

红花籽粕对小鼠的急性毒性及抗溃疡性结肠炎作用研究

戚曼¹, 王文萱¹, 付向磊¹, 姜超¹, 张亮¹, MD HASAN ALI¹, 李剑², 楚生辉^{1*}, 刘敏^{1*}

1. 石河子大学药学院 新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 新疆 石河子 832003

2. 华东理工大学药学院 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200000

摘要: 目的 评价红花籽粕(红花 *Carthamus tinctorius* 的种子经过压榨提取红花籽油后的副产品)对小鼠的急性毒性及抗溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)作用。方法 C57BL/6 小鼠 ig 不同剂量的红花籽粕, 7 d 后计算脏器指数, 采用苏木素-伊红(HE)染色观察肝、脾、肾组织病理变化, 测定血清中肝功能、肾功能及血脂水平, 以评价红花籽粕的急性毒性。建立葡聚糖硫酸钠(dextran sulphate sodium, DSS)诱导的 UC 小鼠模型, 每天记录小鼠体质量, 测定疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分、结肠长度以及脏器指数, 采用 HE 染色和阿利新蓝-过碘酸雪夫(AB-PAS)染色评价结肠组织病理学变化, 采用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测结肠组织中炎症和黏膜屏障相关因子表达。结果 急性毒性实验中, 与对照组比较, 红花籽粕组小鼠脏器指数、血液生化指标没有显著差异, 脏器病理切片也未见异常。红花籽粕对 DSS 诱导的 UC 小鼠具有较好的保护作用, 可以显著改善体质量减轻、DAI 评分升高、结肠长度缩短等临床症状 ($P < 0.01$), 减轻结肠组织病理损伤, 抑制肠道炎症细胞的浸润, 保护杯状细胞, 提高紧密连接蛋白和黏蛋白的表达 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 改善肠道屏障完整性。结论 红花籽粕具有较高的安全性, 且对 DSS 诱导的 UC 小鼠具有显著的治疗作用。

关键词: 红花籽粕; 急性毒性; 溃疡性结肠炎; 炎症; 肠道屏障

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)08-2601-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.08.011

Acute toxicity and anti-ulcerative colitis effect of safflower seed meal in mice

QI Man¹, WANG Wenxuan¹, FU Xianglei¹, JIANG Chao¹, ZHANG Liang¹, MD HASAN ALI¹, LI Jian², CHU Shenghui¹, LIU Min¹

1. Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Resource and Utilization, Ministry of Education, Pharmacy School of Shihezi University, Shihezi 832000, China

2. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200000, China

Abstract: Objective To evaluate the acute toxicity and anti-ulcerative colitis (UC) effect of safflower seed meal which is the by-product of extracting safflower seed oil from the seeds of *Carthamus tinctorius* in mice. **Methods** C57BL/6 mice were ig different doses of safflower seed meal, the organ index was calculated after 7 d, hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe pathological changes in liver, spleen and kidney tissues, liver function, kidney function and blood lipid levels in serum were measured to evaluate the acute toxicity of safflower seed meal. A UC mouse model induced by dextran sulfate sodium (DSS) was established, the body weight of mice was recorded every day, the disease activity index (DAI) score, colon length, and organ index were measured, pathological changes of colon tissue was evaluated by HE staining and Alisin blue periodate Schiff (AB-PAS) staining, the expressions of inflammatory and mucosal barrier related factors in colon tissue were detected by qRT-PCR and Western blotting. **Results** In the acute toxicity experiment, there was no significant difference in organ index and blood biochemical indicators between safflower seed meal group mice and control group, and no abnormalities were found in organ pathological sections. Safflower seed meal had a good

收稿日期: 2023-12-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82260817); 国家自然科学基金资助项目(82160121); 石河子大学高水平人才研究启动基金(RCZK202036, RCZK202035); 新疆生产建设兵团指导科技计划(2022ZD049, 2022ZD005); 新疆自治区“天池英才”领军人才项目

作者简介: 戚曼, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。E-mail: 3052984093@qq.com

*通信作者: 刘敏, 副教授, 硕士生导师, 从事红花活性成分及产业开发研究。E-mail: liuminshzu@163.com

楚生辉, 副教授, 硕士生导师, 从事民族中药药理学研究。E-mail: 53865963@qq.com

protective effect on DSS-induced UC mice, which significantly improved clinical symptoms such as reduced body weight, increased DAI score, and shortened colon length ($P < 0.01$), alleviated pathological damage to colon tissue, inhibited the infiltration of intestinal inflammatory cells, protected goblet cells, increased the expressions of tight junction protein and mucin ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and improved intestinal barrier integrity. **Conclusion** Safflower seed meal has high safety and significant therapeutic effects on DSS-induced UC mice.

Key words: safflower seed meal; acute toxicity; ulcerative colitis; inflammation; intestinal barrier

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是指以结肠黏膜连续性、弥漫性炎症改变为特征的慢性非特异性炎症性肠病^[1]。病理改变以结肠溃疡糜烂为主, 具有弥散性、浅表性、连续性的特点, 病程漫长, 伴反复发作^[2]。UC 病因和发病机制非常复杂, 尚不清楚, 导致目前临床上的治疗手段有限, 主要依靠氨基水杨酸类、糖皮质激素、免疫抑制剂和生物抑制剂等, 其中 5-氨基水杨酸 (5-aminosalicylic acid, 5-ASA) 是一种经典的抗炎剂, 可以调节白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ)、IL-10 等炎性细胞因子之间的平衡^[3-4], 是轻中度 UC 患者的首选治疗药物^[5], 然而长期使用这些药物会产生严重的不良反应^[6]。近年来, 临床应用中药治疗溃疡性结肠炎越来越广泛^[7-8]。红花籽粕是菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的种子经过压榨提取红花籽油后的副产品^[9]。红花是新疆特有的经济作物之一, 每年红花籽粕的产量超过万吨, 这些红花籽粕可以用于食品、医药和饲料^[10]。现有研究表明, 红花籽粕具有抗氧化、消炎抑菌、改善糖尿病和骨质疏松等生物活性^[11-14], 但如果能够发现红花籽粕新的生物活性, 从中找到具有活性的组分或单体, 将为红花籽粕的进一步开发和利用奠定良好的基础。检索国内外文献, 尚未发现红花籽粕对 UC 相关研究的报道。本研究以葡聚糖硫酸钠 (dextran sulphate sodium, DSS) 诱导的 UC 小鼠为模型, 探讨红花籽粕对 DSS 诱导的 UC 小鼠的治疗作用并对其急性毒性进行考察, 为将红花籽粕用于临床防治 UC 的辅助性治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 药材

