病情反复导致恶化^[4]。研究发现中药、复方中药及天然药物治疗 UC 效果显著, 不良反应较少, 复发率较低^[5-6]。因此, 开发疗效确切、毒副作用小的天然药物作为临床替代用药已成为目前研究的热点^[7]。

原花青素属于缩合鞣质, 广泛存在于葡萄籽、花生、高粱、苹果等植物中, 尤以葡萄籽中含量最为丰富。原花青素是含有双黄酮衍生物的天然多酚化合物总称, 是由不同数量的儿茶素、表儿茶素或没食子酸经 C4-C6 或 C4-C8 键合而成。根据聚合度的不同将 2~4 聚体称为低聚体, 5 聚体以上称为高聚体^[8]。本研究使用低聚葡萄籽原花青素 (GSPE) 是从葡萄籽中提取出来的多酚类化合物, 有研究表明葡萄籽原花青素具有强的抗氧化、清除自由基及抗炎作用^[9-10]。对治疗心脑血管疾病、眼科疾病、提高抗体免疫力有明显的效果^[11]。但其对治疗 UC 的报道较少, 有研究表明葡萄籽原花青素对胃肠道损伤有一定的保护作用^[12-15]。本实验旨在探究不同剂量的 GSPE 素对葡聚糖硫酸钠 (DSS) 诱导的 UC 的治疗效果及其作用机制, 为开发有效的天然药物提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

H1650R 低温离心机 (湘仪离心机仪器有限公司); Infinite F50 全波长酶标仪 (德国 Tecan 公司); F6/10 实验室超细匀浆机 (上海弗鲁克科技发展有限公司); DZKW-D-2 电热恒温水浴锅 (北京市永

光明医疗仪器厂); MX100-4A 微孔板震荡器 (杭州奥盛仪器有限公司); Mini-6K 低速离心机 (杭州奥盛仪器有限公司); 超低温冰箱 (日本 Sanyo 公司); BX53 奥林巴斯正置显微镜 (上海奥林巴斯有限公司); Leica 2016 石蜡切片机 (上海莱卡仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

DSS (批号 Q3526, 美国 MPBIO 生物医学公司); GSPE (批号 002-180502, 儿茶素质量分数 22.6%, 表儿茶素质量分数 18.9%, 原花青素 B₁ 质量分数 4.9%, 原花青素 B₂ 质量分数 3.6%, 原花青素 B₄ 质量分数 1.1%, 天津尖峰天然产物研究开发有限公司); 柳氮磺吡啶肠溶片 (批号 22160712160625, 上海福达制药有限公司); 4%多聚甲醛 (天津百倍生物科技有限公司); 0.9% NaCl 溶液 (山东科伦药业有公司); 超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 试剂盒 (南京建成生物医学工程研究所); 一氧化氮试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6 试剂盒 (北京四柏生物科技有限公司); 血红素加氧酶-1 (HO-1)、核转录因子- κ B (NF- κ B)、转录因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)、Keap-1 抗体 (美国 Cell Signaling 公司)。

1.3 动物

SPF 级 C57 小鼠, 42 只, 雄性, 8 周龄, 体重 20~22 g, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供并饲养, 许可证号 SCXK (京) 2017-0005, 动物合格证号 1112511911000098; 动物饲养于干净舒适的环境, 温度 (22 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C, 湿度 (60 $\pm$ 5) %。

2 方法

2.1 分组、给药方法及 UC 模型的制备

将 42 只 SPF 级 C57 小鼠随机分为对照组、模型组、阳性对照组 (柳氮磺吡啶组) 及 GSPE 低、中、高剂量 (125、250、500 mg/kg) 组, 每组 7 只。

各组小鼠适应性喂养 1 周后, 对照组给予正常饮用水, 其余各组给予含有 3% DSS 的饮用水, 自由饮用 7 d, 诱导小鼠 UC 模型。造模第 1 天开始 ig 给药, 对照组及模型组每日给予等体积蒸馏水, 其他各组每日定时给药 10 mL/kg, 连续给药 7 d。给药后在每日同一时间观察并记录所有小鼠的一般情况、体质量变化、大便性状、大便隐血情况、是否血便及便血程度, 初步判断造模及给药效果。

2.2 样本采集及处理

连续给药至第 7 天后小鼠禁食不禁水 24 h, 第 8 天断头处死取血, 随即解剖取脾脏和结肠肠段样本。全血样本于 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 取血清, -80 °C 保存。脾脏用生理盐水洗净表面血液, 吸水纸吸干后称定质量。结肠肠段铺平测量长度, 取 1 cm 结肠放入 10 倍体积的 4% 多聚甲醛溶液中, 室温静置 24 h 进行固定。另取 1 cm 结肠组织, 剪开, 生理盐水清洗干净, 置于 EP 管中剪碎, 加入 5 倍体积生理盐水进行匀浆, 静置 2 h 后在 4 °C 以 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, -80 °C 保存。

