

基于 Notch 信号通路研究白头翁汤对溃疡性结肠炎小鼠肠黏液屏障的保护作用

刘伟^{1,3}, 刘又前², 蒋翠花^{1,3}, 张东建^{1,3}, 方雨夕^{1,3}, 龚旻^{1,4}, 李寅庆⁵, 王甜甜⁵, 张健^{1,2,3*}

1. 南京中医药大学第三临床医学院, 江苏 南京 210028

2. 南京市溧水区中医院, 江苏 南京 211200

3. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028

4. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 210009

5. 河北御芝林药业有限公司, 河北 石家庄 050000

摘要:目的 探讨白头翁汤对葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 诱导的溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 小鼠肠黏液屏障的保护作用以及对 Notch 通路的影响。方法 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、模型组、美沙拉嗪 (50 mg/kg) 组和白头翁汤低、高剂量 (7.4、14.8 g/kg) 组, 对照组小鼠自由饮用纯净水, 其余各组连续 8 d 自由饮用 2.5% DSS 溶液诱导 UC 模型, 造模同时各给药组 ig 相应药物。每日记录小鼠体质量、粪便稠度以及血便情况; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色观察结肠组织病理变化; 采用 AB-PAS 染色观察结肠组织黏蛋白 2 (mucin 2, MUC2) 的分泌情况; ELISA 法检测结肠组织中髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 活性及促炎因子白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和抗炎因子 IL-10 的含量; 免疫组化法检测结肠组织 Ki67 的表达情况; 免疫荧光法测定结肠组织富含亮氨酸重复序列的 G 蛋白偶联受体 5 (leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5, Lgr5⁺) 肠道干细胞 (intestinal stem cells, ISCs) 阳性细胞数; Western blotting 测定结肠组织 Notch-1、Atoh1、Hes1 和 MUC2 蛋白表达。结果 与模型组比较, 白头翁汤能够缓解 DSS 诱导的 UC 小鼠体质量降低和疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 缓解结肠组织的缩短、水肿以及病理学损伤 ($P < 0.01$ 、 0.001), 减少炎性细胞浸润、隐窝的破坏与杯状细胞的丢失, 降低结肠组织 MPO 活性和 IL-1 β 、TNF- α 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 升高 IL-10 水平 ($P < 0.05$), 增加结肠组织 Ki67 阳性细胞数 ($P < 0.01$), 促进 MUC2 的分泌和 Lgr5⁺ ISCs 的阳性细胞数, 并下调 Notch 和 Hes-1 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.001), 上调 Atoh1 和 MUC2 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 白头翁汤能够降低 UC 小鼠结肠组织促炎细胞因子水平, 增加 Lgr5⁺ ISCs 的增殖和分化, 保护隐窝和杯状细胞结构, 促进 MUC-2 分泌, 其作用可能与调控 Notch-1/Atoh1/Hes1 通路密切相关。

关键词: 白头翁汤; 溃疡性结肠炎; 肠道干细胞; 黏液屏障; Notch 通路; 白头翁皂苷 B₄; 黄柏碱; 小檗碱; 表小檗碱; 黄连碱; 巴马汀; 秦皮甲素; 秦皮乙素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)16-5257-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.16.014

Protective effect of Baitouweng Decoction on intestinal mucus barrier in mice with ulcerative colitis based on Notch signaling pathway

LIU Wei^{1,3}, LIU You-qian², JIANG Cui-hua^{1,3}, ZHANG Dong-jian^{1,3}, FANG Yu-xi^{1,3}, GONG Min^{1,4}, LI Yin-qing⁵, WANG Tian-tian⁵, ZHANG Jian^{1,2,3}

1. School of Third Clinical Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

2. Nanjing Lishui District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 211200, China

3. Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

4. School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

收稿日期: 2023-03-21

基金项目: 南京市卫生科技发展专项资金项目 (YKK22241)

作者简介: 刘伟 (1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。E-mail: lw20201239@163.com

*通信作者: 张健 (1973—), 男, 博士, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药化学。E-mail: zhangjian@jsatcm.com

5. HeBei Yuzhilin Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang 050000, China

Abstract: Objective To explore the protective effect of Baitouweng Decoction (白头翁汤, BTWD) on intestinal mucus barrier in mice with ulcerative colitis (UC) induced by dextran sodium sulfate (DSS) and its effect on Notch pathway. **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into control group, model group, mesalazine (50 mg/kg) group and BTWD low-, high-dose (7.4, 14.8 g/kg) groups. The mice in control group were free to drink pure water, and the other groups were free to drink 2.5% DSS solution for 8 d to induce UC model. At the same time, each group was given corresponding drugs. The body weight, fecal consistency and bloody stool of mice were recorded every day. HE staining was used to observe the pathological changes of colon tissue. The secretion of mucin 2 (MUC2) in colon tissue was observed by AB-PAS staining. The activity of myeloperoxidase (MPO) and contents of pro-inflammatory factors interleukin-6 (IL-6), IL-1 β , tumor necrosis factor- α (TNF- α) and anti-inflammatory factor IL-10 in colon tissue were detected by ELISA. The expression of Ki67 in colon tissue was detected by immunohistochemistry. The number of positive cells of leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 (Lgr5⁺) intestinal stem cells (ISCs) in colon tissue was determined by immunofluorescence. Western blotting was used to detect Notch-1, Atoh1, Hes1 and MUC2 protein expressions in colon tissue. **Results** Compared with model group, BTWD alleviated the decrease of body weight and increase of disease activity index (DAI) in UC mice induced by DSS ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), alleviated the shortening, edema and pathological damage of colon tissue ($P < 0.01, 0.001$), reduced the infiltration of inflammatory cells, destruction of crypts and goblet cells, decreased MPO activity and IL-1 β , TNF- α levels in colon tissue ($P < 0.05, 0.01$), increased IL-10 level ($P < 0.05$), increased the number of Ki67 positive cells in colon tissue ($P < 0.01$), promoted the secretion of MUC2 and the number of Lgr5⁺ ISCs positive cells, down-regulated Notch and Hes-1 protein expressions ($P < 0.05, 0.001$), up-regulated Atoh1 and MUC2 protein expressions ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** BTWD can reduce the level of pro-inflammatory cytokines in colon tissue of UC mice, increase the proliferation and differentiation of Lgr5⁺ ISCs, protect crypt and goblet cell structure, and promote the secretion of MUC-2, which may be related to the regulation of Notch-1/Atoh1/Hes1 pathway. **Key words:** Baitouweng Decoction; ulcerative colitis; intestinal stem cells; mucus barrier; Notch signaling pathway; pulchinoside B₄; phellodendrine; berberine; epiberberine; coptidine; palmatine; esculin; esculetin

