

• 药理与临床 •

基于 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路研究乌梅丸对溃疡性结肠炎小鼠结肠上皮细胞焦亡的作用机制

赵冠宇¹, 辛蕊华³, 仇正英³, 石磊¹, 王瑞琼^{1,2}, 邵晶^{1,2}, 吴国泰^{1,2*}, 杜丽东^{1,2*}

1. 甘肃中医药大学药学院, 甘肃 兰州 730000

2. 陇药产业创新研究院, 甘肃 兰州 730000

3. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃 兰州 730050

摘要: 目的 研究乌梅丸对葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium salt, DSS) 诱导的小鼠溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 的治疗作用及其通过介导核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) /半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cystein-aspartate protease-1, Caspase-1) /消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) 信号通路对结肠上皮细胞焦亡的影响。方法 自由饮用 2% DSS 构建 UC 小鼠模型, ig 乌梅丸水煎液治疗, 持续 7 d, 记录小鼠体质量变化和便血情况, 分离完整结肠测量长度; 苏木素-伊红 (HE) 染色观察结肠组织病理变化; TUNEL 染色检测结肠上皮细胞损伤情况; ELISA 法检测小鼠血清二胺氧化酶 (diamine oxidase, DAO) 活性和白细胞介素-18 (interleukin-18, IL-18)、IL-1 β 含量; qRT-PCR 法检测结肠组织 *Occludin-1*、*IL-18*、*IL-1 β* 、*NLRP3*、*Caspase-1* 和 *GSDMD* mRNA 表达; Western blotting 检测结肠组织 *Occludin-1*、NLRP3、Caspase-1 和 GSDMD-N 蛋白表达。结果 与模型组比较, 乌梅丸能减缓小鼠体质量下降, 抑制结肠缩短、减轻结肠病理损伤, 并且降低肠黏膜通透性, 减少外周血和结肠组织中 IL-1 β 、IL-18 表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 降低结肠上皮细胞焦亡相关因子 *NLRP3*、*Caspase-1*、*GSDMD* mRNA 和蛋白表达 ($P < 0.01$)。结论 乌梅丸对 DSS 诱导的 UC 小鼠具有治疗作用, 其作用机制与下调 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路、抑制结肠上皮细胞焦亡有关。

关键词: 乌梅丸; 溃疡性结肠炎; 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 炎症小体; 细胞焦亡; 肠黏膜通透性; 盐酸黄柏碱; 盐酸黄连碱; 盐酸小檗碱

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)24-8086-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.24.013

Mechanism of Wumei Wan on colonic epithelial cell pyroptosis in mice with ulcerative colitis based on NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway

ZHAO Guan-yu¹, XIN Rui-hua³, QIU Zheng-ying³, SHI Lei¹, WANG Rui-qing^{1,2}, SHAO Jing^{1,2}, WU Guo-tai^{1,2}, DU Li-dong^{1,2}

1. College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Gansu Pharmaceutical Industry Innovation Research Institute, Lanzhou 730000, China

3. Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical of Chinese Academic of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050, China

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect of Wumei Wan (乌梅丸) on dextran sulfate sodium salt (DSS)-induced ulcerative colitis (UC) in mice and its effect on nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3)/cystein-aspartate protease-1 (Caspase-1)/gasdermin D (GSDMD) signaling pathway-mediated colonic epithelial cell pyroptosis. **Methods** UC mouse model was induced by drinking 2% DSS freely, and treated with aqueous decoction of Wumei Wan for seven consecutive days.

收稿日期: 2023-07-19

基金项目: 甘肃省自然科学基金资助项目 (20JR10RA317, 22JR5RA038, 22JR5RA041); 甘肃省中医药研究中心开放课题 (ZYZX-2020-20); 甘肃省中医药科研立项课题资助项目 (GZK-2019-23)

作者简介: 赵冠宇, 硕士研究生, 从事中药药理与毒理研究。E-mail: 1449291531@qq.com

*通信作者: 吴国泰, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药药理、毒理及安全性评价研究。E-mail: 1018830451@qq.com

杜丽东, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药药理、毒理及安全性评价研究。E-mail: lidong_du@126.com

Weight changes and blood in stool of mice were recorded. The complete colon was isolated to measure the length. The histopathological changes of colon was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The colonic epithelial cell damage were observed by TUNEL staining. The diamine oxidase (DAO) activity, interleukin-18 (IL-18) and IL-1 β levels in serum of mice were detected by ELISA. The mRNA expression levels of *Occludin-1*, *IL-18*, *IL-1 β* , *NLRP3*, *Caspase-1* and *GSDMD* in colon tissue were detected by qRT-PCR. The protein expressions of Occludin-1, NLRP3, Caspase-1 and GSDMD-N in colon tissues were detected by Western blotting. **Results** Compared with model group, Wumei Wan slowed down weight loss, inhibited colonic shortening, attenuated pathological damage to the colon, reduced intestinal mucosal permeability, decreased the expressions of IL-1 β and IL-18 in blood and colon tissues ($P < 0.05$, 0.01), and decreased the expressions of colonic epithelial cell pyroptosis-related factors *NLRP3*, *Caspase-1* and *GSDMD* genes and proteins in mice ($P < 0.01$). **Conclusion** Wumei Wan has therapeutic effects on DSS-induced UC mice, and its mechanism is related to inhibiting the NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway and decreasing colonic epithelial cell pyroptosis.

