

• 药理与临床 •

药根碱通过调节细胞凋亡和激活 Nrf2/HO-1 信号通路减轻葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠溃疡性结肠炎黏膜损伤

牛圣奇^{1,2}, 李 星¹, 李浩田¹, 魏士长¹, 景漫毅¹, 赵艳玲^{1,2*}

1. 中国人民解放军总医院第五医学中心 药剂室, 北京 100039

2. 解放军医学院, 北京 100853

摘要:目的 考察药根碱对葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 诱导的溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 小鼠的治疗作用及机制, 并评估其安全性。方法 将 50 只 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组、药根碱组 (160 mg/kg) 和 DSS+药根碱低、高剂量 (80、160 mg/kg) 组, 除对照组和药根碱组外, 其余组给予小鼠含 3% DSS 的饮用水构建小鼠 UC 模型。对小鼠体质量、结肠长度、疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分、结肠组织病理学进行观察, 检测血清中谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 活性和总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC), 以及结肠组织中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平, 考察药根碱对 UC 小鼠的治疗作用及抗氧化作用; 采用免疫荧光法探究药根碱对 UC 小鼠结肠黏膜炎症反应、肠道黏蛋白 (mucin 2, MUC2)、肠道屏障功能相关蛋白闭合蛋白 (occludin) 和闭锁小带蛋白-1 (zonula occludens-1, ZO-1) 的表达以及 F4/80⁺和 CD11b⁺细胞浸润的影响; 采用分子对接考察药根碱与凋亡、抗氧化蛋白的结合能力, 采用 TUNEL 染色评估 UC 小鼠结肠上皮细胞的凋亡情况, Western blotting 法检测凋亡和抗氧化应激相关蛋白 B 淋巴细胞 2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2)、B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白 (B-cell lymphoma-2 associated X protein, Bax)、核因子 E 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2) 及血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 的表达。通过检测 UC 小鼠血清丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 活性和主要器官组织病理学变化评估药根碱的安全性。结果 药根碱可显著缓解 DSS 诱导的 UC 小鼠症状, 降低 DAI 评分, 恢复结肠长度 ($P<0.01$), 缓解结肠组织损伤; 药根碱升高了 UC 小鼠血清中 T-AOC、GSH-Px 水平 ($P<0.05$ 、 0.01) 以及结肠组织中 SOD 活性 ($P<0.05$), 并降低了结肠组织中 MDA 水平 ($P<0.05$); 免疫荧光结果显示, 药根碱组的 F4/80⁺和 CD11b⁺表达降低, MUC2、ZO-1 和 occludin 表达升高; TUNEL 染色结果显示, 药根碱可改善 UC 小鼠结肠上皮细胞凋亡。分子对接结果表明, 药根碱与凋亡、抗氧化蛋白均有良好的结合能力。Western blotting 结果显示, 药根碱治疗后 Bax 表达显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), Bcl-2、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)。此外, 药根碱组血清 ALT 和 AST 活性及肝、心、脾、肺和肾组织病理结果与对照组无差异。结论 药根碱可能通过抑制肠上皮细胞凋亡, 激活 Nrf2/HO-1 信号通路减轻 DSS 诱导的 UC 小鼠结肠黏膜损伤, 并表现出较好的安全性。

关键词: 药根碱; 溃疡性结肠炎; 氧化应激; 凋亡; Nrf2/HO-1 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)19-6577-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.19.012

Jatrorrhizine attenuate dextran sulfate sodium-induced mucosal damage in mice with ulcerative colitis by regulating apoptosis and activating Nrf2/HO-1 signaling pathway

NIU Shengqi^{1,2}, LI Xing¹, LI Haotian¹, WEI Shizhang¹, JING Manyi¹, ZHAO Yanling^{1,2}

1. Department of Pharmacy, the Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China

2. Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China

收稿日期: 2024-05-08

基金项目: 国家自然科学基金重大项目 (82192915); 国家重点研究与发展计划项目 (2018YFC1704500)

作者简介: 牛圣奇, 硕士研究生, 从事中药药理学及中药新药研发。E-mail: shengqi6868@163.com

*通信作者: 赵艳玲, 研究员, 博士生导师, 从事中药药理学及中药新药研发。E-mail: zhaoyl2855@126.com

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect and mechanism of jatrorrhizine on dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis (UC) in mice and to assess its safety. **Methods** Fifty C57BL/6J mice were randomly divided into control group, DSS group, DSS + jatrorrhizine (80 mg/kg) group, DSS + jatrorrhizine (160 mg/kg) group, and jatrorrhizine (160 mg/kg) group. The UC mice model was replicated by giving mice drinking water containing 3% DSS. Body weight, colon length, disease activity index (DAI) score, and colon histopathology were observed, and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity and total antioxidant capacity (T-AOC) in serum were measured, as well as superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) level in colon tissue to examine the therapeutic and antioxidant effects of jatrorrhizine on UC mice. Immunofluorescence method was used to investigate the effects of drug radicals on colonic mucosal inflammation, expression of mucin 2 (MUC2), occludin and zonula occludens-1 (ZO-1), and cell infiltration of F4/80⁺ and CD11b⁺ in mice. Molecular docking was used to validate the docking of jatrorrhizine with apoptotic and antioxidant proteins. TUNEL staining was used to evaluate apoptosis of colonic epithelial cells in mice. Western blotting (WB) was used to detect the expression of intestinal barrier function proteins occludin and ZO-1, and expressions of oxidative stress and apoptosis-related proteins B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), B-cell lymphoma-2 associated X protein (Bax), nuclear factor erythroid-2 related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1). **Results** Jatrorrhizine significantly alleviated the symptoms of DSS-induced UC mice, reduced DAI scores, restored the length of the colon ($P < 0.05, 0.01$), slowed down the colon tissue damage, and activities of GSH-Px and T-AOC in serum and SOD in colon tissue were increased ($P < 0.05, 0.01$), and the level of MDA in colon tissue was decreased ($P < 0.05$). Immunofluorescence results suggested that expressions of F4/80⁺ and CD11b were reduced, and that the expressions of MUC2, ZO-1, and occludin were increased in jatrorrhizine-treated groups. TUNEL staining results showed that apoptosis of mouse colon epithelial cells was improved in jatrorrhizine group. Molecular docking results showed that jatrorrhizine had a good binding ability to apoptotic and antioxidant proteins, and WB results showed that the expression of Bax was significantly reduced, and the expressions of Bcl-2, Nrf2 and HO-1 were significantly increased after jatrorrhizine treatment ($P < 0.05, 0.01$). In addition, the expressions of ALT and AST and histopathological results of liver, heart, spleen, lung and kidney in the group administered with jatrorrhizine alone did not differ from those in the control group. **Conclusion** Jatrorrhizine may attenuate DSS-induced colonic mucosal injury in UC mice by regulating apoptosis and activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway, and the results of toxicological study have shown that jatrorrhizine has good safety.