红花籽采自新疆建设兵团第九师 161 团 (塔城地区裕民县) 无刺红花, 经石河子大学药学院楚生辉副教授鉴定为菊科红花属植物红花 *C. tinctorius* L. 的干燥成熟果实。

1.2 动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠, 雌雄各半, 体质量 18~

22 g, 购自新疆医科大学实验动物中心, 许可证号 SCXK (新) 2023-0001。小鼠饲养于 SPF 级环境中, 温度 20~22 °C、相对湿度 50%~60%、12 h 光照/12 h 黑暗周期。动物实验经石河子大学医学伦理委员会批准 (批准号 A2022-093-01)。

1.3 药品与试剂

5-ASA (批号 C13983588) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; FITC-葡聚糖 (平均相对分子质量 3 000~5 000, 批号 0456702411) 购自德国 Merck 公司; DSS (相对分子质量 40 000, 批号 S14049) 购自上海源叶生物科技有限公司; 紧密连接蛋白 1 (zona occludens 1, ZO-1) 抗体 (批号 1002002-4)、封闭蛋白 (Occludin) 抗体 (批号 1002475-17) 购自英国 Abcam 公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 230040406) 购自中杉金桥生物技术公司; 10% 十二烷基硫酸钠、1.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.8)、1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 6.8)、蛋白质上样缓冲液、三羟甲基氨基甲烷、甘氨酸、脱脂奶粉 (批号分别为 1207Z034、20230504、2308001、A2306002、1130L072、6230815001、3230609001) 购自北京索莱宝生物科技有限公司; 聚山梨酯 20 (批号 CT31191180) 购自北京酷来搏科技有限公司; ECL 化学发光试剂 (批号 2120c03) 购自江苏亲科生物研究中心有限公司; TransZol Up 试剂、EasyScript[®] One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒、PerfectStart[®] Green qPCR SuperMix 试剂盒 (批号分别为 P61220、R10208、Q20409) 购自北京全式金生物技术有限公司; 丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 试剂盒 (批号 20230805)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 试剂盒 (批号 20230325)、总胆红素 (total bilirubin, TBIL) 试剂盒 (批号 20230422)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 试剂盒 (批号 20230313)、总胆固醇 (total cholesterol, TC) 试剂盒 (批号 20230414)、三酰甘油 (triglycerides, TG) 试剂盒 (批号 20230414)、

肌酐 (creatinine, CRE) 试剂盒 (批号 20230327) 均购自南京建成生物工程研究所。

1.4 仪器

AR124CN 型电子分析天平 [奥豪斯仪器 (上海) 有限公司]; 5418R 型低温离心机 (德国 Eppendorf 公司); ECLIPSE E100 型正置光学显微镜 (日本 Nikon 公司); Cytation 3 型酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); Mini-PROTEANTetra 型电泳槽、MiniTransBlotCell 型转印槽、164-5070 型恒压电泳仪电源 (美国 Bio-Rad 公司); Tanon 5200 Multi 型全自动化学发光成像系统 (上海天能科技有限公司); Rotor-Gene Q 型 qRT-PCR 仪 (德国 QIAGEN 公司); ZD-9556 型水平脱色摇床 (江苏盛蓝仪器制造有限公司)。

2 方法

2.1 红花籽粕的制备

取适量的红花种子, 粉碎, 于 50 °C 低温真空干燥 2 h, 按固液比 1 : 6 加入石油醚溶液, 进行索氏浸提 (75 °C 浸提 3 h), 滤过, 减压浓缩。收集红花籽粕, 45 °C 低温烘干 3 h, 粉碎, 40 目过筛, 粉末用生理盐水配制成 1 g/mL 的溶液。采用苯酚-硫酸法测定 1 g/mL 红花籽粕溶液中总多糖的含量, 检测波长为 490 nm。以葡萄糖标准品质量浓度为横坐标 (x), 吸光度 (A) 为纵坐标 (y), 线性回归方程为 $y = 13.396x + 0.0944$ ($R^2 = 0.9909$), 计算得出红花籽粕溶液中总多糖质量分数为 24.25%。

2.2 红花籽粕急性毒性实验

2.2.1 分组及给药 取小鼠 70 只, 雌雄各半, 适应性饲养 1 周后, 随机分为对照组和红花籽粕 (0.25、0.50、1.00、2.00、5.00、10.00 g/kg) 组, 每组 10 只。给药前小鼠禁食 12 h (自由饮水), 于次日上午 ig 给药 1 次, 常规饲养, 连续观察 7 d, 记录动物的毒性反应和死亡情况。

2.2.2 一般生长状况观察 观察并记录 7 d 内各组小鼠体质量变化、毛色光洁度、四肢活动、进食、饮水、分泌物及粪便等情况。记录各组小鼠有无中毒症状出现、中毒反应的起始时间、严重程度、持续时间、是否可逆及死亡情况等, 出现死亡或濒死动物及时进行解剖检查。

2.2.3 体质量测定 实验期间每天同一时间记录各组小鼠的体质量。

2.2.4 脏器病理检查 给药 7 d 后, 全部动物处死解剖, 观察各脏器 (心、肝、脾、肺、肾、胃、肠) 的色泽、体积和质地的变化; 取肝脏、脾脏、肾脏

称定质量, 计算脏器指数。

$$\text{脏器指数} = \text{脏器质量} / \text{体质量}$$

肝、脾、肾组织用 4% 多聚甲醛固定, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 然后将组织标本切成 8 μm 厚的切片。切片用苏木素-伊红 (HE) 染色, 显微镜观察各个组织器官的组织结构及细胞形态。

2.2.5 血液检查 给药 7 d 后, 全部动物摘眼球取血, 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min 后收集血清, 检测血清中 ALT、AST 活性及 TBIL、BUN、TC、TG、CRE 水平。

2.3 红花籽粕对 DSS 诱导的 UC 小鼠的保护作用

2.3.1 分组、造模及给药 小鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为对照组、模型组、5-ASA (100 mg/kg) 组和红花籽粕 (5 g/kg) 组, 每组 10 只, 小鼠单独编号。对照组自由饮用纯净水, 其余小鼠自由饮用 3% DSS 水溶液, 连续 7 d, 诱导急性 UC。造模同时, 各给药组 ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 等体积的水, 1 次/d, 连续 14 d。