2.3 血清及结肠组织中细胞因子及炎症因子检测

取低温保存的血清及结肠组织匀浆上清液快速复苏, 按 ELISA 试剂盒方法检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、NO、SOD、MDA 水平。

2.4 结肠组织 HE 染色病理形态学分析

4% 多聚甲醛固定保存的结肠组织, 常规石蜡切片, 苏木精 (HE) 染色, 光学显微镜下观察各组小鼠结肠的形态学变化。参照 Wirtz 等^[16]方法对结肠损伤程度进行半定量评分。

2.5 免疫组化检测结肠组织中相关蛋白的表达

4% 多聚甲醛固定保存的结肠组织, 常规石蜡切

片, 进行免疫组化 NF- κ B、Nrf2、HO-1、Keap-1 蛋白染色, 采用 Image J 软件分析染色结果, 200 倍视野进行拍照, 对各蛋白表达量进行半定量分析。

2.6 统计学处理

正态性分布数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 13.0 统计软件分析数据, 各组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD- t 检验及 Dunnett- t 检验。

3 结果

3.1 GSPE 对 DSS 诱导的 UC 小鼠一般情况的影响

观察结果显示, 对照组小鼠活动状态良好, 体质量无下降、毛发光滑有光泽; 模型组小鼠在造模第 2 天即出现腹泻, 随后出现大便稀溏, 第 4 天出现便血、行动迟缓、体质量下降、精神萎靡不振、毛发黯淡无光症状。GSPE 各给药小鼠组也出现便溏、便血等症状, 但症状均轻于模型组。

3.2 GSPE 对 DSS 诱导的 UC 小鼠体质量和脾脏质量的影响

各组小鼠体质量变化情况如图 1 所示, 对照组小鼠体质量没有明显变化, 其余各组小鼠体质量均有所下降。与对照组比较, 模型组小鼠脾脏质量显著增加 ($P < 0.01$), 说明 DSS 模型构建成功。与模型组比较, GSPE 给药组小鼠体质量均高于模型组 ($P < 0.01$), 脾脏质量显著降低 ($P < 0.01$), 说明 GSPE 对 UC 小鼠的症状有一定的改善。

3.3 GSPE 对 DSS 诱导的 UC 小鼠结肠长度的影响

各实验组小鼠结肠长度结果如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠结肠长度明显缩短 ($P < 0.01$), 说明 DSS 诱导后小鼠出现了 UC, 模型制备成功。与模型组比较, GSPE 给药后小鼠结肠长度明显增加 ($P < 0.01$), 说明 GSPE 对 UC 有一定的治疗作用。

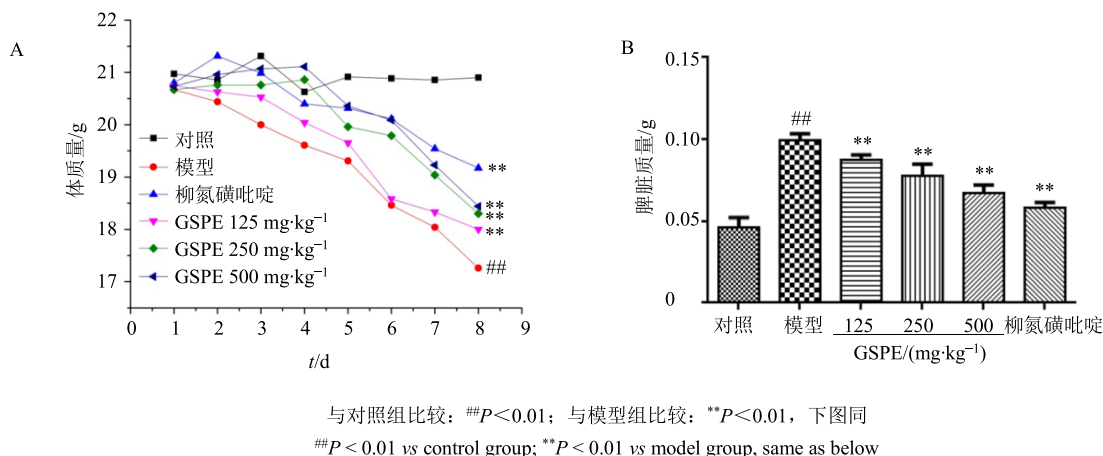


图 1 GSPE 对 DSS 诱导的 UC 小鼠体质量 (A) 和脾脏质量 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Fig. 1 Effect of GSPE on body weight (A) and spleen weight (B) of UC mice induced by DSS ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

