

基于转录组学研究毛冬青三萜皂苷对脂多糖诱导小鼠肠损伤的保护作用及其机制

王莹¹, 陈冰莹¹, 伍钰蓉¹, 张颖茵¹, 王倩¹, 李瑜², 张蕾^{1*}

1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 广州中医药大学护理学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 探讨毛冬青三萜皂苷 (*Ilex pubescens* triterpenoid saponin, IPTS) 对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的小鼠肠损伤的作用及潜在机制。方法 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、模型组和 IPTS 低、中、高剂量 (88、176、264 mg/kg) 组, 给予药物干预 7 d, ip LPS 诱导小鼠小肠损伤, 造模 7 h 后, 采用苏木素-伊红 (HE) 染色法观察小鼠回肠组织病理变化; 检测小鼠血清中丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性; 采用 qRT-PCR 和 Western blotting 法检测回肠组织炎症因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , *IL-1 β*)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , *TNF- α*) mRNA 和肠屏障紧密连接蛋白 *ZO-1*、*Occludin* mRNA 及蛋白表达。通过转录组学测序挖掘 IPTS 作用于回肠的潜在机制。结果 与模型组比较, IPTS 组小鼠回肠组织完整, 氧化应激损伤改善 ($P < 0.001$), 回肠炎症因子水平降低 ($P < 0.01$), 肠屏障恢复 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。RNA-seq 测序结果显示, 与对照组比较, 模型组共筛选出 2584 个差异表达基因; 与模型组比较, IPTS 高剂量组共筛选出 259 个差异表达基因; 这些差异表达基因主要富集在免疫球蛋白 A (immunoglobulin A, IgA) 相关的肠道免疫、花生四烯酸代谢、B 细胞受体、瞬时受体电位 (transient receptor potential, TRP) 通道炎症调控、亚油酸代谢等信号通路。结论 IPTS 可以改善 LPS 诱导的小鼠小肠损伤, 可能与花生四烯酸代谢、IgA 相关的肠道免疫代谢以及 TRP 通道炎症调控通路密切相关。

关键词: 毛冬青三萜皂苷; 肠损伤; 转录组学; 氧化应激; 炎症; 肠屏障

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)22-7102-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.22.013

Effect and mechanism of *Ilex pubescens* triterpenoid saponins on lipopolysaccharide-induced intestinal barrier injury in mice based on transcriptome

WANG Ying¹, CHEN Bing-ying¹, WU Yu-rong¹, ZHANG Ying-yin¹, WANG Qian¹, LI Yu², ZHANG Lei¹

1. School of Pharmaceutical Science, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

2. School of Nursing, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To investigate the effect and potential mechanism of *Ilex pubescens* triterpenoid saponins (IPTS) on lipopolysaccharide (LPS)-induced small intestinal injury in mice. **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into control group, model group and IPTS low-, medium-and high-dose (88, 176, 264 mg/kg) groups. After 7 d of drug intervention, mice were ip LPS to induce small intestine injury. After 7 h of modeling, hematoxylin eosin (HE) staining was used to observe pathology of ileum in mice; Level of malondialdehyde (MDA) and activity of superoxide dismutase (SOD) in serum of mice were detected; qRT-PCR and Western blotting were used to detect inflammatory factor interleukin-1 β (*IL-1 β*), tumor necrosis factor- α (*TNF- α*) mRNA and intestinal barrier tight junction protein *ZO-1*, *Occludin* mRNA and protein expressions in ileum. The potential mechanism of IPTS on ileum was explored by transcriptome sequencing. **Results** Compared with model group, ileum in IPTS group was intact, oxidative stress injury was

收稿日期: 2022-08-16

基金项目: 广东省科技计划项目 (2016A020226031); 广东省自然科学基金资助项目 (2018A030313328); 广东省教育厅创新强校工程项目 (2016KTSCX019)

作者简介: 王莹 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础及其作用机制。Tel: 13128253065 E-mail: 839072446@qq.com

*通信作者: 张蕾, 女, 硕士生导师, 教授, 研究方向为中药药效物质基础及其作用机制。Tel: 15622182155 E-mail: zhangleic431@163.com

improved ($P < 0.001$), level of ileitis factor was decreased ($P < 0.01$), and intestinal barrier was restored ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). RNA-seq sequencing results showed that 2584 differentially expressed genes were screened from model group compared with control group; Compared with model group, 259 differentially expressed genes were screened out in IPTS high-dose group; These differentially expressed genes were mainly enriched in signaling pathway such as immunoglobulin A (IgA) related intestinal immunity, arachidonic acid metabolism, B cell receptor, transient receptor potential (TRP) channel inflammation regulation, linoleic acid metabolism, etc.

Conclusion IPTS can improve LPS induced intestinal injury in mice, which may be closely related to arachidonic acid metabolism, IgA related intestinal immune metabolism and TRP channel inflammatory regulation pathway.

Key words: *Ilex pubescens* triterpene saponins; intestinal barrier injury; transcriptome; oxidative stress; inflammation; intestinal barrier

毛冬青 *Ilex pubescens* Hook. et Am. 是冬青科冬青属植物, 是我国南方常用中药, 其主要功效为清热解毒、活血通络。中医通过辨证论治, 广泛应用毛冬青治疗心脑血管疾病, 其在降低不良反应等方面明显优于化学药, 且疗效稳定, 无耐药性和成瘾性, 患者容易接受^[1]。植物化学和药效学研究结果表明, 毛冬青的主要活性成分为三萜皂苷^[2]。然而, 当将毛冬青三萜皂苷 (*Ilex pubescens* triterpenoid saponin, IPTS) 的体内过程纳入药理机制的阐释中时, 却有系列问题亟待解决: 毛冬青主要药效物质三萜皂苷类成分口服给药血药浓度低, 即便相对吸收特性较好的苷元如毛冬青甲素, 单体口服给药的绝对生物利用度 $< 3\%$ ^[3-4]。本课题组前期组织分布研究结果发现, 大鼠 ig 毛冬青提取液后, IPTS 主要分布于胃肠道, 仅有少量分布于心脏, 脑中更是痕量的分布, 因此现有的基于非口服给药途径的药理学研究结果尚无法诠释其口服用药抗心脑血管性疾病的作用机制。