2.3.2 疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分 每天同一时间记录小鼠体质量, 观察小鼠粪便性状和便血情况, 根据表 1 进行 DAI 评分^[15-16]。

$$\text{DAI} = (\text{体质量变化分数} + \text{便血分数} + \text{大便性状分数}) / 3$$

表 1 DAI 评分标准

Table 1 DAI scoring criteria

分数	体质量下降率 (x) / %	粪便性状	粪便隐血情况
0	<1	正常	隐血 (-)
1	1 ≤ x < 5	松散, 半成形糊状	隐血 (+)
2	5 ≤ x < 10	松散明显, 基本不成形	隐血 (++)
3	10 ≤ x < 15	稀水样便	隐血 (+++)
4	≥ 15	稀便更加明显	肉眼便血

2.3.3 肠道通透性检测 末次给药后小鼠禁食 12 h, ig FITC-葡聚糖 (50 mg/kg), 4 h 后小鼠 ip 1% 戊巴比妥钠 (60 mg/kg) 麻醉, 摘眼球取血, 4 °C、3 000 r/min 离心 15 min。精确吸取 100 μL 血清, 在避光状态下添加到黑色荧光酶标板上, 每孔加入标准品 100 μL, 在波长 480 nm 和 520 nm 处检测样品的荧光强度, 通过连续稀释 FITC-葡聚糖产生的标准曲线计算血清中 FITC-葡聚糖的水平。

2.3.4 脏器指数测定 小鼠处死后, 取肝脏、脾脏、肾脏, 称定质量, 计算脏器指数。

2.3.5 结肠组织 HE 和阿利新蓝-过碘酸雪夫 (AB-PAS) 染色 小鼠处死后, 取结肠组织, 肉眼观察大体形态, 测量长度后, 用 4% 多聚甲醛固定, 梯度乙

醇脱水，石蜡包埋，然后将组织标本切成 8 μm 厚的切片。切片分别用 HE 和 AB-PAS 染色，光镜下观察结肠炎症和杯状细胞情况。组织损伤评分标准见表 2，使用 Image J 软件进行定量统计。

表 2 组织损伤评分标准

Table 2 Tissue injury scoring criteria

炎症	病变深度	隐窝破坏	病变范围 (x) /%	评分
无	无	无	无	0
轻	黏膜层	1/2 破坏	1 ≤ x < 25	1
中	黏膜下层	2/3 破坏	25 ≤ x < 50	2
重	肌层和浆膜层	100%破坏	50 ≤ x < 75	3
无	无	全部隐窝和肠上皮破坏	75 ≤ x < 100	4

表 3 引物序列

Table 3 Primer sequences

基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
<i>IL-6</i>	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
<i>IL-10</i>	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG
<i>IL-1β</i>	GCAACTGTTCTGAAGTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTC AACT
<i>TNF-α</i>	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
<i>IFN-γ</i>	CAGCAACAGCAAGGCGAAAAAGG	TTTCCGCTTCTGAGGCTGGAT
<i>ZO-1</i>	GTTGGTACGGTGCCCTGAAAAGA	GCTGACAGGTAGGACAGACGAT
<i>Occludin</i>	TGGCAAGCGATCATACCCAGAG	CTGCCTGAAGTCATCCACACTC
<i>Muc1</i>	AGTGCCTCTGACGTGAAGTCAC	GGGAGGGAAGTGCATCTCATT
<i>Muc2</i>	ACTCTCCACACCCAGCATCATC	GTGTCTCCGTATGTGCCGTTGT
<i>GAPDH</i>	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG	ATGCCAGTGAGCTTCCCCTTCAG

牛奶，室温封闭 2 h；分别加入一抗 (1 : 1 000)，4 °C 摇床孵育过夜；次日洗膜 5 次，加入 HRP 标记的二抗 (1 : 5 000)，室温孵育 2 h，洗膜 5 次，用 ECL 化学发光试剂曝光条带，全自动化学发光成像系统进行成像，通过 Image J 软件进行量化。

2.4 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行分析，数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA)，组间两两比较采用 *t* 检验分析。

2.3.6 qRT-PCR 检测结肠组织 *IL-6*、*IL-10*、*IL-1β*、*TNF-α*、*IFN-γ*、*ZO-1*、*Occludin*、黏蛋白 1 (*mucin-1*, *Muc1*)、*Muc2* mRNA 表达 取 30 mg 结肠组织，Trizol 法匀浆提取总 RNA，使用 EasyScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA，进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 3。

2.3.7 Western blotting 实验 取 50 mg 结肠组织，加 500 μL 裂解液进行匀浆，于冰上裂解 30 min，12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液，测定蛋白浓度，加热使蛋白变性。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

3 结果

3.1 红花籽粕的急性毒性

3.1.1 一般生长状况观察 各组均未出现小鼠死亡的情况，并且所有小鼠的饮水量、摄食量、尿量及粪便等均正常，皮毛颜色正常、有光泽，四肢活动灵活，活动状态良好，精神状态良好，眼、耳、口、鼻处无异常分泌物，无中毒症状。

3.1.2 体质量变化 如表 4 所示，与对照组比较，红花籽粕各剂量组小鼠体质量均无显著差异。

表 4 各组小鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 5)

Table 4 Changes of body weight of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, *n* = 5)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/g				
		实验前	1 d	3 d	5 d	7 d
对照	—	23.50 ± 0.67	23.78 ± 0.67	24.01 ± 0.53	23.45 ± 1.01	23.61 ± 1.24
红花籽粕	0.25	24.12 ± 0.82	24.67 ± 0.89	24.54 ± 0.70	24.17 ± 1.16	24.39 ± 1.96
	0.50	23.55 ± 1.46	24.14 ± 1.76	24.51 ± 1.99	25.24 ± 2.50	25.04 ± 2.53
	1.00	22.89 ± 1.19	22.64 ± 1.43	22.88 ± 1.74	23.41 ± 1.41	23.64 ± 1.78
	2.00	23.17 ± 0.52	23.59 ± 0.40	23.60 ± 0.92	24.02 ± 0.95	24.02 ± 1.10
	5.00	23.33 ± 1.31	23.76 ± 1.43	23.59 ± 1.62	23.60 ± 1.43	23.80 ± 1.85
	10.00	22.73 ± 0.46	22.90 ± 0.63	23.13 ± 0.73	22.75 ± 0.55	22.44 ± 1.32

3.1.3 脏器病理检查 实验结束，小鼠解剖后肉眼观察主要脏器（心、肝、脾、肺、肾、胃、肠），胸腔、腹腔浆膜光滑无积液，脏器色泽、大小和质地正常，无明显肉眼可见病变。对解剖后的主要脏器称定质量，计算脏器指数，如表 5 所示，与对照组比较，红花籽粕各剂量组小鼠的肝脏指数、脾脏指数和肾脏指数均无显著性差异。组织病理学检查(图 1)发现，对照组和红花籽粕各剂量组小鼠的肝脏组