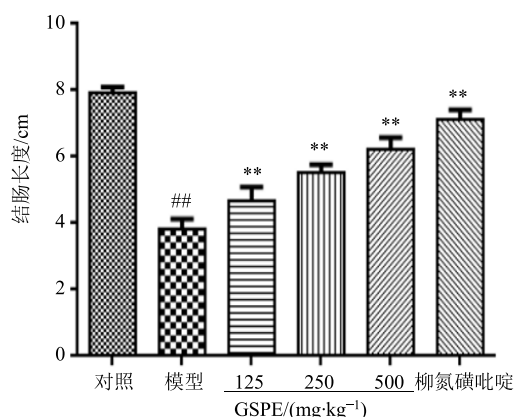


图 2 GSPE 对 DSS 诱导的 UC 小鼠结肠长度的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Fig. 2 Effect of GSPE on colon length of UC mice induced by DSS ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

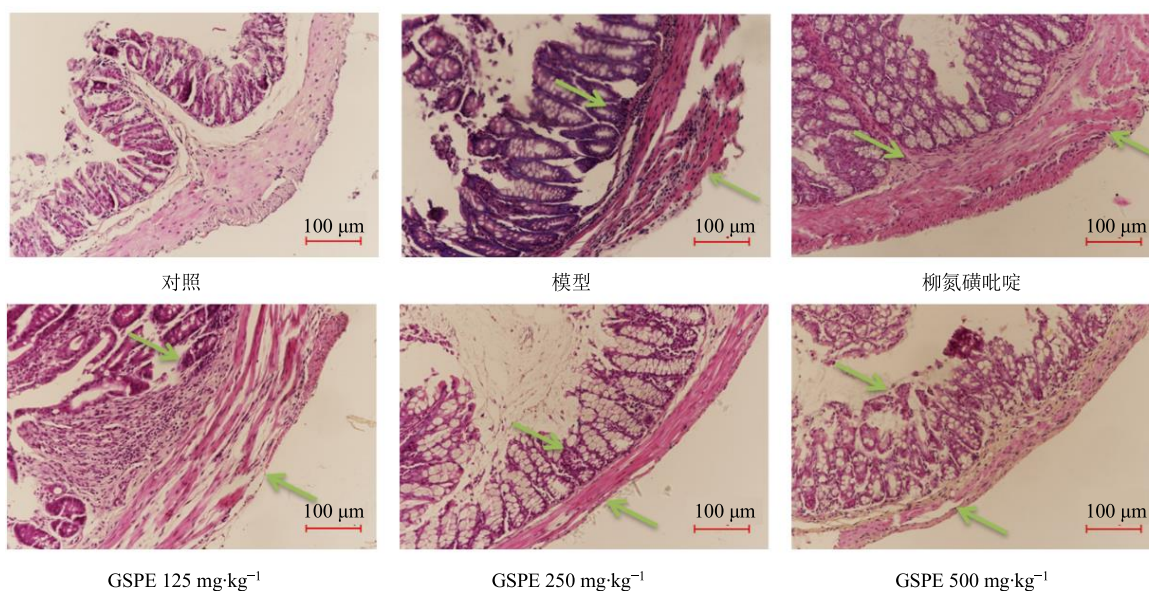


图 3 GSPE 对 DSS 诱导的 UC 小鼠结肠组织病理学变化的影响 (HE 染色)

Fig. 3 Effect of GSPE on pathological changes of colon tissue of UC mice induced by DSS (HE staining)

剂量越高改善效果越明显, 呈现显著的量效关系。

按病理组织学诊断指标对染色结果进行评分, 结果见表 1。与对照组比较, 模型组小鼠结肠组织病理评分明显升高 ($P < 0.05$), 提示 DSS 对结肠造成严重损伤, 造模成功形成了 UC。与模型组比较, GSPE 中、高剂量组小鼠结肠组织病理评分显著降低 ($P < 0.01$), 提示 GSPE 能够有效改善 DSS 诱导的小鼠结肠黏膜损伤、炎症细胞浸润。

