

• 药理与临床 •

基于 NLRP3 炎症小体研究白头翁汤正丁醇提取物对白念珠菌定植下小鼠溃疡性结肠炎的作用机制

王亚东^{1,2}, 徐志庆^{1,2}, 夏 丹^{1,2}, 张梦翔^{1,2}, 汪天明^{1,2,3}, 邵 菁^{1,2,3}, 汪长中^{1,2,3*}

1. 安徽中医药大学中西医结合学院, 安徽 合肥 230012

2. 安徽省中医药科学院 中西医结合研究所, 安徽 合肥 230012

3. 安徽中医药大学 中药复方安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012

摘 要: 目的 研究白头翁汤正丁醇提取物 (butyl alcohol extract of Baitouweng Decoction, BAEB) 对白念珠菌异常定植下的葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium salt, DSS) 诱导的小鼠溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 的治疗作用, 以及对 Dectin-1/脾酪氨酸激酶 (spleen tyrosine kinase, Syk) /NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 信号通路的影响。方法 将 105 只 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、DSS 组、DSS+白念珠菌组及 BAEB 低、中、高剂量 (20、40、80 mg/kg) 组和美沙拉嗪 (200 mg/kg) 组。对照组小鼠每日自由饮水; DSS 组予 3% DSS 溶液, 自由饮用连续 7 d; 其他组在 DSS 组基础上, 在第 1、3、5、7 天 ig 白念珠菌 (1×10^8 CFU/只)。第 8 天开始分别 ig 相应药物, 1 次/d, 连续 7 d。每天称定小鼠质量, 观察一般状态, 收集粪便, 采用平板培养法检测粪便真菌载量。末次给药次日, 处死小鼠, 测量结肠长度, 苏木素-伊红 (HE) 染色法进行结肠组织学分析; ELISA 法检测结肠组织炎症因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和 IL-18 水平; 免疫组化法检测结肠组织 Occludin 和闭锁连接蛋白-1 (zonula occludens-1, ZO-1) 表达; Western blotting 检测结肠组织 Dectin-1、核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、Syk、凋亡相关微粒蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC)、剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cleaved cysteine-aspartate protease-1, cleaved Caspase-1) 和 NLRP3 蛋白表达。结果 与对照组和 DSS 组比较, DSS+白念珠菌组小鼠粪便培养出更多的白念珠菌 ($P < 0.01$); 结肠黏膜损伤程度严重 ($P < 0.01$); 结肠组织炎症因子 IL-1 β 、IL-18 水平明显升高 ($P < 0.01$); 结肠组织 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达明显下降 ($P < 0.05$); 结肠组织 NLRP3、NF- κ B 和 Dectin-1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), ASC、cleaved Caspase-1 和 Syk 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与 DSS+白念珠菌组相比, BAEB 组小鼠肠道白念珠菌显著减少 ($P < 0.01$); 结肠组织中 IL-1 β 、IL-18 水平下降 ($P < 0.05$ 、 0.01); 结肠组织 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); BAEB 低剂量组 Syk 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$); BAEB 中剂量组 ASC 和 Syk 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), NLRP3 和 NF- κ B 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); BAEB 高剂量组 NF- κ B 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), ASC 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。结论 BAEB 可能通过抑制白念珠菌异常定植下 Dectin-1/Syk 通路所介导的 NLRP3 炎症小体过度活化, 进而阻断 IL-1 β 与 IL-18 的产生来发挥抗 UC 作用。

关键词: 白念珠菌; 溃疡性结肠炎; 白头翁汤正丁醇提取物; NLRP3 炎症小体; Dectin-1/Syk 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)13-3997-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.13.013

Mechanism of butyl alcohol extract of Baitouweng Decoction on ulcerative colitis in mice colonized by *Candida albicans* based on NLRP3 inflammasome

WANG Ya-dong^{1,2}, XU Zhi-qing^{1,2}, XIA Dan^{1,2}, ZHANG Meng-xiang^{1,2}, WANG Tian-ming^{1,2,3}, SHAO Jing^{1,2,3}, WANG Chang-zhong^{1,2,3}

1. School of Integrated Traditional and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China

收稿日期: 2022-03-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81774034); 国家自然科学基金资助项目 (81573725); 安徽省自然科学基金资助项目 (1808085QH286); 安徽中医药大学重点项目 (2019zrzd04); 安徽省教育厅重点项目 (KJ2017A301, KJ2018A0276)

作者简介: 王亚东 (1980—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药抗感染与免疫。Tel: 13855102327 E-mail: 13855102327@qq.com

*通信作者: 汪长中, 博士生导师, 主要从事中医药抗感染与免疫研究。E-mail: ahwc63@sina.com

2. Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230012, China

3. Anhui Province Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China

Abstract: Objective To observe the therapeutic effect of butyl alcohol extract of Baitouweng Decoction (BAEB) on ulcerative colitis induced by dextran sodium sulfate (DSS) stimulated by abnormal colonization of *Candida albicans* in mice and Dectin-1/spleen tyrosine kinase (Syk)/NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3) signaling pathway. **Methods** A total of 105 C57BL/6 mice were randomly divided into control group, DSS group, DSS + *C. albicans* group and BAEB low-, medium- and high-dose (20, 40, 80 mg/kg) groups and mesalazine (200 mg/kg) group. Mice in control group were given free access to water every day; DSS group was given 3% DSS solution for seven consecutive days; Other groups were ig *C. albicans* (1×10^8 CFU) on 1st, 3rd, 5th, and 7th days on basis of DSS group. On 8th day, mice were ig corresponding drugs, once a day for seven consecutive days. Body weight of mice was weighed every day, general state was observed, feces were collected, and fecal fungal load was detected by plate culture method. The day after last administration, mice were sacrificed, colon length was measured, and hematoxylin-eosin (HE) staining was used for colon histological analysis; ELISA was used to detect the inflammatory factor interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-18 levels in colon tissue; Immunohistochemistry was used to detect the expression of Occludin and zonula occludens-1 (ZO-1) in colon tissue; Western blotting was used to detect protein expressions of Dectin-1, nuclear factor- κ B (NF- κ B), Syk, apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC), cleaved cystein-aspartate protease-1 (cleaved Caspase-1) and NLRP3 in colon tissue. **Results** Compared with control group and DSS group, more *C. albicans* were cultured in feces of mice in DSS + *C. albicans* group ($P < 0.01$); Degree of colonic mucosal injury was severe ($P < 0.01$); Inflammatory factors IL-1 β and IL-18 levels in colon tissue were significantly increased ($P < 0.01$); Occludin and ZO-1 protein expressions in colon tissue were significantly decreased ($P < 0.05$); NLRP3, NF- κ B and Dectin-1 protein expressions in colon tissue were significantly increased ($P < 0.01$), ASC, cleaved Caspase-1 and Syk protein expressions were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). Compared with DSS + *C. albicans* group, number of colony-forming units (CFU) of *C. albicans* in intestinal tract of mice in BAEB group was decreased ($P < 0.01$); Levels of IL-1 β and IL-18 in colon tissue were decreased ($P < 0.05, 0.01$); Occludin and ZO-1 protein expressions in colon tissue were increased ($P < 0.05, 0.01$); Syk protein expression in low-dose BAEB group was significantly decreased ($P < 0.01$); ASC and Syk protein expressions in BAEB medium-dose group were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), NLRP3 and NF- κ B protein expressions were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$); NF- κ B protein expressions in BAEB high-dose group was significantly decreased ($P < 0.01$), ASC protein expression was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** BAEB may exert anti-UC effect by inhibiting the overactivation of NLRP3 inflammasome mediated by Dectin-1/Syk pathway under abnormal *C. albicans* colonization, thereby blocking the production of IL-1 β and IL-18.