Key words: Wumei Wan; ulcerative colitis; nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 inflammasome; pyroptosis; intestinal mucosal permeability; phellodendrine chloride; coptisine hydrochloride; berberine

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种由过度炎症反应引起的非特异性肠病, 已被世界卫生组织定义为难治性疾病。主要表现为从直肠开始出现溃烂并最终延伸至结肠近端, 且伴有腹痛的血性腹泻。近年来, UC 的发病率在全球范围内逐年递增, 在亚洲地区尤为明显^[1-2]。UC 患者的正常生活受到严重影响, 更令人担忧的是 UC 病程长且易反复发作, 患者肠道癌变的风险远高于正常人^[3-4]。目前, UC 发病机制尚未完全揭示, 临床治疗药物中 5-氨基水杨酸类药物 (5-amino salicylic acid, 5-ASA) 应用最广、治疗效果较好, 但长期应用存在一定的不良反应。因此对新型治疗药物的需求与日俱增。

传统中医药理论将 UC 定义为湿热蕴肠、肝脾虚弱、外邪入体导致出血性腹泻, 中药的多靶点、低毒性的特点为破解 UC 反复发作的治疗困境提供可能。乌梅丸是出自东汉张仲景《伤寒论》的经典方剂, 由乌梅、花椒、细辛、干姜、黄连等 10 味药物组成, 有缓肝调中、清上温下之效, 用于治疗蛔厥久痢, 距今已有近 2000 年的用药历史^[5]。现今, 乌梅丸用于治疗多种胃肠疾病^[6]。课题组前期研究发现乌梅丸对 UC 有一定治疗作用, 但其对结肠上皮细胞焦亡的影响尚不清楚。核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 是 NOD 样受体家族 (NOD-like receptors, NLRs) 的重要成员, 是先天免疫的核心之一。活化的 NLRP3 炎症小体通过激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cysteine-aspartate protease-1, Caspase-1), 促进细胞内白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-1 β 前体的活化, 激活消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) 触发细胞焦亡^[7]。研究发现, NLRP3 在 UC 患者及不同方式诱

导的 UC 动物模型中均异常表达。王康等^[8]通过体外研究发现葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium salt, DSS) 诱导 24 h 后, 人结直肠腺癌 Caco-2 细胞和人正常结肠上皮 NCM460 细胞的细胞膜完整性被破坏, 细胞损伤明显, 细胞焦亡诱导蛋白 GSDMD-N 的表达显著升高, 提示 DSS 能够诱导上皮细胞过量焦亡, 破坏肠黏膜屏障诱发 UC。本研究使用 2% DSS 诱导建立 UC 小鼠模型, 以乌梅丸水煎液进行干预, 通过药效指标和 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路相关蛋白检测, 研究乌梅丸上皮细胞焦亡的影响, 为乌梅丸治疗 UC 的推广应用提供依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 6~7 周龄, 购自中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心, 许可证号 SYXK (甘) 2019-0002。动物于室温 (25.0 $\pm$ 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 (55 $\pm$ 5) %、自然光照/黑暗循环的环境下饲养。动物实验由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所实验动物伦理委员会批准 (2022-009) 并在其指南下进行。

1.2 药材

乌梅丸 (乌梅 30 g、当归 6 g、桂枝 6 g、人参 6 g、干姜 9 g、制附子 6 g、花椒 5 g、细辛 3 g、黄连 9 g、黄柏 6 g) 按照《方剂学》组方, 中药饮片均购自甘肃中医药大学附属医院, 经甘肃中医药大学附属医院杨锡仓主任中药师分别鉴定为蔷薇科植物梅 *Prunus mume* (Sieb.) Sieb. et Zucc. 的干燥近成熟果实、伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根、樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝、五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎、姜科植物姜 *Zingiber*

officinale Rosc. 的干燥根茎、毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的子根的加工品、芸香科植物花椒 *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. 的干燥成熟果实、马兜铃科植物北细辛 *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag. 的干燥根和根茎、毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎、芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮。

1.3 药品与试剂

美沙拉嗪(批号 GC16607)购自美国 GLP BIO 公司; DSS(批号 S2839, 相对分子质量 36 000~50 000)购自美国 MP 公司; Occludin-1 兔多克隆抗体(批号 66378-1-ig)购自美国 Proteintech 公司; NLRP3 抗体(批号 13158S)、Caspase-1 抗体(批号 89332S)、GSDMD-N 抗体(批号 10137S)、 β -actin 抗体(批号 4970S)均购自美国 CST 公司; 山羊抗兔 IgG 二抗(批号 BF03008)、山羊抗鼠 IgG 二抗(批号 BF03001)均购自北京博奥龙免疫技术有限公司; 小鼠 IL-18 ELISA 试剂盒(批号 JL20253)、IL-1 β ELISA 试剂盒(批号 JL18442)、二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)、ELISA 试剂盒(批号 JL11855)均购自上海江莱生物公司; TUNEL 染色试剂盒(批号 11684795910)购自瑞士罗氏公司。