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种肠道炎症性疾病, 通常从直肠黏膜开始, 连续性地延伸至近端结肠, 最终累及整个结肠, 其临床症状主要为里急后重、腹痛、血性腹泻^[1]。在过去的 10 年中, 全球 UC 的发病率显著上升, 同时数据表明长期感染 UC 的患者更容易患结肠癌的风险^[2-5]。目前临床上治疗 UC 的主要药物为氨基水杨酸盐类和免疫抑制剂, 但由于症状容易持续复发, 长期的治疗会产生严重的不良反应^[6]。因此迫切需要寻找疗效显著、不良反应小的药物用于临床治疗。

目前 UC 的病因尚未阐明清楚, 但诸多证据表明, 黏液屏障功能障碍与 UC 的发生发展密切相关^[7-8]。黏液屏障作为抵御肠上皮细胞和肠腔细菌直接接触的第一道屏障, 可以有效地将肠上皮细胞与肠腔内容物隔离, 保护上皮细胞免受肠道细菌和病原体的侵袭。肠道杯状细胞分泌的黏蛋白 2 (mucin 2, MUC2) 是构成黏液屏障最主要的成分^[9-10]。杯状细胞由富含亮氨酸重复序列的 G 蛋白偶联受体 5 (leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5, Lgr5⁺) 肠道干细胞 (intestinal stem cells, ISCs) 分化而来, Notch 信号被报道在调控肠道干细胞的增

殖和分化中起重要作用^[11]。当 Notch 过度激活时, 会限制 Lgr5⁺ 肠道干细胞向杯状细胞的分化, 削弱黏液屏障^[12]。

中药作用温和, 具有多成分、多靶点的特点, 以及较少的不良反应, 在 UC 临床治疗中发挥重要作用^[1,13]。中医根据 UC 的临床症状, 将其归于“肠癖”“下利”“滞下”等范畴。《伤寒论辨厥阴病脉证并治》载有“热利下重者, 白头翁汤主之”。白头翁汤主治厥阴下利属热证者, 被认为是治疗湿热下利的基础方^[1]。白头翁汤由白头翁、黄连、黄柏、秦皮组成, 现代药理学研究表明白头翁汤可以通过调节肠道菌群^[14]和抑制炎症反应^[15-16]等方式改善结肠炎症, 目前尚无报道白头翁汤能否通过改善黏液屏障功能来缓解 UC。因此, 本研究通过 2.5% 葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 建立 UC 小鼠模型, 从结肠黏液屏障修复角度, 探讨白头翁汤对 UC 黏液层的保护作用以及对 Notch 通路的影响, 为其临床推广应用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 40 只, 6~8 周龄,

体质量 18~22 g, 购自斯贝福(北京)生物技术有限公司, 合格证号 SCXK(京)2019-0010。动物在标准的实验室条件下饲养, 温度(25±3)℃, 相对湿度(53±3)%, 12 h 明暗光周期, 自由进食饮水, 适应性饲养 7 d 后开始实验。动物实验方案符合伦理规定, 并经江苏省中医药研究院伦理委员会批准(批准号 AEWC-20210810-163)。

1.2 药材

白头翁(江苏亚邦中药饮片有限公司, 批号 20042901)、黄柏(贵州同德药业有限公司, 批号 20210302-01)、黄连(亳州市万珍中药饮片厂, 批号 2104005)、秦皮(江苏同济中药饮片有限公司, 批号 191210)购自南京中医药大学附属中西医结合医院中药房, 并经江苏省中医药研究院钱士辉研究员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 的干燥根茎以及木犀科植物苦枥白蜡树 *Fraxinus rhynchophylla* Hance 的干燥枝皮。

1.3 药品与试剂

DSS(相对分子质量 36 000~50 000, 批号 160110)购自美国 MP Biomedicals 公司; 美沙拉嗪肠溶片(批号 2021125)购自葵花药业集团; 4%多聚甲醛(批号 G1101-500ML)购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 小鼠白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)试剂盒(批号分别为 MB-2776A、MB-2899A、MB-2912A、MB-2868A、MB-3074A)购自江苏酶标生物有限公司; β -actin 抗体(批号 AF5003)、HRP 标记的山羊抗兔二抗(批号 A0208)、一抗稀释液(批号 P0023A)、二抗稀释液(批号 P0023D)、10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶、TEMED、1 mol/L Tris-HCl (pH 8.8)、1 mol/L Tris-HCl (pH 6.8)、30% Acr-Bis(批号分别为 ST628、ST728、ST788、ST768、ST003)购自上海碧云天生物科技有限公司; Notch 抗体(批号 ab52627)购自美国 Abcam 公司; Atoh1 抗体(批号 21215-1-AP)、MUC2 抗体(批号 27675-1-AP)购自美国 Proteintech 公司; Hes1 抗体(批号 GTX108356)购自美国 Genetex 公司; Ki67 抗体(批号 ab16667)购自英国 Abcam 公司; Lgr5 抗体(批号 A10545)购自武汉爱博泰克生物技术有限公司;

对照品白头翁皂苷 B₄(批号 111766-202103, 质量分数 99.8%)、盐酸小檗碱(批号 110713-202015, 质量分数 85.9%)、盐酸黄柏碱(批号 111895-201805, 质量分数 94.9%)、秦皮乙素(批号 110741-202109, 质量分数 99.9%)、秦皮甲素(批号 110740-201806, 质量分数 92.4%)购自中国食品药品检定研究院。

1.4 仪器

MS203DU 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); SynergyH1 型酶联免疫检测仪(美国 Bio Tek 公司); Hei-VAP Ultimate 旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司); GMBH37081 型倒置光学显微镜(德国 Carl Zeiss 公司); SCIENTZ-48 型高通量组织研磨仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); SPE10-0111 型 Western blotting 荧光成像仪(美国 Azure Biosystem 公司); WGH201 型超纯水系统(日本 Yamato Scientific 公司); 690BR028786 型半干转系统、552BR206289 型电泳槽、043BR68680 型电泳电源(美国 Bio-Rad 公司); Heraeus Megafuge 8R 型高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); JJ-12J 型脱水机、JB-P5 型包埋机(武汉俊杰电子有限公司); RM2016 型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司); KD-P 型组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司); Alltima C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m)、Waters e2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)。

2 方法

2.1 药物的制备

2.1.1 DSS 的配制 用电子天平称取 DSS 25 g, 溶解于 1 L 超纯水中, 超声配成 2.5% DSS 溶液。

2.1.2 白头翁汤的制备 白头翁汤由白头翁 15 g、黄柏 9 g、黄连 9 g、秦皮 9 g 组成, 称取白头翁、黄柏、黄连、秦皮药材饮片, 第 1 次加 10 倍量的纯净水煎煮, 第 2 次 8 倍量的纯净水煎煮, 每次 40 min, 合并药液并滤去药渣, 随后置于旋转蒸发仪中, 按给药剂量浓缩至 1.48 g/mL, 于 4℃ 冰箱保存备用。参照美国食品药品监督管理局给出的人体常规用量和小鼠折算系数 12.3, 按照体表面积进行小鼠等量剂量换算作为低剂量组的治疗剂量, 即 7.4 g/kg。根据《中国药典》2020 年版含量测定的方法, 采用高效液相色谱分别测定主要成分的含量, 白头翁中白头翁皂苷 B₄ 的质量分数为 4.72%, 黄柏中黄柏碱、小檗碱的质量分数分别为 0.38%、