Key words: jatrorrhizine; ulcerative colitis; oxidative stress; apoptosis; Nrf2/HO-1 signaling pathway

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种病因不明的慢性非特异性肠道疾病, 给患者的身心健康带来了极大的困扰^[1-2]。氨基水杨酸类制剂、免疫抑制剂、糖皮质激素和生物制剂是目前治疗 UC 的主要药物^[3], 然而当前的药物治疗存在一定的局限, 尚未能够达到患者对疾病治疗的预期^[4]。中药在治疗 UC 上积累了丰富的经验, 在 UC 中医诊疗专家共识 (2023) 中, 含黄连的方剂是较为常用的药方^[5]。从中药中提取的天然产物已经成为新药发现的重要来源之一, 天然产物多具有结构清晰、疗效确切等特点, 为当前各种疾病的治疗做出了重要贡献^[6]。药根碱是从黄连中分离出的天然的异喹啉生物碱, 其在体内、体外已被证实具有抗凋亡、抗氧化应激等药理作用^[7-8]。此外, 已有动物实验研究发现药根碱对 UC 具有治疗作用, 但其治疗 UC 的作用机制及安全性仍缺少更进一步的研究。研究表明, 过量的氧化应激, 如活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的增加, 以及肠上皮细胞的过度凋亡与 UC 的黏膜炎症反应密切相关^[9]。据此, 本研究推测药根碱可能通过调节氧化应激及发挥抗凋亡作

用从而减轻 UC 黏膜损伤。本研究以药根碱为研究对象, 以葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 诱导的 UC 小鼠模型为载体, 探讨药根碱治疗 UC 的作用机制, 并对其在治疗过程中的安全性进行初步评估。

1 材料

1.1 药品与试剂

药根碱 (质量分数 ≥ 98%, 批号 CHB210110) 购自成都克洛玛生物科技有限公司; 葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium salt, DSS, 相对分子质量 36 000~50 000, 批号 S8634) 购自北京泽平科技公司; BCA 蛋白检测试剂盒 (批号 PA115) 购自北京天根生化科技公司; 血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 抗体 (批号 80w1044)、核因子 E 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2) 抗体 (批号 85m9929) 购自江苏亲科生物有限公司; B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白 (B-cell lymphoma-2 associated X protein, Bax) 抗体 (批号 AB32503)、B 淋巴细胞 2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2) 抗体 (批号 AB182858) 购自英国 Abcam 有限公司; 天冬氨

酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 试剂盒 (批号 20230421)、丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 试剂盒 (批号 20230423)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (批号 20230412)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 试剂盒 (批号 20230413)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (批号 20230412) 和总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC) 试剂盒 (批号 20230412) 均购自南京建成生物工程研究所; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH, 批号 6225350332)、HRP 标记的山羊抗兔二抗 (批号 823636043107)、RIPA 裂解液 (批号 R0010)、12% 凝胶配制试剂盒 (批号 323S19050419)、ECL 超敏发光液 (批号 323S16106839) 均购自北京华兴博创基因技术有限公司。

1.2 仪器

Nikon Eclipse E100 型光学显微镜 (日本尼康公司); SiGMR3-18K 型冷冻高速离心机 (美国 SIGMA 公司); YP-B5002 型电子天平 (上海光正医疗仪器有限公司); DYY-7C 型电泳仪 (北京六一仪器厂); Touch Imager Pro 型 e-BLOT 成像仪 (上海易亨特生命科学有限公司); SynergyH2 型全功能微孔板检测仪 (美国伯腾仪器有限公司)。

1.3 动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 50 只, 体质量 (20±2) g, 购于北京斯贝福生物技术有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2019-0010, 动物饲养于 SPF 级清洁环境中, 温度 (25±0.5) °C, 相对湿度 (55±5) %, 饲养期间动物自由获取食物和水。本研究动物实验经中国人民解放军总医院伦理委员会批准, 批准号为 IACUC-2021-0022。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

适应性喂养 6 d 后, 将 50 只小鼠随机分为对照组、模型组、DSS+药根碱低剂量 (80 mg/kg) 组、DSS+药根碱高剂量 (160 mg/kg) 组和药根碱 (160 mg/kg) 组, 每组 10 只, 药根碱剂量设置依据前期的研究结果^[10]。通过含 3% DSS 饮用水连续饮用 7 d 后, 正常饮用水连续饮用 3 d 进行造模, 各给药组在造模的同时 ig 给药, 每天 1 次, 连续给药 10 d。每天测量并观察小鼠的体质量、毛发、精神状态及粪便情况, 采用便血试纸检测小鼠粪便隐血情况。末

次给药结束后, 小鼠眼内眦静脉取血, 并处死小鼠。测量小鼠结肠长度, 并将结肠分为 3 段分别用于制作石蜡组织切片、Western blotting 实验以及氧化应激指标的测定。

2.2 疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分的测定

根据小鼠的粪便稠度、粪便带血情况、体质量下降程度进行 DAI 评分, 评分标准参考文献方法^[11], 其中体质量下降 (x) 1% $<x\leq 5\%$ 为 1 分, 5% $<x\leq 10\%$ 为 2 分, 10% $<x\leq 15\%$ 为 3 分, $x>15\%$ 为 4 分; 粪便根据便血性质进行打分, 隐血阴性为 0 分, 隐血弱阳性为 1 分, 隐血强阳性为 2 分, 粪便带血为 3 分, 肛门带血为 4 分; 粪便硬而成形为 0 分, 湿软为 1 分, 稀软为 2 分, 稀水为 3 分。

DAI=体质量减轻程度+粪便性状+便血情况

2.3 结肠组织病理学检查

采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色法进行结肠组织病理学检查。测定小鼠结肠长度后, 取末端结肠组织 (约 0.5 cm) 置于 4% 多聚甲醛溶液中进行固定, 制成石蜡切片, 经脱蜡、HE 染色、脱水、封片处理后, 在显微镜下观察并采集图像。

2.4 氧化应激与肝功能指标检测

采用眼内眦静脉取血法采集小鼠血样, 颈椎脱臼法处死小鼠。小鼠血样于 3 000 r/min 离心 10 min, -80 °C 保存。结肠组织称质量后与预冷的生理盐水混合, 匀浆, 4 °C、3 500 r/min 离心 10 min。收集上清液, 采用 BCA 蛋白检测试剂盒测定上清液中蛋白的浓度。根据试剂盒说明书检测血清中 AST、ALT、GSH-Px 活性和 T-AOC 水平, 以及结肠组织中 SOD 活性和 MDA 水平。

2.5 免疫荧光检测

将小鼠结肠组织石蜡切片进行脱蜡, 采用柠檬酸和 EDTA 进行抗原修复, 经 PBS 清洗 3 次后采用牛血清蛋白封闭 30 min。加入一抗 4 °C 孵育过夜。PBS 清洗后孵育二抗 (50 min), 然后采用 DAPI 重染细胞核, 室温孵育 10 min (避光), 最后用抗荧光淬灭片封片。采用 Casview 观察免疫荧光图像。

2.6 分子对接

在 PDB 数据库下载 Bcl-2 和 Bax 凋亡相关蛋白, 以及 Nrf2 和 HO-1 抗氧化相关蛋白分子的 3D 结构, 采用 AutoDock 4 软件中对其进行去水加氢。在 TCMSP (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 数据

库和 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站下载药根碱药物分子, 并进行去水加氢。将药根碱及蛋白在 AutoDock 4 中进行对接, 采用 OpenBabelGUI 2.4.1 软件将对接复合物的 PDBQT 格式转换为 PDB 格式。PyMol 2.5 及 LigPlot+2.2 进行可视化作图并分析。

2.7 TUNEL 法测定结肠组织细胞凋亡

小鼠结肠组织的石蜡切片进行脱蜡至水后, 滴加蛋白酶 K 工作液修复, 加破膜液覆盖组织, 37 °C 孵育 TUNEL 反应液, 孵育结束后进行 DAPI 染核、抗荧光素淬灭剂封片, 最后在荧光显微镜下观察并拍照, 其中视野中蓝色代表细胞核, 绿色为凋亡细胞。

2.8 Western blotting 法检测结肠组织 Nrf2/HO-1 通路及凋亡相关蛋白表达

采用高效 RIPA 裂解液 (含 1% 的 PMSF 及磷酸酶抑制剂) 提取结肠组织总蛋白, 采用 BCA 蛋白质定量试剂盒测定蛋白浓度。加蛋白上样缓冲液将蛋白浓度调平后, 蛋白样品经 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 进行一抗孵育、二抗孵育等操作, 并在 e-blot 上显影成像, 采用 Image J 软件对蛋白条带进行定量分析。