本课题组在研究 IPTS 抗动脉粥样硬化作用机制时发现, IPTS 不但可以调控肠道菌群结构改善动脉粥样硬化, 还能显著降低动脉粥样硬化小鼠血清中脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 水平^[5]。文献报道, 动脉粥样硬化疾病常伴随肠黏膜屏障功能障碍, 使其通透性增大, 从而导致肠道菌群产生的 LPS 透过肠屏障进入血液循环中。当 LPS 从肠道转移到循环中时, 与 LPS 结合蛋白形成复合体, 可以与单核细胞上的 CD14 结合进而导致促炎细胞因子的产生^[6]。基于“肠-心”轴理论、毛冬青在民间的抗炎用途和其组织分布特点, 推测毛冬青具有抗小肠炎性损伤, 维持肠黏膜屏障紧密连接和完整性, 进而发挥其抗心脑血管疾病的作用。由于通过高脂饮食制备的动脉粥样硬化模型伴肠道损伤周期长、成模率低, 本研究通过 ip LPS 建立小鼠小肠损伤的炎症模型, 探讨 IPTS 保护小肠黏膜屏障的作用, 并结合

转录组学测序分析, 探索其潜在机制和作用靶点。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 体质量 18~22 g, 购自珠海百试通生物科技有限公司, 动物合格证号 SCXK (粤) 2020-0051。动物于广州中医药大学中药学院动物房 SPF 级环境中适应性饲养 1 周, 温度 $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、12 h 光昼交替, 自由进食饮水。实验单位使用许可证编号为 SYXK (粤) 2019-0202, 动物实验经广州中医药大学中药学院实验动物伦理审查委员会批准 (批准号 ZYD-2021-223)。

1.2 药材

毛冬青购自广州白云山中药饮片有限公司, 经广州中医药大学张丹雁教授鉴定为冬青科冬青属植物毛冬青 *I. pubescens* Hook. et Am. 的干燥根。

1.3 药品与试剂

毛冬青皂苷 B₁ 对照品 (质量分数 $> 98\%$) 由广州中医药大学赵钟祥教授课题组提供; 4% 多聚甲醛固定液 (批号 21211717) 购自北京 Biosharp 公司; PBS 缓冲液 (批号 GA21120122694) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; LPS (批号 12190801) 购自美国 Sigma 公司; 生理盐水 (批号 0506A22) 购自雷根生物公司; 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒 (批号 20211119)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒 (批号 20211120) 购自南京建成生物工程研究所; TRIzol 试剂 (批号 03877118721)、HiFiScript gDNA Removal RT Master Mix 试剂盒 (批号 02322)、Magic SYBR Mixture 试剂盒 (批号 09321) 购自康为世纪公司; 小鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 引物 (批号 I620KA5091) 购自生工生物工程公司; DEPC 水 (批号 051821210702) 购自北京索莱宝公司; GAPDH 抗体 (批号 AC21110131A) 购自武汉赛维尔生物科

技有限公司; ZO-1 抗体(批号 GR3398704-6)、Occludin 抗体(批号 GR3383643-14)购自英国 Abcam 公司; 山羊抗兔 IgG 抗体(批号 S0001)购自 Affinity 公司; Marker(批号 91226047)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.4 仪器

LC-LX-HR165A 型冷冻离心机(上海力辰公司); Eclipse E100 型正置光学显微镜(日本尼康公司); THM51 119300 型全波长酶标仪、NC2000 型 Nanodrop 紫外定量仪、ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); SDS-PAGE 垂直电泳槽、垂直转印槽(美国 Bio-Rad 公司); Illumina Misseq 测序仪(美国 Illumina 公司)。

2 方法

2.1 IPTS 的制备

毛冬青根茎饮片打成粗粉,用 10 倍量的蒸馏水浸泡 24 h,浸泡 2 次,并定时搅拌,滤过,弃去滤液,滤过后的粗粉按料液比 1:10 加入 85%乙醇加热回流提取 2 次,每次 1 h,收集全部滤液,浓缩,干燥后得到毛冬青提取粉末。以毛冬青皂苷 B₁ 为对照品,采用比色法测定总三萜皂苷的质量分数,以对照品浓度为横坐标(x),吸光度为纵坐标(y),得标准曲线 $y=369.95x-0.0529$ ($R^2=1.000$),计算得三萜皂苷的质量分数为 81.6%。

2.2 造模、分组及给药

C57BL/6 小鼠随机分为对照组、模型组和 IPTS 低、中、高剂量(88、176、264 mg/kg)组,每组 12 只。IPTS 溶于 0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)配制成质量浓度为 8.8、17.6、26.4 mg/mL 的混悬液,各给药组 ig 相应药物(10 mL/kg),对照组和模型组 ig 等体积的 0.5% CMC-Na,1 次/d,连续 7 d。末次给药后,模型组和各给药组 ip LPS(10 mg/kg),造模 7 h 后,记录小鼠造模前后体质量及状态变化,计算小鼠 ip LPS 前后体质量差值。

2.3 IPTS 对肠损伤小鼠血清中 MDA 水平及 SOD 活性的影响

造模 7 h 后,对小鼠进行麻醉,摘眼球取血,室温静置 1 h 后,4 ℃、3800 r/min 离心 10 min,收集上清液,于-80 ℃保存。按照试剂盒说明书测定血清中 MDA 水平及 SOD 活性。

2.4 IPTS 对肠损伤小鼠回肠组织病理变化的影响

小鼠脱颈椎处死后,在冰上取回肠,用 PBS 溶于小心冲洗,取 0.5 cm 置于 4%多聚甲醛溶液中固

定,经石蜡包埋后切片,进行苏木素-伊红(HE)染色,于光学显微镜下观察小肠组织病理变化。

2.5 IPTS 对肠损伤小鼠回肠组织炎症因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和肠屏障蛋白 ZO-1、Occludin mRNA 表达的影响

取各组小鼠回肠组织 20 mg,按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析。引物序列:IL-1 β 上游引物 5'-CACTACAGGCTCCG-AGATGAACAAC-3'、下游引物 5'-TGTCGTTGCTT-GGTTCTCCTTGAC-3'; TNF- α 上游引物 5'-AGAGGTTGGCTATGGAGGCTGTG-3'、下游引物 5'-CCTGCATCGTTGACGGTCTTCC-3'; ZO-1 上游引物 5'-AACCCGAACTGATGCTGTGGATAG-3'、下游引物 5'-CGCCCTTGGAATGTATGTGGAGAG-3'; Occludin 上游引物 5'-TTGGCTACGGAGGTG-GCTATGG-、下游引物 5'-CCTTTGGCTGCTCTTG-GGTCTG-3'; GAPDH 上游引物 5'-GGTTGTCTCCT-GCGACTTCA-3'、下游引物 5'-TGGTCCAGGGTT-TCTTACTCC-3'。

2.6 IPTS 对肠损伤小鼠回肠组织 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达的影响

取各组小鼠回肠组织 30 mg,加入 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂,使用冷冻组织研磨仪进行匀浆(60 Hz、60 s),匀浆后放于碎冰上静置 20 min,4 ℃、1200 r/min 离心 5 min,取上清液。采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,加入 Loading buffer 后混匀,沸水煮 15 min 使蛋白变性。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,加入 5%脱脂牛奶,室温封闭 2.5 h;分别加入相应抗体,4 ℃孵育过夜;加入二抗,室温孵育 1 h,加入 ECL 工作液发光显色,采用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.7 RNA-Seq 测序分析