4.11%，黄连中小檗碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀的质量分数分别为 6.36%、1.04%、1.83%、1.59%，秦皮中秦皮甲素、秦皮乙素的质量分数分别为 1.06%、0.17%。

2.2 动物分组、造模和给药

小鼠适应性喂养 1 周后，随机分为对照组、模型组、美沙拉嗪 (50 mg/kg^[17-18]) 组和白头翁汤低、高剂量 (7.4、14.8 g/kg) 组，每组 8 只。对照组每天自由饮用纯净水，模型组和各给药组连续 8 d 自由饮用 2.5% DSS 溶液，造模同时各给药组 ig 相应药物。

2.3 样本的收集和处理

给药结束后，于第 9 天用毛细管玻璃扎入小鼠的眼眶内眦静脉丛，快速旋转进入，采用 1.5 mL 灭菌的 EP 管收集血液，室温静置 2 h，4000 r/min 离心 15 min 取血清，储存于 -80 °C 冰箱中。取血后，立即颈椎脱位处死小鼠，分离盲肠至直肠部位的结肠，对分离后的结肠组织进行拍照，再用预冷的生理盐水冲洗干净后，将收集到的结肠组织分成 2 部分，剪取 1 cm 的结肠远端部分别放入 4% 多聚甲醛和卡诺氏固定液 [(无水乙醇-氯仿-冰醋酸 (6:3:1))] 中进行固定，用于病理学染色，其余结肠组织转移至 -80 °C 的冰箱中储存用于后续实验。

2.4 疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分

每日观察小鼠活动状态，称定体质量，观察粪便性状以及有无便血情况，按照表 1 标准进行 DAI 评分^[19-20]。

表 1 DAI 评分标准

Table 1 DAI score standard

| 评分 | 体质量下降率 (x) | 粪便稠度 | 直肠出血 |
|----|---------------|------------|--------|
| 0 | 0 < x ≤ 1% | 正常 | 正常 |
| 1 | 1% < x ≤ 5% | 松散，半成形糊状 | 隐血呈阳性 |
| 2 | 5% < x ≤ 10% | 松散明显，基本不成形 | 隐血呈强阳性 |
| 3 | 10% < x ≤ 20% | 稀水样便 | 肉眼血便 |
| 4 | > 20% | 稀便更加明显 | 血便更加明显 |

2.5 结肠组织苏木素-伊红 (HE) 和 AB-PAS 染色

2.5.1 HE 染色 取小鼠结肠组织，使用 4% 多聚甲醛固定，随后进行石蜡包埋、切片、脱蜡、水化后，用 HE 染色，使用倒置显微镜观察拍照后进行组织病理学观察。

2.5.2 AB-PAS 染色 取小鼠结肠组织，使用卡诺

氏固定液固定，随后进行石蜡包埋、切片、脱蜡、用 AB-PAS 染色后，使用倒置显微镜观察拍照后观察杯状细胞的结构和数量、黏液层厚度和分泌情况，中性黏液为红色，酸性黏液呈蓝色，中性和酸性混合黏液呈紫色。

2.6 脾脏指数和结肠长度

DSS 诱导的 UC 小鼠模型表现为结肠长度的缩短，同时过度的炎症反应会导致脾脏质量增大。按照动物伦理相关要求对小鼠处死后，取出肛门至盲肠末端的结肠，PBS 冲洗后用直尺测量长度。小心剥离脾脏，滤纸吸去血液后称定质量，记录并计算脾脏指数。

$$\text{脾脏指数} = \text{脾脏湿质量} / \text{体质量}$$

2.7 ELISA 法检测结肠组织中炎症因子水平

取各组小鼠结肠组织，加入 PBS，用匀浆器匀浆，3000 r/min 离心 20 min，收集上清，按试剂盒说明书测定促炎因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 及抗炎因子 IL-10 含量和 MPO 活性。

2.8 免疫组化法检测结肠组织中 Ki67 蛋白表达

各组小鼠结肠组织石蜡切片脱蜡至水，3% 过氧化氢封闭 10 min，EDTA 抗原修复缓冲液 (pH 9.0) 微波辐射进行修复，牛血清白蛋白封闭后，滴加 Ki67 抗体，4 °C 孵育过夜；滴加二抗，37 °C 孵育 30 min，加入 DAB 显色剂，显色完全后，自来水冲洗，苏木素复染，1% 盐酸乙醇分化，自来水冲洗，氨水返蓝，流水冲洗，脱水封片。在显微镜下观察，用 Image J 软件定量分析阳性细胞数。

2.9 免疫荧光法检测结肠组织中 Lgr5⁺ ISCs 数

取各组小鼠结肠组织石蜡切片脱蜡至水，加入 EDTA 抗原修复缓冲液 (pH 8.0)，于微波炉进行抗原修复，随后加入自发荧光淬灭剂 5 min，流水冲洗 10 min，加入牛血清白蛋白孵育 30 min，滴加 Lgr5 抗体，4 °C 孵育过夜。洗涤后，滴加二抗，DAPI 复染细胞核，封片，在荧光倒置显微镜下观察并拍照。DAPI 紫外激发波长 330~380 nm，发射波长 420 nm，发蓝光；FITC 激发波长 465~495 nm，发射波长 515~555 nm，发绿光。

2.10 Western blotting 检测结肠组织中 Notch、Atoh1、MUC2 和 Hes1 蛋白表达

取各组小鼠结肠组织，加入含有 1% PMSF 的预冷的 RIPA 裂解缓冲液，匀浆后，4 °C、12 000 r/min 离心 15 min，收集上清液。用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰

胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 分别加入一抗 (1:1000), 4 °C 孵育过夜; TBST 洗膜 4 次, 每次 8 min, 加入二抗 (1:1000), 室温孵育 2 h, TBST 洗膜后, 加入 ECL 化学发光液显影, 用 Image J 软件进行灰度分析。

2.11 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行统计分析。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间的显著性差异分析采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), LSD 检验 (方差不齐时用 Dunnett's T3 检验) 对组间两两比较。

3 结果

3.1 白头翁汤对 UC 小鼠 DAI 评分和体质量的影响

对照组小鼠毛发光滑, 黑亮光泽明显, 饮水饮食正常, 体质量呈平稳的上升趋势, 活动状态良好, 粪便呈紧实棕黄色, 无腹泻、血便等。模型组小鼠在自由饮用 2.5% DSS 3 d 后, 出现倦怠懒动、精神萎靡、毛发凌乱、食欲减弱现象, 随着时间的增加, DAI 评分显著增加 ($P < 0.001$, 图 1-A), 体质量显著下降 ($P < 0.001$, 图 1-B), 出现大量稀水样鲜红