3.5 GSPE 对 DSS 诱导的 UC 小鼠血清及结肠组织炎症因子水平的影响

采用 ELISA 法测定小鼠血清和结肠组织中

3.4 GSPE 对 DSS 诱导的 UC 小鼠结肠组织病理改变的影响

HE 染色结果如图 3 所示, 对照组小鼠结肠组织结构完整, 无溃疡, 无损伤, 肠腺排列整齐且完整, 黏膜未见炎性细胞浸润, 肌层保持完整平滑。模型组小鼠结肠组织结构已经被完全破坏, 黏膜上层细胞脱落、坏死, 大量炎性细胞浸润、充血。柳氮磺吡啶组小鼠结肠组织只有局部组织损伤, 可见少量炎性细胞浸润。GSPE 低剂量组小鼠结肠组织局部损伤较严重, 黏膜上皮细胞部分坏死, 炎性细胞浸润程度稍强于模型组; 中剂量组结肠组织局部损伤, 可见到部分完整的组织构造, 少量炎性细胞浸润; 高剂量组结肠组织稍有损伤, 绒毛清晰, 黏膜无损伤、无坏死、无炎性细胞浸润, 说明 GSPE

表 1 GSPE 对 DSS 诱导的 UC 小鼠结肠组织病理评分的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Table 1 Effect of GSPE on pathological scores of colon tissue of UC mice induced by DSS ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	结肠组织病理评分
对照	—	0
模型	—	7.05 ± 1.02 ^{##}
柳氮磺吡啶	500	1.31 ± 0.56 ^{**}
GSPE	125	5.96 ± 1.76 [*]
	250	3.49 ± 1.22 ^{**}
	500	1.57 ± 0.75 ^{**}

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平, 结果如图 4 所示, 模型组小鼠各炎症因子水平显著高于对照组, 说明 UC 造模成功。与模型组比较, GSPE 各给药组小鼠血清和结肠组织中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平显著降低 ($P<0.05$), 说明 GSPE 能够抑制 DSS 诱发的

UC 小鼠结肠组织、血清中细胞炎症因子的增加, 从而抑制炎症的发生、发展。

3.6 GSPE 对 DSS 诱导的 UC 小鼠血清及结肠组织中细胞因子水平的影响

结果如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠

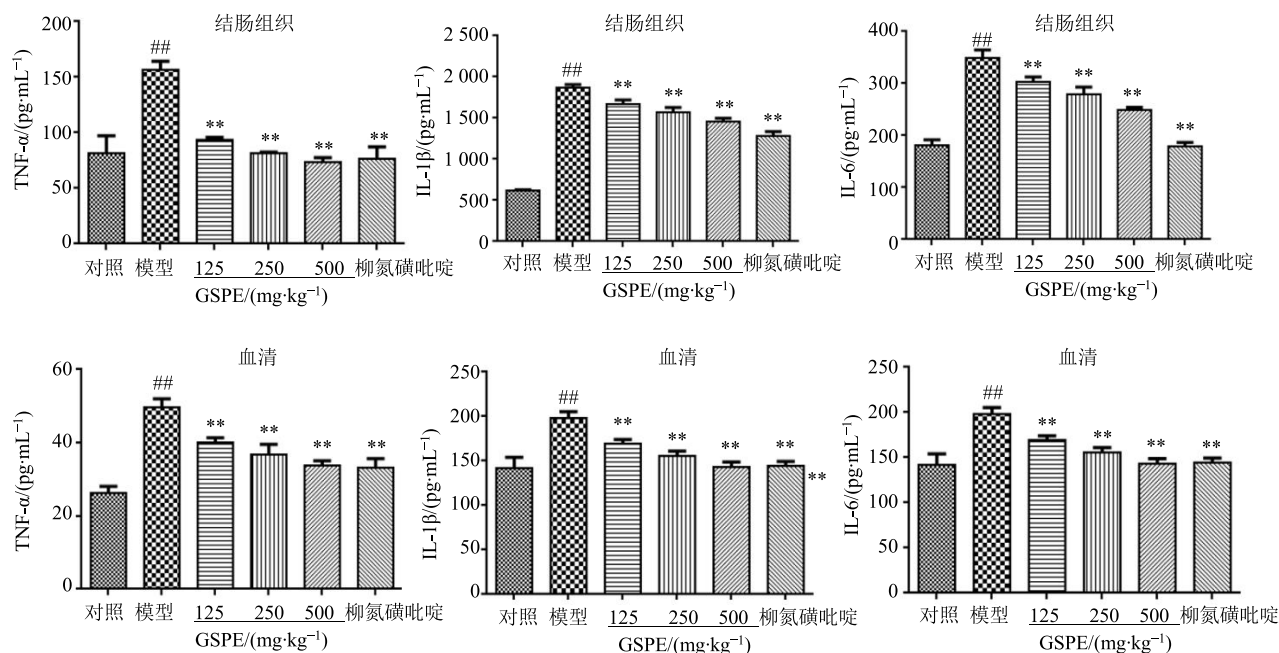


图 4 GSPE 对 DSS 诱导的 UC 小鼠血清与结肠组织中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Fig. 4 Effect of GSPE on TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in serum and colon tissue of UC mice induced by DSS ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