Key words: *Candida albicans*; ulcerative colitis; butyl alcohol extract of Baitouweng Decoction (BAEB); NLRP3 inflammasome; Dectin-1/Syk signaling pathway

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种慢性免疫介导的结肠炎症性疾病^[1]。流行病学调查显示, 在世界范围内, UC 的发病率正逐年增加^[2], 目前国内 UC 的发病率达 1.16/万^[3]。由于病程长、病变反复、并发症较多, 甚至增加结直肠癌发生的风险^[4], UC 已经成为威胁我国居民健康的重要疾病之一。近年来, 在 UC 发病机制研究中发现, 肠道菌群与免疫系统之间相互作用是影响肠道乃至整个机体健康状态的一个关键因素^[5]。真菌是肠道菌群的重要组成部分, 其中白念珠菌是最常见的人类共生真菌, 也是人类最常见的真菌机会性病原体^[6]。动物实验显示, UC 大鼠肠道白念珠菌含量明显上升^[7], 且伴随给药时间延长, 其含量逐渐下降并呈现明显量效关系^[8]。本课题组前期研究发现, 白念珠菌异常定植肠道可加重小鼠 UC 的病情, 抗白念

珠菌治疗可显著提高 UC 的治疗效果^[9]。在临床上, 糖皮质激素及免疫抑制剂的使用, 使继发白念珠菌机会感染突增^[10], 造成患者的病情呈现经常反复的特点。肠道白念珠菌过度定植时, 巨噬细胞内 Dectin-1/脾酪氨酸激酶 (spleen tyrosine kinase, Syk) 通路得以激活, 进而对 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 炎症小体过度激活而释放大量白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-18, 破坏肠道黏膜屏障, 引起结肠组织的炎症损伤, 参与了 UC 的致病作用^[11-12]。因此, 白念珠菌在肠道过度定植与 UC 病情程度之间呈现出很强的相关性, 白念珠菌可以被视为从微生态角度进行干预从而治疗 UC 的一个重要靶标^[9]。

白头翁汤 (白头翁 15 g、黄柏 12 g、黄连 6 g、

秦皮 15 g) 出自《伤寒论》，为中华中医药学会脾胃病分会推荐治疗 UC 的方药^[3]。临床研究表明，白头翁汤对 UC 具有良好的疗效。体外实验也证明白头翁汤正丁醇提取物 (butyl alcohol extract of Baitouweng Decoction, BAEB) 对白念珠菌具有明显抑制作用^[13-14]。本课题组前期也进行了大量的实验，发现 BAEB 对于白念珠菌定植下的 UC 小鼠有着显著的治疗效果。然而，白头翁汤对白念珠菌定植下的 UC 的作用机制尚不清楚。故本研究拟从肠道白念珠菌的过度定植角度出发，通过检测 Dectin-1/Syk 通路、NLRP3 炎症小体相关指标的变化以及反映肠黏膜屏障功能的 Occludin 和闭锁连接蛋白-1 (zonula occludens-1, ZO-1) 蛋白表达情况，探讨 BAEB 对 UC 的作用机制，以期可能将 BAEB 开发为作用机制新颖、临床疗效显著的抗 UC 药物奠定坚实的理论基础和实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 KM 小鼠 105 只，6~8 周龄，体重 18~22 g，购自安徽医科大学实验动物中心，动物合格证号 SCXK (皖) 2017-001，安徽省实验动物质量合格证号 No.340729210100005024。小鼠于动物房适应性饲养 1 周，明暗交替 12 h/12 h，室温维持 20~26 °C，相对湿度维持 40%~70%，自由进食饮水。动物实验经安徽中医药大学动物伦理委员会批准 (批准号 AHUCM-2021007)。

1.2 菌株

白念珠菌标准株 SC5314 由中国人民解放军第二军医大学药学院姜远英教授惠赠。

1.3 药材

白头翁、黄柏、黄连、秦皮购自安徽中医药大学第一附属医院中药房，并经安徽中医药大学高家荣主任药师鉴定分别为毛茛科植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bge.) Regel 的干燥根、芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid 的干燥树皮、毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch 的干燥根茎和木犀科植物苦枥白蜡树 *Fraxinus rhynchophylla* Hance 的干燥枝皮。

1.4 药品与试剂

美沙拉嗪肠溶片 (批号 10402226, 0.25g/片) 购自葵花药业；葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium salt, DSS, 批号 S3045) 购自美国 MP Biomedicals 公司；小鼠 IL-1 β 、IL-18 ELISA 试剂盒 (批号分别

为 01/2021、01/2021) 购自上海酶联生物科技有限公司； β -葡聚糖 ELISA 试剂盒 (批号 202101) 购自上海科兴生物科技有限公司；核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) p65 抗体、凋亡相关微粒蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC) 抗体、山羊抗兔 IgG 抗体 (批号分别为 ATTNO2501、ATSAP1701、ATSAP0901) 购自美国 Abbkine 公司；ZO-1 抗体、Occludin 抗体、F4/80 抗体、ECL 超敏发光试剂盒、山羊抗小鼠 IgG 抗体、 β -actin 抗体 (批号分别为 44h7470、53t8241、44k4122、1824c03、19z2345、54o2802) 购自美国 Affinity 公司；NLRP3 抗体、剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cleaved cystein-aspartate protease-1, cleaved Caspase-1) 抗体 (批号分别为 15101S、4) 购自美国 CST 公司；Syk 抗体 (批号 104032427) 购自沈阳万类生物科技有限公司；Dectin-1 抗体 (批号 E0317) 购自美国 Santa Cruz 生物技术公司；RIPA 细胞裂解液 (强)、预染蛋白 Marker、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号分别为 AUKJH、AUKPW、SPHNU) 购自山东思科捷生物技术有限公司；法国科玛嘉念珠菌显色培养基 (批号 P002076) 购自上海欣中生物工程有限公司；聚山梨酯 20 (批号 20CS1808) 购自北京金克隆生物技术有限公司；牛血清白蛋白 (批号 EZ5679A168) 购自德国 Biofroxx 公司。