织切片肝小叶结构完整、清晰可见，肝细胞索以中央静脉为中心向四周呈放射状排列且吻合成网，肝窦清晰可见；脾脏组织切片结构未见异常变化，脾窦未见扩张，脾小体大小未见异常变化，红白髓比例未见异常；肾脏组织切片结构未见异常变化，肾小管上皮细胞排列整齐，结构清晰，未见水肿性变化，肾小球大小、形态正常，未见明显炎症细胞浸润。红花籽粕各剂量组的病理切片与对照组吻合。

表 5 各组小鼠脏器指数变化 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 5 Changes of organ index of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肝脏指数	脾脏指数	肾脏指数
对照	—	43.52±10.16	4.18±1.59	11.46±2.41
红花籽粕	0.25	43.45±6.29	5.58±1.52	11.51±1.72
	0.50	52.60±7.28	6.06±1.06	12.06±2.50
	1.00	47.63±3.34	5.41±1.06	12.08±1.44
	2.00	41.40±5.27	5.40±0.69	12.12±2.63
	5.00	49.93±1.64	4.64±0.57	9.80±2.17
	10.00	45.20±2.36	4.97±1.25	11.54±1.41

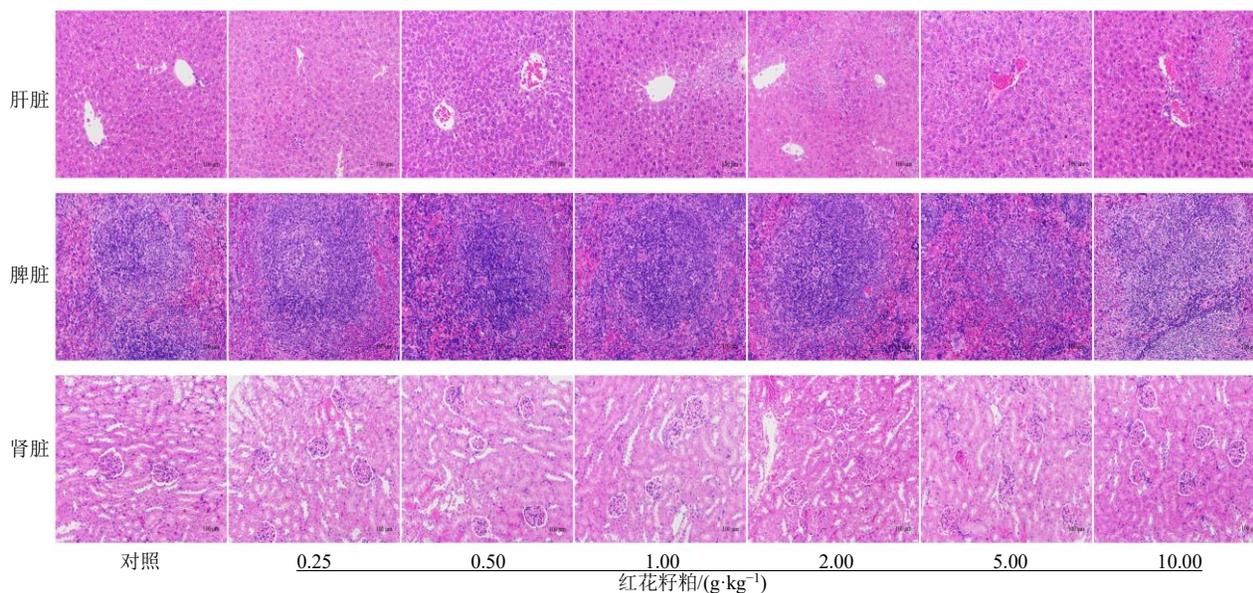


图 1 各组小鼠肝脏、脾脏、肾脏病理变化 (HE, ×200)

Fig. 1 Pathological changes of liver, spleen and kidney tissue of mice in each group (HE, × 200)

3.1.4 血液检查 如表 6 所示，与对照组比较，红花籽粕 (10 g/kg) 组小鼠血清中 ALT、AST 活性均显著升高 ($P < 0.05$), BUN 水平显著降低 ($P < 0.05$)。红花籽粕各剂量组其余血液生化指标均无显著差异。上述急性毒性实验结果表明，红花籽粕无明显毒性。

3.2 红花籽粕对 DSS 诱导的 UC 小鼠的保护作用

3.2.1 红花籽粕对 UC 小鼠 DAI 评分和体质量的影响 对照组小鼠活动状态良好，精神状态良好，饮

水饮食正常，毛发光滑有光泽，粪便呈紧实棕黄色。模型组小鼠在自由饮用 3% DSS 水溶液 3 d 后，出现身体蜷缩、活动减少、行动迟缓、精神不振、食欲减弱、毛发凌乱竖立、粪便松散等现象，随着时间的增加，DAI 评分显著增加，体质量显著下降(图 2)，粪便呈稀水样鲜红色，并且出现死亡情况。给予红花籽粕和 5-ASA 治疗后，上述指标均有所改善，DAI 评分显著降低，体质量显著升高，且红花籽粕的改善效果最为显著。

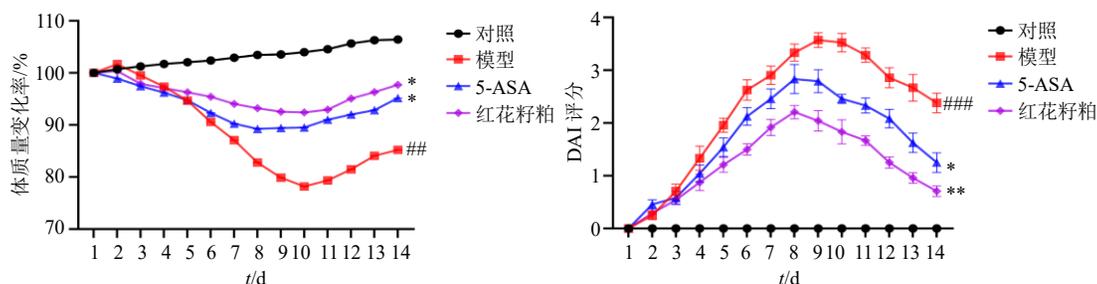
表 6 各组小鼠血液生化指标变化 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 6 Changes of blood biochemical indexes of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	TBIL/ (μmol·L ⁻¹)	CRE/(μmol·L ⁻¹)	BUN/ (mmol·L ⁻¹)	TC/ (mmol·L ⁻¹)	TG/ (mmol·L ⁻¹)
对照	—	33.30±6.87	93.02±10.64	9.11±1.05	23.27±3.15	6.53±0.08	3.48±0.66	0.96±0.18
红花籽粕	0.25	32.67±10.92	87.08±12.48	8.52±1.06	24.02±7.62	6.35±1.03	2.84±0.41	0.78±0.07
	0.50	44.25±6.68	84.47±16.94	9.59±1.35	36.00±11.92	7.54±0.18	3.39±0.75	0.92±0.07
	1.00	27.04±4.68	79.07±12.98	9.79±1.50	33.80±11.40	5.55±0.79	2.94±0.56	0.83±0.15
	2.00	42.20±8.47	86.80±16.20	8.54±1.20	30.71±14.81	6.71±0.09	2.85±0.49	0.89±0.14
	5.00	51.04±10.38	112.95±7.33	9.81±1.67	37.66±10.76	5.92±1.04	3.28±0.49	0.89±0.19
	10.00	111.96±16.15 [#]	116.17±9.99 [#]	8.64±1.76	39.91±12.83	5.25±0.33 [#]	3.32±0.17	0.97±0.06