2.7.1 RNA 提取和 RNA-Seq 测序 分别取对照组、模型组、IPTS 高剂量组回肠组织 100 mg,置于 RNase-Free 冻存管内,于液氮中冷冻,委托(上海)美吉生物公司进行 RNA 提取和 RNA-Seq 测序,并使用该公司在线分析平台进行分析。转录测序具体流程如下:采用 TruSeq™ RNA sample preparation Kit 试剂盒建立 RNA 文库。首先利用带有 Oligo(dT)的磁珠从 1 μ g 总 RNA 中富集有 poly-A 尾的 mRNA,再加入 fragmentation buffer,将 mRNA 随机断裂成

300 bp 左右的小片段,接着采用 SuperScript double-stranded cDNA synthesis kit 试剂盒,加入六碱基随机引物,以 mRNA 为模板反转合成一链 cDNA,随后进行二链合成,形成稳定的双链结构。双链的 cDNA 结构为黏性末端,加入 End Repair Mix 将其补成平末端,随后在 3' 末端加上一个 A 碱基,用于连接 Y 字形的接头。cDNA 经过 PCR 富集后,beads (DNA clean beads) 筛选 200~300 bp 的条带。经 TBS380 定量后,使用 Illumina HiSeq xten/NovaSeq 6000 测序平台进行高通量测序,测序读长为 PE150。

2.7.2 测序滤过原始数据质控对比 对原始测序数据进行滤过,去除 reads 中的接头序列,去除序列末端质量值小于 20 的碱基,去除含 N 比率超过 10% 的 reads,舍弃去 adapter 及质量修剪后长度小于 20 bp 的序列,对滤过的数据与参考基因组比对分析。

2.7.3 基因差异表达分析 在 RNA-Seq 分析中,通过定位到基因组区域的序列数来计算基因的表达水平。使用 RSEM 软件对基因的表达水平进行定量分析,获得基因的序列数后,使用基于负二项分布的 DESeq2 软件对 Raw 数进行分析,基于一定的标准化处理和筛选条件获得比较组间表达差异的基因,最后按照表达量倍数差异和表达差异显著性进行筛选,校正的 P 值 (P_{adjust}) < 0.05 且 $|\log_2\text{FC}| \geq 2$ 。

2.7.4 基因本体 (gene ontology, GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 利用 GO 数据库,使用 Goatools 软件,进行 Fisher 精确检验,对差异基因进行 GO 功能显著性富集分析。采用 BH 方法对 P 值进行校正,当 $P_{\text{adjust}} < 0.05$ 时,认为此功能存在显著富集情况。使用 KOBAS 进行 KEGG 通路富集分析,计算原理同 GO 功能富集分析,满足 $P_{\text{adjust}} < 0.05$ 的 KEGG 通路定义为在差异表达基因中显著富集的 KEGG 通路。

2.7.5 IPTS 对 LPS 诱导的肠损伤小鼠回肠组织关键基因表达的影响 通过 qRT-PCR 验证关键差异基因肌醇-1,4,5-三磷酸受体 2 (inositol-1,4,5-trisphosphate receptor type 2, *ITPR2*)、嘌呤能受体 P2Y2 (purinergic receptor P2Y2, *P2RY2*)、整合素亚基 $\alpha 4$ (integrin subunit $\alpha 4$, *ITGA4*)、*IL-15*、趋化因子受体 4 (C-X-C motif chemokine receptor 4, *CXCR4*)、细胞色素 P450 家族 2 亚家族 C 成员 55 (cytochrome P450 family 2 subfamily C member 55, *CYP2C55*)、*CYP2C65*、*CYP2C66*、*CYP2C68*、V 组

磷脂酶 A2 (phospholipase A2 group V, *PLA2G5*) 的表达。取小鼠回肠组织 20 mg,按“2.5”项下方法进行 qRT-PCR 分析,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')	产物长度/bp
<i>ITPR2</i>	F: GGCTCGGTCAATGGCTTCATCAG R: GGCACACCTTGAACAGGCAGTC	124
<i>P2RY2</i>	F: GTGCTGTTGCCCGTGCTCTATG R: AGTCCGAAACTGCCAGGTGAAAC	139
<i>ITGA4</i>	F: AGGCAAAGAGGTCCCAGGCTAC R: TCTCCACTGCTTGAAACTCGTATGC	150
<i>IL-15</i>	F: ACATCCATCTCGTGCTACTTGTGT R: CCCAAAATGAAGACATGAATGCCAG	80
<i>CXCR4</i>	F: CCTGCCCACCATCTACTTCATCATC R: GGTACTTGTCGTCATGCTCCTTAG	110
<i>CYP2C55</i>	F: AGGATCGCATTC AAGAGGAAGCATC R: CAGATCACATTGGAGGGAGCACAG	112
<i>CYP2C65</i>	F: TGA CTCTGCGAACTTTGGGATGG R: AGGAGCACAGCCGAGGATGAAG	137
<i>CYP2C66</i>	F: GGTGTGTTTCTGGGGCTTCTCTC R: GCCAGGAGGAAGGTTTCTTCTCTG	87
<i>CYP2C68</i>	F: GCATGAGGTCCAGCGGTACATTG R: ATGCAGCACTGATGTCAGAGATGTC	133
<i>PLA2G5</i>	F: CACTGGCTTGTTCTCTGGCTTG R: GGCATTCTCTCTGGTCACCTTCTC	95

2.8 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析,计量资料满足正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料不满足正态分布用 $M (P_{25}, P_{75})$ 描述。采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行多组资料比较,方差齐时采用 LSD 进行两两比较,方差不齐时采用 Dunnett's T_3 法;不符合正态分布的数据采用非参数 Kruskal-Wallis 检验进行两两比较。

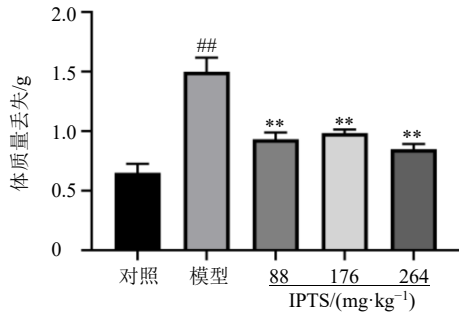
3 结果

3.1 IPTS 对肠损伤小鼠体质量的影响

如图 1 所示,与对照组比较,模型组小鼠体质量丢失明显升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠体质量丢失均明显降低 ($P < 0.01$)。表明小鼠 ip LPS 会造成体质量下降,IPTS 可以缓解 LPS 造成的小鼠体质量下降。