1.5 仪器

H1-16kr 型高速冷冻离心机 (湖南可成仪器设备有限公司)；K3 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific)；RM2016 型组织切片机 (德国 Leica 公司)；DYY-6C 型电泳仪 (北京六一生物科技有限公司)；Tanon 5200 型全自动化学发光成像分析系统 (上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 BAEB 的制备

按照文献方法^[9]制备 BAEB，在提取过程中，通过检测白头翁皂苷 B₄、秦皮甲素、小檗碱含量，并注意有机溶剂浓度、有机溶剂用量、提取时间、提取次数 4 个因素进行质量控制^[15]。BAEB 中主要成分含量见表 1。

2.2 白念珠菌悬液的配制

将白念珠菌接种于装有液态沙氏培养基的锥形瓶中，置于 37 °C 恒温摇床中培养 12 h。取出，离心收集后将菌液浓度调整至 1 $\times$ 10⁹ CFU/mL 备用。

表 1 BAEB 中主要成分含量

Table 1 Contents of main active components in BAEB

成分	质量分数/(mg·g ⁻¹)
小檗碱	315.26
白头翁皂苷 B ₄	174.81
秦皮甲素	46.91
黄连碱	19.60
黄柏碱	16.78
表小檗碱	12.66
药根碱	9.92
秦皮乙素	2.39

2.3 白念珠菌异常定植下的小鼠 UC 模型建立与药物干预

参考马克龙等^[16]与 Choteau 等^[17]方法,采用 DSS 自由饮用结合 ig 白念珠菌的方法构建白念珠菌定植小鼠 UC 模型。小鼠随机分为对照组、DSS

组、DSS+白念珠菌组及 BAEB 低、中、高剂量(20、40、80 mg/kg)^[18]组和美沙拉嗪(200 mg/kg)组,每组 15 只。对照组小鼠自由饮用蒸馏水;DSS 组小鼠自由饮用 3% DSS 溶液,连续 7 d;DSS+白念珠菌组及各给药组小鼠自由饮用 3% DSS 溶液,同时隔日 ig 0.1 mL 白念珠菌,连续 4 次。第 8 天,各给药组 ig 相应药物,对照组和 DSS 组 ig 等体积生理盐水,1 次/d,连续 7 d。

2.4 小鼠一般体征观察和疾病活动指数(disease activity index, DAI)计算

每日观察小鼠的精神、饮食、活动和毛发等一般状况,记录小鼠体质量、大便性状和便血情况,对小鼠 DAI 进行评分,评分标准见表 2。

表 2 DAI 评分标准

Table 2 Scoring criteria of DAI

得分	体质量下降率(a)	大便性状	肉眼血便
0	≤1%	颗粒和硬度均适中	无异常
1	1%<a≤5%	颗粒成形,较软,不黏附肛门	粪便有暗红色斑点
2	5%<a≤10%	颗粒软且黏附于肛门	粪便有暗红色斑点,肛门可见出血
3	>10%	不成形,黏附肛门,腹泻	粪便深红色,肛门周围有血液黏附

2.5 结肠长度、黏膜损伤指数、组织病理形态学观察及评分

小鼠麻醉后眼球取血,离心获取血清,-20℃冰箱保存备用。颈椎脱臼处死小鼠,无菌操作下迅速剖开腹腔,切取小鼠结肠,测量结肠长度,观察结肠水肿、溃疡等损伤程度,并进行结肠黏膜损伤指数(colon mucosa damage index, CMDI)评分,评分标准:组织无损伤,0 分;局部充血、无溃疡,1 分;局部充血、肠壁增厚、无溃疡,2 分;有溃疡、直径<1 cm,3 分;溃疡直径 1~2 cm、肠管与外周无粘连,4 分;溃疡直径约 1~2 cm、肠管增厚、与外周脏器黏连,5 分。切取一部分结肠,于 4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋,4 μm 连续切片,苏木素-伊红(HE)染色,于光学显微镜下观察结肠病理学变化,按照文献方法^[19]进行评分,评分标准见表 3。剩余结肠组织于-80℃冰箱保存,用于后续实验。

表 3 结肠组织病理学评分标准

Table 3 Scoring criteria of colonic histopathology

得分	炎症程度	炎症范围	隐窝损失程度
0	无	无	无
1	轻度	固有层	基底 1/3 受损
2	中度	黏膜和黏膜下层	基底 2/3 受损,表面上皮完整
3	重度	透壁	整个隐窝和上皮丢失

2.6 肠道白念珠菌载荷量评估

收集各组小鼠第 1、5、9、13 天的粪便,干燥、称定质量后,重悬于预冷的 PBS 中,涂布在含有双抗的科玛嘉显色固体培养基上,于 37℃恒温培养 24 h,计数平板上白念珠菌微菌落数量。

2.7 免疫组化检测结肠组织 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达

肠组织石蜡切片脱蜡至水,3%过氧化氢封闭 10 min,柠檬酸盐缓冲液微波辐射抗原修复,羊血清封闭。分别加入 Occludin(1:100)、ZO-1(1:100)抗体,4℃孵育过夜;加入二抗,37℃孵育 30 min,加入 SABC 和 DAB 显色剂后,经苏木素复染,乙醇脱水,二甲苯透明,封片。于显微镜下观察,棕黄色或棕褐色颗粒的细胞为阳性细胞。

2.8 ELISA 检测结肠组织 IL-1β、IL-18 水平

取各组小鼠结肠组织,称定质量,加适量 PBS,匀浆,离心,收集上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-1β、IL-18 水平。

2.9 Western blotting 法检测结肠组织 NLRP3、Dectin-1、Syk、NF-κB、ASC 和 cleaved Caspase-1 蛋白表达

取结肠组织,加液氮后用研钵研碎,根据组织蛋白提取试剂盒说明书提取蛋白样品。BCA 法对蛋

白进行定量,蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,封闭后,以 TBST 漂洗,分别加入 Dectin-1(1:1000)、NF- κ B(1:2000)、Syk(1:10 000)、ASC(1:2000)、cleaved Caspase-1(1:1000)、NLRP3(1:1000)和 β -actin(1:1000)抗体,4℃孵育过夜;TBST 漂洗后,加入 HRP 标记的二抗(1:1000),室温孵育 2 h,漂洗后加入 ECL 化学发光液显色,采用凝胶成像系统观察结果,并进行灰度分析。