1.4 仪器

CX-23 型光学显微镜(日本 Olympus 公司); ASP300S 型组织脱水机、RM2016 型石蜡切片机(德国 Leica 公司); Bead Ruptor 12 型组织研磨机(美国 Omni International 公司); 5418R 型低温离心机、BioPhotometer plu/D30 型核酸蛋白测定仪(德国 Eppendorf 公司); Gen5 型多功能酶标仪(美国 Bio-Tek 公司); ProFlex 3 $\times$ 32 型荧光定量 PCR 仪(购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Quant Studio 5 型 qRT-PCR 仪(美国 ABI 公司); PowerPac HC 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); DYCZ-40S 型转膜槽(北京六一生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 乌梅丸给药溶液的制备 乌梅丸全方用 10 倍量水浸泡 30 min(制附子先煎 30 min, 人参隔水蒸 30 min)后煎煮, 武火煮沸后转文火煎煮 45 min, 趁热滤过。剩余药渣再加入 8 倍量水重复煎煮 45 min, 合并 2 次药液。浓缩后得到含生药量 1.3 g/mL 药液。经 HPLC 检测乌梅丸水煎液中盐酸黄柏碱质

量分数为 0.18 mg/g、盐酸黄连碱质量分数为 1.72 mg/g、盐酸小檗碱质量分数为 4.84 mg/g, 均符合《中国药典》2020 年版一部中乌梅丸含量检测标准。

2.1.2 美沙拉嗪给药溶液的制备 称取 0.625 g 美沙拉嗪溶于 25 mL 5%羧甲基纤维素钠中, 配制成 25 mg/mL 的美沙拉嗪溶液。

2.1.3 2% DSS 溶液的制备 称取 2 g DSS 溶于水, 并加水至 100 mL 配制成 2% DSS 溶液, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存待用。

2.2 动物分组、造模与给药

小鼠适应性饲养 7 d 后, 按照随机数字表法将 30 只小鼠分为对照组、模型组、美沙拉嗪(0.5 g/kg)组和乌梅丸低、高剂量(13.04、26.09 g/kg, 分别相当于临床剂量的 1、2 倍)组, 每组 6 只。对照组小鼠自由饮水, 其余各组自由饮用 2% DSS 溶液复制 UC 小鼠模型, 同时各给药组 ig 相应药物, 1 次/d, 连续 7 d。末次给药后, 所有动物禁食不禁水 24 h, 异氟烷吸入麻醉, 摘眼球取血, 脱颈椎处死小鼠, 取完整结肠测量长度并拍照, 同时取结肠后段 2~3 cm 处剖开拍照, 剩余结肠分段保存于 4%多聚甲醛和-80 $^{\circ}$ C 冰箱待用。

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

每天称定小鼠体质量, 观察粪便和便血情况。参照 Zhou 等^[9]方法进行 DAI 评分。

2.4 结肠长度测量及结肠黏膜损伤指数(colon mucosa damage index, CMDI)评分

取各组小鼠完整结肠, 测量并记录结肠长度。取 2~3 cm 结肠段沿肠系膜纵向剖开, 生理盐水冲去结肠内粪便, 观察结肠表面损伤情况。参考 Cheng 等^[10]方法进行 CMDI 评分。

2.5 组织学评价

取 4%多聚甲醛固定的结肠组织, 脱水后石蜡包埋, 切成 5 μ m 薄片, 进行苏木素-伊红(HE)染色。于光学显微镜下观察组织形态并参照 Almarzooqi 等^[11]评分方法进行组织病理学评分。

2.6 TUNEL 染色

取“2.5”项下组织石蜡块, 按 5 μ m 连续切片, 按 TUNEL 染色试剂盒说明书染色后, 于荧光显微镜下观察并拍照。

2.7 qRT-PCR 检测结肠组织 Occludin-1、IL-18、IL-1 β 、NLRP3、GSDMD 和 Caspase-1 mRNA 表达

取-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存的结肠组织, 用 TRIZOL 提取组织中总 RNA。按照试剂盒说明书合成 cDNA,

进行 qRT-PCR 分析。反应程序: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 20 s, 40 个循环。使用 2^{-ΔΔC_t} 计算目的基因相对表达量, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
<i>Caspase-1</i>	F: TGCCAGAGCACAAGACTTC R: TCCTTGTTTCTCTCCACGGC
<i>GSDMD</i>	F: ATGGCATGGCTTACACCACC R: ATGGCATGGCTTACACCACC
<i>IL-18</i>	F: ACAGGCCTGACATCTTCTGC R: ATTGTTCTGGGCAAGAGG
<i>IL-1β</i>	F: GCAGGCAGTATCACTCATTGT R: GGCTTTTGTGTTTCATCTC
<i>NLRP3</i>	F: TCTGCACCCGGACTGTAAAC R: CACCCAACTGTAGGCTCTGC
<i>Occludin-1</i>	F: GGATGACTACAGAGAGAGGGAGGG R: CATAGTCTCCACCATCCTCTTG
<i>β-actin</i>	F: GGTACACAGGGCTGCTTT R: ACTGTGCCGTTGACCTTGC

2.8 Western blotting 检测 Occludin-1、NLRP3、GSDMD-N 和 Caspase-1 蛋白表达

取-80 °C 保存的结肠组织, 加入 800 μL 预冷的蛋白提取混合液 (RIRP 缓冲液-蛋白酶抑制剂-磷酸酶抑制剂 100:1:1) 及研磨珠 4~5 粒, 组织研磨机研磨 20 s, 制备组织匀浆。4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度后, 加入 PBS 及 Loading Buffer 于 100 °C 金属浴中进行蛋白变性 10 min。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, 5% 脱脂牛奶封闭后, 加入一抗孵育过夜, 隔天加入二抗孵育 1 h, 滴加 ECL 发光液, 暗室内曝光, 扫描显影条带, 采用 Image J 软件分析目的蛋白的灰度值并进行统计分析。