粪便。给予白头翁汤和美沙拉嗪治疗后, 小鼠症状均较模型组有所改善, DAI 评分明显降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), 体质量明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.2 白头翁汤对 UC 小鼠脾脏指数和结肠长度的影响

对照组结肠组织肠壁纹理清晰, 黏膜光滑, 色泽棕黄, 无红色充血溃疡, 无黏连。如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠结肠长度显著缩短 ($P < 0.001$), 脾脏指数明显升高 ($P < 0.001$), 且结肠色泽呈现黑红色。给予白头翁汤和美沙拉嗪治疗后, 小鼠结肠长度显著增加 ($P < 0.01$ 、 0.001); 白头翁汤低剂量组和美沙拉嗪组小鼠脾脏指数均明显降低 ($P < 0.05$)。

3.3 白头翁汤对 UC 小鼠结肠组织病理的影响

如图 3 所示, 对照组小鼠结肠黏膜上皮完整、隐窝结构正常、固有层腺体呈整齐且紧密排列, 无炎性细胞浸润、充血、水肿和溃疡的形成, 为正常结肠黏膜。模型组小鼠结肠组织中杯状细胞严重丢失, 黏膜上皮破损, 腺体排列紊乱, 隐窝结构被严重破坏, 并出现大量炎性细胞浸润。各给药组结肠

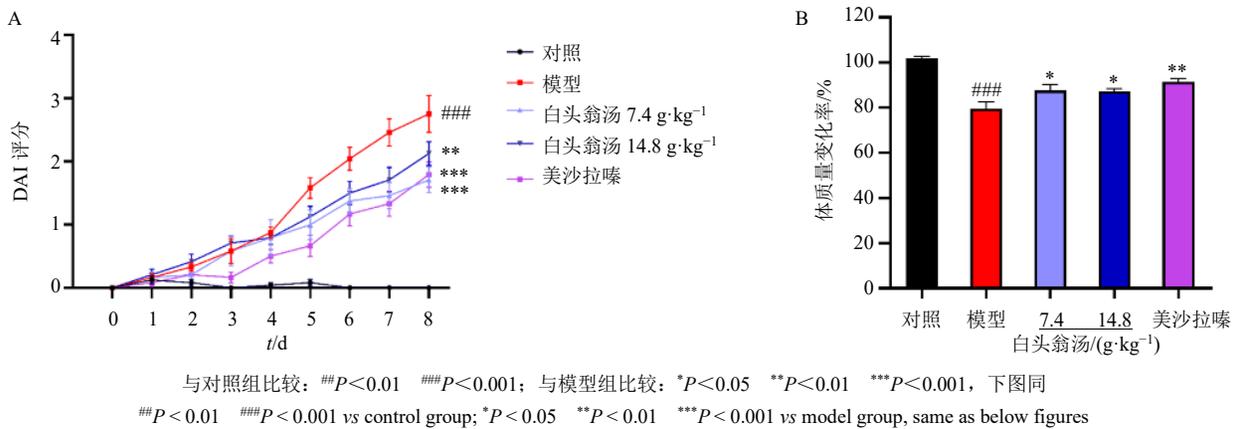


图 1 白头翁汤对 UC 小鼠 DAI 评分 (A) 和体质量 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effects of Baitouweng Decoction on DAI score (A) and body weight (B) of UC mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

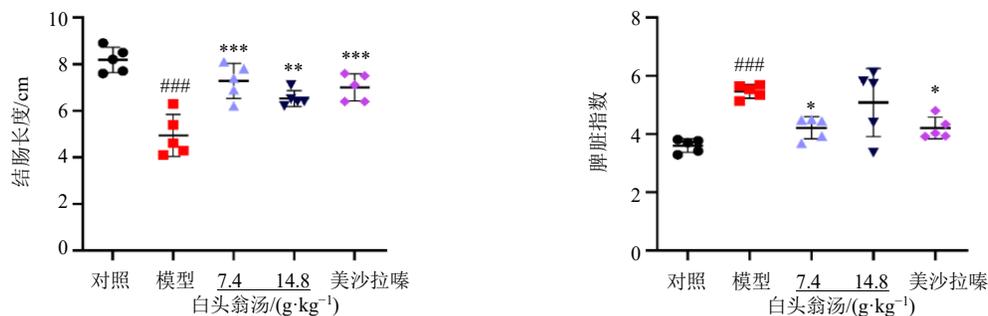


图 2 白头翁汤对 UC 小鼠结肠长度和脾脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Effect of Baitouweng Decoction on colon length and spleen index of UC mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

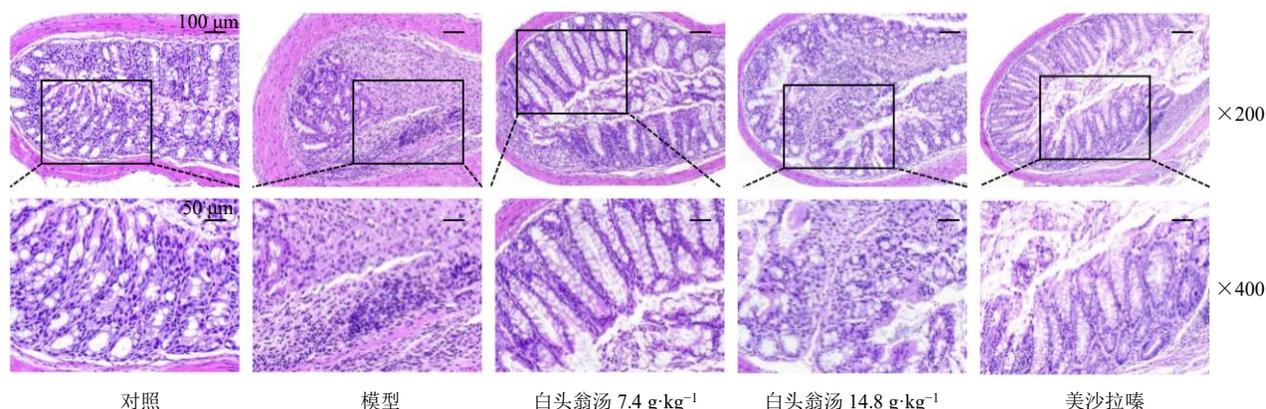


图3 白头翁汤对 UC 小鼠结肠组织病理变化的影响 (HE)

Fig. 3 Effect of Baitouweng Decoction on pathological changes of colon tissue in UC mice (HE)