2.10 统计学分析

所有实验数据用 SPSS 20 统计分析软件进行处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差(One-way ANOVA)分析和 LSD 检验(方差不齐时用 Dunnett's T3 检验)对组间变量进行多重比较。

3 结果

3.1 BAEB 对小鼠一般状态 and DAI 的影响

对照组小鼠毛发色泽、饮食、精神、大便均正常;DSS 组小鼠在自由饮用 DSS 溶液 3 d 后,出现行动迟缓、食欲减退和稀便,且随着时间延长,症状逐渐加重,出现黏液便和血便,DAI 逐渐增大(表 4);DSS+白念珠菌组小鼠的症状和体征与 DSS 组相似,但出现稀便和血便的时间更早,DAI 升高更明显,与同时间点对照组相比有显著差异($P <$

0.01);第 8 天,经 BAEB 和美沙拉嗪治疗,上述症状均得到不同程度的改善,随着治疗时间的延长,DAI 开始下降,与同时间点 DSS+白念珠菌组相比有显著差异($P < 0.05$)。在治疗组中,BAEB 中、高剂量组 DAI 下降较明显,效果优于 BAEB 低剂量组。BAEB 中、高剂量组之间无差别。说明 BAEB 可以降低白念珠菌定植的 DSS 诱导 UC 小鼠 DAI 评分,并且随剂量增加而降低,但当剂量达到一定程度后,效果不再增加。

3.2 BAEB 对小鼠结肠长度、CMDI、组织病理学 and 评分的影响

如表 5 所示,与对照组相比,DSS+白念珠菌组小鼠结肠长度明显缩短($P < 0.01$);BAEB 组和美沙拉嗪组结肠长度明显长于 DSS+白念珠菌组($P < 0.05$ 、0.01);DSS+白念珠菌组结肠黏膜水肿、溃疡和糜烂,黏膜下见大量炎性浸润,上皮细胞破损,杯状细胞核腺体减少或排列不整齐(图 1),CMDI 和组织病理学评分升高,与对照组相比有明显差异($P < 0.01$);BAEB 治疗后,小鼠结肠黏膜水肿、糜烂和溃疡明显减轻,上皮细胞破损明显减少,杯状细胞核腺体排列不整齐明显改善,CMDI 和组织病理学评分降低,与 DSS+白念珠菌组相比有显著差异($P < 0.05$ 、0.01)。BAEB 可以明显改善白

表 4 BAEB 对白念珠菌定植的 DSS 诱导 UC 小鼠 DAI 评分的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

Table 4 Effect of BAEB on DAI score in UC mice induced by DSS with *C. albicans* colonization ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	DAI 评分				
		第 1 天	第 4 天	第 7 天	第 10 天	第 13 天
对照	—	0	0	0	0	0
DSS	—	0	1.20±0.45	2.50±0.71	1.71±1.11	1.25±0.50
DSS+白念珠菌	—	0	1.00±0	3.63±1.19 ^{##}	2.33±0.58 [#]	1.33±0.58 [#]
BAEB	20	0	1.14±0.38	3.57±1.81	2.00±0.00 [*]	1.25±0.50 [*]
	40	0	1.00±0.29	3.00±0.82	1.57±0.79 [*]	1.00±0 [*]
	80	0	1.43±0.53	3.30±1.34	1.33±0.52 [*]	1.00±0 [*]
美沙拉嗪	200	0	1.00±0	3.50±1.22	2.00±1.41 [*]	1.33±0.58

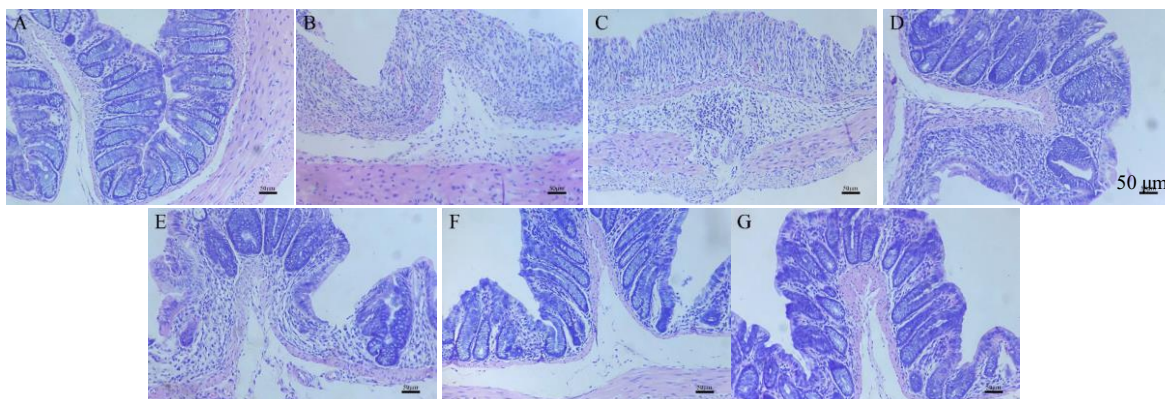
与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与 DSS+白念珠菌组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 下表同

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs DSS + *C. albicans* group, same as below tables

表 5 BAEB 对白念珠菌定植的 DSS 诱导 UC 小鼠结肠长度、CMDI 评分和组织病理学评分的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

Table 5 Effect of BAEB on colon length, CMDI scores and histopathological score in UC mice induced by DSS with *C. albicans* colonization ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	结肠长度/cm	CMDI 评分	组织病理学评分
对照	—	11.6±0.4	0	0
DSS	—	10.3±0.7 ^{##}	2.25±1.26 ^{##}	2.50±0.24 ^{##}
DSS+白念珠菌	—	9.5±0.9 ^{##}	2.00±1.41 ^{##}	2.67±0.33 ^{##}
BAEB	20	10.4±0.3 [*]	2.33±1.15	0.78±0.19 [*]
	40	10.9±0.3 ^{**}	1.00±1.00 [*]	0.44±0.19 ^{**}
	80	11.4±0.6 ^{**}	0.67±0.58 ^{**}	0.56±0.19 ^{**}
美沙拉嗪	200	10.6±0.7 [*]	2.33±1.15	1.11±0.38



A-对照组 B-DSS 组 C-DSS+白念珠菌组 D-美沙拉嗪组 E-BAEB 低剂量组 F-BAEB 中剂量组 G-BAEB 高剂量组, 下图同

A-control group B-DSS group C-DSS + *Candida albicans* group D-mesalazine group E-BAEB low-dose group F-BAEB medium-dose group G-BAEB high-dose group, same as below figures

图 1 BAEB 对白念珠菌定植的 DSS 诱导 UC 小鼠结肠组织病理的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of BAEB on colon histopathology in UC mice induced by DSS with *C. albicans* colonization (HE, $\times 200$)