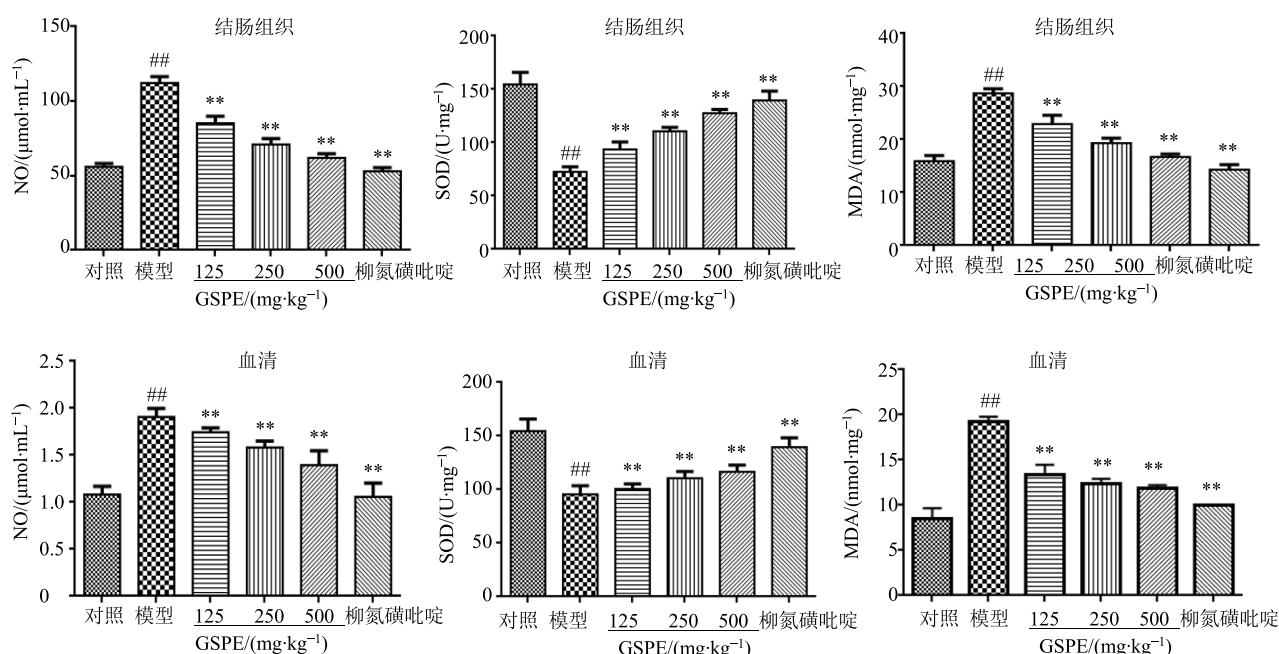


图 5 GSPE 对 DSS 诱导的 UC 小鼠血清与结肠组织中 NO、SOD、MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Fig. 5 Effect of GSPE on NO, MDA, and SOD in serum and colon tissue of UC mice induced by DSS ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

血清和结肠组织中 NO、MDA 水平显著升高, SOD 水平显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, GSPE 各剂量组小鼠结肠和血清中 NO、MDA 水平均显著降低, SOD 水平升高 ($P < 0.01$), 说明 GSPE 能有效地促进 UC 小鼠结肠组织和血清中 SOD 的增加, 抑制 MDA 和 NO 的产生, 从而发挥着抗氧化的作用, 来调节体内的氧化应激反应。

3.7 GSPE 对 DSS 诱导的 UC 小鼠结肠组织中蛋白表达的影响

利用免疫组化检测分析小鼠结肠黏膜中的

HO-1、Nrf2、NF- κ B、Keap-1 蛋白表达水平, 利用 Image J 软件进行染色分析。结果如图 6、7 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠结肠组织中 NF- κ B、Keap-1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), Nrf2、HO-1 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, GSPE 各给药组小鼠 NF- κ B、Keap-1 蛋白表达水平显著降低, HO-1、Nrf2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), 且呈现显著的剂量依赖性, 说明 GSPE 能够有效降低炎症蛋白的表达从而减轻炎症反应对机体的损伤。