病理情况有所改善, 隐窝破坏程度较小, 保持较好的结肠组织上皮的完整性, 炎症细胞浸润减少, 以及腺体排列较为整体。白头翁汤低剂量组结肠组织有少量的淋巴浸润, 而白头翁汤高剂量组相比白头翁汤低剂量组结肠中间位置有较多炎性浸润。

3.4 白头翁汤对 UC 小鼠结肠黏液屏障的影响

如图 4 所示, 对照组隐窝结构明显, 每个隐窝里存在大量的杯状细胞, 并有黏蛋白从杯状细胞分泌, 结肠上皮细胞覆盖着较厚的黏液层, 黏液均连续完整。模型组小鼠的成熟杯状细胞严重缺失, 每

个隐窝的杯状细胞数量明显减少, 黏液层破坏。给予白头翁汤和美沙拉嗪后, 显著改善了 DSS 引起的杯状细胞和黏蛋白的大量消耗。白头翁汤低剂量组对黏液屏障的保护作用较美沙拉嗪更加明显, 美沙拉嗪组小鼠黏液蛋白聚集在隐窝内, 而没有分泌出去形成连续的黏液层。

3.5 白头翁汤对 UC 小鼠结肠组织中炎症因子水平的影响

MPO 来源于中性粒细胞, 是中性粒细胞浸润的标志。如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠结

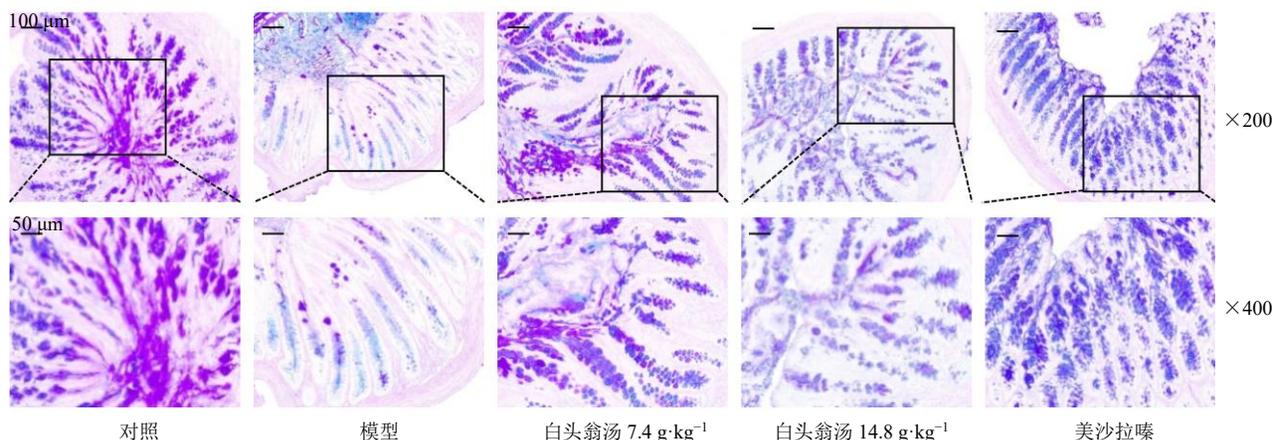


图4 白头翁汤对 UC 小鼠结肠组织 MUC2 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of Baitouweng Decoction on MUC2 protein expression in colon tissue of UC mice

表 2 白头翁汤对 UC 小鼠结肠组织炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effect of Baitouweng Decoction on inflammatory factors in colon tissue of UC mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

| 组别 | 剂量/(g·kg ⁻¹) | IL-6/(pg·mg ⁻¹) | TNF- α /(pg·mg ⁻¹) | IL-1 β /(pg·mg ⁻¹) | MPO/(pg·mg ⁻¹) | IL-10/(pg·mg ⁻¹) |
|------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 对照 | — | 8.99 ± 0.46 | 48.67 ± 9.55 | 12.49 ± 3.02 | 222.0 ± 35.29 | 65.32 ± 13.95 |
| 模型 | — | 16.83 ± 2.04 ^{###} | 89.89 ± 4.68 ^{###} | 26.80 ± 4.64 ^{###} | 414.8 ± 58.94 ^{##} | 40.66 ± 5.65 ^{##} |
| 白头翁汤 | 7.4 | 13.78 ± 1.99 | 64.36 ± 9.98* | 20.16 ± 3.69* | 282.5 ± 44.09** | 59.69 ± 8.45* |
| | 14.8 | 14.82 ± 2.22 | 73.31 ± 13.60* | 20.44 ± 3.18* | 302.2 ± 47.48** | 50.76 ± 9.02 |
| 美沙拉嗪 | 0.05 | 12.21 ± 3.71* | 61.93 ± 26.17* | 18.98 ± 1.48** | 278.4 ± 68.33** | 53.53 ± 4.49 |

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

肠组织 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平和 MPO 活性均显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), IL-10 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组 TNF- α 、IL-1 β 水平和 MPO 活性均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 白头翁汤低剂量组 IL-10 水平显著升高 ($P < 0.05$), 美沙拉嗪组 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.05$)。

3.6 白头翁汤对 UC 小鼠结肠组织 Ki67 蛋白表达的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠结肠组织中 Ki67 阳性细胞 (棕黄色) 明显减少 ($P < 0.001$), 说明模型组小鼠结肠组织细胞增殖能力较

弱; 与模型组比较, 美沙拉嗪组和白头翁汤低剂量组 Ki67 阳性细胞显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01), 说明白头翁汤能够改善 UC 小鼠结肠细胞的增殖能力。

3.7 白头翁汤对 UC 小鼠结肠组织 Lgr5⁺ ISCs 的影响

如图 6 所示, 模型组小鼠结肠组织中 Lgr5⁺ ISCs 减少, 说明模型组 ISCs 增殖和分化能力降低, 分泌型细胞不能得到持续的更新, 杯状细胞耗竭; 给予美沙拉嗪和白头翁汤治疗后, Lgr5⁺ ISCs 的数量减少情况得到缓解, 说明白头翁汤保护了 UC 小鼠 ISCs 免受破坏。

