

• 药理与临床 •

菊苣酸抑制铁死亡和炎症反应改善葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎继发性肝损伤

蔡维维¹, 朱雪雪¹, 侯 豹¹, 孙海建¹, 邱丽颖¹, 德 曲³, 次旦南卓^{2*}

1. 江南大学无锡医学院, 江苏 无锡 214122

2. 西藏藏医药大学 藏医系, 西藏 拉萨 850000

3. 西藏日喀则市藏医药医院, 西藏 日喀则 857012

摘 要: 目的 研究菊苣酸对小鼠溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 继发肝损伤的改善作用及作用机制。方法 35 只 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为对照组、模型组及菊苣酸低、高剂量 (10、30 mg/kg) 组和 5-氨基水杨酸 (150 mg/kg) 组, 每组 7 只。采用 3.5% 葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 诱导 UC 继发性肝损伤小鼠模型, 并按 10 mL/kg 剂量 ig 不同药物治疗, 1 次/d, 连续 11 d。末次给药 24 h 后收集各组小鼠血清、结肠、脾脏和肝脏组织。采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色法和天狼星红 (sirius red) 染色法观察肝脏组织病理变化及纤维化情况; 采用试剂盒检测小鼠肝脏组织中丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、过氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量; 采用试剂盒检测血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和 IL-1 β 水平; 使用 Liperfluo 试剂盒及 FerroOrange 试剂盒检测肝脏组织中脂质过氧化物 (lipid peroxidation, LPO) 及游离 Fe²⁺ 水平; 采用 qRT-PCR 法检测肝脏组织中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β mRNA 表达; 采用 Western blotting 检测肝组织谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 和磷酸化核因子- κ B p65 (phosphorylated nuclear factor- κ B p65, p-NF- κ B p65) 蛋白表达。结果 与对照组比较, 模型组小鼠脾脏和肝脏指数显著升高 ($P < 0.001$), 肝脏细胞肿胀、纤维化面积显著增加 ($P < 0.01$ 、 0.001), 血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.001$), 肝脏组织中 AST、ALT、MDA、ROS 含量显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), SOD 活性显著降低 ($P < 0.01$), 肝脏组织中 LPO 及 Fe²⁺ 积累增多、凋亡细胞增多, TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA 表达显著升高 ($P < 0.001$), 肝组织中铁死亡通路关键蛋白 GPX4 表达显著下降 ($P < 0.001$)、炎症通路 p-p65 蛋白表达显著上调 ($P < 0.001$)。与模型组比较, 菊苣酸组小鼠肝脏组织病理损伤明显改善, 血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), AST、ALT、MDA、ROS 含量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), SOD 活性显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 肝脏组织中 LPO 及 Fe²⁺ 积累减少、凋亡细胞减少, TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β mRNA 表达显著降低 ($P < 0.001$), 肝脏组织中 GPX4 表达显著上调 ($P < 0.05$ 、 0.01)、p-p65 蛋白表达显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 菊苣酸可以缓解 DSS 诱导的 UC 继发性肝脏炎症, 通过抑制铁死亡和炎症途径发挥保肝作用。

关键词: 菊苣酸; 溃疡性结肠炎; 肝损伤; 铁死亡; 炎症反应

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)24-8435-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.24.012

Chicoric acid ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis-associated secondary liver injury by inhibiting iron death and inflammatory response

CAI Weiwei¹, ZHU Xuexue¹, HOU Bao¹, SUN Haijian¹, QIU Liying¹, DE Qu³, TSEDIEN Nhamdriel²

1. Wuxi Medical College, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

2. Tibet University of Tibetan Medicine, Lhasa 850000, China

3. Tibetan traditional Medicine Hospital of Rikaze City, Shigatse 857012, China

收稿日期: 2024-09-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82170424, 82370364, 81700364, 82300414); 无锡市软科学研究课题项目 (KX-24-C009, KX-24-C160); 西藏藏医药大学重点学科建设-藏医基础理论方向 (BSDJS-XKJS-24-01); 西藏日喀则市科技项目 (RKZ2024ZR-005)

作者简介: 蔡维维, 硕士, 实验师, 主要从事天然产物研究与开发。E-mail: caiweiwei@jiangnan.edu.cn

*通信作者: 次旦南卓 (1984—), 副教授, 博士, 主要从事藏药与中药理论研究与药物开发。E-mail: 536913114@qq.com

Abstract: Objective To investigate the improvement effect and mechanism of chicoric acid (CA) on secondary liver injury in mice with ulcerative colitis (UC). **Methods** A total of 35 male c57BL/6J mice were randomly divided into control group, DSS group, CA-L (10 mg/kg) group, CA-H (30 mg/kg) group, and 5-ASA (150 mg/kg) group, with seven mice in each group. A mouse model of secondary liver injury in UC using 3.5% dextran sulfate sodium (DSS) was constructed and administered different drug by gavage at a dose of 10 mL/kg once a day for 11 days. After the last administration for 24 h, serum, colon, spleen and liver tissues were collected. Hematoxylin eosin (HE) staining and sirius red staining were used to observe the pathological changes and fibrosis of liver tissue. The activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST), superoxide dismutase (SOD) and content of malondialdehyde (MDA) in mouse liver tissue were detected by kits; The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and IL-1 β in serum were detected by kits; The lipid peroxides (LPO) and free Fe²⁺ in liver tissue were detected by Liperfluo assay kit and FerroOrange assay kit, qRT-PCR was performed to measure the mRNA expression of *TNF- α* , *IL-6* and *IL-1 β* in liver tissue; Western blotting was performed to determine the protein expression of glutathione peroxidase 4 (GPX4) and phosphorylated nuclear factor kappa B p65 (p-NF- κ B p65) in liver tissue. **Results** Compared with the control group, the DSS group showed a significantly increase in spleen and liver indices ($P < 0.001$), swelling of liver cells, and a significantly increase in fibrosis area ($P < 0.01, 0.001$). The levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β in serum were significantly increased ($P < 0.001$), and the contents of AST, ALT, MDA, and ROS in liver tissue were significantly increased ($P < 0.01, 0.001$). The activity of SOD was significantly decreased ($P < 0.01$), and the accumulation of lipid peroxides (LPO) and Fe²⁺ in liver tissue increased, as well as an increase in apoptotic cells. The expression of *TNF- α* , *IL-6* and *IL-1 β* mRNA was also significantly increased ($P < 0.001$). The expression of GPX4, a key protein in the iron death pathway, was significantly decreased ($P < 0.001$), and the expression of p-p65 protein in the inflammatory pathway was significantly increased ($P < 0.001$). Compared with the DSS group, the pathological damage of liver tissue in CA group mice was significantly improved, and the levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β in serum were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). The contents of AST, ALT, MDA, and ROS were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and the activity of SOD was significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). The accumulation of lipid peroxides (LPO) and Fe²⁺ in liver tissue was reduced, and the number of apoptotic cells was decreased. The expression of *TNF- α* , *IL-6* and *IL-1 β* mRNA was significantly reduced ($P < 0.001$). The expression of GPX4 was significantly upregulated ($P < 0.05, 0.01$), and the expression of p-p65 protein was significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** CA can alleviate DSS induced secondary liver inflammation in colitis, and its mechanism of action may be to exert its hepatoprotective effect by inhibiting iron death and inflammatory pathways.