2.9 ELISA 检测外周血 DAO 活性和 IL-18、IL-1β 含量

取各组小鼠血液, 4 °C、3500 r/min 离心 15 min, 吸取上层血清, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清 DAO 活性和 IL-18、IL-1β 含量。

2.10 统计学分析

用 GraphPad Prism 9 软件作图, 用 Image J 及 Image-pro plus 6.0 软件对 HE 染色、TUNEL 染色、Western blotting 图片进行处理。用 IBM SPSS 27 软件通过独立样本 *T* 检验进行显著性统计, 数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。

3 结果

3.1 乌梅丸对 UC 小鼠一般状态和 DAI 评分的影响

与对照组比较, 模型组小鼠造模第 3 天起出现倦怠、扎堆、肛门附近毛发杂乱等变化, 4~7 d 出现逐渐加重的便血现象, 2 d 后体质量下降逐渐加剧, 并于第 5 天起具有显著性差异 ($P<0.05$ 、 0.01 , 图 1); 同时 DAI 评分升高, 并于第 3 天起具有显著性差异 ($P<0.01$)。与模型组比较, 美沙拉嗪和乌梅丸能显著减轻小鼠体质量下降 ($P<0.05$ 、 0.01), 延缓 DSS 导致的小鼠便血, 减轻便血症状, 显著降低小鼠 DAI 评分 ($P<0.05$ 、 0.01)。

3.2 乌梅丸对 UC 小鼠结肠长度和 CMDI 评分的影响

如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠结肠长度显著缩短 ($P<0.01$), CMDI 评分显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 美沙拉嗪组和乌梅丸高剂量组小鼠结肠长度显著增加 ($P<0.01$), 各给药组 CMDI 评分显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。

3.3 乌梅丸对 UC 小鼠结肠组织病理变化的影响

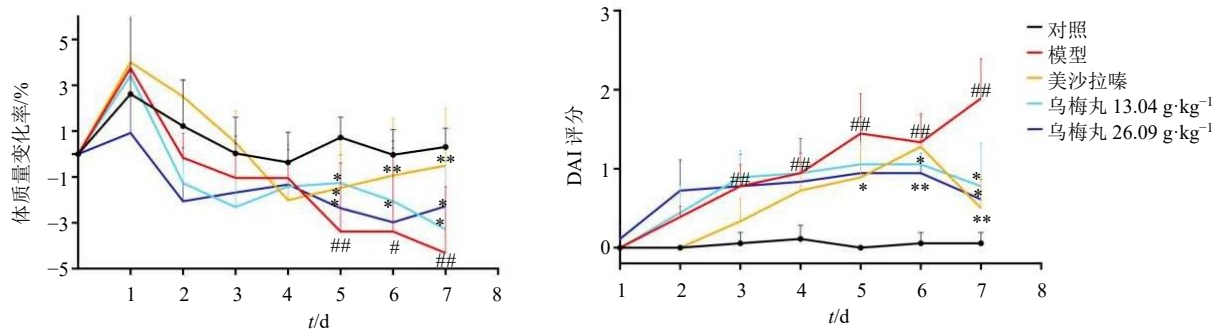
如图 3 所示, 对照组小鼠结肠中未见明显炎症细胞浸润, 绒毛和隐窝结构良好, 上皮细胞层完整, 黏膜下层未见明显水肿。与对照组比较, 模型组小鼠结肠黏膜下层出现明显的炎症细胞浸润, 黏膜下层间隙增大, 隐窝结构损伤, 肠上皮细胞损伤, 病理组织学评分显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 乌梅丸高剂量组炎症细胞浸润面积降低, 黏膜下层水肿缓解, 绒毛和隐窝结构完整, 上皮细胞层损伤修复, 病理组织学评分显著降低 ($P<0.01$), 作用优于低剂量组。

3.4 乌梅丸对 UC 小鼠肠黏膜通透性的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠外周血 DAO 活性显著升高 ($P<0.01$), 结肠组织 Occludin-1 蛋白和 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组小鼠外周血 DAO 活性均显著下降 ($P<0.01$), 结肠组织 Occludin-1 mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.01$), 美沙拉嗪组和乌梅丸高剂量组结肠组织 Occludin-1 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01), 提示乌梅丸能修复肠黏膜屏障, 降低肠黏膜通透性。

3.5 乌梅丸对 UC 小鼠肠上皮细胞的保护作用

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠结肠组织中受损死亡的细胞数量增加, 死亡细胞比例显



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同
 # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below figures

图 1 乌梅丸对 UC 小鼠体质量和 DAI 评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of Wumei Wan on body weight and DAI score of UC mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