与对照组比较: [#]*P*<0.05.

[#]*P*<0.05 vs control group.



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 2 红花籽粕对 UC 小鼠体质量和 DAI 评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of safflower seed meal on body weight and DAI score of UC mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2.2 红花籽粕对 UC 小鼠脏器指数、结肠长度和肠道通透性的影响 对照组小鼠结肠组织肠壁纹理清晰, 黏膜表面光滑, 形态完整, 无红斑和溃疡, 无黏连; 模型组小鼠的结肠组织有明显的形态损伤, 如弥漫性出血点、红斑、溃疡、黏连、水肿和组织坏死。如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠的脏器指数显著升高 (*P*<0.01、0.001), 结肠长度显著缩短 (*P*<0.001), 肠道通透性显著升高 (*P*<0.001)。与模型组比较, 各给药组小鼠结肠长度显著

增加 (*P*<0.05、0.01), 肠道通透性显著降低 (*P*<0.01); 红花籽粕组小鼠的脏器指数显著降低 (*P*<0.01), 5-ASA 组脏器指数无显著变化。

3.2.3 红花籽粕对 UC 小鼠结肠组织病理的影响 如图 4 所示, HE 染色结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠的结肠组织表现出明显的损伤, 如内黏膜损伤、黏膜溃疡、黏膜充血、明显的炎症细胞浸润、明显的杯状细胞丢失、隐窝完整性破坏、肌层水肿, 组织学评分显著升高 (*P*<0.001)。AB-PAS 染色结

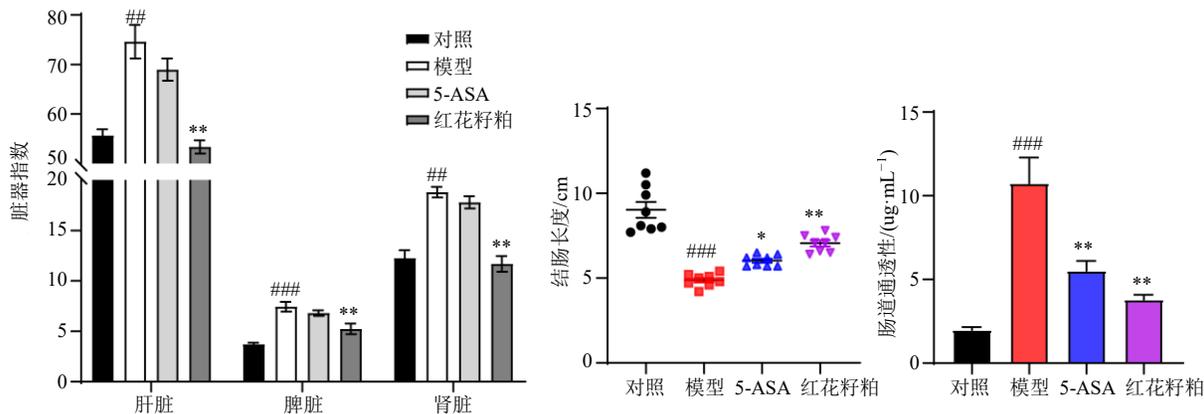


图 3 红花籽粕对 UC 小鼠脏器指数、结肠长度和肠道通透性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effect of safflower seed meal on organ index, colon length and intestinal permeability of UC mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

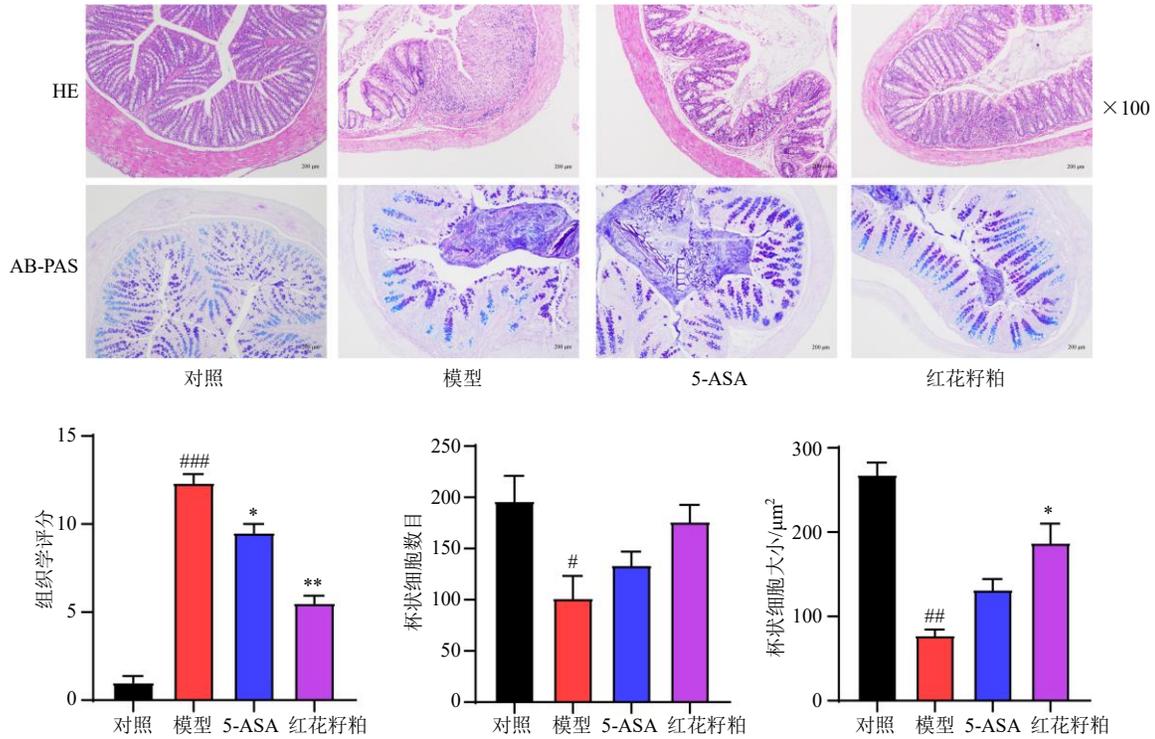


图4 红花籽粕对 UC 小鼠结肠组织病理变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effect of safflower seed meal on pathological changes in colon tissue of UC mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