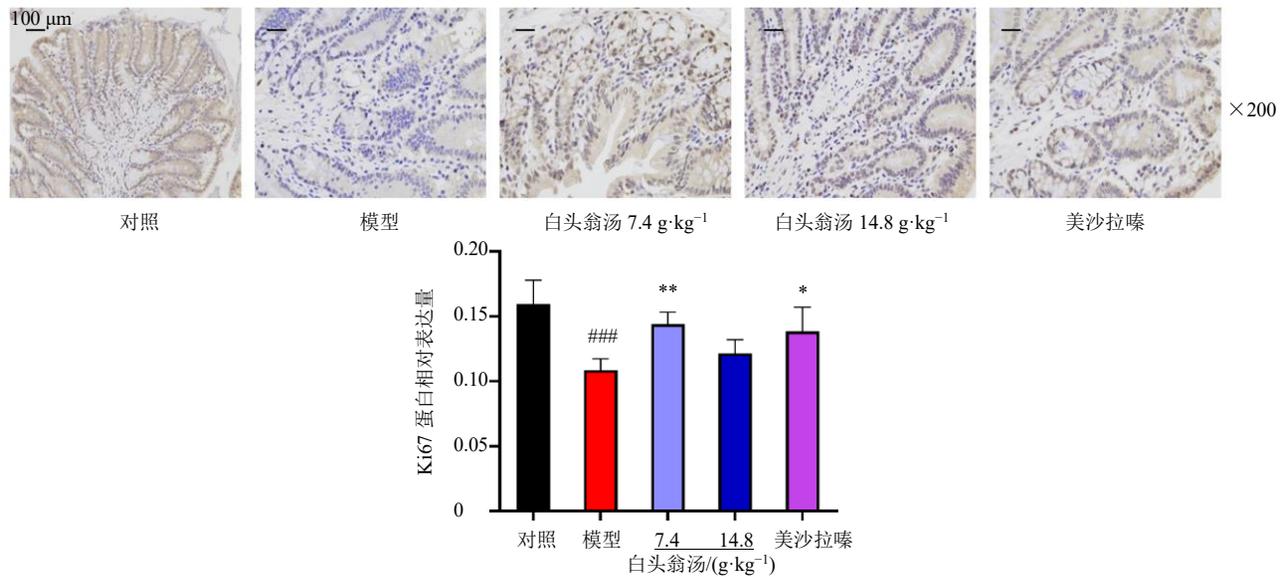


图 5 白头翁汤对 UC 小鼠结肠组织 Ki67 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of Baitouweng Decoction on Ki67 protein expression in colon tissue of UC mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

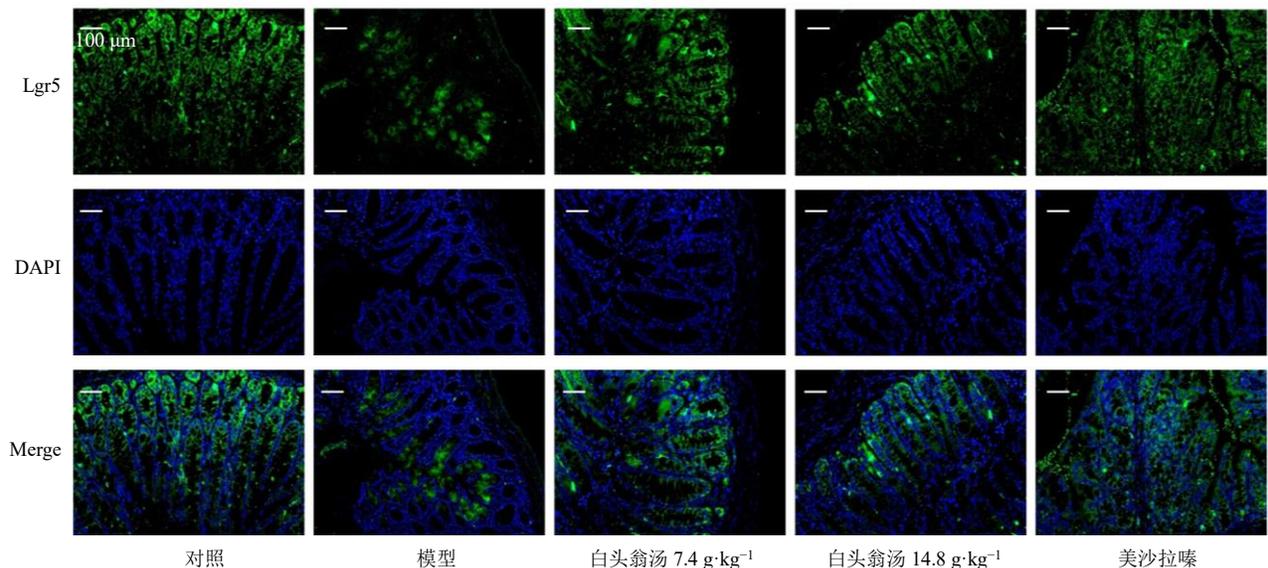
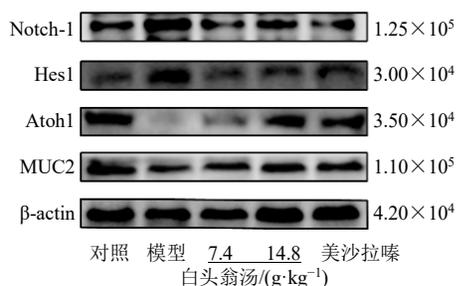


图 6 白头翁汤对 UC 小鼠结肠组织 Lgr5⁺ ISCs 表达的影响 ($\times 200$)

Fig. 6 Effect of Baitouweng Decoction on Lgr5⁺ ISCs expression in colon tissue of UC mice ($\times 200$)

3.8 白头翁汤对 UC 小鼠结肠组织 Notch、Hes1、Atoh1 和 MUC2 蛋白表达的影响

如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组结肠组织 Notch1 和 Hes1 蛋白表达水平明显升高($P < 0.01$ 、 0.001), 说明 DSS 诱导的 UC 小鼠 Notch 信号通路被激活, 而下游 Atoh1 和 MUC2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组 Notch1 和 Hes1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.001), 白头翁汤低剂量组和美沙拉嗪组 Atoh1 和 MUC2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。表明白头翁汤可能通过抑制 Notch 信号通路来增强黏液屏障的功能。



4 讨论

本研究进一步证实了白头翁汤对 UC 小鼠的治疗作用, 发现白头翁汤可以降低 UC 小鼠结肠 MPO、IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平, 促进 IL-10 的表达抑制炎症。本研究还发现白头翁汤具有改善黏液屏障功能, 主要体现在白头翁汤可以增加杯状细胞 MUC2 的分泌并增厚黏液层, 减少由 DSS 诱导 Lgr5⁺ ISCs 的损失。白头翁汤影响了 Notch-1/Hes1/Atoh1 信号通路, 该通路的激活可能抑制了 ISCs 增殖以及向分泌型细胞的分化, 进而导致杯状细胞的耗竭 (图 8, 由 figdraw 绘图)。