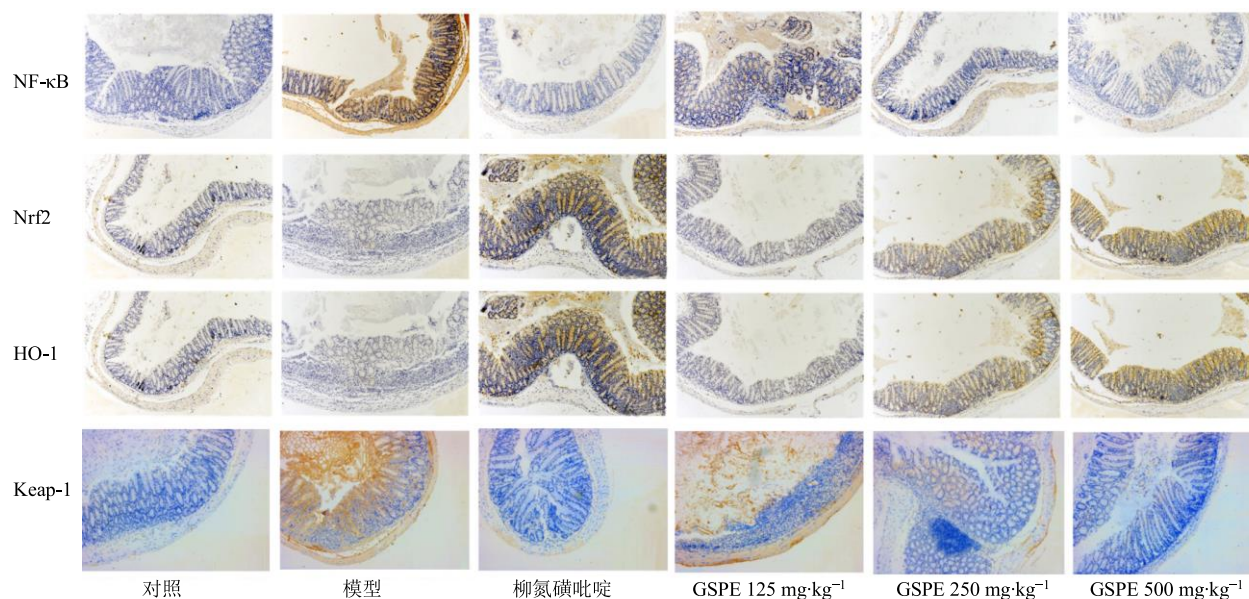


图 6 GSPE 对 DSS 诱导的 UC 小鼠结肠组织中 NF- κ B、Nrf2、HO-1、Keap-1 蛋白表达的影响

Fig. 6 Effect of GSPE on protein expression of NF- κ B, Nrf2, HO-1, and Keap-1 in colon tissue of UC mice induced by DSS

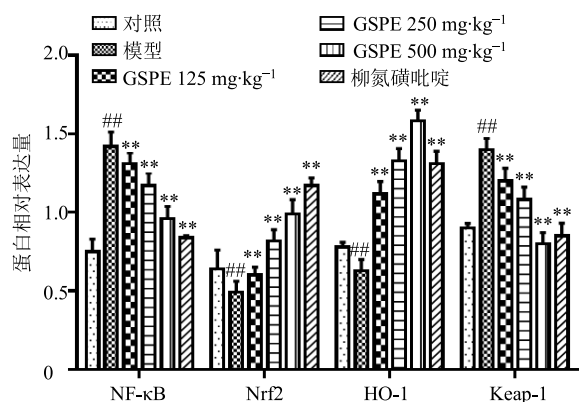


图 7 GSPE 对 DSS 诱导的 UC 小鼠结肠组织中 NF- κ B、Nrf2、HO-1、Keap-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Fig. 7 Effect of GSPE on proteins expression of NF- κ B, Nrf2, HO-1, and Keap-1 in colon tissue of UC mice induced by DSS ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

4 讨论

NF- κ B 是免疫网络中至关重要的细胞活化、信号转导以及转录激活因子^[17-19], 在 UC 发生发展过程中发挥核心作用^[20], 对细胞因子、黏附因子、免疫性受体、促凋亡蛋白均有调控作用^[21-22]。NF- κ B 的活化异常是 UC 发病的生理、病理学机制之一, 其表达水平可作为 UC 病情及治疗效果的评估指标^[23]。NF- κ B 活化后可使多种细胞因子完成基因转录, 导致炎症因子如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的大量表达, 最终引起机体的损伤。因此在 NF- κ B 通路中, NF- κ B 水平下降说明药物通过该机制发挥了抗炎作用。研究结果显示 GSPE 可以有效下调结肠组织中 NF- κ B 蛋白表达水平, 减少 NO、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等细胞因子的生成, 抑制炎症的发生和发展。