3.2 IPTS 对肠损伤小鼠血清中 MDA 水平及 SOD 活性的影响

如图 2 所示,与对照组比较,模型组小鼠血清中 MDA 水平显著升高 ($P < 0.001$),SOD 活性显著降低 ($P < 0.001$);与模型组比较,IPTS 高剂量组小鼠血清中 MDA 水平显著降低 ($P < 0.001$),各给药组 SOD 活性均显著升高 ($P < 0.001$)。表明小鼠 ip



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below figures

图 1 IPTS 对肠损伤小鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of IPTS on body weight of mice with intestinal barrier injury ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

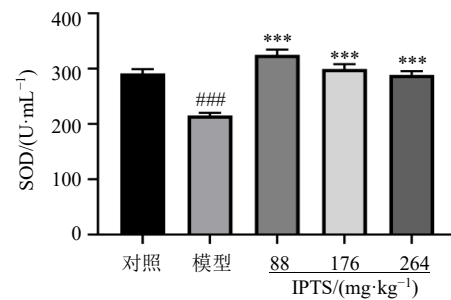
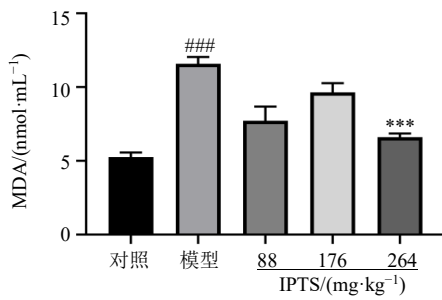


图 2 IPTS 对肠损伤小鼠血清中 MDA 水平及 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of IPTS on MDA level and SOD activity in serum of mice with intestinal barrier injury ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

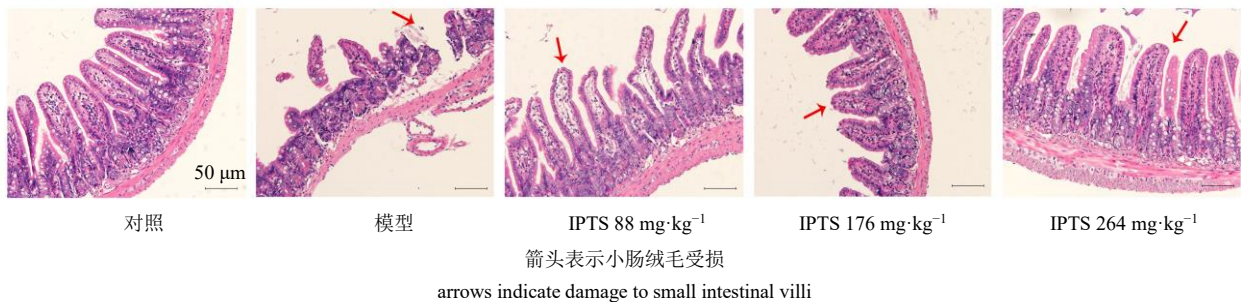


图 3 IPTS 对肠损伤小鼠回肠组织病理变化的影响 (HE, ×200)

Fig. 3 Effect of IPTS on pathological changes of ileum in mice with intestinal barrier injury (HE, ×200)

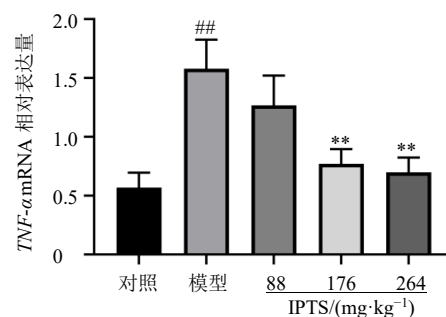
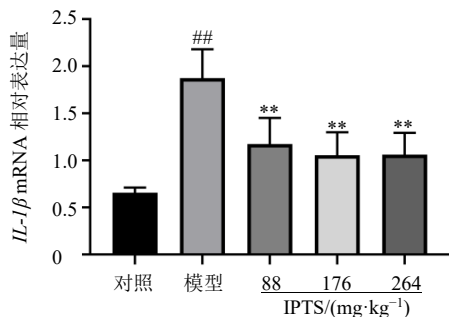


图 4 IPTS 对肠损伤小鼠回肠组织 IL-1β 和 TNF-α mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effect of IPTS on IL-1β and TNF-α mRNA expressions in ileum of mice with intestinal barrier injury ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

LPS 后, 体内发生氧化应激损伤, IPTS 能够缓解氧化应激损伤。

3.3 IPTS 对肠损伤小鼠回肠组织病理变化的影响

如图 3 所示, 对照组小鼠回肠组织结构正常, 绒毛排列紧密, 细胞形态正常, 无组织学病变。模型组小鼠回肠绒毛断裂, 肠黏膜上皮细胞脱落。与模型组比较, IPTS 低、中剂量组小鼠回肠绒毛恢复, 仅有小部分脱落; IPTS 高剂量组小鼠回肠损伤较轻, 肠黏膜结构基本完整, 肠绒毛大部分排列整齐。

3.4 IPTS 对肠损伤小鼠回肠组织炎症因子 IL-1β 和 TNF-α mRNA 表达的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠回肠组织中 IL-1β 和 TNF-α 的 mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组小鼠回肠

组织中 *IL-1 β* mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.01$)，IPTS 中、高剂量组回肠组织中 *TNF- α* mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.01$)。表明 IPTS 能够显著降低 LPS 诱导的肠损伤小鼠回肠组织中炎症因子表达。

3.5 IPTS 对肠损伤小鼠回肠组织肠屏障蛋白 *ZO-1*、*Occludin* mRNA 和蛋白表达的影响

如图 5 所示，与对照组比较，模型组小鼠回肠组织中屏障蛋白 *ZO-1*、*Occludin* 的 mRNA 表达水平均显著降低 ($P<0.001$)；与模型组比较，IPTS 高剂量组回肠组织中 *ZO-1* 的 mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.001$)，IPTS 中、高剂量组回肠组织中

Occludin 的 mRNA 表达水平明显升高 ($P<0.05$ 、 0.001)。

如图 6 所示，与对照组比较，模型组小鼠回肠组织中 *ZO-1* 和 *Occludin* 蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.001$)；与模型组比较，IPTS 中、高剂量组回肠组织中 *ZO-1* 和 *Occludin* 蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.01$ 、 0.001)。

以上结果表明，小鼠 ip LPS 后，回肠组织中肠屏障蛋白 *ZO-1* 和 *Occludin* 的 mRNA 及蛋白表达均显著降低，造成回肠肠屏障损伤；IPTS 能够显著恢复其表达，保护回肠肠屏障。