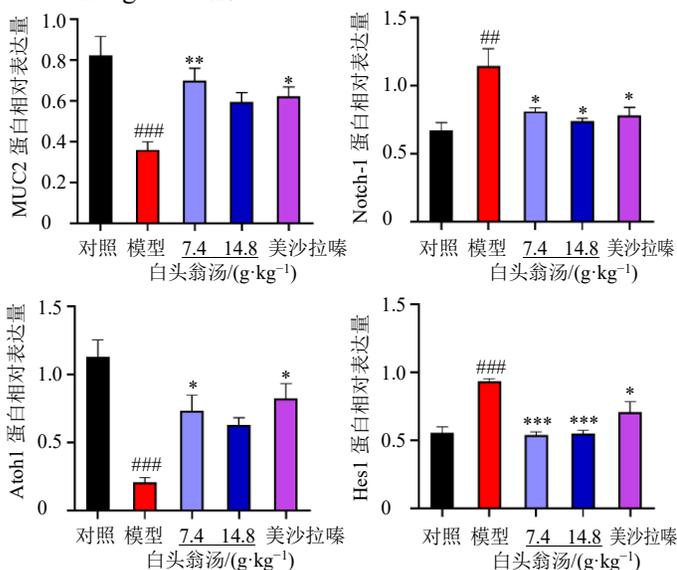


图 7 白头翁汤对 UC 小鼠结肠组织 Notch-1 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of Baitouwen Decoction on Notch-1 signaling pathway related protein expressions in colon tissue of UC mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

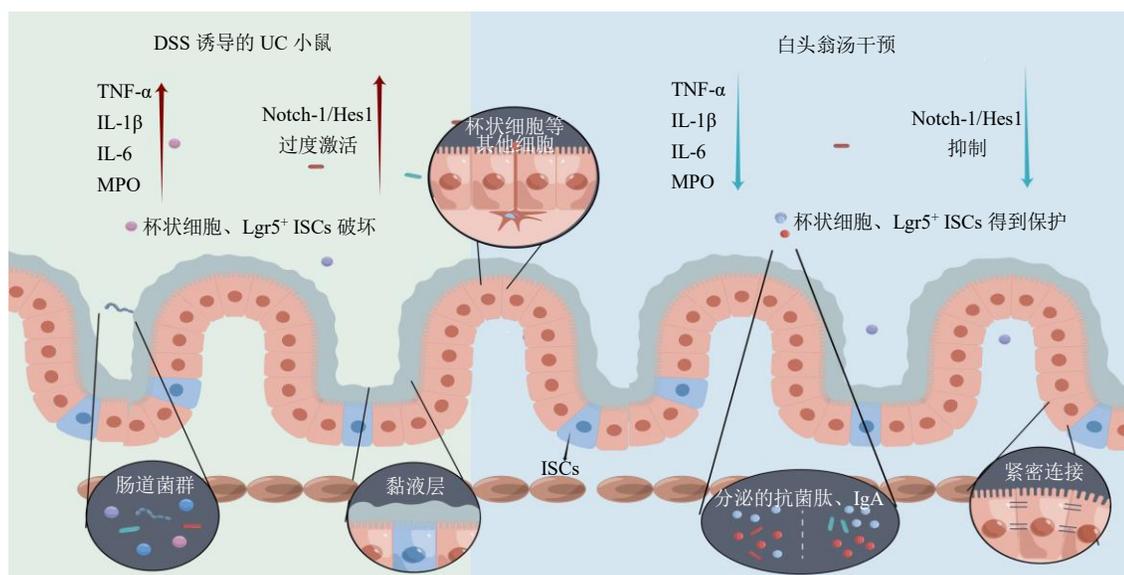


图 8 白头翁汤通过调控 Notch-1 信号通路治疗 UC 小鼠

Fig. 8 Baitouwen Decoction regulates Notch-1 signaling pathway to treat UC mice

完整的肠屏障功能对于肠道稳态至关重要^[21-22]。肠屏障主要由以黏液层为主的化学屏障、上皮细胞构成的机械屏障和固有层构成的免疫屏障 3 部分组成^[23]。黏液层是肠道屏障的重要组成部分,保护肠上皮细胞免受肠腔病原体的侵袭。黏液屏障约由 30 种核心蛋白组成,主要包括黏蛋白、抗菌肽和免疫球蛋白 A (immunoglobulin A, IgA),其中杯状细胞合成的 MUC2 是构成黏蛋白最基本的骨架^[24]。在 UC 患者以及 UC 小鼠模型中,细菌可以穿透结肠内黏液层^[25-26]。另有报道表明 MUC2 基因敲除小鼠由于肠道微生物和肠道上皮细胞直接接触,会自发发生结肠炎^[10]。结肠组织 AB-PAS 染色显示,白头翁汤可以恢复 DSS 诱导的杯状细胞的破坏以及黏蛋白的耗竭。

Lgr5⁺ ISCs 的增殖和分化对于维持黏液层的完整性扮演着重要角色^[27-29]。Lgr5⁺ ISCs 具有高度的自我更新和高分化潜力。由于 UC 病情的反复发作,伤及隐窝结构,位于隐窝底部的 Lgr5⁺ ISCs 则会迁移至伤口处,更新肠道上皮细胞,生成特定的分泌型杯状细胞和潘氏细胞,维持受损肠黏膜上皮细胞的更新、再生和修复^[30]。在不同的结肠炎造模方式中, DSS 造模能够呈剂量相关性地破坏 Lgr5⁺ ISCs^[28]。在自发引起结肠炎的 IL-10 敲除小鼠结肠组织中, Lgr5⁺ ISCs 异常增殖和分化,分泌谱系细胞丢失^[18]。Chen 等^[12]发现肝脏固醇 12 α -羟化酶 (sterol 12 α -hydroxylase, CYP8B1) /胆酸通路通过抑制过氧化物酶体增殖物激活受体 α 依赖的脂肪酸氧化,抑制 Lgr5⁺ ISCs 再生,并最终促进结肠炎。Ju 等^[31]发现葡萄外泌体能够诱导 Lgr5⁺ ISCs 保护小鼠免受 DSS 诱导的结肠炎。天然植物产物小檗碱可以调节 Wnt 通路激活 Lgr5⁺ ISCs 恢复肠稳态^[32]。本研究结果证实了白头翁汤能够调节 ISCs 增殖分化,促进杯状细胞再生保护黏液屏障。