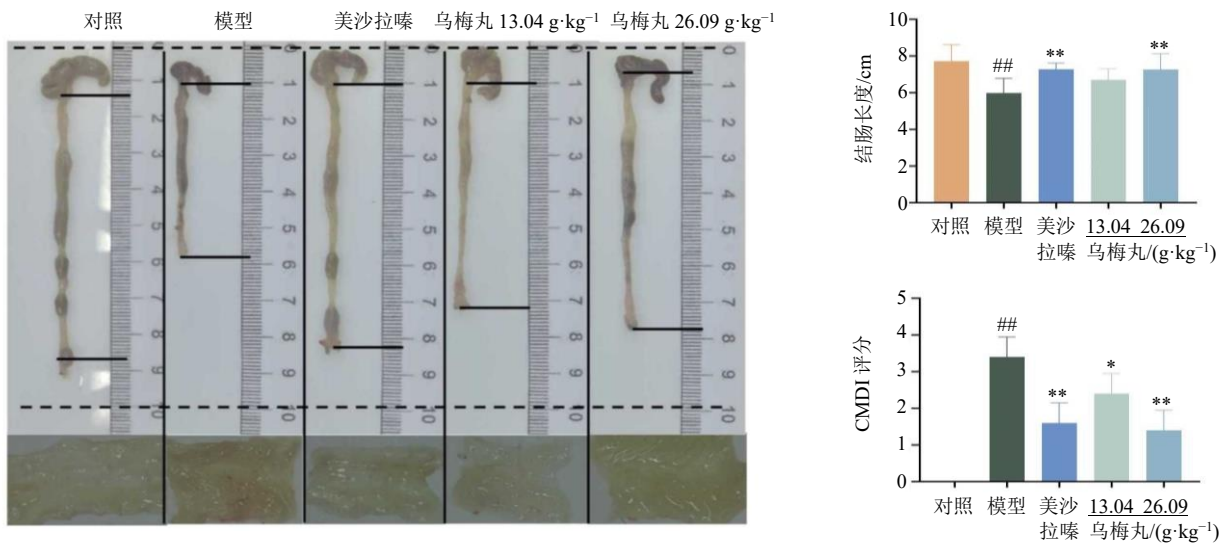
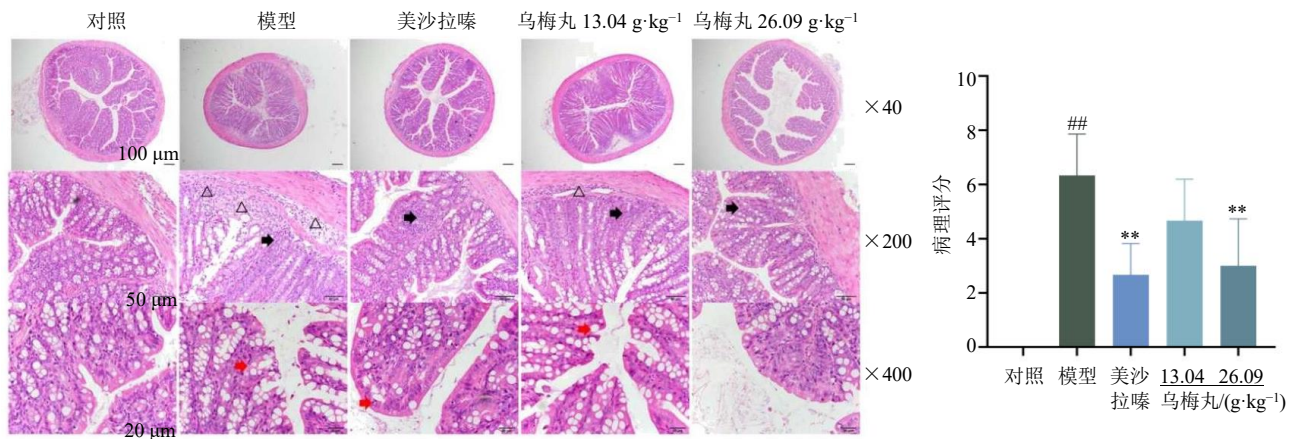


图 2 乌梅丸对 UC 小鼠结肠长度和 CMDI 评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of Wumei Wan on colonic length and CMDI scores of UC mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



黑色三角表示炎症浸润, 黑色箭头表示隐窝结构和绒毛损伤, 红色箭头表示上皮细胞死亡

black triangles indicate inflammatory infiltration, black arrows indicate crypt and villus damage, red arrows indicate epithelial cell death

图 3 乌梅丸对 UC 小鼠结肠组织病理变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of Wumei Wan on pathological changes of colon tissue in UC mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

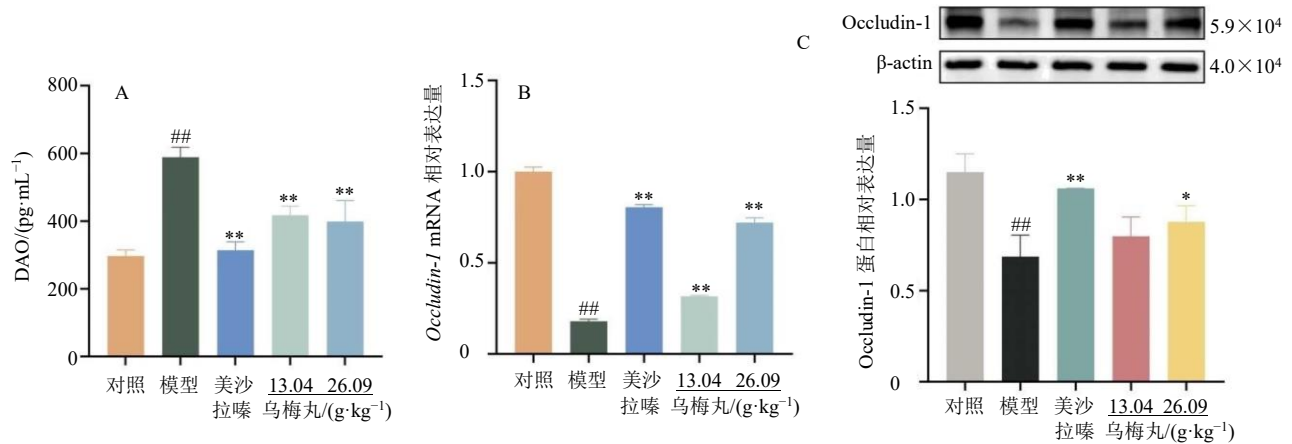


图 4 乌梅丸对 UC 小鼠外周血 DAO 活性 (A)、结肠组织 *Occludin-1* mRNA (B) 和蛋白 (C) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 4 Effect of Wumei Wan on DAO activity (A) in peripheral blood, *Occludin-1* mRNA (B) and protein (C) expressions in colon tissue of UC mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