2.9 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析, 多组间计量资料采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 两组间比较采用 *t* 检验进行统计分析。采用 GraphPad Prism (8.2.0) 软件作图。

3 结果

3.1 药根碱对 DSS 诱导 UC 小鼠症状的影响

各组小鼠服用含 3% DSS 饮用水 3 d 后, 小鼠的基本活动减少, 出现竖毛、弓背现象, 体质量均呈下降趋势, 可见模型组小鼠体质量下降趋势最为明显 ($P < 0.01$), DSS+药根碱低、高剂量组小鼠体质量下降较为缓慢, 其中 DSS+药根碱高剂量组的 UC 小鼠体质量下降速度比 DSS+药根碱低剂量组缓慢, 药根碱组与对照组体质量变化无明显差异 (图 1-A)。经 DSS 造模后, 小鼠出现软便或便血症状, DAI 评分结果显示, 与对照组相比, 模型组小鼠的 DAI 评分明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, DSS+药根碱低、高剂量组小鼠的结肠炎症状均明显减缓 ($P < 0.01$), 药根碱组与对照组的 DAI 评分无明显差异 (图 1-B)。此外, 与对照组相比, 模型组小鼠的结肠长度明显缩短 ($P < 0.01$), 而服用药根碱可明显改善 UC 小鼠结肠缩短的症状 ($P <$

0.01, 图 1-C、D), 药根碱组与对照组的结肠长度没有明显变化。以上结果提示, 药根碱对 UC 小鼠具有良好的治疗作用。

3.2 药根碱对 DSS 诱导 UC 小鼠结肠组织形态学的影响

如图 2 所示, 对照组和药根碱组小鼠结肠组织细胞形态结构正常, 模型组小鼠结肠黏膜层损伤较重, 可见黏膜下层炎症细胞弥漫性浸润, 伴有隐窝结构损伤及隐窝数量减少。DSS+药根碱低、高剂量组小鼠隐窝损伤和数量明显得到改善, 提示药根碱可显著修复 DSS 诱导的 UC 小鼠结肠组织损伤。

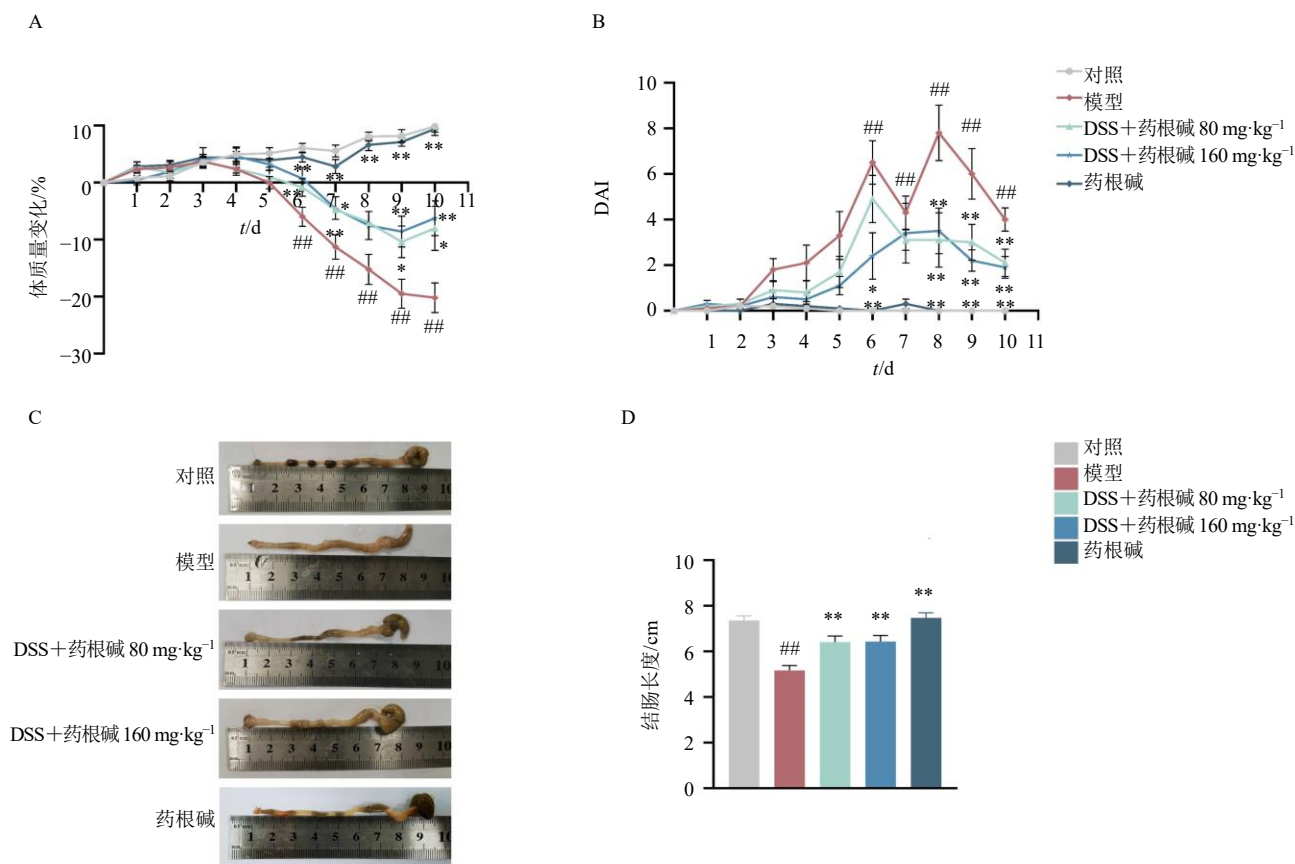
3.3 药根碱对 DSS 诱导 UC 小鼠结肠组织炎症细胞浸润的影响

CD11b 蛋白主要表达于单核细胞、中性粒细胞、巨噬细胞的细胞膜表面, F4/80⁺蛋白是巨噬细胞的生物标志物^[11-12]。如图 3-A、B 所示, 与对照组相比, 模型组的 F4/80⁺和 CD11b⁺细胞明显增加; 与模型组相比, 药根碱可减少 UC 小鼠结肠组织中的炎性细胞浸润。

3.4 药根碱对 DSS 诱导 UC 小鼠肠道屏障功能的影响

黏蛋白是一种主要由杯状细胞产生的糖蛋白, 杯状细胞的丢失是结肠炎的组织学特征之一^[13]。MUC2 是杯状细胞产生的主要黏蛋白之一, 为确定药根碱是否会影响 UC 小鼠的肠道屏障功能, 采用免疫荧光法观察小鼠结肠组织中黏蛋白的表达变化。结果显示, 与对照组相比, 模型组小鼠结肠组织中的 MUC2 荧光强度明显降低; 与模型组相比, DSS+药根碱低、高剂量组小鼠的 MUC2 荧光表达明显改善。其中, 药根碱组与对照组的 MUC2 荧光强度无明显差异 (图 4-A)。

肠上皮细胞之间的紧密连接对于维持肠上皮细胞的完整性至关重要, 同时, 肠表面的黏蛋白也发挥着重要作用。ZO-1 和 occludin 是构成紧密连接的主要蛋白^[14], 采用免疫荧光法观察小鼠结肠组织中 ZO-1 和 occludin 的表达变化。结果显示, 与对照组相比, 模型组小鼠结肠组织中 ZO-1 和 occludin 的荧光强度明显降低, 表明小鼠黏膜屏障的完整性受到不同程度的损伤。与模型组相比, DSS+药根碱低、高剂量组小鼠的 ZO-1 和 occludin 的荧光强度均增强, 说明药根碱可以促进小鼠受损的肠上皮细胞屏障功能的恢复, 维持肠道屏障的完整性。此外, 药根碱组小鼠的 ZO-1 和 occludin 的荧光强度与对照组无显著差异 (图 4-B、C)。



A-体重变化情况; B-DAI 评分; C、D-结肠长度; 与对照组比较: $^{\#}P<0.05$ $^{###}P<0.01$; 与模型组比较: $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$, 下图同。
A-changes in body weight; B-DAI score; C, D-colon length; $^{\#}P<0.05$ $^{###}P<0.01$ vs control group; $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs model group, same as below figures.