果显示,与对照组比较,模型组小鼠存在严重的杯状细胞衰竭和杯状细胞成熟缺陷,黏蛋白消耗,黏液层被破坏,黏液较少。与模型组比较,5-ASA组小鼠的结肠组织损伤得到显著改善 ($P < 0.05$),杯状细胞消耗情况无显著性变化;红花籽粕组小鼠的结肠组织损伤和杯状细胞消耗情况均得到显著改善 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.2.4 红花籽粕对 UC 小鼠肠道炎症的影响 根据结肠组织 HE 染色结果,推测红花籽粕缓解 DSS 诱导的 UC 疗效与抑制炎症密切相关。如图 5 所示,与对照组比较,模型组小鼠结肠组织中 *IL-6*、*IL-1 β* 、*TNF- α* 基因表达水平显著升高 ($P < 0.01, 0.001$),这些促炎因子可以募集中性粒细胞,诱导炎症发生;同时 *IFN- γ* 基因表达水平显著升高 ($P < 0.001$),这

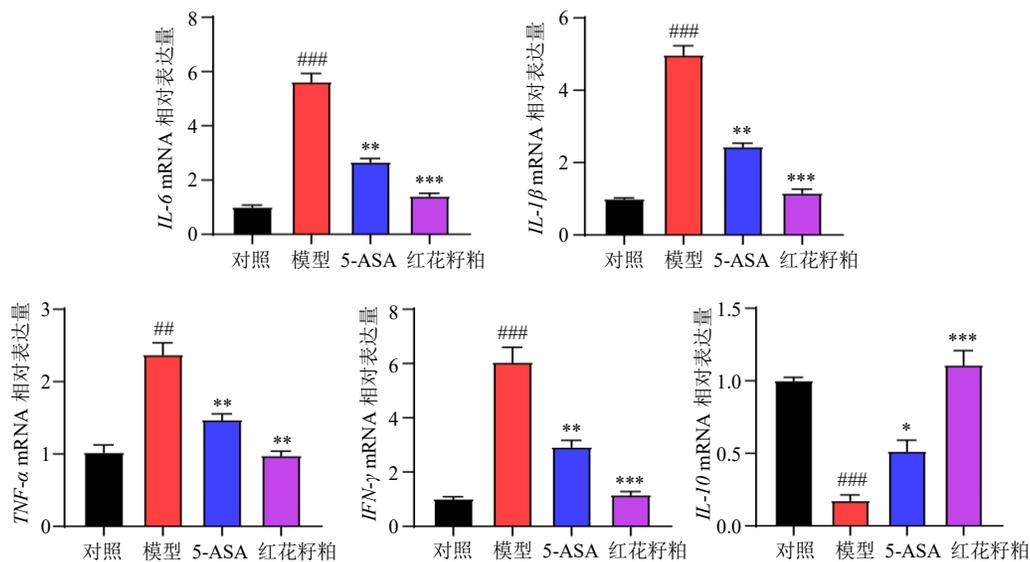


图5 红花籽粕对 UC 小鼠结肠组织炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effect of safflower seed meal on levels of inflammatory factors in colon tissue of UC mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

与肠黏膜屏障的完整性有关；此外，抗炎因子 *IL-10* 基因表达水平显著降低 ($P < 0.001$)。与模型组比较，5-ASA 和红花籽粕组小鼠结肠组织中 *IL-6*、*IL-1 β* 、*TNF- α* 、*IFN- γ* 基因表达水平均显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)，*IL-10* 基因表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001)，且红花籽粕的逆转效果最为显著，表明红花籽粕能通过抑制炎症保护 UC 小鼠。

3.2.5 红花籽粕对 UC 小鼠黏膜屏障功能的影响 如图 6 所示，与对照组比较，模型组小鼠结肠组织

中 ZO-1 和 Occludin 蛋白和基因表达水平均明显降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)，同时 *Muc1* 和 *Muc2* 基因表达水平也明显降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。与模型组比较，红花籽粕组小鼠结肠组织中 ZO-1、Occludin 蛋白和基因表达水平均明显升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)，*Muc1* 和 *Muc2* 基因表达水平也明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)，但 5-ASA 组以上指标均没有显著变化。表明红花籽粕可以有效改善肠道黏膜的异常受损状况，恢复上皮结构的完整性。