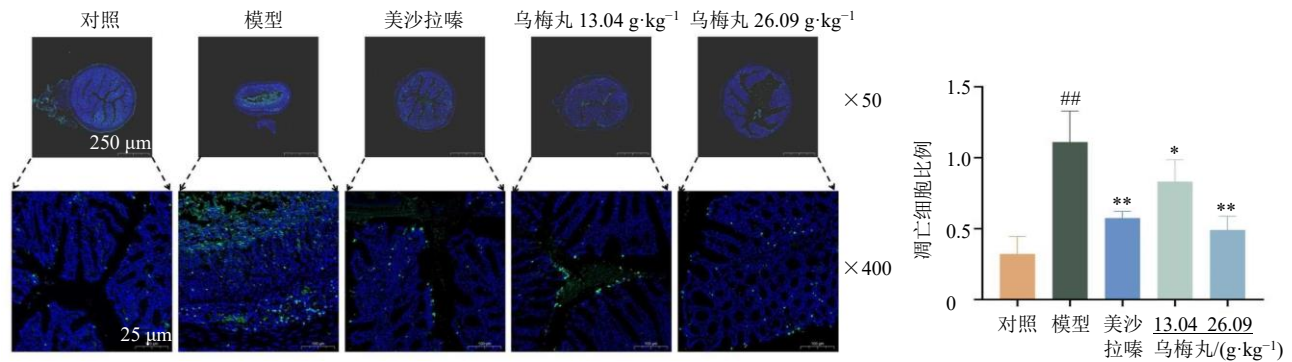


图 5 乌梅丸对 UC 小鼠肠上皮细胞的保护作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 5 Protective effect of Wumei Wan on intestinal epithelial cells in UC mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组结肠组织中细胞死亡数量减少, 死亡细胞比例显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 且乌梅丸高剂量组作用优于低剂量组。

3.6 乌梅丸对 UC 小鼠结肠上皮细胞焦亡关键炎症因子的影响

如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠外周血 IL-18、IL-1 β 含量显著升高 ($P < 0.01$), 结肠组

织 IL-18、IL-1 β mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组外周血 IL-18、IL-1 β 含量和结肠组织 IL-18、IL-1 β mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.7 乌梅丸对 UC 小鼠结肠组织 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 焦亡通路的影响

如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠结肠组织 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 的 mRNA 和蛋白

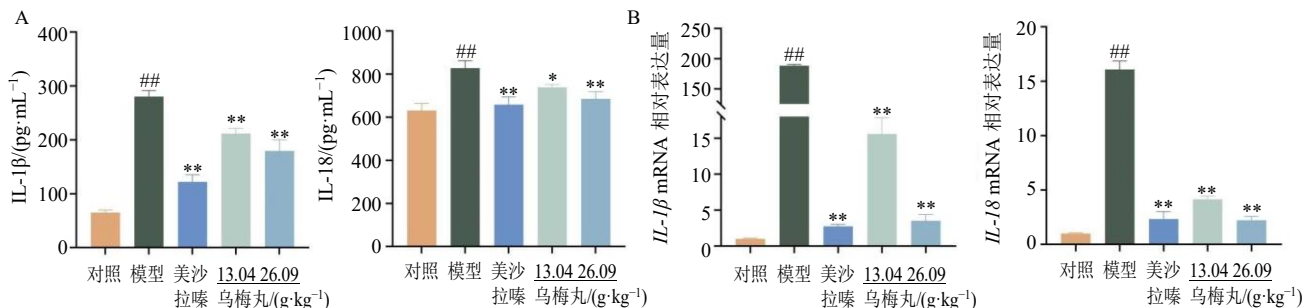


图 6 乌梅丸对 UC 小鼠外周血 IL-1 β 、IL-18 含量 (A) 和结肠组织 IL-1 β 、IL-18 mRNA 表达 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 6 Effect of Wumei Wan on IL-1 β , IL-18 levels in peripheral blood (A) and IL-1 β , IL-18 mRNA expressions in colon tissue (B) of UC mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