Key words: chicoric acid; ulcerative colitis; liver injury; iron death; inflammatory response

天然化合物菊苣酸是菊苣、蒲公英、紫锥菊等常用抗炎药用植物中极为重要的活性成分之一^[1], 为一种天然多酚化合物。现代药理学研究表明, 菊苣酸作为 1 种天然产物, 具有抗病毒、抗炎、抗氧化、抗肿瘤、免疫调节等多种药理活性^[1-3]。研究等发现^[4], 菊苣酸可清除长期高脂饮食诱导的氧化应激产生的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 积累, 缓解机体氧化应激造成的氧化损伤, 因此 CA 在增强机体免疫功能、缓解炎症等方面具有重要的药理作用。

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种炎症性疾病, 被广泛认为与结肠屏障损伤和炎症反应有关^[5]。持续的炎症反应促使白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等促炎因子的产生, 造成结肠屏障的破坏。在结肠炎症状态下, 肠屏障被破

坏, 各种共生微生物、致病微生物和/或其代谢产物 (如脂多糖、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等) 通过肠系膜静脉和门静脉输送到肝脏, 刺激肝脏产生炎症损伤, 而炎症性肝病反过来加剧 UC 形成恶性循环, 因此肝损伤的治疗不容忽视。因此, 本研究旨在探讨 CA 对硫酸葡聚糖钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 诱导的 UC 小鼠继发性肝损伤的改善作用, 以期为临床治疗该疾病提供新的思路。

1 材料

1.1 动物

35 只 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠, 体质量 (20 $\pm$ 2) g, 购自苏州斯贝福生物技术有限公司, 许可证号 SYXK (苏) 2021-0056, 饲养于江南大学医学院实验动物中心屏障环境, 所有动物实验经江南大学实验动物委员会的批准, 批准号 JN.No20240630t0600930[369]。

1.2 药品与试剂

菊苣酸(批号 HY-N0457A, 质量分数 99.98%)、DSS (批号 HY-116282, 质量分数 99.20%, 相对分子质量 5×10^4)、5-氨基水杨酸 (5-aminosalicylic acid, 5-ASA, 批号 HY-15027, 质量分数 99.82%) 均购自美国 MedChemExpress 公司; IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、过氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (批号分别为 H002-1-2、H052-1-2、H007-1-2、C010-2-1、C009-2-1、A001-3-2、A003-1-2)、苏木素-伊红 (hematoxylin eosin, HE)、链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物 (streptavidin-biotin complex, SABC) 试剂盒 (批号分别为 D006-1-4、I001-1-1) 均购自南京建成生物科技有限公司; 天狼星红 (sirius red) 染料、二氢乙锭染料 (dihydroethidium, DHE) (批号分别 G1472、G4817) 购自北京索莱宝科技有限公司; 细胞脂质过氧化物检测试剂盒 (liperfluo-cell lipid peroxide detection kit, Liperfluo)、2 价铁离子检测探针 (FerroOrange) 试剂盒 (批号 L248、F374) 购自上海东仁化学科技有限公司; 谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)、磷酸化核因子- κ B p65 (phosphorylated nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p-p65)、NF- κ B p65 抗体 (批号分别为 30388-1-AP、82335-1-RR、10745-1-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; GAPDH 及山羊抗兔二抗 (批号 ab8245、ab6721) 购自上海艾博抗贸易有限公司。

1.3 仪器

EG1150H+C 型生物组织包埋机、RM2135 型石蜡切片仪 (德国徕卡仪器有限公司); Panoramic MIDI 型数字切片扫描系统 (匈牙利 3DHISTECN 公司); AX2202ZH/E 型电子天平 (上海奥豪斯仪器有限公司); Synergy H4 型全功能微孔板检测仪 (美国 Biotech 公司); Axio VertA1 型蔡司倒置荧光显微镜、Axio Imager Z2 型蔡司正置荧光显微镜 (德国卡尔蔡司公司); 5424R 型冷冻离心机 (德国 eppendorf 公司); 5200Multi 型全自动化学发光分析仪 (上海天能科技有限公司); LightCycler 480 II 型全自动荧光定量 PCR 系统 (美国罗氏公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

将 35 只小鼠随机分为对照组、模型组、5-ASA (150 mg/kg) 组及菊苣酸低、高剂量 (10、30 mg/kg) 组, 每组 7 只。适应性饲养 7 d 后, 各给药组连续 ig 相应质量浓度药物 3 d (10 mL/kg), 对照组和模型组小鼠 ig 等体积生理盐水, 期间自由饮用无菌水。随后, 除对照组外, 其余 4 组均换成连续自由饮用新鲜的 3.5% DSS 溶液 8 d, ig 对应剂量的药物, 1 次/d, 对照组和模型组小鼠 ig 等体积生理盐水。

2.2 体质量变化及疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 的评估

每天记录小鼠体质量及饮食、饮水量, 观察小鼠活动状况、精神状态、粪便性状及小鼠粪便潜血评估, 计算 DAI。DAI 评分标准见表 1^[6]。

表 1 DAI 评分标准

Table 1 DAI scoring criteria

评分	体质量下降百分比/%	粪便黏稠度	粪便潜血
0	0	正常	阴性
1	1~5	软便	浅蓝
2	6~10	黏液样便	蓝色
3	11~15	稀液状便	深蓝
4	>15	稀液状便	肉眼血便