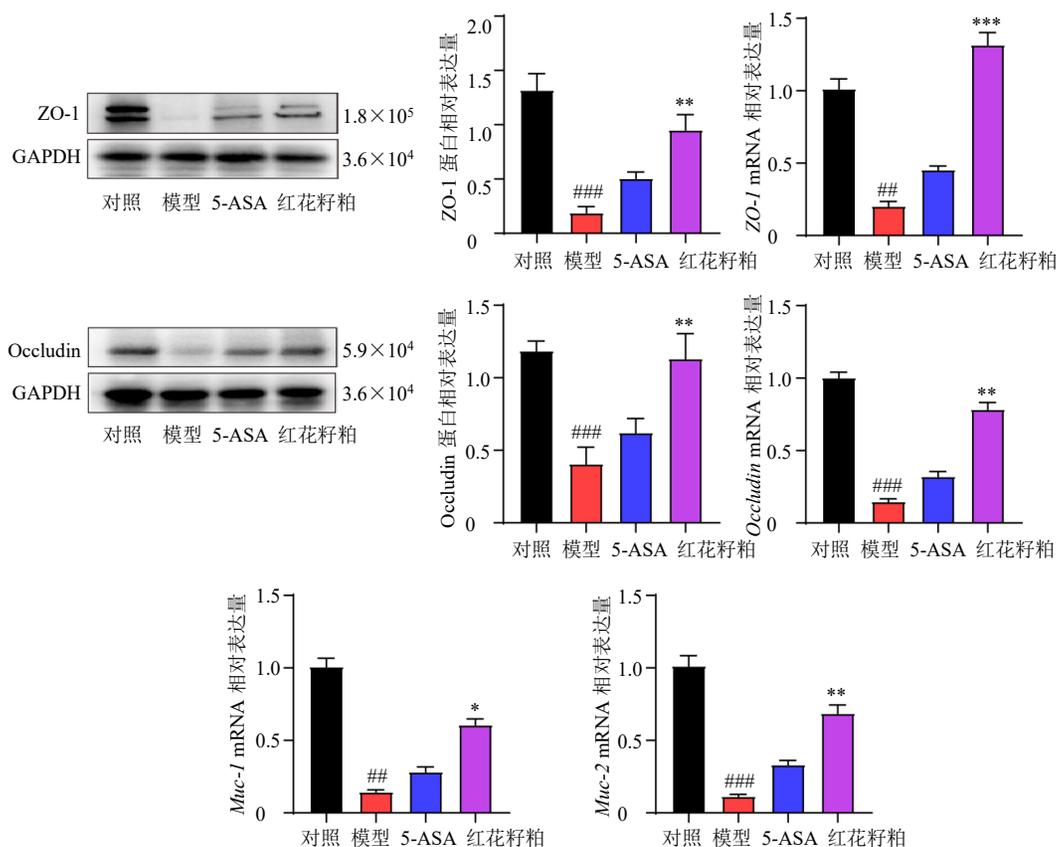


图 6 红花籽粕对 UC 小鼠结肠组织黏膜屏障相关因子表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Effect of safflower seed meal on expressions of mucosal barrier-related factors in colon tissue of UC mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

本研究对红花籽粕进行急性毒性考察，各组均未见死亡小鼠，小鼠的生理状况良好，不同剂量的红花籽粕组小鼠的脏器指数均无显著差异，肝脏、脾脏和肾脏的病理切片未见明显的病变，炎性浸润可忽略不计，无明显异常，血清中 ALT、AST、TBIL、CRE、BUN、TC 和 TG 指标也未见异常，除了剂量为 10 g/kg 的红花籽粕组小鼠的 ALT、AST 活性和 BUN 水平与对照组比较具有显著差异，其余指标无显著性差异，但根据已有文献表明，ALT、AST 和

BUN 的改变并不被认为具有毒理学意义^[17-18]，因为在肝脏和肾脏指数或组织病理学检查中均未显示出相关的损伤，所以 ALT、AST 和 BUN 的变化与毒理学效应无关。综上，急性毒性实验结果表明红花籽粕没有明显毒性。但其安全性评价还是应该结合长期毒性实验进行进一步的验证，以全面保证临床用药的安全性。同时本研究证实了红花籽粕对 DSS 诱导的 UC 小鼠的治疗作用，红花籽粕可以改善 UC 小鼠的一般情况，显著减缓小鼠体质量下降，降低 DAI 评分，提高脏器指数，增加结肠长度，降低肠

道通透性,并改善了结肠损伤。

炎症在 UC 的病理过程中起着重要作用,肠道炎症会引起环境因素的剧烈爆发,可诱导结肠黏膜损伤,增加肠道通透性^[19]。促炎因子和抗炎因子分泌失衡是肠道非特异性炎症反应的关键环节。结肠组织中高水平的 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 对中性粒细胞具有趋化性,使其激活并释放炎症介质,进一步放大炎症反应,诱发或加重 UC^[20-23]。IFN- γ 可通过影响紧密连接的结构和功能来破坏肠道屏障功能^[24]。而 IL-10 是一种由单核细胞和巨噬细胞产生的抗炎性因子,可抑制中性粒细胞、单核细胞产生促炎性因子^[25]。DSS 诱导的 UC 小鼠的结肠组织通常以大量产生和分泌炎症因子为特征^[26]。本研究发现红花籽粕显著降低了 UC 小鼠结肠中促炎因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 的水平,显著升高了抗炎因子 IL-10 的水平,这与 5-ASA 的作用相似。这些结果表明,红花籽粕的抗炎作用至少是其作用机制之一。

UC 由多因素共同促成,肠黏膜屏障的损坏是其关键病理机制之一,黏液屏障对维持肠道功能和内稳态具有重要作用。肠黏膜屏障是预防有害物质和病原菌的第一道防线,包括化学屏障、生物屏障、免疫屏障、机械屏障,其中机械屏障居于主导地位^[27-28]。大量证据表明,肠黏膜屏障功能障碍与 UC 发病密切相关^[29]。紧密连接蛋白是肠黏膜机械屏障的重要组成部分,临床上,UC 患者通常表现为肠黏膜屏障功能障碍和溃疡型病变形成,造成局部渗漏,降低黏膜紧密连接蛋白(如 ZO-1、Occludin 等)的表达,肠黏膜通透性随之增加,最终导致肠上皮屏障损伤加重,进一步加重肠道损伤^[30-32]。化学屏障主要由肠黏液层组成,而肠黏液层主要由肠道杯状细胞、黏蛋白和抗菌蛋白 3 部分组成。黏蛋白分分泌型黏蛋白(Muc2)和膜结合型黏蛋白(Muc1),结肠的黏液层形成网格筛,主要以 Muc2 为主^[33-34]。据报道,UC 患者的肠黏液厚度明显减少,Muc2 基因敲除的小鼠会发生自发性结肠炎^[35]。杯状细胞是分泌黏蛋白的基础结构,当其受到细菌刺激时,能够激活相应的信号转导通路,促进 Muc2 蛋白的分泌,可将入侵的细菌冲回肠腔内^[36]。本研究结果显示,红花籽粕显著逆转了 UC 小鼠的肠道通透性增高,修复了肠道屏障保护作用。在此基础上进一步研究了红花籽粕是否能调节 DSS 诱导的 UC 小鼠的肠道紧密连接蛋白和黏液层。结肠组织 AB-PAS 染色结果显示,红花籽粕可以恢复 DSS 诱

导的杯状细胞衰竭、成熟缺陷以及黏蛋白消耗,这与 qRT-PCR 和 Western blotting 结果一致,在 UC 小鼠中,紧密连接蛋白(ZO-1 和 Occludin)和黏蛋白(Muc1 和 Muc2)的表达显著下降,表明结肠的黏膜屏障遭到破坏。但在经过红花籽粕的治疗后显著逆转了上述指标表达,这些结果充分证明了红花籽粕对缓解 UC 的保护机制是通过增强肠道屏障和黏液屏障的功能来实现的。