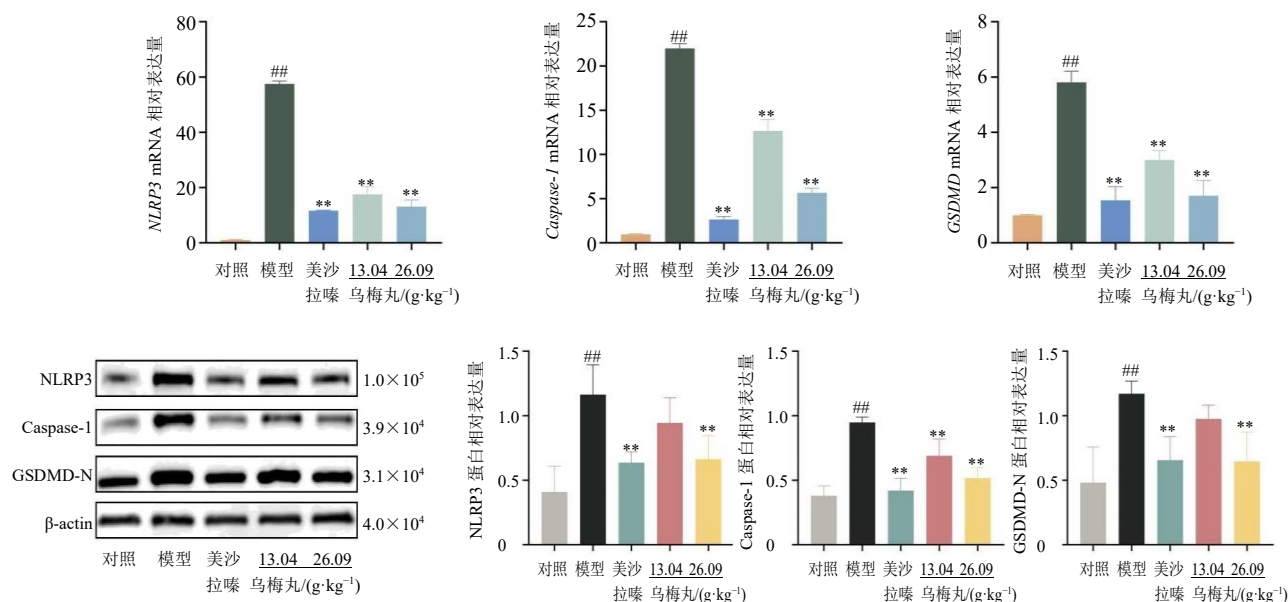


图 7 乌梅丸对 UC 小鼠结肠组织 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 焦亡通路的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of Wumei Wan on NLRP3/Caspase-1/GSDMD pyroptosis pathway in colon tissue of UC mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表达水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组小鼠结肠组织 *NLRP3*、*Caspase-1*、*GSDMD* mRNA 表达水平显著下降 ($P < 0.01$), *Caspase-1* 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 美沙拉嗪组和乌梅丸高剂量组 *NLRP3* 和 *GSDMD-N* 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$), 提示乌梅丸能够抑制 DSS 诱导 *NLRP3*/*Caspase-1*/*GSDMD* 通路的过度活化进而抑制细胞焦亡的发生。

4 讨论

UC 发病率的全球性升高带来的医疗压力已经引起广泛关注, 尚未明确的复杂发病机制为 UC 的治疗带来了重大阻碍。美沙拉嗪作为临床最常用治疗药物, 使用频率逐年增加, 同时暴露出一定的使用限制^[12-13]。传统中草药成为 UC 治疗的新选择, 其中乌梅丸等中药方剂在治疗 UC 上被寄予厚望^[14-15]。乌梅丸出自张仲景所著的《伤寒论》, 有温上清下、安蛔止痛之效^[16], 对治疗肠道疾病, 尤其对炎症性肠病有显著疗效^[17]。核因子- κ B、Notch 等通路已被研究证实是乌梅丸治疗 UC 的作用靶点, 充分展现了中药多靶点治疗的优势^[18-19]。本研究在已有研究的基础上, 构建 UC 小鼠模型并 ig 乌梅丸水煎液, 发现乌梅丸能缓解 DSS 诱导的小鼠体质量下降、便血、结肠缩短等症状, 修复肠道黏膜屏障的病理损伤, 对 UC 有治疗作用。

肠黏膜屏障具有维护肠道稳态, 控制肠内外物质交换的功能。肠上皮细胞和细胞间连接构成的完

整结构是维持屏障功能的重要保证^[20]。黏膜通透性的增加是 UC 发病的关键机制之一, 促进肠道修复、恢复肠黏膜通透性被认为是 UC 治愈中的关键^[21-22]。本研究发现乌梅丸组小鼠血清 DAO 活性显著减少, 结肠组织中 Occludin-1 蛋白和 mRNA 表达水平显著回升, 提示乌梅丸通过促进紧密连接表达, 促进肠黏膜屏障修复。HE 和 TUNEL 染色发现, 模型组小鼠肠道中肿胀破裂的上皮细胞比例增加, 死亡的细胞出现脱离现象, 而乌梅丸能减少结肠上皮细胞死亡, 维持上皮屏障结构完整性, 这一发现证明了上皮细胞在肠黏膜屏障的重要作用, 为 UC 的相关研究提供了新的切入点。

上皮细胞的增殖分化、衰老以及损伤细胞的脱落共同维持肠道上皮屏障的稳定, 保证肠道功能的同时维持肠道细胞活力^[23]。Yan 等^[24-25]研究发现, 乌梅丸能够通过调节巨噬细胞极化、维持上皮细胞增殖和凋亡间的平衡等机制缓解 UC。细胞焦亡是一种较为独特的细胞程序性死亡的方式, 表现为细胞不断胀大直至细胞膜破裂, 并伴随细胞内炎症因子的释放, 能够进一步加剧炎症反应。上皮细胞过度焦亡造成上皮细胞层损伤, 同时加剧肠道内的炎症反应, 进而导致 UC 的加剧^[26]。本研究通过检测血清和组织中参与细胞焦亡的炎症因子 IL-1 β 、IL-18 的表达, 以及结肠中关键因子 *NLRP3*、*Caspase-1*、*GSDMD* 蛋白和 mRNA 表达, 减少上皮细胞焦亡比例。