2.3 样本采集

末次给药后, 禁食不禁水 24 h, 称定体质量后麻醉小鼠, 收集血液、结肠、肝脏、脾脏等组织, 记录各组小鼠结肠长度、肝脏和脾脏质量。将一部分组织固定于 4% 多聚甲醛溶液中, 用于组织切片染色; 另一部分储存于 -80 °C, 用于分子生物学检测。计算器官指数。

器官指数 = 器官质量/体质量

2.4 肝脏病理学检测

将固定于多聚甲醛中的肝脏组织, 流水冲洗, 梯度脱水, 浸蜡后包埋成蜡块。随后, 制成 4 μ m 石蜡切片, 65 °C 下烘干 2 h, 梯度乙醇洗脱, 二甲苯脱蜡, HE 染色, 封片, 晾干, 用数字切片扫描仪读取切片, 观察肝脏组织的形态变化并评分。0 分: 肝细胞形态整齐, 肝细胞索排列整齐, 未见病理改变; 1 分: 肝细胞索排列不整齐, 出现紊乱, 细胞内出现空泡, 有轻微的炎性浸润; 2 分: 肝小叶不清晰, 细胞轻微固缩, 细胞之间可见间隙, 有较多的炎性浸润; 3 分: 肝细胞明显固缩, 细胞之间的间隙明显, 有明显的炎性浸润^[7]。

2.5 肝脏组织纤维化检测

将各组脱蜡处理后的肝脏组织切片，按天狼星红染色试剂盒使用说明书染色后，用无水乙醇将多余的染色液冲洗干净，待乙醇挥发后，中性树脂封片，于显微镜下观察，拍照并记录分析。

2.6 肝脏组织中 AST、ALT、MDA、SOD 含量检测

取小鼠肝脏组织，用预冷的 PBS 冲洗，按照肝脏组织与 PBS 体积比 1:9 冰浴匀浆，3 000 r/min、4 ℃离心 15 min，取上清。按照试剂盒说明书测定肝功能指标 AST、ALT 及氧化应激因子 MDA、SOD 水平。

2.7 血清中炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 含量测定

将全血室温静置 30 min，2 500 r/min 离心 20 min，取上清，备用。采用 ELISA 法检测血清中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平。

2.8 肝脏中脂质过氧化物 (lipid peroxidation, LPO) 和游离 Fe²⁺检测

制作新鲜肝脏组织的冰冻切片，分别使用 Liperfluo 试剂盒及 FerroOrange 试剂盒检测肝脏组织中 LPO 及游离 Fe²⁺，于荧光显微镜下观察荧光强度。

2.9 肝脏组织细胞凋亡检测

将肝脏组织石蜡块制作成 3 μ m 切片并脱蜡至水，滴加含 PI 和 Hoechst 染料的工作液，置于 37 ℃烘箱孵育 30 min 后，PBS 洗涤 3 次，每次 3 min，滴加含防淬灭剂的封片剂，在荧光显微镜下观察各组的荧光强度。

2.10 RT-PCR 检测肝脏中促炎因子的表达

取各组小鼠的新鲜肝脏组织，液氮研磨，使用 TRIzol 试剂提取各组 RNA，再取 1 μ g 逆转录成 cDNA 后，用 SYBR Green 进行荧光定量 PCR 检测，以 β -actin 为内参，采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 IL-1 β 、IL-6、TNF- α mRNA 的相对表达量。内参及目的基因引物序列见表 2。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
TNF- α	F: CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA
	R: TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
IL-1 β	F: GCTGAAAGCTCTCCACCTCAATG
	R: TGTCGTTGCTTGGTTCTCCTTG
IL-6	F: GCCTTCTTGGGACTGATGCT
	R: TGTGACTCCAGCTTATCTCTTGG
β -actin	F: CATGGAGTCCTGTGGCATCC
	R: CTCCTTCTGCATCCTGTCGG

2.11 Western blotting 法检测肝脏组织中 GPX4 和 p-NF- κ B p65 蛋白表达

取新鲜肝脏组织加入 RIPA 裂解液，于冰上提取组织中总蛋白并定量。调整蛋白样品浓度与上样缓冲液混匀并沸水浴加热变性后，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，在质量浓度为 5%脱脂奶粉中封闭 1 h，TBST 洗膜后加入一抗 (1:2 000)，4 ℃孵育过夜，TBST 洗膜后再加入 HRP 标记的二抗 (1:3 000)，室温孵育 1 h，TBST 洗膜后，采用 ECL 化学发光，以 GAPDH 为内标蛋白，使用 Image-J 分析软件计算各组 GPX4、p-NF- κ B p65 蛋白相对表达水平。

2.12 统计学分析

所有实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，每组数据至少来自 3 个独立性实验结果，使用 GraphPad Prism 8.0 统计学数据软件进行数据处理，两组间比较采用 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对 UC 小鼠精神状态、体质量、饮食饮水量及 DAI 的影响