白头翁汤影响 Notch 信号通路进而维持 ISCs 平衡分泌型细胞调节黏液屏障可能是发挥功效的原因之一^[27,33]。当 Notch 激活时,Notch 胞内域进入细胞核,随后激活转录因子 Hes1 的表达, Hes1 抑制转录因子 Atoh1 的表达,从而限制肠道干细胞向杯状细胞的分化,导致黏液屏障减弱^[34-36]。在 UC 患者中, Notch 信号过度激活^[37]。另有研究表明青白汤可以抑制 Notch 信号恢复黏液屏障功能来缓解 UC^[38]。本研究发现白头翁汤可能通过调控 Notch 信号通路,进而可能影响 ISCs 的增殖和分化。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 魏玮. 溃疡性结肠炎中西医结合诊疗专家共识 [J]. 中国中西医结合杂志, 2023, 43(1): 5-11.
- [2] Krugliak Cleveland N, Torres J, Rubin D T. What does disease progression look like in ulcerative colitis, and how might it be prevented? [J]. *Gastroenterology*, 2022, 162(5): 1396-1408.
- [3] Kobayashi T, Siegmund B, Le Berre C, et al. Ulcerative colitis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6(1): 74.
- [4] Feuerstein J D, Moss A C, Farraye F A. Ulcerative colitis [J]. *Mayo Clin Proc*, 2019, 94(7): 1357-1373.
- [5] Du L, Ha C. Epidemiology and pathogenesis of ulcerative colitis [J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2020, 49(4): 643-654.
- [6] Yoon H, Jangi S, Dulai P S, et al. Incremental benefit of achieving endoscopic and histologic remission in patients with ulcerative colitis: A systematic review and meta-analysis [J]. *Gastroenterology*, 2020, 159(4): 1262-1275.
- [7] Morampudi V, Graef F A, Stahl M, et al. Tricellular tight junction protein tricellulin is targeted by the enteropathogenic *Escherichia coli* effector EspG1, leading to epithelial barrier disruption [J]. *Infect Immun*, 2017, 85(1): e00700-e00716.
- [8] Wang Y R, You K Y, You Y, et al. Paeoniflorin prevents aberrant proliferation and differentiation of intestinal stem cells by controlling C1q release from macrophages in chronic colitis [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 182: 106309.
- [9] Yao D B, Dai W L, Dong M, et al. MUC2 and related bacterial factors: Therapeutic targets for ulcerative colitis [J]. *EBioMedicine*, 2021, 74: 103751.
- [10] van der Sluis M, de Koning B A, de Bruijn A C, et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection [J]. *Gastroenterology*, 2006, 131(1): 117-129.
- [11] Cheng C W, Biton M, Haber A L, et al. Ketone body signaling mediates intestinal stem cell homeostasis and adaptation to diet [J]. *Cell*, 2019, 178(5): 1115-1131.
- [12] Chen L, Jiao T, Liu W, et al. Hepatic cytochrome P450 8B1 and cholic acid potentiate intestinal epithelial injury in colitis by suppressing intestinal stem cell renewal [J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(9): 1366-1381.
- [13] 申睿, 刘苗, 朱向东, 等. 中医药治疗溃疡性结肠炎实验研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(7): 1721-1725.
- [14] 胡静怡, 朱磊, 连紫宇, 等. 白头翁汤对溃疡性结肠炎模型小鼠肠道菌群及短链脂肪酸的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(6): 817-822.

- [15] 高颖, 王遥, 安佰平, 等. 白头翁汤对放射性肠炎小鼠的抗炎和抗凋亡作用的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(4): 827-830.
- [16] 王亚东, 徐志庆, 夏丹, 等. 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 [J]. 中草药, 2022, 53(13): 3997-4006.
- [17] Tian X L, Peng Z L, Luo S P, *et al.* Aesculin protects against DSS-Induced colitis through activating PPAR γ and inhibiting NF- κ B pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 857: 172453.
- [18] Wang Y R, You K Y, You Y, *et al.* Paeoniflorin prevents aberrant proliferation and differentiation of intestinal stem cells by controlling C1q release from macrophages in chronic colitis [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 182: 106309.
- [19] Andújar I, Ríos J L, Giner R M, *et al.* Beneficial effect of shikonin on experimental colitis induced by dextran sulfate sodium in BALB/c mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 271606.
- [20] Liang L, Xiong Q Q, Kong J X, *et al.* Intraperitoneal supplementation of iron alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis by enhancing intestinal barrier function [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 144: 112253.
- [21] Chelakkot C, Ghim J, Ryu S H. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications [J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(8): 1-9.
- [22] 谢晶日, 陈善涛, 刘芝伟. 溃疡性结肠炎发病机制研究进展 [J]. 海南医学院学报, 2022, 28(23): 1835-1840.
- [23] Dong L J, Xie J W, Wang Y Y, *et al.* Mannose ameliorates experimental colitis by protecting intestinal barrier integrity [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 4804.
- [24] Gustafsson J K, Johansson M E V. The role of goblet cells and mucus in intestinal homeostasis [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2022, 19(12): 785-803.
- [25] Fang J, Wang H, Zhou Y P, *et al.* Slimy partners: The mucus barrier and gut microbiome in ulcerative colitis [J]. *Exp Mol Med*, 2021, 53(5): 772-787.
- [26] Goyal N, Rana A, Ahlawat A, *et al.* Animal models of inflammatory bowel disease: A review [J]. *Inflammopharmacol*, 2014, 22(4): 219-233.
- [27] Zheng L, Duan S L, Wen X L, *et al.* Molecular regulation after mucosal injury and regeneration in ulcerative colitis [J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9: 996057.
- [28] Girish N, Liu C Y, Gadeock S, *et al.* Persistence of Lgr5⁺ colonic epithelial stem cells in mouse models of inflammatory bowel disease [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2021, 321(3): G308-G324.
- [29] Goto N, Goto S, Imada S, *et al.* Lymphatics and fibroblasts support intestinal stem cells in homeostasis and injury [J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(8): 1246-1261.
- [30] 李叶华, 陈晔光. 肠上皮干细胞研究进展 [J]. 中国科学: 生命科学, 2018, 48(7): 713-720.
- [31] Ju S W, Mu J Y, Dokland T, *et al.* Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis [J]. *Mol Ther*, 2013, 21(7): 1345-1357.
- [32] Luo Z C, Li Z H, Liang Z, *et al.* Berberine increases stromal production of Wnt molecules and activates Lgr5⁺ stem cells to promote epithelial restitution in experimental colitis [J]. *BMC Biol*, 2022, 20(1): 287.
- [33] Ludikhuizen M C, Meerlo M, Gallego M P, *et al.* Mitochondria define intestinal stem cell differentiation downstream of a FOXO/Notch axis [J]. *Cell Metab*, 2020, 32(5): 889-900.
- [34] Shinoda M, Shin-Ya M, Naito Y, *et al.* Early-stage blocking of Notch signaling inhibits the depletion of goblet cells in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice [J]. *J Gastroenterol*, 2010, 45(6): 608-617.
- [35] Zheng X, Tsuchiya K, Okamoto R, *et al.* Suppression of *hath1* gene expression directly regulated by *hes1* via Notch signaling is associated with goblet cell depletion in ulcerative colitis [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2011, 17(11): 2251-2260.
- [36] 夏青松, 徐丽君, 陈广, 等. 信号分子通路网络对肠干细胞增殖和分化的调控 [J]. 生理科学进展, 2020, 51(4): 305-310.
- [37] Okamoto R, Tsuchiya K, Nemoto Y, *et al.* Requirement of Notch activation during regeneration of the intestinal epithelia [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009, 296(1): G23-G35.
- [38] Lin J C, Wu J Q, Wang F, *et al.* QingBai Decoction regulates intestinal permeability of dextran sulphate sodium-induced colitis through the modulation of notch and NF- κ B signaling [J]. *Cell Prolif*, 2019, 52(2): e12547.

[责任编辑 李亚楠]