图 1 Jatrorrhizine alleviates symptoms of DSS-induced UC in mice (n = 10)
Fig. 1 Jatrorrhizine alleviates symptoms of DSS-induced UC in mice (n = 10)

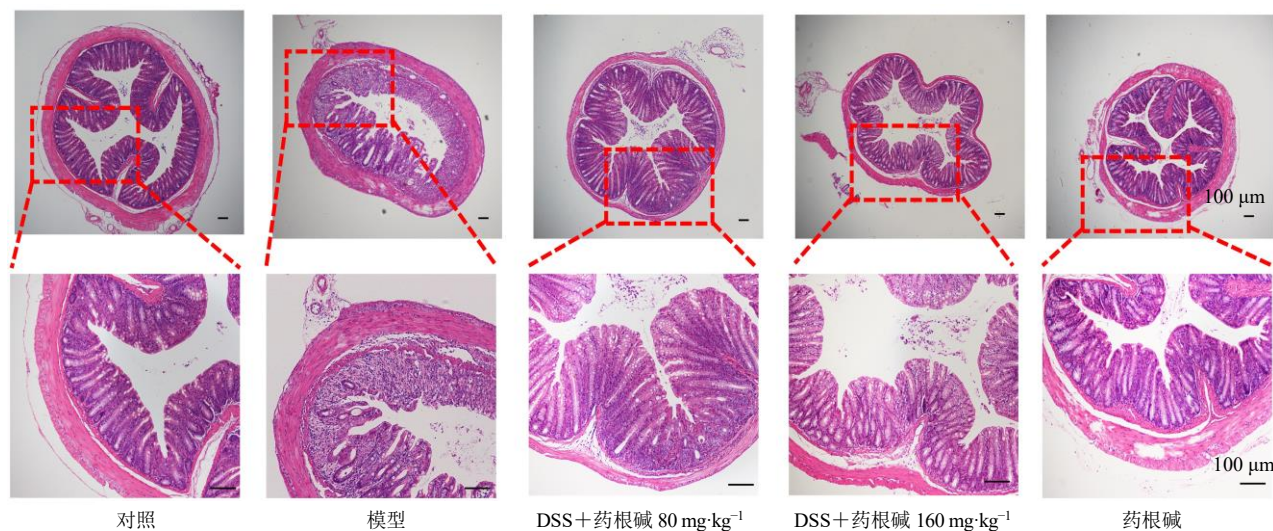
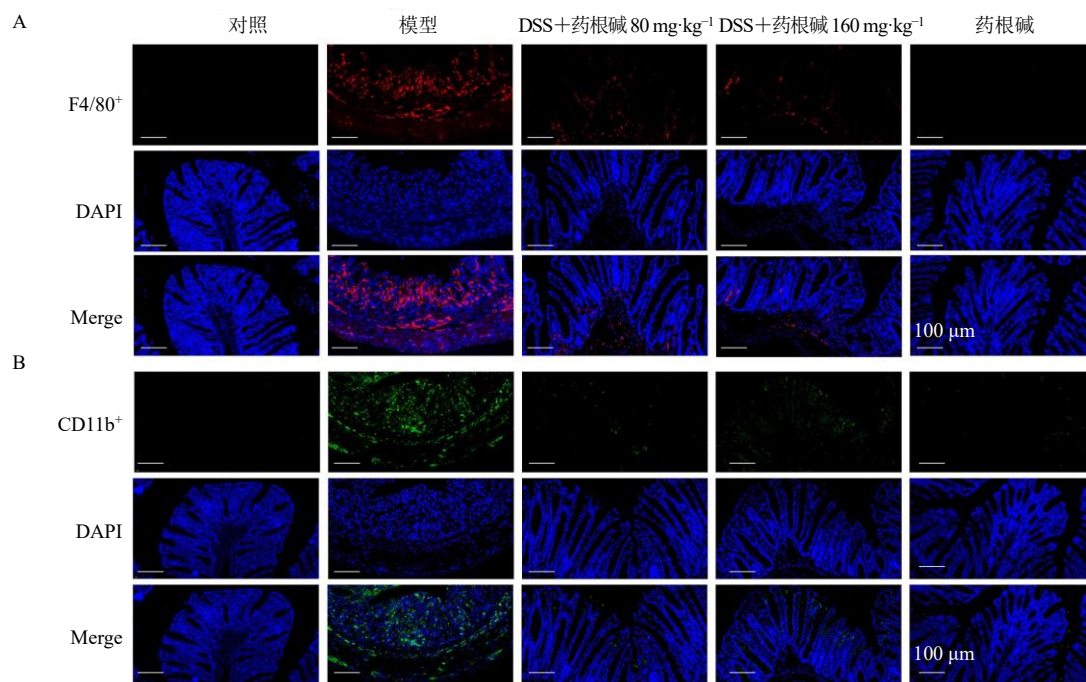


图 2 药根碱对 UC 小鼠结肠组织病理学损伤的影响 (HE, ×100)
Fig. 2 Effect of jatrorrhizine on histopathological injury of colon in UC mice (HE, ×100)