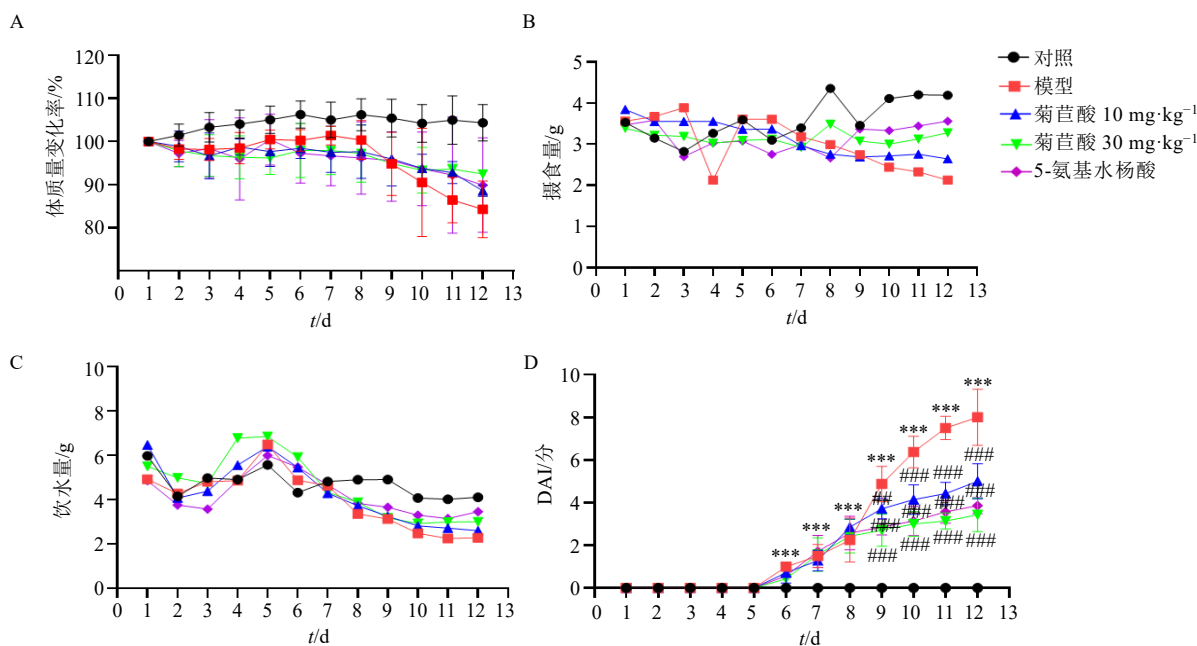
结果如图 1 所示。对照组小鼠精神状态良好、活泼好动、毛发润泽发亮，饮食饮水规律、大便成形、颜色正常、体质量稳定增长；与对照组比较，模型组小鼠精神萎靡、反应迟钝、蜷缩懒动、毛色暗淡、饮食饮水量随着造模时间的延长显著减少，并逐渐出现腹泻便血等症状，体质量显著下降，DAI 值显著升高 ($P < 0.001$)。与模型组比较，菊苣酸和 5-ASA 组小鼠精神状态有所好转，进食进水及活动量逐渐增加，大便形态及血便情况有所改善，DAI 值显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

3.2 对 UC 小鼠结肠长度、脾脏指数及肝脏指数的影响

结果如图 2 所示。与对照组比较，模型组小鼠结肠长度显著缩短 ($P < 0.001$)，脾脏指数及肝脏指数均显著升高 ($P < 0.001$)，表明 DSS 诱导小鼠发生结肠炎，脾脏指数的升高，也说明小鼠体内炎症升高，同时肝脏也有一定程度的受损；与模型组比较，菊苣酸低、高剂量组和 5-ASA 组结肠长度显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01)，脾脏指数及肝脏指数显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，说明菊苣酸和 5-ASA 可以改善 DSS 诱导的 UC 小鼠体内炎症反应。

3.3 对肝脏病理学变化的影响

HE 染色和天狼星红染色结果 (图 3) 显示，



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$, 下同。
 ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 1 各组小鼠体重 (A)、摄食量 (B)、饮水量 (C) 及 DAI (D) 情况 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Body weight (A), food (B), water intake (C) and DAI (D) of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

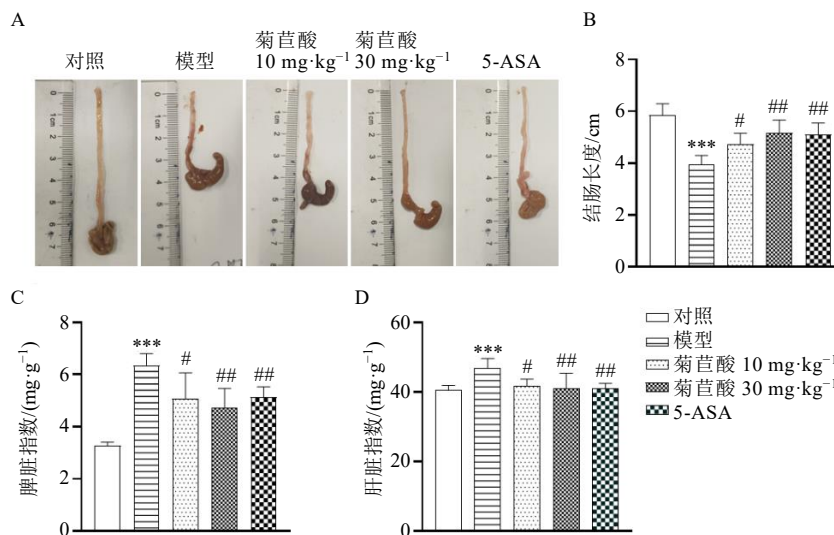


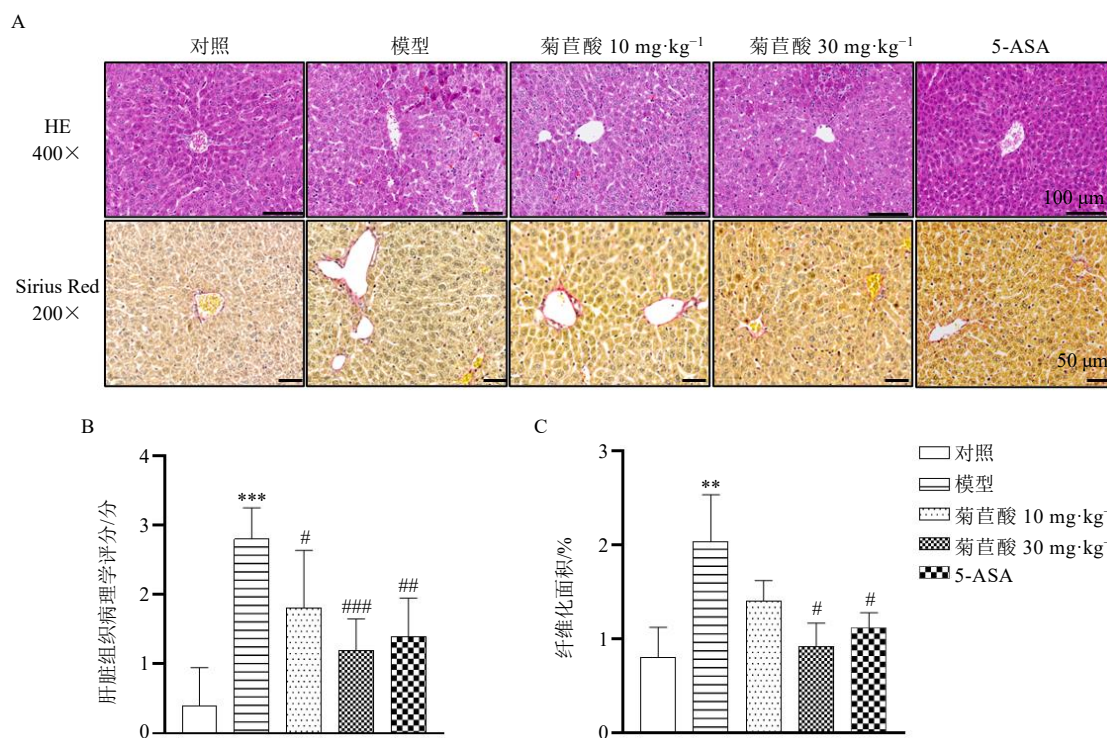
图 2 各组小鼠结肠长度 (A、B)、脾脏指数 (C) 及肝脏指数 (D) ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Colon length (A, B), spleen index (C), and liver index (D) of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