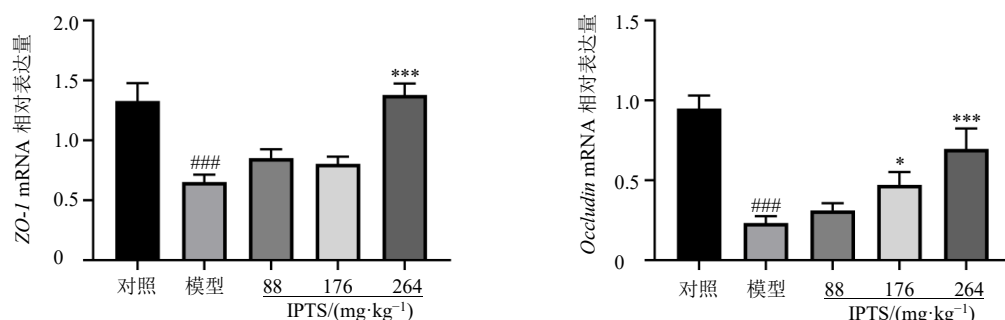


图 5 IPTS 对肠损伤小鼠回肠组织 *ZO-1* 和 *Occludin* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 5 Effect of IPTS on *ZO-1* and *Occludin* mRNA expressions in ileum of mice with intestinal barrier injury ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

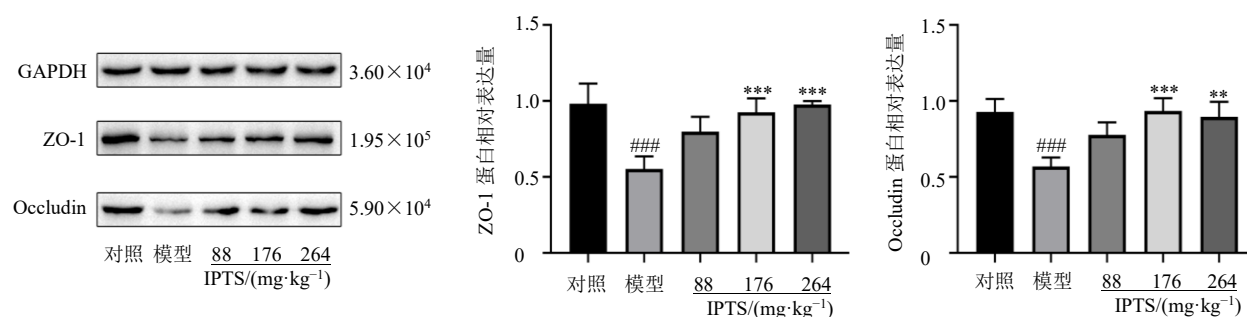


图 6 IPTS 对肠损伤小鼠回肠组织 *ZO-1* 和 *Occludin* 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 6 Effect of IPTS on *ZO-1* and *Occludin* protein expressions in ileum of mice with intestinal barrier injury ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3.6 转录组学测序数据的质量评估

本研究共完成 14 个样品（对照组 4 个、模型组 5 个、IPTS 高剂量组 5 个）的转录组测序分析。经质量控制所有样品的误差率小于 0.025 3%，所有样品的 Q_{20} 均大于 97.85%， Q_{30} 均大于 93.94%。根据饱和度曲线可知，所有样品测序数据量已满足定量要求。覆盖度分布图说明测序无偏向性，测序所得序列在基因上均匀分布。

3.7 基因差异表达分析结果

模型组和对照组之间有 2584 个差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs)，与对照组比

较，模型组上调 DEGs 1119 个，下调 DEGs 1465 个；IPTS 高剂量组和模型组之间有 259 个 DEGs，与模型组比较，IPTS 高剂量组上调 DEGs 208 个，下调 DEGs 51 个。由差异表达基因聚类分析图（图 7）可知，IPTS 在一定程度上回调了小鼠 ip LPS 后回肠组织 DEGs。

3.8 DEGs 富集分析

将筛选出的 DEGs 进行 GO 和 KEGG 富集分析。GO 富集结果见图 8，模型组与对照组相比，与分子功能相关的差异基因主要富集在连接、催化活性；与细胞成分相关的主要富集于细胞部分、细胞