3.5 药根碱与凋亡和抗氧化相关蛋白的分子对接
根据上述研究结果, 提示药根碱对 DSS 诱导的

UC 小鼠治疗作用可能与抑制细胞凋亡及 Nrf2/HO-1 信号通路有关。因此, 选择 Bcl-2 和 Bax 凋亡相关

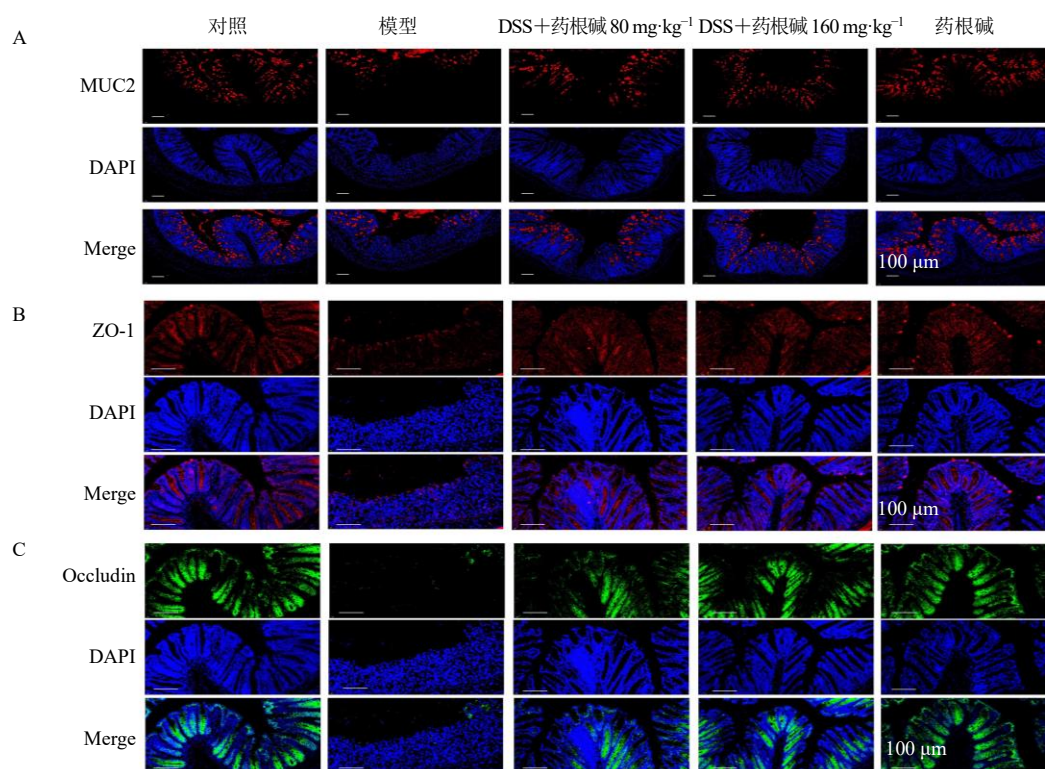


A-F4/80⁺免疫荧光; B-CD11b⁺免疫荧光。

A-F4/80⁺ immunofluorescence; B-CD11b⁺ immunofluorescence.

图 3 药根碱减轻 UC 小鼠结肠炎症细胞浸润 (×200)

Fig. 3 Jatrorrhizine alleviates infiltration of colon inflammatory cell in UC mice (×200)



A-MUC2 免疫荧光 (×100); B-ZO-1 免疫荧光 (×200); C-occludin 免疫荧光 (×200)。

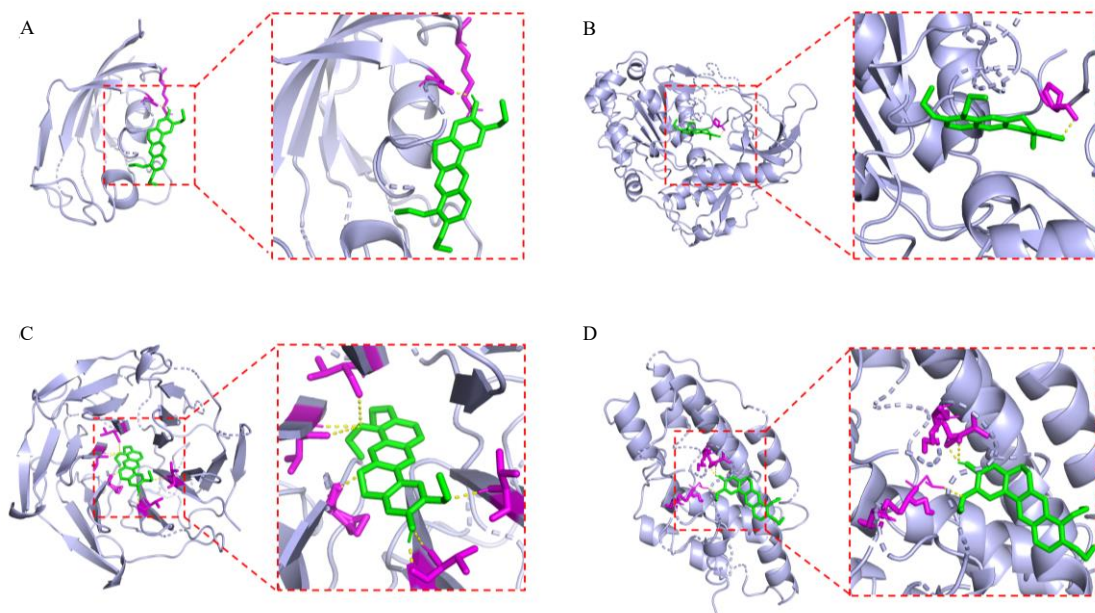
A-MUC2 immunofluorescence (×100); B-ZO-1 immunofluorescence (×200); C-occludin immunofluorescence (×200).

图 4 药根碱对 UC 小鼠肠道屏障功能的影响

Fig. 4 Effect of jatrorrhizine on intestinal barrier function of UC mice

蛋白以及 Nrf2 和 HO-1 抗氧化相关蛋白, 通过分子对接的方式, 研究并模拟药根碱与蛋白靶点的结合作用。如图 5 所示, 药根碱可以通过氢键与 Bcl-2 (PDB ID: 3ey6)、Bax (PDB ID: 6hph)、Nrf2 (PDB ID: 7ofe) 和 HO-1 (PDB ID: 7cka) 相互作用。药物与蛋白质之间的结合能越低, 两者之

间的亲和力越高, 形成分子复合物的稳定性越高。药根碱与 Bcl-2 (结合能 -6.88 kcal/mol, 1 kcal/mol $=4.184$ kJ/mol) 和 HO-1 (结合能 -7.36 kcal/mol) 均具有良好的亲和性, 其中, 药根碱与 Nrf2 的结合能最低 (结合能 -9.35 kcal/mol), 与 Bax 的结合能最高 (结合能 -6.16 kcal/mol)。



A-药根碱-Bcl-2; B-药根碱-Bax; C-药根碱-Nrf2; D-药根碱-HO-1。
A-JAT-Bcl-2; B-JAT-Bax; C-JAT-Nrf2; D-JAT-HO-1.

图 5 药根碱与凋亡和抗氧化相关蛋白的分子对接图

Fig. 5 Molecular docking diagram of jatrorrhizine with apoptosis and antioxidant-related proteins

3.6 药根碱对 DSS 诱导 UC 小鼠细胞凋亡的影响

如图 6-A 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠结肠组织 Bcl-2 表达明显降低 ($P<0.05$), Bax 表达显著升高 ($P<0.05$); 与模型组相比, DSS+药根碱低、高剂量组小鼠结肠组织 Bax、Bcl-2 蛋白表达显著回调 ($P<0.05$ 、 0.01), 而药根碱组与对照组 Bax、Bcl-2 蛋白表达无明显差异。为证实上述结果, 采用 TUNEL 染色法观察肠上皮细胞的凋亡情况, 结果显示, 与对照组相比, 模型组小鼠的肠上皮细胞中 TUNEL 阳性细胞数量明显增加, 然而药根碱可改善 UC 小鼠肠上皮细胞的凋亡 (图 6-B), 提示药根碱可通过调节细胞凋亡, 改善 DSS 诱导的 UC 小鼠肠道黏膜损伤。