本研究结果表明红花籽粕安全无毒,为红花籽粕的开发利用提供了初步的毒理学基础,其临床应用有效性及安全性尚需深入探讨。同时本研究发现红花籽粕对 UC 具有良好的治疗作用,其作用机制可能是缓解炎症和保护肠道屏障,为临床应用红花籽粕提供实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王少鑫,浦江,刘超群,等. 炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-4 在溃疡性结肠炎中的表达及临床意义 [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2015, 24(01): 104-106.
- [2] Hindryckx P, Baert F, Hart A, et al. Clinical trials in ulcerative colitis: A historical perspective [J]. *J Crohns Colitis*, 2015, 9(7): 580-588.
- [3] Kim N H, Lee S M, Kim Y N, et al. Standardized fraction of *Turbinaria ornata* alleviates dextran sulfate sodium-induced chronic colitis in C57BL/6 mice via upregulation of FOXP3⁺ regulatory T cells [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(10): 1463.
- [4] Xiao H Y, Li H L, Wen Y F, et al. *Tremella fuciformis* polysaccharides ameliorated ulcerative colitis via inhibiting inflammation and enhancing intestinal epithelial barrier function [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 180: 633-642.
- [5] 郭艳娥. 康复新联合 5-ASA 对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜 IFN- γ 、IL-4、IL-12 表达的影响 [D]. 太原: 山西医科大学, 2014.
- [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] 孙欣欣,都基莎,孙颖. 半夏泻心汤治疗溃疡性结肠炎有效性和安全性的 Meta 分析 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(4): 878-884.
- [8] 张曦,徐小婷,MOHAMMED Ismail,等. 青黛及其有效成分抗溃疡性结肠炎药理作用及机制的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(5): 997-1002.
- [9] 沈飞,夏明. 红花籽粕的综合利用 [J]. 今日科苑,

- 2010(16): 171.
- [10] 杨玉霞, 吴卫, 郑有良, 等. 不同品种 (系) 红花籽粕营养品质分析 [J]. 中国粮油学报, 2008, 23(4): 174-178.
- [11] 杨新月. 红花籽粕和亚麻籽粕木脂素成分的抗骨质疏松和抗炎活性研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2023.
- [12] 王海亮, 牛俊丽, 南珊珊, 等. 红花籽粕对紫色色杆菌 ATCC12472 群体感应抑制作用 [J]. 饲料研究, 2021, 44(19): 85-88.
- [13] 田华, 信学雷, 麦提喀斯木·尼扎木丁, 等. 红花籽粕提取物对糖尿病大鼠的降脂作用 [J]. 解放军预防医学杂志, 2016, 34(3): 351-353.
- [14] 孙立. 红花籽粕抗氧化肽的制备及抗氧化活性研究 [D]. 石河子: 石河子大学, 2014.
- [15] Zou Q H, Zhang X, Liu X S, *et al.* *Ficus carica* polysaccharide attenuates DSS-induced ulcerative colitis in C57BL/6 mice [J]. *Food Funct*, 2020, 11(7): 6666-6679.
- [16] 吕廷梅, 刘衡, 王希通, 等. 蜚蠊提取物脂质体的制备、表征及其抗溃疡性结肠炎的疗效 [J]. 南京中医药大学学报, 2023(12): 1211-1223.
- [17] Meng J R, Yan Z, Wu Y J, *et al.* Preclinical safety evaluation of IFN α 2a-NGR [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2008, 50(3): 294-302.
- [18] Guo X H, Weng L J, Yi L T, *et al.* Toxicological safety evaluation in acute and 21-day studies of ethanol extract from *Solanum lyratum* Thunb [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 8518324.
- [19] Yang Y F, Wang Y, Zhao L, *et al.* Chinese herbal medicines for treating ulcerative colitis via regulating gut microbiota-intestinal immunity axis [J]. *Chin Herb Med*, 2023, 15(2): 181-200.
- [20] Hou C Y, Chen L L, Yang L Z, *et al.* An insight into anti-inflammatory effects of natural polysaccharides [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 153: 248-255.
- [21] 陈曦, 韩宇鹏, 陈刚, 等. 骨髓单个核细胞移植对溃疡性结肠炎小鼠 miR-21 及炎症因子 TNF- α 表达的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(10): 2190-2192.
- [22] Fischer S, Rath T, Geppert C I, *et al.* Long-term combination therapy with anti-TNF plus vedolizumab induces and maintains remission in therapy-refractory ulcerative colitis [J]. *Am J Gastroenterol*, 2017, 112(10): 1621-1623.
- [23] Arifa R D, Madeira M F, de Paula T P, *et al.* Inflammasome activation is reactive oxygen species dependent and mediates irinotecan-induced mucositis through IL-1 β and IL-18 in mice [J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(7): 2023-2034.
- [24] Singh U P, Singh N P, Murphy E A, *et al.* Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients [J]. *Cytokine*, 2016, 77: 44-49.
- [25] 曾晓霞. 不同灸量对慢性溃疡性结肠炎大鼠血清 IL-8、IL-10 含量影响的研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2015.
- [26] Xu M, Duan X Y, Chen Q Y, *et al.* Effect of compound sophorae decoction on dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis in mice by regulating Th17/Treg cell balance [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 2396-2408.
- [27] Chen S S, Zhang C, He B H, *et al.* The role of lncRNAs in regulating the intestinal mucosal mechanical barrier [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 2294942.
- [28] Xie X X, Geng C, Li X, *et al.* Roles of gastrointestinal polypeptides in intestinal barrier regulation [J]. *Peptides*, 2022, 151: 170753.
- [29] 韦喜生, 刘英香, 郑晓君. NK 细胞联合红花多糖对结肠癌细胞的杀伤作用及机制研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(5): 571-576.
- [30] Martini E, Krug S M, Siegmund B, *et al.* Mend your fences: The epithelial barrier and its relationship with mucosal immunity in inflammatory bowel disease [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2017, 4(1): 33-46.
- [31] Hall C H T, Lee J S, Murphy E M, *et al.* Creatine transporter, reduced in colon tissues from patients with inflammatory bowel diseases, regulates energy balance in intestinal epithelial cells, epithelial integrity, and barrier function [J]. *Gastroenterology*, 2020, 159(3): 984-998.e1.
- [32] 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.
- [33] Bergstrom K, Fu J, Johansson M E, *et al.* Core 1- and 3-derived O-glycans collectively maintain the colonic mucus barrier and protect against spontaneous colitis in mice [J]. *Mucosal Immunol*, 2017, 10(1): 91-103.
- [34] Hoebler C, Gaudier E, De Coppet P, *et al.* MUC genes are differently expressed during onset and maintenance of inflammation in dextran sodium sulfate-treated mice [J]. *Dig Dis Sci*, 2006, 51(2): 381-389.
- [35] 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.
- [36] McGuckin M A, Lindén S K, Sutton P, *et al.* Mucin dynamics and enteric pathogens [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(4): 265-278.