在对照组中,肝细胞紧密排列,结构完整,偶见轻微自身纤维化现象;模型组肝细胞出现肿胀和松散排列的特征以及炎症浸润现象,纤维化现象明显;菊苣酸和 5-ASA 组小鼠肝细胞肿胀现象显著减轻,细胞排列变得紧密,炎症细胞浸润减少,纤维化面积减少,说明菊苣酸和 5-ASA 可以改善 DSS 诱导的 UC 小鼠肝损伤。

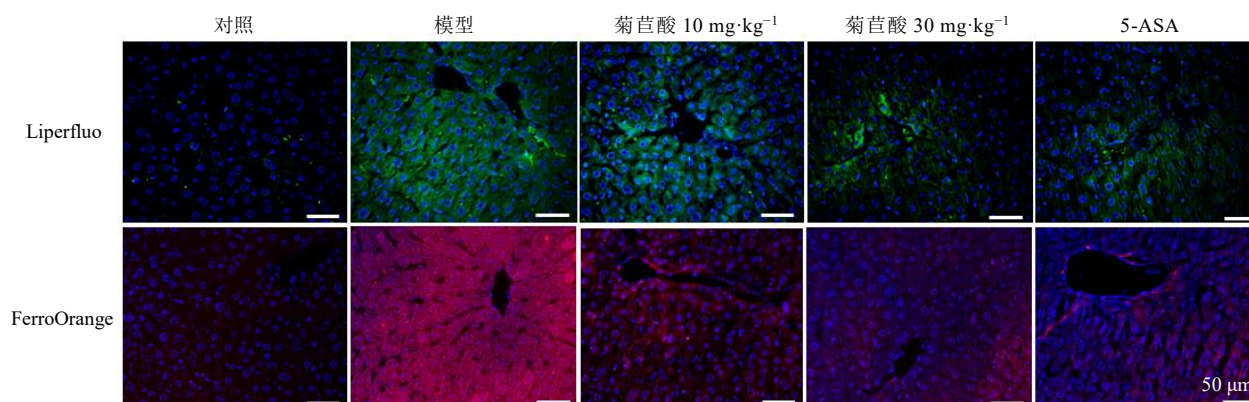
3.4 对 UC 小鼠肝脏中铁死亡相关的 LPO 及 Fe²⁺ 积累的影响

结果如图 4 所示。与对照组比较, DSS 组小鼠肝脏组织 LPO (绿色荧光) 和 Fe²⁺ (红色荧光) 积累, 荧光强度增强; 与模型组比较, 菊苣酸和 5-ASA 组小鼠肝脏组织脂质过氧化物和 Fe²⁺ 积累减少。



A-肝脏组织病理学和纤维化检测; B-肝脏组织病理学评分; C-肝脏组织纤维化面积统计。

A-pathology and fibrosis detection of liver tissue; B-pathological scoring of liver tissue; C-statistics of fibrosis area in liver tissue.

图 3 各组小鼠肝脏组织形态学及纤维化情况比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 3 Comparison of liver tissue morphology and fibrosis of mice in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 6$)图 4 各组小鼠肝脏组织中 LPO 及 Fe²⁺变化 (×200)Fig. 4 Changes of LPO and Fe²⁺ in liver tissues of mice in each group (×200)

3.5 对 UC 小鼠肝脏组织中 ROS 含量的影响

结果如图 5 所示。与对照组比较, 模型组小鼠肝脏组织 ROS 荧光强度 (红色) 升高; 与模型组比较, 菊苣酸组和 5-ASA 组小鼠肝脏组织 ROS 荧光强度降低, 说明菊苣酸可以改善炎症诱导的肝脏组织中的氧化应激反应。

3.6 对 UC 小鼠肝脏组织 AST、ALT、SOD 和 MDA 水平的影响

结果如图 6 所示。与对照组比较, 模型组小鼠肝脏组织 AST、ALT、MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), SOD 活性显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 菊苣酸组和 5-ASA 组小鼠肝脏组织 AST、ALT、MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), SOD

活性显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.7 对 UC 小鼠血清中炎症因子水平的影响

结果如图 7 所示。与对照组比较, 模型组小鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 菊苣酸组和 5-ASA 组小鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

3.8 对 UC 小鼠肝脏中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 表达水平的影响

结果如图 8 所示。与对照组比较, 模型组小鼠肝脏组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α mRNA 表达显著增加 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 菊苣酸组和 5-

ASA 组小鼠肝脏组织 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 表达显著降低 ($P < 0.001$)。

3.9 对 UC 小鼠肝脏细胞凋亡的影响

结果如图 9 所示。与对照组比较, 模型组小鼠肝脏组织凋亡细胞数量上升, 红色荧光增强; 与模型组比较, 菊苣酸组和 5-ASA 组小鼠肝脏组织凋亡细胞数量下降, 红色荧光减弱。

3.10 对 UC 小鼠肝脏中 GPX4 和 p-NF- κ B p65 蛋白表达的影响

结果如图 10 所示。与对照组比较, 模型组小鼠肝脏组织 GPX4 表达显著下调 ($P < 0.001$), p-NF- κ B p65

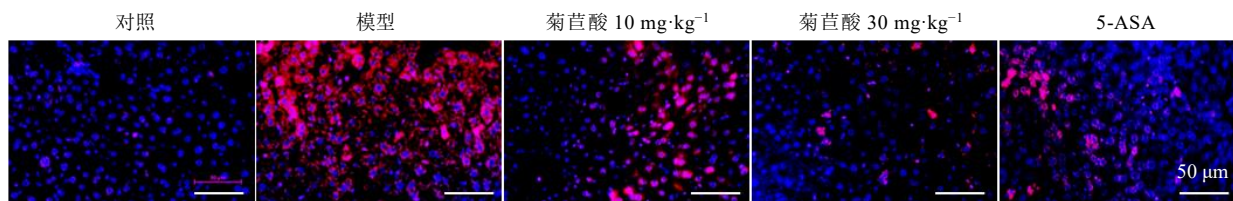


图 5 各组小鼠肝脏组织 ROS 荧光染色 ($\times 200$)