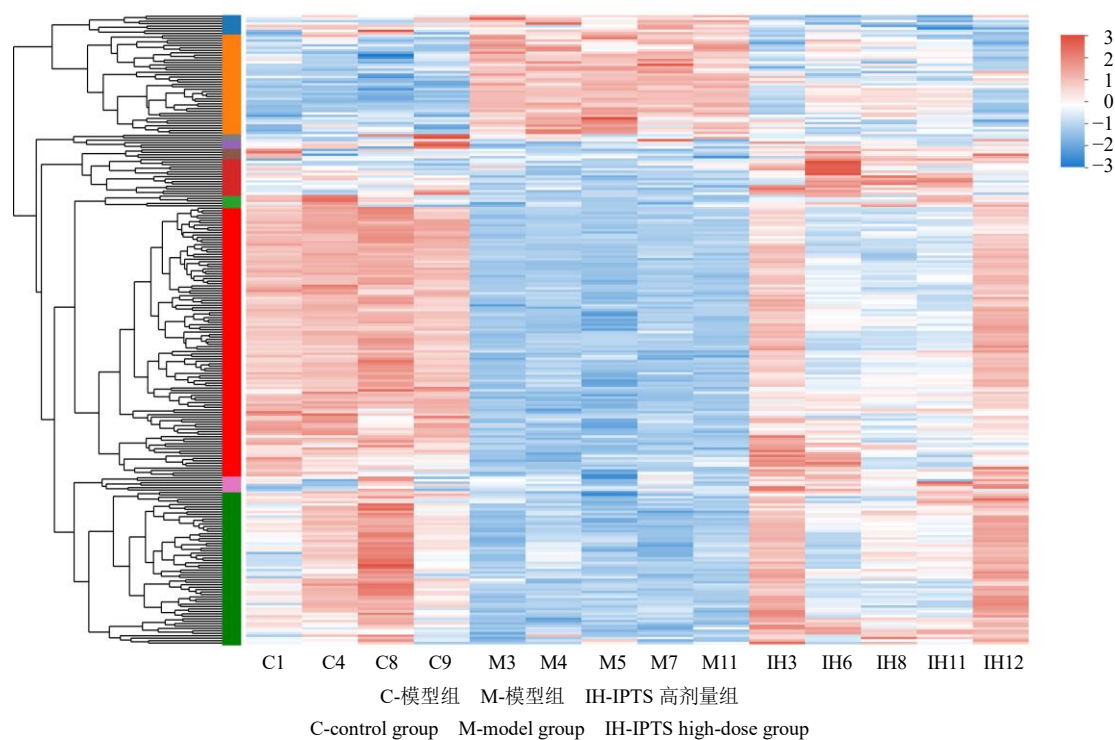


图 7 DEGs 聚类分析图

Fig. 7 Cluster analysis map of DEGs

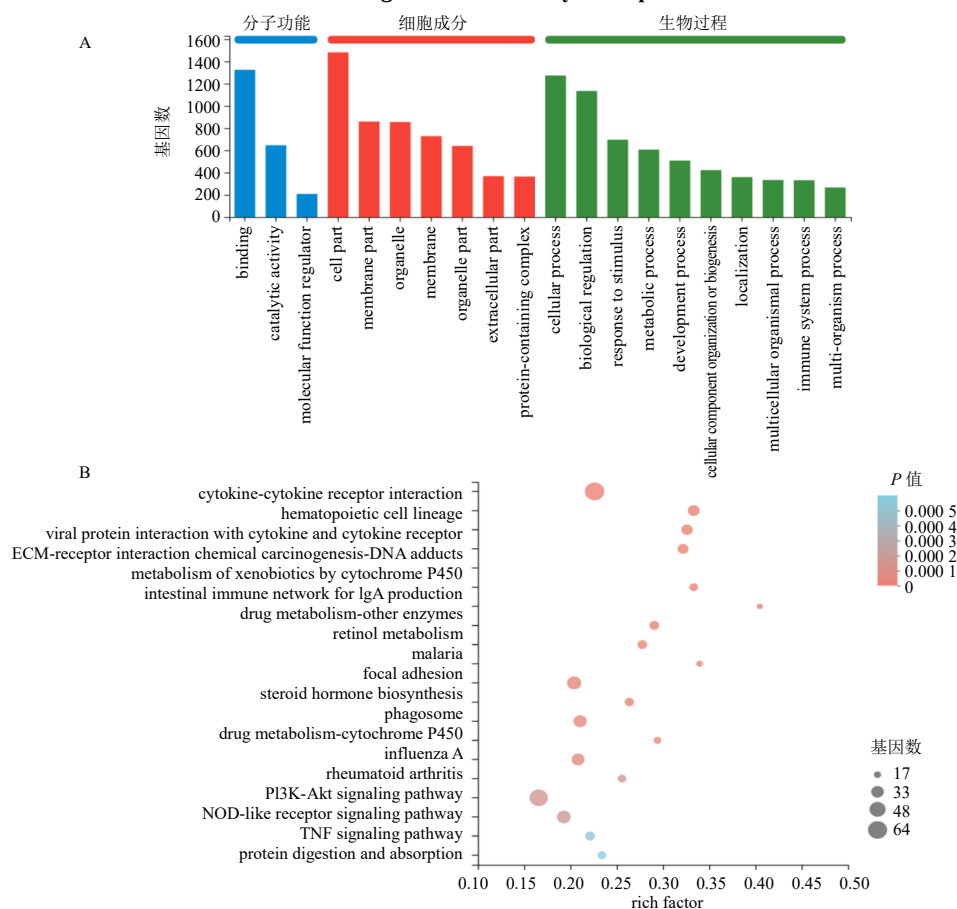


图 8 对照组与模型组 DEGs 的 GO 功能 (A) 和 KEGG 通路 (B) 富集分析

Fig. 8 GO function (A) and KEGG pathway (B) enrichment analysis of DEGs between control group and model group

器、细胞膜；与生物过程相关的主要富集在细胞过程、生物调控。KEGG 通路主要富集在 IgA 生成相关肠道免疫网络、甾体激素生物合成、磷脂酰肌醇 3-激酶（phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K）-蛋白激酶 B（protein kinase B, Akt）信号通路、TNF 信号通路、NOD 样受体信号通路、核因子- κ B（nuclear factor- κ B, NF- κ B）信号通路等。

如图 9 所示，IPTS 高剂量组与模型组相比，与分子功能相关的差异基因主要富集在连接、催化活性；与细胞成分相关的主要富集于细胞部分、细胞器、细胞膜；与生物过程相关的主要富集在细胞过程、生物调控、代谢过程。KEGG 通路主要富集在免疫球蛋白 A（immunoglobulin A, IgA）生成相关肠道免疫网络、亚油酸代谢、色氨酸代谢、花生四烯酸代谢、药物代谢-细胞色素 P450、B 细胞受体信号通路、瞬时受体电位（transient receptor potential, TRP）通道炎症调控通路等。

3.9 IPTS 对肠损伤小鼠回肠组织关键基因表达的影响

以 *GAPDH* 为内参基因，通过 qRT-PCR 对 RNA-Seq 分析结果中 TRP 通道炎症调控、花生四烯酸代谢、IgA 相关的肠道免疫相关通路的 10 个关键基因 *P2RY2*、*ITPR2*、*ITGA4*、*IL-15*、*CXCR4*、*CYP2C55*、*CYP2C65*、*CYP2C66*、*CYP2C68*、*PLA2G5* 进行 mRNA 表达水平的验证。如图 10 所示，与对照组比较，模型组小鼠回肠组织中 *P2RY2*、*ITPR2*、*ITGA4*、*IL-15*、*CXCR4*、*CYP2C55*、*CYP2C65*、*CYP2C66*、*CYP2C68* mRNA 表达水平均显著降低（ $P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001 ），*PLA2G5* mRNA 表达水平显著升高（ $P < 0.001$ ）；与模型组比较，IPTS 高剂量组回肠组织中 *P2RY2*、*ITPR2*、*ITGA4*、*IL-15*、*CXCR4*、*CYP2C55*、*CYP2C65*、*CYP2C66*、*CYP2C68* mRNA 表达水平均显著升高（ $P < 0.05$ 、 0.01 ），*PLA2G5* mRNA 表达水平显著降低（ $P < 0.01$ ）。