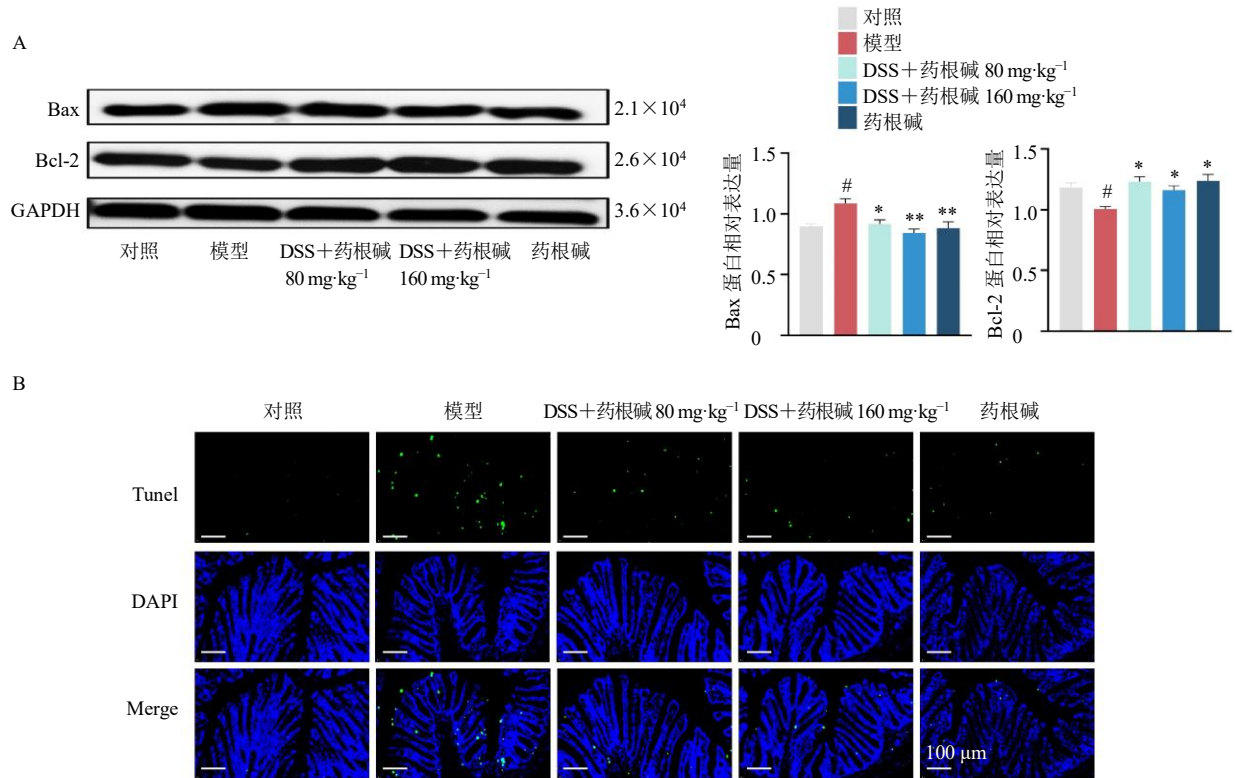
3.7 药根碱对 DSS 诱导 UC 小鼠氧化应激及抗氧化能力的影响

研究表明, 氧化应激与结肠炎的炎症反应密切相关^[15-16], 通过检测 UC 小鼠血清中 T-AOC、GSH-Px

水平以及结肠组织中 SOD 活性和 MDA 的水平, 探究药根碱对 UC 小鼠氧化应激和抗氧化能力的影响。如图 7-A 所示, 与对照组相比, 模型组 UC 小鼠结肠组织中 MDA 的水平明显增加, 提示 UC 小鼠结肠组织过氧化程度较高, 同时, 模型组 SOD、T-AOC、GSH-Px 水平显著降低, 提示 UC 小鼠抗氧化能力减弱。药根碱组与对照组比较 UC 小鼠氧化应激及抗氧化能力无明显差异, 提示药根碱能够明显减缓过氧化, 提高小鼠的抗氧化能力。

如图 7-B 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠结肠组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), 说明模型小鼠在不同程度上受到了氧化损伤; 与模型组相比, DSS+药根碱低、高剂量组小鼠的 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达显著回升 ($P<0.05$ 、 0.01)。

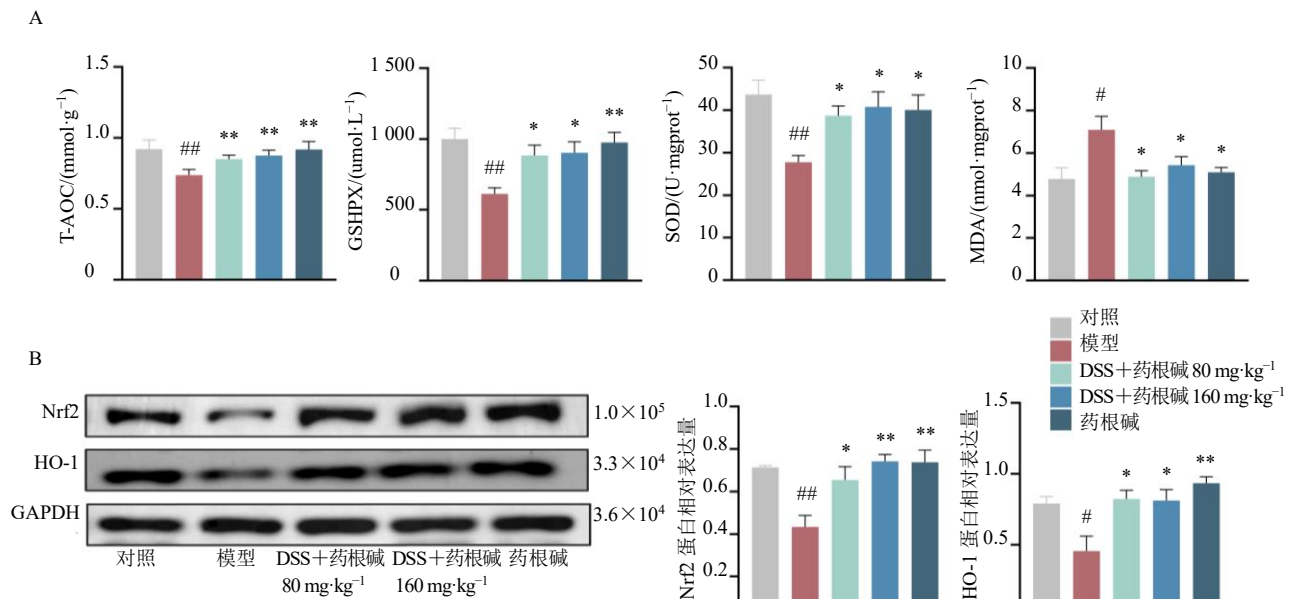
综上所述, 药根碱可减轻 UC 小鼠氧化应激损伤, 对 UC 小鼠抗氧化能力具有修复作用, 其作用机制可能与 Nrf2/HO-1 信号通路有关。



A-结肠组织中 Bax、Bcl-2 和 GAPDH 的表达；B-结肠 TUNEL 染色 (×200)。
A-expressions of Bax, Bcl-2 proteins in colon tissue; B-TUNEL staining of colon (×200).

图 6 药根碱对 UC 小鼠的抗凋亡作用 (n = 3)

Fig. 6 Anti-apoptotic effect of jatrorrhizine on UC mice (n = 3)



A-T-AOC、MDA 水平及 GSH-Px、SOD 活性 (n = 6)；B-Nrf2 和 HO-1 的表达 (n = 3)。
A-levels of T-AOC, MDA and activities of GSH-Px, SOD (n = 6)；B-expressions of Nrf2 and HO-1 (n = 3).