念珠菌定植的 DSS 诱导 UC 小鼠的结肠长度及 CMDI 评分, 且呈剂量相关性, 其中 BAEB 中、高剂量组效果优于美沙拉嗪组。组织病理学评分以 BAEB 中剂量组降低最明显, 说明 BAEB 可以改善白念珠菌定植的 DSS 诱导 UC, 并随剂量增加而增加, 但当剂量达到一定程度后, 效果不再增加。

3.3 BAEB 对小鼠肠道白念珠菌载荷的影响

收集小鼠第 1、5、9、13 天的粪便, 在科玛嘉的培养板上培养, 长出的蓝色光滑菌落是白念珠菌。

如表 6 所示, DSS+白念珠菌组小鼠粪便白念珠菌增多, 与对照组相比有显著差异 ($P<0.01$); 第 8 天给予 BAEB 后, 白念珠菌在肠道定植能力下降, 菌落形成单位 (colony forming units, CFU) 随着治疗时间延长逐渐减小, 各治疗组与同时时间点 DSS+白念珠菌组相比有明显下降 ($P<0.01$); 第 13 天 BAEB 中、高剂量组与 DSS+白念珠菌组相比 CFU 明显下降 ($P<0.01$)。因此, BAEB 降低 DSS 诱导 UC 小鼠结肠 CFU, 呈剂量相关性。

表 6 BAEB 对白念珠菌定植的 DSS 诱导 UC 小鼠肠道白念珠菌载荷的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 6 Effect of BAEB on intestinal *Candida albicans* load in UC mice induced by DSS with *C. albicans* colonization ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	CFU			
		第 1 天	第 5 天	第 9 天	第 13 天
对照	—	0	0	0	0
DSS	—	0	0	0	0
DSS+白念珠菌	—	0	233.50 $\pm$ 8.32 ^{##}	328.67 $\pm$ 17.82 ^{##}	66.00 $\pm$ 1.73 ^{##}
BAEB	20	0	268.00 $\pm$ 32.11	193.67 $\pm$ 25.04 ^{**}	58.33 $\pm$ 14.84
	40	0	246.00 $\pm$ 45.21	173.33 $\pm$ 11.18 ^{**}	53.50 $\pm$ 2.83 ^{**}
	80	0	266.50 $\pm$ 27.78	128.00 $\pm$ 22.02 ^{**}	40.33 $\pm$ 10.05 ^{**}
美沙拉嗪	200	0	277.00 $\pm$ 39.88	202.75 $\pm$ 16.62 ^{**}	60.17 $\pm$ 5.01

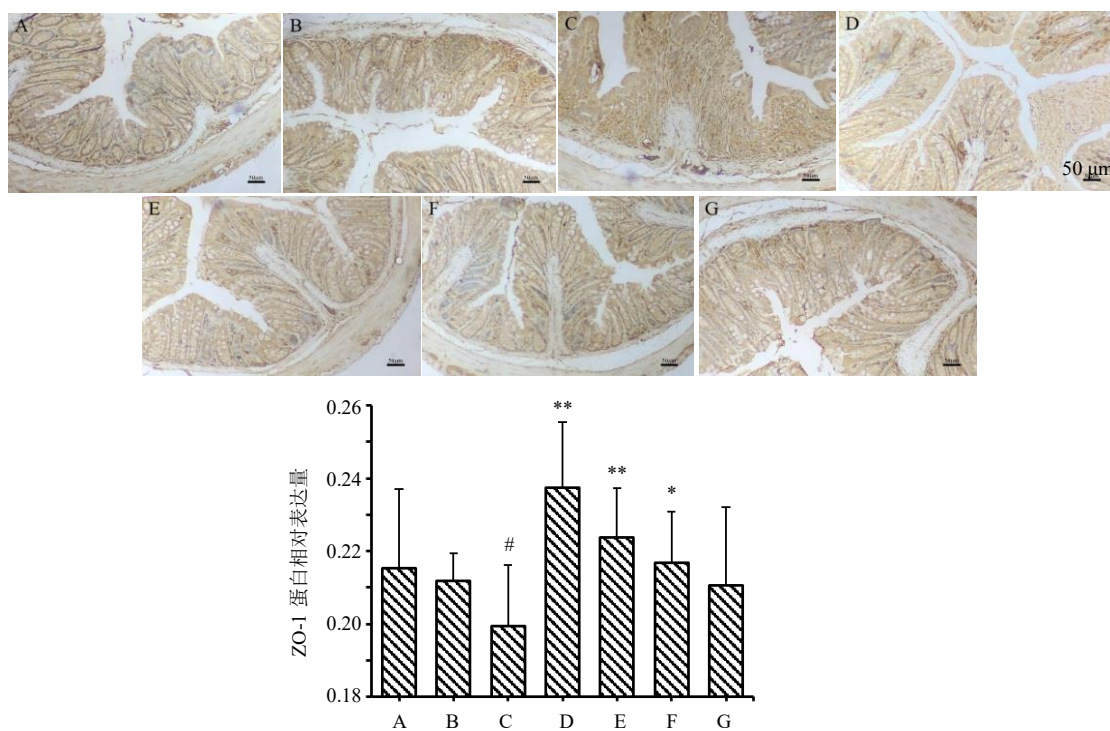
3.4 BAEB 对结肠组织 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达的影响

如图 2、3 所示, Occludin 和 ZO-1 的表达定位于肠黏膜上皮细胞的细胞膜, 镜下呈棕色。DSS+白念珠菌组 Occludin 和 ZO-1 阳性表达均降低。给予 BAEB 治疗后, Occludin 和 ZO-1 阳性表达上升, 以 BAEB 低、中剂量组效果明显 ($P<0.05, 0.01$)。

说明 BAEB 低剂量下可明显促进 Occludin 和 ZO-1 的表达, 且效果与美沙拉嗪相似。

3.5 BAEB 对小鼠结肠组织中 IL-1 β 和 IL-18 水平的影响

如表 7 所示, 与对照组相比, DSS 组与 DSS+白念珠菌组小鼠结肠组织中促炎因子 IL-1 β 、IL-18 水平明显升高 ($P<0.01$); 与 DSS+白念珠菌组相



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与 DSS+白念珠菌组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下图同
$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs DSS + *C. albicans* group, same as below figures

图 2 BAEB 对白念珠菌定植的 DSS 诱导 UC 小鼠结肠组织 ZO-1 蛋白表达的影响 (×200)

Fig. 2 Effect of BAEB on ZO-1 protein expression in colon tissue of UC mice induced by DSS with *C. albicans* colonization (× 200)