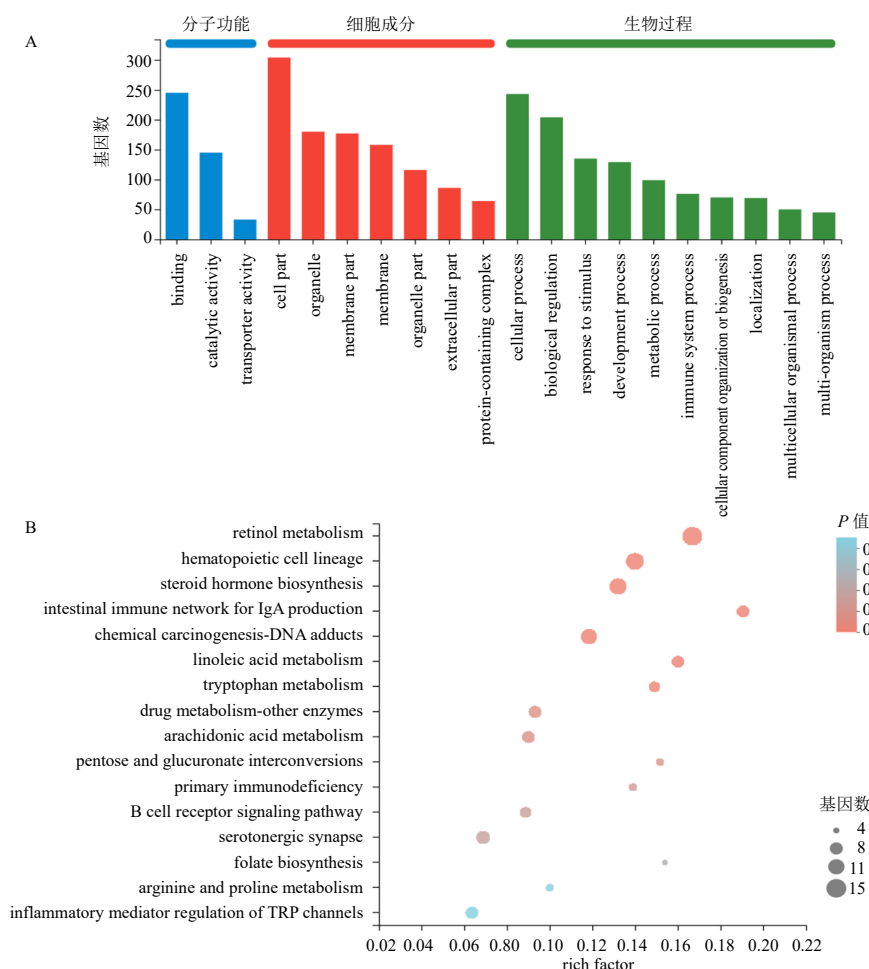
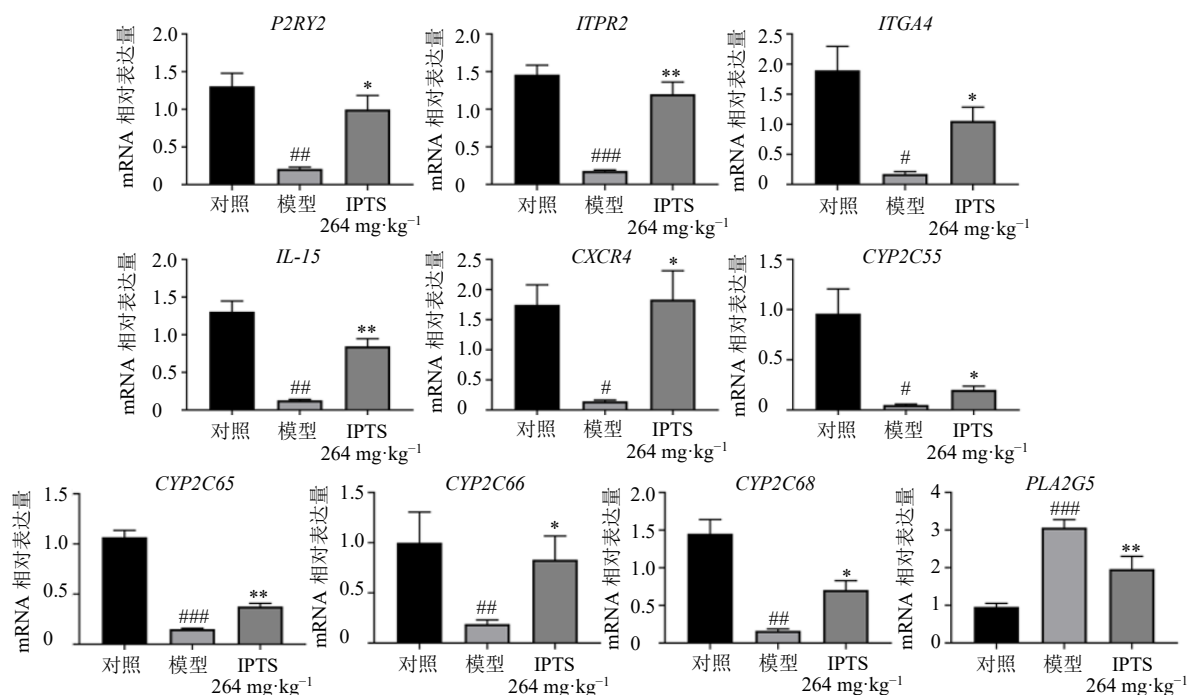


图 9 模型组与 IPTS 高剂量组 DEGs 的 GO 功能 (A) 和 KEGG 通路 (B) 富集分析

Fig. 9 GO function (A) and KEGG pathway (B) enrichment analysis of DEGs between model group and IPTS high-dose group

图 10 IPTS 对肠损伤小鼠回肠组织中关键基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 10 Effect of IPTS on expressions of key genes in ileum of mice with intestinal barrier injury ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

LPS 是革兰阴性菌细胞壁的一种成分, 在肠屏障功能障碍中有着重要作用, LPS 诱导的模型被广泛认为是评价肠道损伤的代表性实验模型^[7]。在 LPS 刺激下, NF- κ B 信号通路被激活, 释放大炎症因子如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等。肠道炎症与肠屏障破坏有关, 肠上皮炎症可通过炎症信号转导下调紧密连接蛋白的表达^[8]。肠道机械屏障是肠屏障中重要的组成部分, 由单层的肠上皮细胞及细胞间的连接组成。其中, 细胞间的连接方式包括紧密连接、黏附连接等, 紧密连接是细胞间主要的连接方式。与紧密连接相关的蛋白有 ZO 蛋白家族、Occludin、Claudins 蛋白家族等, 这些蛋白的表达有助于肠屏障功能^[9]。本研究结果显示, IPTS 可以下调肠损伤小鼠回肠组织中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 的水平, 上调回肠组织中紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin 表达。

MDA 是脂质过氧化的产物, 被认为是过度氧化应激的指标。SOD 可以催化 O₂^{·-}歧化为 H₂O₂ 和 O₂, 参与抗氧化系统。小肠过度氧化应激反应可以破坏脂质和蛋白质等重要细胞成分, 进而导致肠屏障损伤^[7]。本研究发现, IPTS 降低肠损伤小鼠血清中 MDA 水平, 升高 SOD 活性, 表明 IPTS 可以抑制机体过度氧化应激反应, 保护肠屏障。