UC 的发病与机体氧化应激失衡密不可分, 过

氧化反应是发生 UC 的重要因素, 氧自由基水平的升高会激发炎症反应^[24], 活性氧自由基的产生超过了机体对过氧化物的清除能力会使机体的氧化系统和抗氧化系统失衡^[25], 体内过多的活性氧自由基会导致脂质过氧化、蛋白质变性及诱发基因突变, 最终导致细胞的氧化损伤^[26]。酶抗氧化防御系统和脂质过氧化是反应氧化应激的经典指标, 酶抗氧化系统包括 SOD 等酶, 脂质氧化损伤后的产物是 MDA。Keap-1/Nrf2 是经典的抗氧化通路, 生理状态下, 胞浆内的 Keap-1 起接合器的作用, 通过泛素连接酶与 Nrf2 结合在一起, Nrf2 被蛋白酶降解。当氧化应激反应出现, Keap-1 作为氧化还原反应的传感器, 其构象发生变化时 Nrf2 解离, 转入细胞核内激活靶基因表达, 调控下游 II 相代谢酶 (如 HO-1)、抗氧化酶 (如 SOD) 的表达, 进而发挥抗氧化损伤的作用, 恢复细胞的内稳态^[27]。因此在 Keap-1/Nrf2 抗氧化通路中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平升高表明药物通过该机制发挥了抗氧化作用。本研究结果显示 GSPE 可以有效升高细胞中 SOD 水平, 降低细胞中 MDA 水平, 升高 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平, 发挥抗氧化作用。

有研究表明, NF- κ B 信号通路与 Nrf2 信号通路存在串扰关系, NF- κ B 可以抑制转录时 Nrf2 的信号传导, Nrf2 和 HO-1 与促炎因子的表达与 NF- κ B 的失活有重要联系^[28]。Keap-1 在细胞抗炎方面起着重要的作用^[29-30], 可以直接作用于 NF- κ B 信号通路, 其主要是通过调控 IKK β 影响 NF- κ B 信号通路, IKK β 是 NF- κ B 信号通路中激酶复合物的核心组成部分, 其活性增强可有效激活 NF- κ B 信号通路。Keap-1 特异性结合 IKK β , 并与泛素连接蛋白 CUL3-RBX1 复合体相连, 介导 IKK β 的泛素化降解^[31], 阻止了 NF- κ B 磷酸化入核, 减轻炎症反应。本研究结果表明, GSPE 可以上调 Nrf2 蛋白表达水平, 进而促进其下游蛋白 HO-1 的蛋白表达, 上调结肠组织中 SOD 水平, 下调 MDA 水平, 进而调节氧化应激失衡, 发挥其抗氧化作用, 缓解炎症反应。

本实验结果表明 GSPE 能够剂量依赖性地降低 NF- κ B 蛋白表达水平, 降低细胞炎性因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平, 上调 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平, 上调结肠组织中 SOD 水平, 下调 MDA 水平, 改善 UC 小鼠组织病理变化, 从而改善 UC 疾病症状。GSPE 可能是通过 Nrf2 和 HO-1 抗氧化通路和 NF- κ B 抗炎通路发挥治疗作用的。

参考文献

- [1] 刘霞, 于泳, 黄煌, 等. 丹皮酚对慢性溃疡性结肠炎大鼠血清炎症因子影响的研究 [J]. 文摘版: 医药卫生, 2015(2): 251.
- [2] 张蕊. 溃疡性结肠炎患者结肠黏膜 ARE 结合活性与 HO-1 表达的变化 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.
- [3] Novak G, Hindryckx P, Khanna R, *et al.* The safety of vedolizumab for the treatment of ulcerative colitis [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2017, 16(4): 501-507.
- [4] Koh S J, Kim J W, Kim B G, *et al.* Fexofenadine regulates nuclear factor-B signaling and endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells and ameliorates acute and chronic colitis in mice [J]. *J Pharmacol Exper Ther*, 2015, 352(3): 455-461.
- [5] 吴湘华, 孙翠凤. 自拟清肠排毒汤对急性溃疡性结肠炎 (大肠湿热证) 免疫功能和炎症因子的影响 [J]. 中国中医急症, 2016, 25(10): 1942-1944.
- [6] 刘志龙, 赵佩, 高进贤, 等. 铁皮石斛提取物对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠的抗氧化及抗炎作用 [J]. 中国新药杂志, 2019, 28(2): 214-220.
- [7] Zhang Z, Li S, Cao H, *et al.* The protective role of phloretin against dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice [J]. *Food Funct*, 2019, 10(1): 422-431.
- [8] 吕晓楠. 低聚原花青素对抗溃疡性结肠炎的作用及其机制研究 [D]. 天津: 武警后勤学院, 2014.
- [9] 刷红梅, 曲梓怡, 王召令. 原花青素的抗氧化作用 [J]. 中国组织工程研究, 2007, 11(16): 3155-3157.
- [10] 陈美珊, 梁统, 周克元. 原花青素的抗炎作用及其作用机制探讨 [J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(12): 1080-1082.
- [11] 段国平, 刘晓利, 赵丕文, 等. 葡萄籽原花青素的药理学研究进展 [J]. 环球中医药, 2014, 11(4): 313-316.
- [12] Chu H, Tang Q, Huang H, *et al.* Grape-seed proanthocyanidins inhibit the lipopoly-saccharide-induced inflammatory mediator expression in RAW264. 7 macrophages by suppressing MAPK and NF- κ B signal pathways [J]. *Envir Toxicol Pharmacol*, 2016, doi: 10.1016/j.etap.2015.11.018.
- [13] Li W, Zhang X, Wu Y, *et al.* Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(12): 1117-1120.
- [14] Gulgun M, Erdem O, Oztas E, *et al.* Proanthocyanidin prevents methotrexate-induced intestinal damage and oxidative stress [J]. *Exper Toxicol Pathol*, 2010, 62(2): 109-115.
- [15] Ho K T, Jeong J E, Young C D, *et al.* Gastroprotective effect of grape seed proanthocyanidin extracts against