Fig. 5 ROS fluorescence staining of mouse liver tissue of each group ($\times 200$)

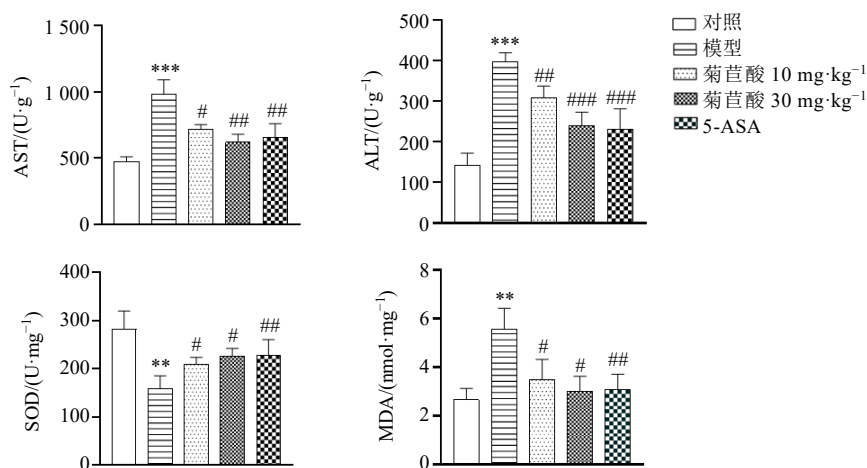


图 6 各组小鼠肝脏组织中 AST、ALT、MDA、SOD 含量变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 6 Comparison of AST, ALT, MDA, and SOD levels in liver tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

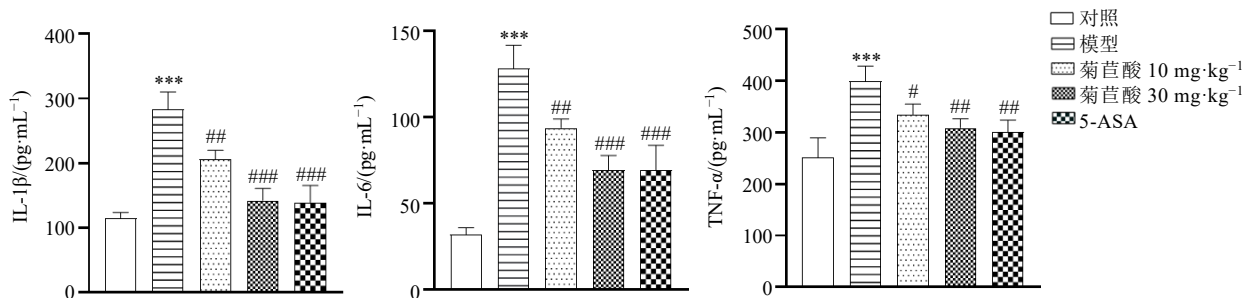


图 7 各组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 7 Comparison of IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels in serum of mice in different groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

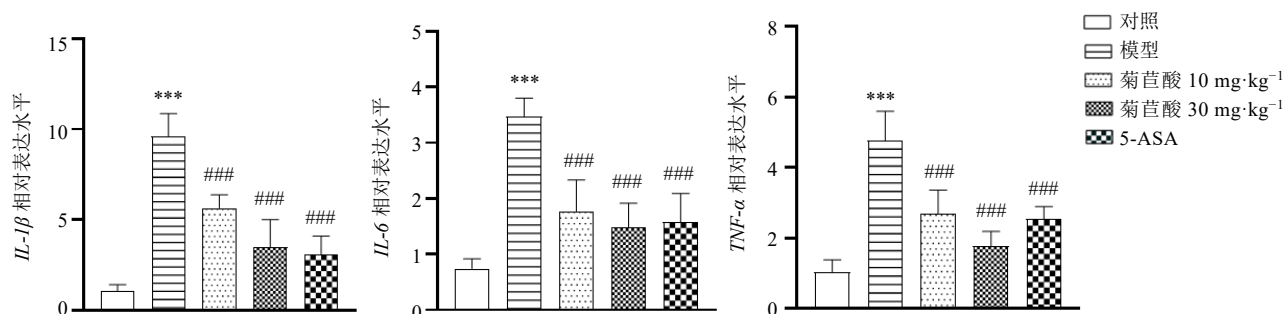


图 8 各组小鼠肝脏组织中 *IL-1β*、*IL-6*、*TNF-α* mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 8 *IL-1β*, *IL-6* and *TNF-α* mRNA expression in liver tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

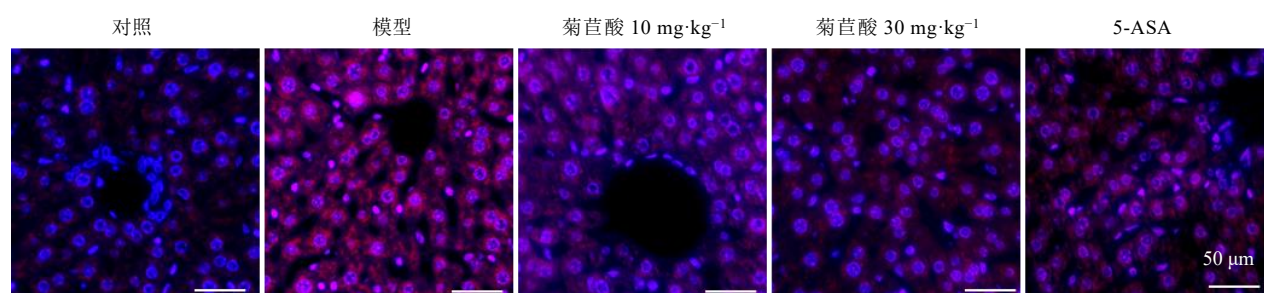


图 9 各组小鼠肝脏组织细胞凋亡 (×400)