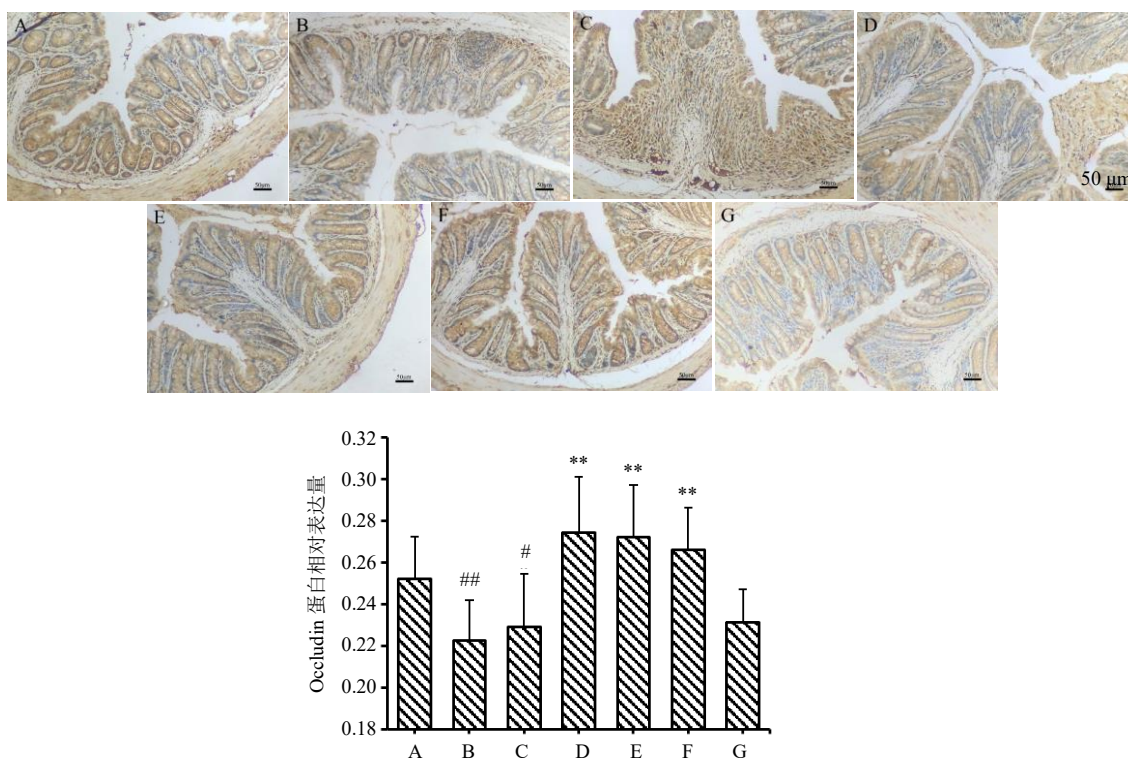


图 3 BAEB 对白念珠菌定植的 DSS 诱导 UC 小鼠结肠组织 Occludin 蛋白表达的影响 (×200)

Fig. 3 Effect of BAEB on Occludin protein expression in colon tissue of UC mice induced by DSS with *C. albicans* colonization (× 200)

表 7 BAEB 对白念珠菌定植的 DSS 诱导 UC 小鼠结肠组织 IL-1 β 和 IL-18 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)Table 7 Effect of BAEB on IL-1 β and IL-18 levels in colon tissue of UC mice induced by DSS with *C. albicans* colonization ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mg ⁻¹)	IL-18/(pg·mg ⁻¹)
对照	—	0.68 $\pm$ 0.06	0.72 $\pm$ 0.04
DSS	—	1.24 $\pm$ 0.09 ^{##}	1.22 $\pm$ 0.09 ^{##}
DSS+白念珠菌	—	1.28 $\pm$ 0.04 ^{##}	1.23 $\pm$ 0.25 ^{##}
BAEB	20	1.15 $\pm$ 0.07 [*]	1.06 $\pm$ 0.05 [*]
	40	1.18 $\pm$ 0.06 [*]	1.12 $\pm$ 0.04 [*]
	80	1.08 $\pm$ 0.06 ^{**}	1.04 $\pm$ 0.08 [*]
美沙拉嗪	200	1.02 $\pm$ 0.05 ^{**}	1.02 $\pm$ 0.06 [*]

比, BAEB 各剂量组小鼠结肠组织中 IL-1 β 、IL-18 水平均明显降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。

3.6 BAEB 对小鼠结肠组织 Dectin-1、NF- κ B、Syk、ASC、cleaved Caspase-1 和 NLRP3 蛋白表达的影响

如图 4 所示, 与对照组相比, DSS+白念珠菌组小鼠结肠组织 NLRP3、NF- κ B 和 Dectin-1 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$), ASC、cleaved Caspase-1 和 Syk 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 且 DSS+白念珠菌组的变化较 DSS 组明显; 与 DSS+白念珠菌组相比, BAEB 低剂量组 Syk 蛋

白表达水平显著降低 ($P < 0.01$); BAEB 中剂量组 ASC 和 Syk 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), NLRP3 和 NF- κ B 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01); BAEB 高剂量组 ASC 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), NF- κ B 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。

4 讨论

目前公认 UC 的发病机制与肠道菌群失衡及肠道免疫功能紊乱密切相关。近年来研究发现, UC 患者肠道内菌群多样性明显降低, 白念珠菌比例显著增加^[20], 白念珠菌在肠道过度定植与 UC 病情程度