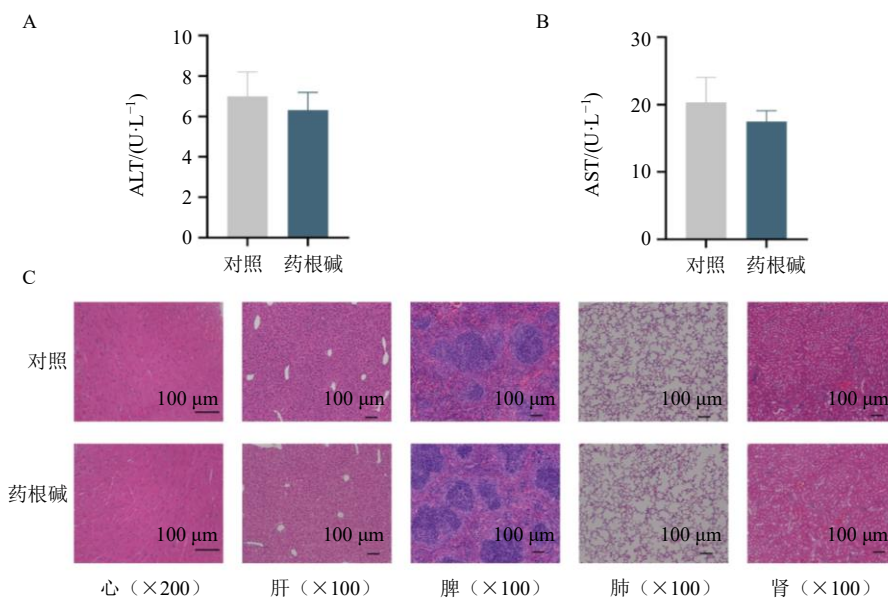
图 7 药根碱对 UC 小鼠氧化应激和抗氧化能力的调节作用

Fig. 7 Regulation of jatrorrhizine on oxidative stress and antioxidant capacity of UC mice

3.8 药根碱对 DSS 诱导 UC 小鼠的安全性评价

为探讨药根碱的生物安全性,测定了小鼠血清中肝功能指标 ALT 和 AST 的活性。结果显示,对照组比较,药根碱组 ALT、AST 的活性无统计学意义,提示药根碱具有良好的安全性(图 8-A、B)。

此外,为进一步探讨药根碱对小鼠是否具有毒性作用,对小鼠的肝、心、脾、肺和肾脏组织进行 HE 染色,结果显示,对照组和药根碱组的组织病理学染色无显著差异,再次证实药根碱对小鼠无毒性作用(图 8-C)。



A-小鼠 ALT 的表达 ($n=4$); B-小鼠 AST 的表达 ($n=4$); C-小鼠心、肝、脾、肺、肾的组织病理学观察 ($n=3$)。

A-expression of ALT in mice ($n=4$); B-expression of AST in mice ($n=4$); C-histopathological observation of mouse heart, liver, spleen, lung and kidney ($n=3$).

图 8 药根碱对 DSS 诱导 UC 小鼠的安全性评价

Fig. 8 Safety evaluation of jatrorrhizine in DSS induced UC mice

4 讨论

本研究发现药根碱能够调节肠道屏障功能,恢复 UC 小鼠肠道损伤。基于 DSS 诱导的 UC 小鼠模型与临床症状相似,本研究通过 DSS 构建 UC 小鼠模型,探究药根碱对 UC 的作用和机制。结果表明,模型组小鼠出现便血、腹泻和体质量减轻的症状,同时,药根碱的干预显著减轻了 UC 小鼠的上述症状。从组织病理学观察结果发现,药根碱明显改善了 DSS 诱导的小鼠结肠组织病理损伤。结肠组织中巨噬细胞和中性粒细胞的大量浸润可以反映组织的炎症程度。免疫荧光结果显示,DSS 诱导的 UC 小鼠 CD11b⁺和 F4/80⁺炎性细胞浸润水平升高,而药根碱逆转了这一结果。上述结果表明,药根碱可减轻 DSS 诱导的 UC 小鼠结肠炎症程度。

肠屏障功能障碍是 UC 的一个突出特征。MUC2 是由驻留在肠隐窝的杯状细胞分泌的凝胶黏蛋白,是黏液屏障的主要成分^[17]。occludin 和 ZO-1 是顶端上皮之间的紧密连接蛋白,可以避免肠微绒毛和壁膜结构的破坏^[18-19],对于肠道紧密连接结构和屏障

功能不可或缺。免疫荧光结果显示,模型组 UC 小鼠结肠组织中 MUC2、ZO-1 和 occludin 的荧光强度降低,与之相反,药根碱能够上调 MUC2、ZO-1 和 occludin 的表达。提示药根碱通过调节肠道屏障功能,增强黏膜屏障中黏蛋白的表达,对 DSS 诱导的 UC 小鼠肠道损伤具有明显的修复作用。

UC 是一种慢性炎症性疾病,在疾病发展过程中与细胞凋亡密切相关^[20]。研究表明,异常的细胞凋亡可引起肠屏障功能障碍。TUNEL 染色结果证实了药根碱能抑制肠上皮细胞的凋亡。Bcl-2 和 Bax 是线粒体凋亡通路中的关键信号分子^[21], Bcl-2 具有抗细胞凋亡作用,而 Bax 是一种众所周知的细胞凋亡加速剂,一旦 Bcl-2 和 Bax 之间的失衡被打破,将会诱导细胞凋亡^[22]。本研究结果显示,药根碱增加了抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,而降低了促凋亡蛋白 Bax 的表达。

氧化应激在 UC 的发生过程中起着非常重要的作用^[23]。通常情况下,ROS 是细胞代谢的正常产物,但 ROS 的积累会引发蛋白质功能障碍、脂

质过氧化和 DNA 损伤, 导致上皮细胞过度凋亡, 引发炎症反应加剧^[24]。当机体氧化和抗氧化系统信号失衡时, 炎症细胞的浸润又进一步刺激 ROS 的释放和脂质过氧化的积累, 导致肠黏膜损伤^[24]。因此, 从氧化应激和抗氧化的角度了解 UC 的发展极为重要。MDA 的产生是 ROS 对细胞膜反应的结果, MDA 是膜脂过氧化的最终分解产物, 反映机体脂质过氧化的速率和强度, 而 SOD、GSH-Px 是主要的抗氧化酶, T-AOC 可以整体反映机体的抗氧化能力^[25]。本研究发现 DSS 诱导的 UC 小鼠 MDA 水平明显升高, 而 SOD 活性、GSH-Px 和 T-AOC 水平明显降低。相比之下, 药根碱能够显著降低 MDA 水平, 恢复 SOD 活性、T-AOC 和 GSH-

Px 水平, 提示药根碱可以逆转脂质过氧化, 抑制氧化应激。Nrf2 是参与氧化还原稳态调节的关键转录因子, 能够平衡细胞内氧化信号和抗氧化防御机制, 响应氧化应激和一系列抗氧化反应^[9,26]。本研究表明, DSS 能够显著诱导 UC 小鼠结肠组织 Nrf2 下调, 而药根碱能够上调 UC 小鼠结肠组织中 Nrf2 的表达, 同时促进 Nrf2 的靶基因 HO-1 的激活, 发挥抗氧化作用, 提示药根碱可以通过介导 Nrf2/HO-1 信号通路缓解 DSS 诱导的 UC 小鼠结肠黏膜损伤。此外, 氧化应激与肠道黏膜细胞凋亡密切相关^[27]。药根碱能够通过调节细胞凋亡和激活 Nrf2/HO-1 信号通路增强机体的抗氧化应激能力, 从而减轻 DSS 诱导的 UC 小鼠结肠黏膜损伤 (图 9)。