Fig. 9 Apoptosis of liver tissue cells in each group of mice (×400)

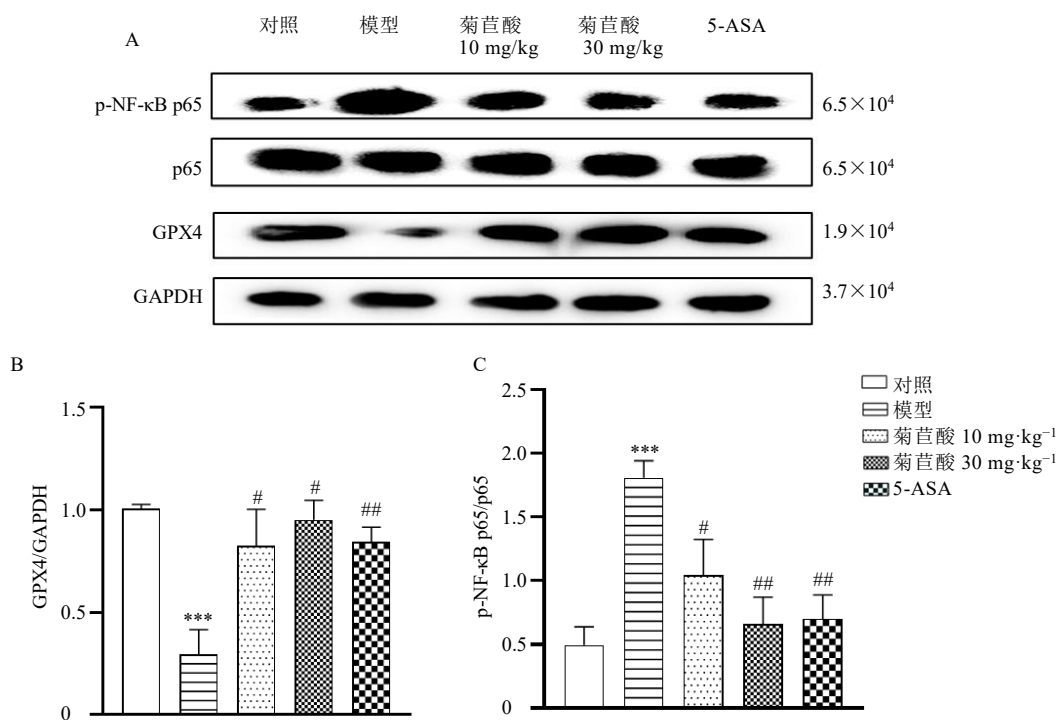


图 10 各组小鼠肝脏组织中 GPX4 和 p-NF-κB p65 表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 10 Expression of GPX4 and p-NF-κB p65 in liver tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

蛋白表达显著上调 ($P < 0.001$)；与模型组比较，菊苣酸组和 5-ASA 组小鼠肝脏组织 GPX4 表达显著上调 ($P < 0.05$ 、 0.01)，p-NF- κ B p65 蛋白表达显著下调 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

4 讨论

UC 是临床上发病率较高的多因素的难治性慢性疾病，以肠屏障损伤为特征，临床上表现为反复腹痛、腹泻、脓血便，这些严重影响患者的生活质量^[8]。5-ASA 是临床用于治疗轻-中度溃疡性结肠炎患者的一线药品，可以通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 或阻断 NF- κ B 通路来减轻结肠炎^[9-10]。因此，本研究采用 5-ASA 作为阳性对照药物，对比评价菊苣酸的药理作用。本研究通过小鼠自由饮用新鲜 DSS 溶液复制慢性 UC 模型，模拟 UC 的发病过程及临床表现。结果显示，菊苣酸可以改善 DSS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎症状，表明 CA 可以缓解 DSS 诱导的结肠炎以及由此引起的体内炎症反应。

继发性肝损伤是溃疡性结肠炎的肠外表现之一^[11]。临床溃疡性结肠炎治疗中，异质性的肝功能表现常被忽视，但 UC 诱导肝损伤的确切机制尚不清楚。许多研究表明，炎症在 UC 的发病机制中起着关键作用，并且有证据表明溃疡性结肠炎和炎症性肝病之间存在重要相关性^[12]。UC 产生的 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等促炎因子，通过门静脉传输到肝脏，会引起肝脏发生急性损伤^[13]。ALT 和 AST 作为反映肝功能状态与肝细胞损伤的指标，已被广泛用于评估慢性肝炎、肝纤维化以及肝硬化等肝脏疾病的严重程度^[14]。当肝脏受到损伤时，肝脏细胞中 AST 和 ALT 活性升高^[15]。本研究结果显示，模型组小鼠血清中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 含量上升，肝脏组织中 AST、ALT 水平升高，菊苣酸能不同程度的降低小鼠血清中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 含量和小鼠肝脏中 AST、ALT 水平，对改善体内炎症以及肝损伤功能有显著的作用。肝脏炎症与氧化应激和脂质过氧化、炎症因子的释放、线粒体功能障碍等多种因素紧密相关，而氧化应激在肝脏损伤的发生、发展过程中起着关键作用^[16]。MDA 作为生物体脂质过氧化的标志物，可引起细胞肿胀、坏死^[17]。SOD 是细胞内抵抗氧化应激最重要的一种酶，能很好的清除自由基，对抗氧化应激，使机体免受氧化的损伤^[18]。氧化应激下

ROS 的倍增可导致 TNF- α 、IL-6 等促炎因子的释放，加重炎症反应，进一步损害肝功能，加速疾病的进程，引起肝脏纤维化的发生^[19]。本研究发现，DSS 诱导的 UC 小鼠肝脏指数升高、炎症细胞浸润、纤维化明显、MDA 水平上升，而 SOD 活性降低，提示模型组小鼠肝脏发生炎症。而给与菊苣酸或 5-ASA 治疗后可以降低炎症引发的肝脏肿胀、减少炎症细胞浸润、纤维化现象、MDA 水平下降，而 SOD 活性升高，说明菊苣酸对 DSS 诱导的 UC 小鼠继发性肝损伤以及肝功能具有改善作用，提示菊苣酸可通过改善氧化应激损伤起到保护肝脏的作用。