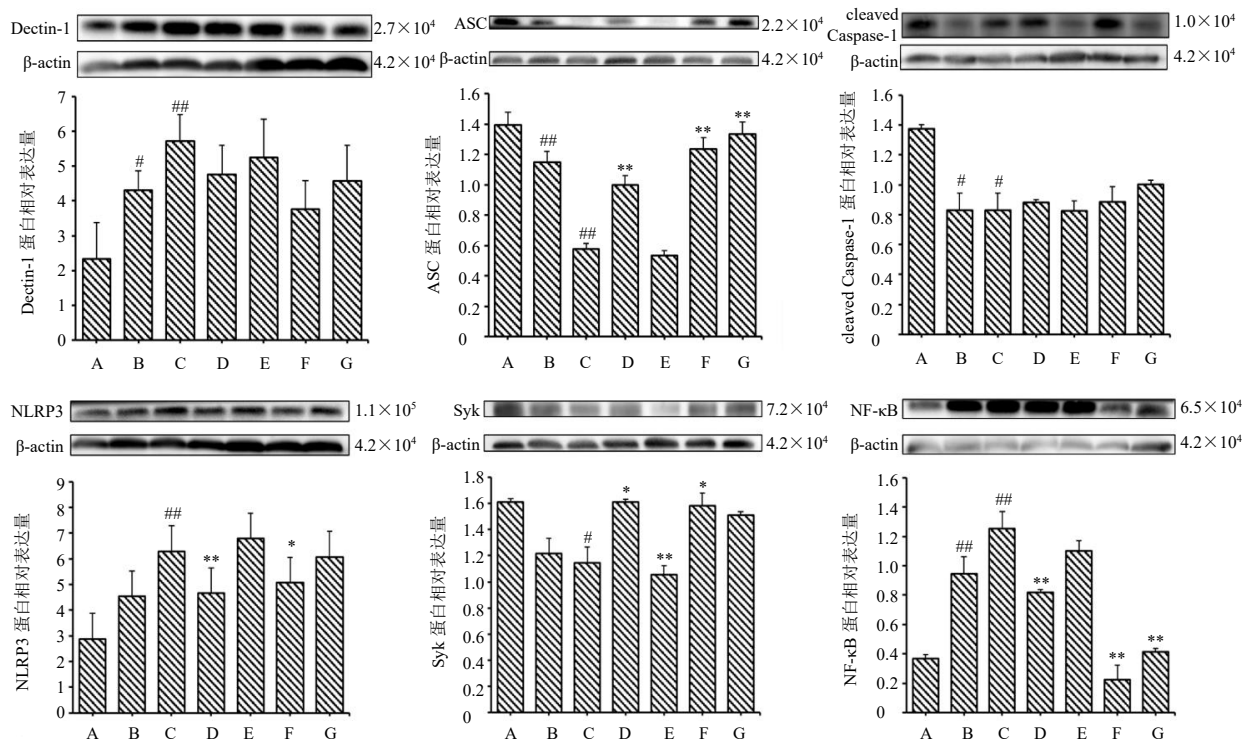


图 4 BAEB 对白念珠菌定植的 DSS 诱导 UC 小鼠结肠组织 NLRP3、Syk、NF- κ B、Dectin-1、ASC 和 cleaved Caspase-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Effect of BAEB on protein expressions of NLRP3, Syk, NF- κ B, Dectin-1, ASC and cleaved Caspase-1 in colon tissue of UC mice induced by DSS with *C. albicans* colonization ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

呈强相关性。但是目前对肠道真菌菌群的研究相对较少^[21]。

本研究中,通过饮用 DSS 结合 ig 白念珠菌构建白念珠菌异常定植下的小鼠 UC 模型。结果显示,DSS+白念珠菌组小鼠粪便培养出的白念珠菌远多于对照组和 DSS 组,且小鼠结肠黏膜损伤程度、血清和组织炎症因子水平均明显高于对照组和 DSS 组,与文献报道一致^[9]。给予 BAEB 治疗 7 d 后,小鼠的便溏便血、体质量下降和结肠长度缩短等体征得到显著改善,DAI 评分明显下降,结肠黏膜的炎性细胞浸润、上皮细胞损伤、腺体紊乱和消失的现象有所减轻,肠道白念珠菌 CFU 数明显减少,反映肠黏膜屏障功能的 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达增加。结果提示,BAEB 对白念珠菌定植的 UC 小鼠具有抑制肠道白念珠菌增殖、保护肠道黏膜屏障、减轻肠道炎症损伤的作用。

肠道白念珠菌过度定植时,白念珠菌通过转位激活肠黏膜组织内巨噬细胞 NLRP3 的表达、Caspase-1 的活化和 IL-1 β 、IL-18 的分泌^[22],以 NLRP3 炎症小体依赖性方式诱导初级巨噬细胞成熟并分泌 IL-1 β 、IL-18^[23]。炎症小体是一类由胞质内模式识别受体参与组装的多蛋白复合体,能够识别病原体表面的病原相关分子模式或者宿主来源的危险信号分子。当免疫细胞受到刺激时,炎症小体各组分结合成复合物,随后经过一系列酶解反应,产生和释放大量促炎性细胞因子 IL-1 β 和 IL-18。其中,对炎症小体的研究目前以 NLRP3 为最多^[24]。

NLRP3 炎症小体复合物由识别分子 NLRP3、接头分子 ASC 和效应分子 Caspase-1 等组成。当免疫细胞被细菌、真菌、病毒等病原体的病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs),以及三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP)、尿酸晶体、 β 淀粉样纤维等损伤相关分子模式分子 (damage-associated molecular patterns, DAMPs) 刺激时,NLRP3 炎症小体被激活。随后 NLRP3 自身寡聚化,招募并活化 ASC,ASC 活化形成大分子的二聚体,招募并活化 Caspase-1 前体。活化的 Caspase-1 剪切 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18,产生 IL-1 β 和 IL-18 并释放,引起宿主炎症反应^[25]。本研究中,DSS+白念珠菌组小鼠结肠组织促炎因子 IL-1 β 和 IL-18 水平明显高于对照组,说明在 DSS 诱导的基础上伴有白念珠菌的定植会加重 UC 的炎症反应,可能与激活结肠黏膜组织内巨噬细胞,触发

NLRP3 炎症小体活化,释放大炎症因子 IL-1 β 和 IL-18,造成结肠黏膜组织炎性损伤有关。白念珠菌异常定植可能参与这一过程。给予 BAEB 治疗后,小鼠结肠组织中 IL-1 β 、IL-18 水平降低,结肠黏膜组织炎性损伤有所减轻,推测 BAEB 可能是通过阻断 NLRP3 炎症小体活化及相关信号通路,进而抑制 IL-1 β 、IL-18 释放并抑制白念珠菌定植,从而发挥作用。