- nonsteroid anti-inflammatory drug-induced gastric injury in rats [J]. *Gut Liver*, 2013, 7(3): 282-289.
- [16] Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, *et al.* Chemically induced mouse models of intestinal inflammation [J]. *Nat Protocol*, 2007, 2(3): 541-546.
- [17] 张子良. 新疆紫草羟基萘醌对葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠溃疡性结肠炎的治疗作用 [D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [18] 陈治水, 陈 宁. 溃疡性结肠炎中西医结合研究新进展 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(4): 437-442.
- [19] Baumgart D C, Carding S R. Inflammatory bowel disease: Cause and immunobiology [J]. *Lancet*, 2007, 369(9573): 1627-1640.
- [20] 陈友琴, 甘华田, 欧阳钦, 等. 抗炎药物对溃疡性结肠炎患者肠黏膜组织 NF- κ B 的活化和细胞黏附分子表达的影响 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2004, 21(5): 732-736.
- [21] Bamias G, Nyce M R, Sa D L R, *et al.* New concepts in the pathophysiology of inflammatory disease [J]. *Annal Inter Med*, 2005, 143(12): 895-904.
- [22] 徐 宁, 欧阳钦, 于振海, 等. Toll 样受体 4、CD14 和核因子- κ B 在溃疡性结肠炎中表达及临床意义 [J]. *中华消化杂志*, 2005, 25(7): 433-434.
- [23] 张旭东, 刘宏岩. 乌梅丸对溃疡性结肠炎大鼠 TLRs/NF- κ B/myD88 信号通路影响的研究进展 [J]. *吉林中医药*, 2019, 39(3): 410-413.
- [24] 徐青青. 美沙拉嗪联合培菲康治疗溃疡性结肠炎的临床疗效 [J]. *天津药学*, 2017, 29(5): 47-48.
- [25] Sohal R S, Allen R G. Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: A unifying hypothesis [J]. *Exper Gerontol*, 1990, 25(6): 499-522.
- [26] 杨 战, 杨宝山, 颜炳柱. Keap1-Nrf2-ARE 抗氧化通路与肝脏疾病的研究进展 [J]. *肝脏*, 2018, 23(3): 266-268.
- [27] 胡流芳, 王 迎, 任汝静, 等. Keap1-Nrf2/ARE 信号通路的抗氧化应激作用及其调控机制 [J]. *国际药学研究杂志*, 2016, 43(1): 146-152.
- [28] Bao L, Li J, Zha D, *et al.* Chlorogenic acid prevents diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress and inflammation through modulation of the Nrf2/HO-1 and NF- κ B pathways [J]. *Inter Immunopharmacol*, 2017, 54: 245-253.
- [29] Jaramillo M C, Zhang D D. The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer [J]. *Genes Dev*, 2013, 27(20): 2179-2191.
- [30] Lu K, Alcivar A L, Ma J, *et al.* NRF2 induction supporting breast cancer cell survival is enabled by oxidative stress-induced DPP3-KEAP1 interaction [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(11): 2881-2892.
- [31] 李振喜. Keap1-Nrf2 与 NF- κ B 信号通路相关性研究进展 [J]. *医学研究杂志*, 2018, 47(4): 14-18.