自 2012 年“铁死亡”现象被揭示以来，众多国内外学者证实炎症过程中伴随着铁死亡的发生。铁死亡是一种新型的细胞死亡方式，铁依赖性脂质过氧化以及谷胱甘肽系统的调控核心酶 GPX4 活性降低是其显著特征^[20]。细胞内不稳定铁池，主要以 Fe²⁺的形式存在，由于 Fe²⁺的不稳定性和高反应活性，可以通过芬顿反应产生羟自由基，并直接与细胞膜、质膜中的多不饱和脂肪酸反应，产生大量脂质 ROS，导致细胞死亡。因此，铁死亡表现为脂质过氧化增高、ROS 升高、铁离子聚集。本研究发现，模型组小鼠肝脏表现出 ROS 含量上升、脂质过氧化增高、铁离子聚集、细胞凋亡增多，同时 GPX4 蛋白表达下调；而菊苣酸可以有效改善肝脏铁死亡现象。

NF- κ B p65 在细胞应对炎症反应、损伤、应激等过程中发挥重要作用。磷酸化的 NF- κ B p65 会被转移到细胞核并促进促炎细胞因子的转录，继而增加促炎因子的产生和释放^[21]。本研究中，模型组 p-NF- κ B p65 蛋白表达上调，炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的 mRNA 表达水平升高，而菊苣酸可以抑制 p-NF- κ B p65 蛋白以及 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等促炎因子 mRNA 的表达，进一步说明 CA 可以改善肝脏炎症反应。

综上，菊苣酸可以缓解 UC 引发的继发性肝损伤，其机制可能与 CA 降低血清中 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的含量，抑制肝脏中 Fe²⁺及脂质体的积累，上调铁死亡中关键蛋白 GPX4 及抑制炎症通路中 NF- κ B p65 的磷酸化表达，从而起到抗炎及抑制铁死亡的作用。本研究为菊苣酸改善因溃疡性结肠炎而引发的肝损伤的治疗提供了新的见解，也为菊苣酸抗炎作用提供了实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王玉真, 高爽, 李凌军, 等. 菊苣酸生物活性及其药理作用研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2020, 29(15): 1729-1733.
- [2] 盛双双, 孙绍欣, 冯帅, 等. 菊苣酸调控 TLR9/NF- κ B 通路改善脓毒症小鼠肠损伤研究 [J]. 中草药, 2023, 54(18): 5952-5959.
- [3] 陈金锐, 李红, 于音. 菊苣酸通过磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路抑制口腔癌 KB 细胞增殖、侵袭与黏附的研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(11): 1199-1202.
- [4] Ding X Q, Jian T, Li J W, *et al.* Chicoric acid ameliorates nonalcoholic fatty liver disease via the AMPK/Nrf2/NF κ B signaling pathway and restores gut microbiota in high-fat-diet-fed mice [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 9734560.
- [5] Ungaro R, Mehandru S, Allen P B, *et al.* Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10080): 1756-1770.
- [6] 郑晓霞, 何小华, 李欣, 等. 2 种诱导溃疡性结肠炎动物模型方法的比较 [J]. 中国兽医杂志, 2024, 60(8): 32-37.
- [7] 王宏, 刘月, 饶露, 等. 辣木籽提取物对高脂血症小鼠血脂及肝脏的影响 [J]. 中国油脂, 2022, 47(7): 66-70.
- [8] 中华中医药学会脾胃病分会. 溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识意见(2017) [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(8): 3585-3589.
- [9] Cevallos S A, Lee J Y, Velazquez E M, *et al.* 5-Aminosalicylic acid ameliorates colitis and checks dysbiotic *Escherichia coli* expansion by activating PPAR- γ signaling in the intestinal epithelium [J]. *mBio*, 2021, 12(1): e03227-e03220.
- [10] Jeong S, Lee H J, Kim S, *et al.* 5-Aminosalicylic acid azo-coupled with a GPR109A agonist is a colon-targeted anticolic drug with a reduced risk of skin toxicity [J]. *Mol Pharm*, 2020, 17(1): 167-179.
- [11] 吴昊, 刘曼, 李娜, 等. 溃疡性结肠炎合并肝损伤 2 例报告 [J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(5): 1171-1173.
- [12] Deng Z J, Meng Y C, Zhao L, *et al.* BMSC cells alleviate liver injury induced by ulcerative colitis via repairing the intestinal-liver barrier and activating hepatocyte growth factor [J]. *Cell Mol Biol*, 2023, 69(2): 19-25.
- [13] Wang A H, Yang X, Lin J C, *et al.* Si-Ni-San alleviates intestinal and liver damage in ulcerative colitis mice by regulating cholesterol metabolism [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 336: 118715.
- [14] 陈莹, 何河, 张慧敏, 等. 声触诊组织量化技术 (VTQ) 测量肝硬度与血清 AST/ALT 比值评价肝硬化患者严重程度及预后分析 [J]. 现代生物医学进展, 2023, 23(14): 2698-2703.
- [15] 王曦烨, 阿都沁夫, 韩晓静, 等. 基于代谢组学方法的红花治疗急性酒精性肝损伤的作用机制研究 [J]. 分析科学学报, 2024, 40(4): 373-380.
- [16] 田晓玲, 蒋佳佳, 张彧, 等. 中药多糖防治非酒精性脂肪性肝病作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55(17): 6016-6025.
- [17] 朱仁英, 郎玉玲, 王久英, 等. 羟基红花黄色素 A 通过调控 Sirt1/FOXO1 信号通路减轻大鼠肝缺血再灌注损伤 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(6): 1099-1106.
- [18] Jing L, Sun Y M, Wang J, *et al.* Oxidative stress and endoplasmic reticulum stress contributed to hepatotoxicity of decabromodiphenyl ethane (DBDPE) in L-02 cells [J]. *Chemosphere*, 2022, 286(Pt 1): 131550.
- [19] Zhu L Y, Zhang Q, Hua C, *et al.* Melatonin alleviates particulate matter-induced liver fibrosis by inhibiting ROS-mediated mitophagy and inflammation via Nrf2 activation [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023, 268: 115717.
- [20] Bersuker K, Hendricks J M, Li Z P, *et al.* The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis [J]. *Nature*, 2019, 575(7784): 688-692.
- [21] Peng L, Wen L, Shi Q F, *et al.* Scutellarin ameliorates pulmonary fibrosis through inhibiting NF- κ B/NLRP3-mediated epithelial-mesenchymal transition and inflammation [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(11): 978.

[责任编辑 罗 曦]