真菌感染时,巨噬细胞内 Dectin-1/Syk 通路得以激活,并介导 NLRP3 炎症小体活化,产生 IL-1 β 、IL-18,但大量 IL-1 β 、IL-18 的产生会引起相应组织的炎性损伤。为证实 BAEB 可能通过靶向 Dectin-1/Syk 通路及其介导的 NLRP3 炎症小体从而抑制 IL-1 β 、IL-18 释放以缓解 UC 的作用机制,检测 Dectin-1/Syk 通路中相关蛋白与 NLRP3 炎症小体的表达。白念珠菌细胞壁成分 β -1,3-葡聚糖作为 PAMP 被宿主免疫细胞,特别是巨噬细胞上的模式识别受体 Dectin-1 识别。Dectin-1 是膜相关 C 型凝集素受体家族的最重要成员。当 Dectin-1 结合 β -1,3-葡聚糖后,其胞内的免疫受体酪氨酸活化基序 (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) 中的酪氨酸首先被 Src 家族激酶磷酸化,继而招募 Syk, Syk 磷酸化后可激活磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C γ 2 (phospholipase C γ 2, PLC γ 2) /Ca²⁺,促使蛋白激酶 C δ (protein kinase C δ , PKC δ) 活化,诱导 Ca²⁺/活化 T 细胞核因子 (nuclear factor of activated T cells, NFAT) 和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) /NLRP3 炎症小体的合成,即白念珠菌 β -1,3-葡聚糖可通过 Dectin-1/Syk 信号通路活化 NLRP3 炎症小体,进而产生大量 IL-1 β 与 IL-18。因此,该信号通路被视为白念珠菌感染引起 NLRP3 炎症小体活化造成免疫炎症性损伤的一个重要干预靶标^[12]。本研究发现,给予 BAEB 治疗后,Dectin-1、NF- κ B、NLRP3 表达呈不同程度地降低,ASC、Syk 和 cleaved Caspase-1 表达上升。结果表明,BAEB 可能通过抑制 Dectin-1、NF- κ B、NLRP3 等蛋白的表达,抑制 ASC 二聚体化及 Syk 磷酸化等,抑制 Dectin-1/Syk 通路介导的 NLRP3 炎症小体过度活化,进而阻断 IL-1 β 与 IL-18 的产生来发挥抗 UC 作用。本研究发现,不同剂量的 BAEB 治疗效果存在差异。综合各项指标,以 BAEB 中剂量的作用效果较明显且稳定。说明 BAEB 在治疗白念珠菌异常定植下的小鼠 UC 时,治疗效果无剂量相关性,其作

用效果有一个最佳药物剂量。

综上所述,BAEB 通过抑制白念珠菌定植,促进黏膜上皮修复,减轻结肠黏膜损伤与炎性细胞浸润,减少促炎因子 IL-1 β 和 IL-18 的分泌,从而发挥对白念珠菌异常定植下的 UC 的治疗作用,其作用机制可能与 BAEB 抑制巨噬细胞 Dectin-1/Syk 通路介导的 NLRP3 炎症小体过度活化有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Du L, Ha C. Epidemiology and pathogenesis of ulcerative colitis [J]. *Gastroenterol Clin N Am*, 2020, 49(4): 643-654.
- [2] Wei S C, Sollano J, Hui Y T, et al. Epidemiology, burden of disease, and unmet needs in the treatment of ulcerative colitis in Asia [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 15(3): 275-289.
- [3] 张声生, 沈洪, 郑凯, 等. 溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识意见 (2017) [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(8): 3585-3589.
- [4] 万健, 吴开春. 溃疡性结肠炎癌变的危险因素和监测 [J]. 中华消化杂志, 2018, 38(12): 865-867.
- [5] 吴田田, 宋光. 溃疡性结肠炎与肠道微生物群关系进展 [J]. 现代消化及介入诊疗, 2020, 25(12): 1695-1698.
- [6] Markey L, Pugliese A, Tian T, et al. Decreased ecological resistance of the gut microbiota in response to clindamycin challenge in mice colonized with the fungus *Candida albicans* [J]. *mSphere*, 2021, 6(1): e00982-e00920.
- [7] 武艳芳, 陈平. 肠道微生态在炎症性肠病发病中的作用及治疗前景 [J]. 医学综述, 2017, 23(23): 4688-4693.
- [8] 耿曙光, 孙平良, 袁代解, 等. 安肠汤对溃疡性结肠炎大鼠肠道真菌基因表达的影响 [J]. 中医杂志, 2017, 58(24): 2132-2136.
- [9] 田歌. 白头翁汤正丁醇提取物对白念珠菌定植的溃疡性结肠炎的作用研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2017.
- [10] 李贞, 陈伟琴, 胡骏, 等. 中药对念珠菌的抑菌现状及机制研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2019, 53(12): 83-88.
- [11] Silva N C, Nery J M, Dias A L T. Aspartic proteinases of *Candida* spp.: Role in pathogenicity and antifungal resistance [J]. *Mycoses*, 2014, 57(1): 1-11.
- [12] Braga-Silva L A, Santos A L S. Aspartic protease inhibitors as potential anti-*Candida albicans* drugs: Impacts on fungal biology, virulence and pathogenesis [J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(16): 2401-2419.
- [13] 施高翔, 汪云霞, 冯鑫, 等. 白头翁汤正丁醇提取物诱导白念珠菌生物被膜细胞凋亡 [J]. 中国真菌学杂志, 2017, 12(1): 13-18.
- [14] 汪云霞, 马克龙, 王艳, 等. 白头翁汤正丁醇提取物对酸性条件下白念珠菌 pH 突变株黏附的影响 [J]. 中草药, 2019, 50(24): 6009-6016.
- [15] 阎力君, 张多, 卢文颖, 等. 正交试验优化白头翁汤抗白色念珠菌物质的提取工艺 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(24): 137-139.
- [16] 马克龙, 韩志君, 潘敏, 等. 肉桂醛对白念珠菌定植下 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠治疗作用及对 dectin-1/TLRs/NF- κ B 信号通路的影响 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(13): 3211-3219.
- [17] Choteau L, Vancraeynest H, le Roy D, et al. Role of TLR1, TLR2 and TLR6 in the modulation of intestinal inflammation and *Candida albicans* elimination [J]. *Gut Pathog*, 2017, 9: 9.
- [18] 王晓妹, 田歌, 段强军, 等. 白头翁汤正丁醇提取物对白念珠菌定植下溃疡性结肠炎小鼠的作用机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(14): 2979-2984.
- [19] 杜丽东, 马清林, 吴国泰, 等. 基于 IKK α /NF- κ B/COX-2 信号通路探讨乌梅丸治疗溃疡性结肠炎的机制 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37(2): 3-7.
- [20] 武艳芳, 陈平. 肠道微生态在炎症性肠病发病中的作用及治疗前景 [J]. 医学综述, 2017, 23(23): 4688-4693.
- [21] Standaert-Vitse A, Jouault T, Vandewalle P, et al. *Candida albicans* is an immunogen for anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody markers of Crohn's disease [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(6): 1764-1775.
- [22] 许莉, 李东升, 董碧麟, 等. 白色念珠菌经组织蛋白酶 B 途径诱导小鼠腹腔巨噬细胞 NLRP3 炎性体表达 [J]. 新乡医学院学报, 2014, 31(1): 1-4.
- [23] Rogiers O, Frising U C, Kuchariková S, et al. Candidalysin crucially contributes to Nlrp3 inflammasome activation by *Candida albicans* hyphae [J]. *mBio*, 2019, 10(1): e02221-e02218.
- [24] Duez H, Pourcet B. Nuclear receptors in the control of the NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Front Endocrinol*, 2021, 12: 630536.
- [25] Patel M N, Carroll R G, Galván-Peña S, et al. Inflammasome priming in sterile inflammatory disease [J]. *Trends Mol Med*, 2017, 23(2): 165.

[责任编辑 李亚楠]