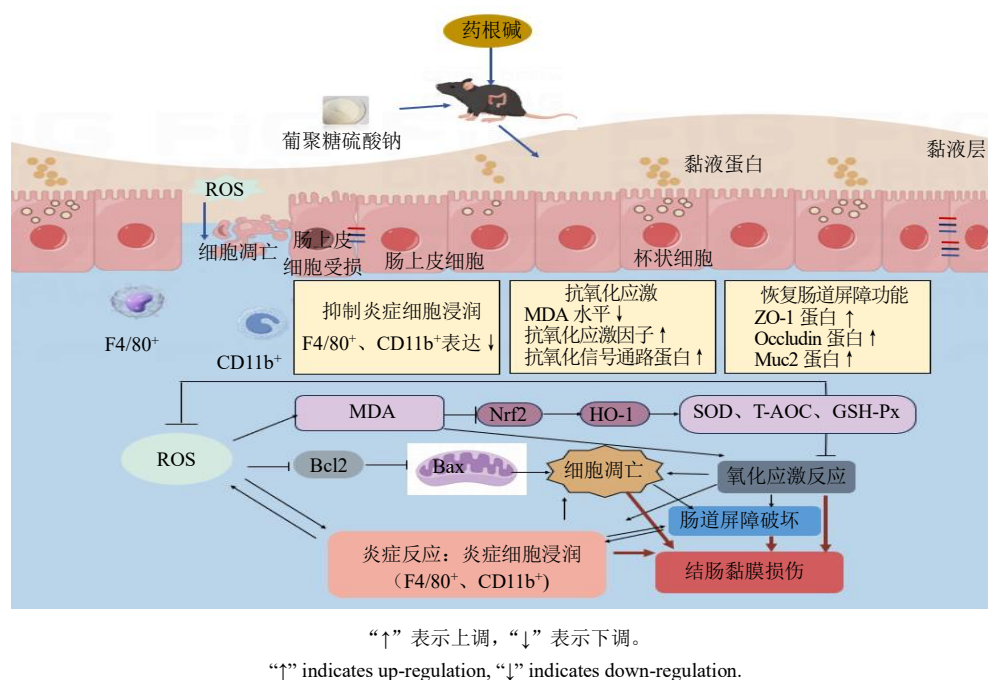


图 9 药根碱抗炎、抗凋亡和抗氧化应激的分子机制

Fig. 9 Mechanisms of anti-inflammatory, anti-apoptotic and anti-oxidative stress of jatrorrhizine

在药根碱的安全性方面, 组织病理学检查结果显示, 药根碱组小鼠心、肝、脾、肺、肾组织均未见病理改变。ALT 和 AST 是肝损伤的重要指标, 是临床诊断和肝损伤研究中常用的生物标志物^[28]。肝功能检测结果显示, 药根碱对小鼠肝组织无损伤作用。以上结果表明, 本研究中药根碱剂量对 UC 小鼠的安全性较好。

综上, 本研究发现药根碱对 DSS 诱导的 UC 小鼠有显著的治疗作用, 且具有较好的安全性。炎症、氧化应激和细胞凋亡与 UC 的发生密切相关。ROS

生成过多会引起炎症、细胞凋亡的发生, 抑制抗氧化酶的产生, 进而促进氧化应激的持续产生, 造成结肠黏膜的损伤, 同时, 炎症反应也会刺激 ROS 的生成。因此, 药根碱可能通过直接清除 ROS 发挥治疗 UC 的作用, 也可能与抑制炎症反应, 减少的 ROS 产生有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Le Berre C, Honap S, Peyrin-Biroulet L. Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2023, 402(10401): 571-584.

- [2] Yang Y, 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.
- [3] 中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见 (2018 年, 北京) [J]. 中华消化杂志, 2018, 38(5): 292-311.
- [4] Kaplan G G, Ng S C. Understanding and preventing the global increase of inflammatory bowel disease [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(2): 313-321.
- [5] 史瑞, 李军祥, 沈洪, 等. 溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识 (2023) [J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(1): 288-296.
- [6] Pugliese N, Roda G, Peyrin-Biroulet L, *et al.* Emerging therapies for the treatment of ulcerative colitis [J]. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2020, 25(1): 71-79.
- [7] Jiang W, Duan W B, Li S, *et al.* Jatrorrhizine protects against okadaic acid induced oxidative toxicity through inhibiting the mitogen-activated protein kinases pathways in HT22 hippocampal neurons [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2015, 14(10): 1334-1342.
- [8] Sun Y F, Gao X Y, Wu P P, *et al.* Jatrorrhizine inhibits mammary carcinoma cells by targeting TNIK mediated Wnt/ β -catenin signalling and epithelial-mesenchymal transition (EMT) [J]. *Phytomedicine*, 2019, 63: 153015.
- [9] Piotrowska M, Swierczynski M, Fichna J, *et al.* The Nrf2 in the pathophysiology of the intestine: Molecular mechanisms and therapeutic implications for inflammatory bowel diseases [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 163: 105243.
- [10] Niu S Q, Jing M Y, Wen J X, *et al.* Jatrorrhizine alleviates DSS-induced ulcerative colitis by regulating the intestinal barrier function and inhibiting TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 3498310.
- [11] Yan Y X, Shao M J, Qi Q, *et al.* Artemisinin analogue SM934 ameliorates DSS-induced mouse ulcerative colitis via suppressing neutrophils and macrophages [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(10): 1633-1644.
- [12] Serra A M, Waddell J, Manivannan A, *et al.* CD11b⁺ bone marrow-derived monocytes are the major leukocyte subset responsible for retinal capillary leukostasis in experimental diabetes in mouse and express high levels of CCR5 in the circulation [J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(2): 719-727.
- [13] Boltin D, Perets T T, Vilkin A, *et al.* Mucin function in inflammatory bowel disease: An update [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2013, 47(2): 106-111.
- [14] Cao C, Zhu B W, Liu Z Q, *et al.* An Arabinogalactan from *Lycium barbarum* attenuates DSS-induced chronic colitis in C57BL/6J mice associated with the modulation of intestinal barrier function and gut microbiota [J]. *Food Funct*, 2021, 12(20): 9829-9843.
- [15] Piechota-Polanczyk A, Fichna J. Review article: The role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases [J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 2014, 387(7): 605-620.
- [16] Bourgonje A R, Feelisch M, *et al.* Oxidative stress and redox-modulating therapeutics in inflammatory bowel disease [J]. *Trends Mol Med*, 2020, 26(11): 1034-1046.
- [17] 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.
- [18] Allam-Ndoul B, Castonguay-Paradis S, Veilleux A. Gut microbiota and intestinal trans-epithelial permeability [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17): 6402.
- [19] Li X L, Li Q Q, Xiong B, *et al.* Discoidin domain receptor 1 (DDR1) promote intestinal barrier disruption in ulcerative colitis through tight junction proteins degradation and epithelium apoptosis [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 183: 106368.
- [20] Günther C, Neumann H, Neurath M F, *et al.* Apoptosis, necrosis and necroptosis: Cell death regulation in the intestinal epithelium [J]. *Gut*, 2013, 62(7): 1062-1071.
- [21] Yao J, Cao X, Zhang R, *et al.* Protective effect of baicalin against experimental colitis via suppression of oxidant stress and apoptosis [J]. *Pharmacogn Mag*, 2016, 12(47): 225-234.
- [22] Edlich F. BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(1): 26-34.
- [23] Piechota-Polanczyk A, Fichna J. Review article: The role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases [J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2014, 387(7): 605-620.
- [24] Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, *et al.* Oxidative stress: An essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases [J]. *Physiol Rev*, 2014, 94(2): 329-354.
- [25] Zhou M X, Xu W M, Wang J Z, *et al.* Boosting mTOR-dependent autophagy via upstream TLR4-MyD88-MAPK signalling and downstream NF- κ B pathway quenches intestinal inflammation and oxidative stress injury [J]. *EBioMedicine*, 2018, 35: 345-360.
- [26] Li Y, Shen L, Luo H S. Luteolin ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice possibly through activation of the Nrf2 signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 40: 24-31.
- [27] Wan Y, Yang L, Jiang S, *et al.* Excessive apoptosis in ulcerative colitis: Crosstalk between apoptosis, ROS, ER stress, and intestinal homeostasis [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2022, 28(4): 639-648.
- [28] Tan C, Fan H, Ding J, *et al.* ROS-responsive nanoparticles for oral delivery of luteolin and targeted therapy of ulcerative colitis by regulating pathological microenvironment [J]. *Mater Today Bio*, 2022, 14: 100246.

[责任编辑 罗 曦]