本研究对对照组、模型组、IPTS 高剂量组进行

转录组学测序。KEGG 通路富集分析结果显示, DEGs 主要富集在 IgA 相关的肠道免疫、花生四烯酸代谢、B 细胞受体、TRP 通道炎症调控、亚油酸代谢等信号通路。IgA 是黏膜免疫系统含量最丰富的抗体亚型, 分泌型免疫球蛋白 A 是由二聚体 IgA、J 链和分泌成分组成的聚合物免疫球蛋白, 是机体黏膜局部抗感染免疫的主要抗体^[10]。肠上皮中的分泌型免疫球蛋白 A 可以拦截入侵的病原体, 防止病原体对肠道屏障的渗透, 并将病原体从组织中排泄出来^[11]。本研究选取 IgA 相关的肠道免疫通路上的 IL-15、CXCR4 基因进行验证。其中, IL-15 是一种 T 细胞生长因子, 可诱导生发中心 B 细胞增殖、分化和 Ig 合成^[12]。趋化因子受体 CXCR4 是趋化因子基质细胞衍生因子 12 (C-X-C motif chemokine ligand 12, CXCL12) 的特异受体。CXCL12 对淋巴细胞有强烈的趋化作用^[13]。因此, IPTS 可能是通过调节其表达进而调节小肠免疫系统, 维持肠屏障功能。

花生四烯酸是一种 ω -6 多不饱和脂肪酸。花生四烯酸代谢通路上的关键基因 PLA2G5, 具有将细胞膜内表面酯化的花生四烯酸水解成游离形式的作用, 再由然后由环氧合酶、脂氧合酶和细胞色素 P450 酶进一步代谢成一系列生物活性介质, 包括前列腺素、白三烯、二十碳四烯酸等, 有助于细胞炎

症信号的传递,被认为是炎症性疾病和心血管疾病的预防和治疗靶点^[14-15]。本研究结果显示,IPTS可能是通过下调 PLA2G5 的表达,上调细胞色素 P450 家族(CYP2C55、CYP2C65、CYP2C66、CYP2C68)的表达,抑制小肠炎症的发生。

此外,TRP 通道是一种阳离子选择性通道,广泛存在于胃肠道,作为各种刺激的检测器和 G 蛋白偶联受体的二级转导。TRP 通道的激活可以引发相关神经肽的炎症并启动免疫反应,在控制单核细胞和巨噬细胞的吞噬、产生趋化因子和细胞因子等方面发挥重要作用^[16],是炎症通路中的重要信号成分^[17]。该通路的关键基因 P2RY2 属于嘌呤能受体家族,能被三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)或其他核苷酸激活。其中, P2Y 受体主要为 G 蛋白偶联受体,可以调节 TRP 通道。该通路另一关键基因 ITPR2 是一种内质网钙释放通道,该基因编码的蛋白家族成员是细胞内第 2 信使钙释放通道。因此, IPTS 可能是通过调节 P2RY2 和 ITPR2 的表达,影响 TRP 通道,进一步抑制小肠炎症反应。

综上所述,本研究通过 LPS 诱导建立小鼠小肠损伤模型,通过检测炎症因子水平、肠屏障蛋白的表达等方法证明 IPTS 具有保护小肠肠屏障的作用。利用转录组学测序的手段,深入探究潜在机制,结果显示 IPTS 通过介导 IgA 相关的肠道免疫信号通路、花生四烯酸代谢的信号通路、TRP 通道炎症调控通路和 B 细胞受体信号通路等多种途径发挥保护作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 乔宛虹. 毛冬青的药理作用及临床应用研究概况 [J]. 中国现代药物应用, 2008, 2(5): 104-106.
- [2] 范星岳, 余继英. 毛冬青活性成分及检测方法的研究进展 [J]. 华西药学杂志, 2019, 34(5): 512-518.
- [3] 柳文媛, 李萍, 冯锋, 等. 大鼠血浆中冬青素 A 的 LC-MS 测定法及其药动学研究 [J]. 中国药学, 2010, 19(1): 38-42.
- [4] 李美芬, 赵钟祥, 林朝展, 等. 毛冬青皂苷元 ilexgenin A 在大鼠体内的药动学研究 [J]. 华西药学杂志, 2012, 27(3): 296-297.
- [5] 白荣钰, 易欢, 陈丰连, 等. 毛冬青三萜皂苷对动脉粥样硬化大鼠肠道菌群的影响 [J]. 中草药, 2021, 52(20): 6245-6253.
- [6] Verhaar B J H, Prodan A, Nieuwdorp M, et al. Gut microbiota in hypertension and atherosclerosis: A review [J]. *Nutrients*, 2020, 12(10): E2982.
- [7] Zhuang S, Zhong J, Bian Y F, et al. Rhein ameliorates lipopolysaccharide-induced intestinal barrier injury via modulation of Nrf2 and MAPKs [J]. *Life Sci*, 2019, 216: 168-175.
- [8] Wu W C, Wang S S, Liu Q, et al. Metformin protects against LPS-induced intestinal barrier dysfunction by activating AMPK pathway [J]. *Mol Pharm*, 2018, 15(8): 3272-3284.
- [9] Sánchez de Medina F, Romero-Calvo I, Mascaraque C, et al. Intestinal inflammation and mucosal barrier function [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2014, 20(12): 2394-2404.
- [10] Hand T W, Reboldi A. Production and function of immunoglobulin A [J]. *Annu Rev Immunol*, 2021, 39: 695-718.
- [11] Pietrzak B, Tomela K, Olejnik-Schmidt A, et al. Secretory IgA in intestinal mucosal secretions as an adaptive barrier against microbial cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): E9254.
- [12] Patidar M, Yadav N, Dalai S K. Interleukin 15: A key cytokine for immunotherapy [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2016, 31: 49-59.
- [13] Mousavi A. CXCL12/CXCR4 signal transduction in diseases and its molecular approaches in targeted-therapy [J]. *Immunol Lett*, 2020, 217: 91-115.
- [14] Wang B, Wu L J, Chen J, et al. Metabolism pathways of arachidonic acids: Mechanisms and potential therapeutic targets [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 94.
- [15] Sztolsztener K, Chabowski A, Harasim-Symbor E, et al. Arachidonic acid as an early indicator of inflammation during non-alcoholic fatty liver disease development [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(8): 1133.
- [16] Santoni G, Morelli M B, Amantini C, et al. "Immuno-transient receptor potential ion channels": The role in monocyte-and macrophage-mediated inflammatory responses [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1273.
- [17] Rajasekhar P, Poole D P, Veldhuis N A. Role of nonneuronal TRPV4 signaling in inflammatory processes [J]. *Adv Pharmacol*, 2017, 79: 117-139.

[责任编辑 李亚楠]