本研究结果表明,乌梅丸能够减轻由 DSS 诱导的小鼠肠道黏膜病理损伤、逆转便血及体质量降低等病理现象,其作用机制可能是通过抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路发挥修复肠道上皮屏障、缓解肠道炎症损伤的作用。本研究结果为乌梅丸作为 UC 的临床有效治疗药物提供理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ungaro R, Mehandru S, Allen P B, *et al.* Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10080): 1756-1770.
- [2] Du L, Ha C. Epidemiology and pathogenesis of ulcerative colitis [J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2020, 49(4): 643-654.
- [3] Feuerstein J D, Cheifetz A S. Ulcerative colitis [J]. *Mayo Clin Proc*, 2014, 89(11): 1553-1563.
- [4] Segal J P, LeBlanc J F, Hart A L. Ulcerative colitis: An update [J]. *Clin Med*, 2021, 21(2): 135-139.
- [5] 谭俊, 黄贵华, 林壮燕, 等. 乌梅丸治疗溃疡性结肠炎的临床及实验研究进展 [J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2022, 6(3): 131-134.
- [6] 王颖, 赵冠宇, 薛淑萍, 等. 乌梅丸及其类方治疗胃肠疾病的临床与基础研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2023, 39(3): 122-128.
- [7] Zhen Y, Zhang H. NLRP3 inflammasome and inflammatory bowel disease [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 276.
- [8] 王康, 邓牧文, 唐立, 等. 葡聚糖硫酸钠诱导体外溃疡性结肠炎的细胞损伤及细胞焦亡机制 [J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2022, 43(4): 373-381.
- [9] Zhou H F, Yang C, Li J Y, *et al.* Quercetin serves as the major component of Xiang-Lian Pill to ameliorate ulcerative colitis via tipping the balance of STAT1/PPAR γ and dictating the alternative activation of macrophage [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 313: 116557.
- [10] Cheng X X, Ji Y F, Li X Y, *et al.* The beneficial effects of *Fomitopsis pinicola* chloroform extract on a dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis mice model [J]. *Ann Transl Med*, 2023, 11(2): 35.
- [11] Almarzooqi S, Venkataraman B, Raj V, *et al.* β -myrcene mitigates colon inflammation by inhibiting MAP kinase and NF- κ B signaling pathways [J]. *Molecules*, 2022, 27(24): 8744.
- [12] Beiranvand M. A review of the biological and pharmacological activities of mesalazine or 5-aminosalicylic acid (5-ASA): An anti-ulcer and anti-oxidant drug [J]. *Inflammopharmacology*, 2021, 29(5):

1279-1290.

- [13] Le Berre C, Roda G, Nedeljkovic Protic M, *et al.* Modern use of 5-aminosalicylic acid compounds for ulcerative colitis [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2020, 20(4): 363-378.
- [14] Zheng S H, Xue T Y, Wang B, *et al.* Chinese medicine in the treatment of ulcerative colitis: The mechanisms of signaling pathway regulations [J]. *Am J Chin Med*, 2022, 50(7): 1781-1798.
- [15] Liu C S, Hu Y X, Luo Z Y, *et al.* Xianglian Pill modulates gut microbial production of succinate and induces regulatory T cells to alleviate ulcerative colitis in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 303: 116007.
- [16] 谢家诚, 马晓聪, 罗伟生. 乌梅丸合甘草泻心汤对寒热错杂型活动期溃疡性结肠炎患者的临床疗效及对免疫功能、氧化应激的影响 [J]. 中药材, 2023, 46(1): 226-230.
- [17] 李克亚, 陆文洪, 王真权, 等. 乌梅丸联合美沙拉嗪对寒热错杂型溃疡性结肠炎患者的临床疗效 [J]. 中成药, 2022, 44(11): 3493-3497.
- [18] 惠毅, 闫曙光. 乌梅丸拆方对 UC 大鼠结肠上皮细胞 Notch 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(7): 114-117.
- [19] 高飞云, 刘婷, 张转红, 等. 基于 NF- κ B 途径探讨溃疡性结肠炎发病机制及中药干预作用研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(6): 123-127.
- [20] Luissint A C, Parkos C A, Nusrat A. Inflammation and the intestinal barrier: Leukocyte-epithelial cell interactions, cell junction remodeling, and mucosal repair [J]. *Gastroenterology*, 2016, 151(4): 616-632.
- [21] 郑晨曦, 冯嘉轩, 陈昭彤, 等. 葛根苓连汤对溃疡性结肠炎小鼠肠道屏障的保护作用机制 [J]. 中国兽医学报, 2023, 43(3): 571-576.
- [22] 刘伟, 刘又前, 蒋翠花, 等. 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 [J]. 中草药, 2023, 54(16): 5257-5266.
- [23] 赵零, 武树奇, 许宁宁, 等. 肠道上皮与肠道微生物相互作用的研究现状 [J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3508-3519.
- [24] Yan S G, Wang P, Wei H L, *et al.* Treatment of ulcerative colitis with Wu-Mei-Wan by inhibiting intestinal inflammatory response and repairing damaged intestinal mucosa [J]. *Phytomedicine*, 2022, 105: 154362.
- [25] Yan S G, Wei H L, Jia R, *et al.* Wu-Mei-wan ameliorates murine ulcerative colitis by regulating macrophage polarization [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 859167.
- [26] 唐立, 陆岩, 欧阳满照. 细胞焦亡与溃疡性结肠炎研究的最新进展 [J]. 广东医学, 2021, 42(11): 1393-1399.

[责任编辑 李亚楠]