

• 药理与临床 •

基于生物信息学分析雷公藤多苷治疗溃疡性结肠炎的关键基因

舒建龙¹, 钦丹萍^{2*}, 周毅骏³, 杨强⁴, 于哲轩¹, 邵诗思¹

1. 浙江中医药大学第一临床医学院, 浙江 杭州 310053
2. 浙江中医药大学附属第一医院 消化内科, 浙江 杭州 310006
3. 杭州市西溪医院, 浙江 杭州 310063
4. 杭州市丁桥医院 消化内科, 浙江 杭州 310021

摘要: 目的 筛选与溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 和雷公藤多苷 (*Tripterygium wilfordii* polycoride, TWP) 治疗应答均相关的核心基因, 探讨 TWP 在缓解 UC 炎症中的潜在机制。方法 构建 2,4,6-三硝基苯磺酸 (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS) /乙醇诱导的 UC 大鼠模型, 利用 Affymetrix GeneChip[®] Rat Genome 230 2.0 芯片, 开展表达谱芯片分析以明确与 UC 炎症及 TWP 治疗应答均相关的核心基因, 并利用富集分析和 IPA 分析发现与核心基因高度相关的通路, 利用慢病毒转染进行验证, 通过 qRT-PCR 和免疫荧光检测核心基因的表达。结果 大鼠结肠表达谱芯片检测结果表明, TWP 可显著下调模型组中上调的 1 056 个差异表达基因, 其中 S100 钙结合蛋白 A8 (S100 calcium binding protein A8, S100A8) 的表达变化最为显著, 提示其可能是 TWP 调控 UC 炎症的核心靶基因。富集分析、IPA 网络分析及慢病毒转染结果进一步表明, S100A8 主要通过调控核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路及相关炎症因子发挥作用。免疫荧光与 qRT-PCR 结果也证实, TWP 干预可显著降低 S100A8 在 UC 模型中的表达, 抑制作用呈剂量相关性。结论 S100A8 可能是 TWP 调控 UC 炎症的关键靶点, 其调控机制可能与 NF- κ B 通路相关, 为 UC 的药物干预提供了新的分子靶点和潜在的治疗策略。

关键词: 溃疡性结肠炎; 雷公藤多苷; S100A8; NF- κ B 通路; 炎症

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)13-4668-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.13.011

Analysis of key genes of *Tripterygium wilfordii* polyglycosides in treatment of ulcerative colitis based on bioinformatics

SHU Jianlong¹, QIN Danping², ZHOU Yijun³, YANG Qiang⁴, YU Zhexuan¹, SHAO Shisi¹

1. The First School of Clinical Medicine of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China
2. Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China
3. Hangzhou Xixi Hospital, Hangzhou 310063, China
4. Department of Gastroenterology, Hangzhou Dingqiao Hospital, Hangzhou 310021, China

Abstract: Objective To identify core genes associated with ulcerative colitis (UC) pathogenesis and *Tripterygium wilfordii* polycoride (TWP) therapeutic response, while elucidating the molecular pathways through which TWP mitigates intestinal inflammation. **Methods** A 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)/ethanol-induced UC rat model was established. Genome-wide transcriptomic profiling was performed using the Affymetrix GeneChip[®] Rat Genome 230 2.0 microarray to identify inflammation-related differentially expressed genes (DEGs) modulated by TWP. Enrichment analysis and IPA were employed to delineate critical signaling pathways. Key findings were validated via qRT-PCR and immunofluorescence assays. **Results** Microarray analysis revealed that TWP treatment significantly down-regulated 1 056 inflammation-associated DEGs up-regulated in UC rats, with S100 calcium binding protein A8 (S100A8) exhibiting the most prominent suppression. Functional enrichment and IPA network modeling implicated

收稿日期: 2024-12-09

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81273903); 国家自然科学基金面上项目 (81673798); 国家自然科学基金面上项目 (81973617)

作者简介: 舒建龙 (1990—), 男, 博士研究生, 研究方向为中医药治疗消化系统疾病。E-mail: 527573137@qq.com

*通信作者: 钦丹萍 (1962—), 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 研究方向为消化免疫学。E-mail: qindp19841@sina.com

S100A8 in nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway modulation and inflammatory cytokine regulation. Lentiviral transduction experiments further confirmed this pathway association. Both immunofluorescence and qRT-PCR analysis demonstrated that TWP dose-dependently inhibited S100A8 expression in colonic tissues of UC rats. **Conclusion** S100A8 serves as a pivotal therapeutic target through which TWP ameliorates UC-associated inflammation, primarily via NF- κ B pathway inhibition. This study unveils novel molecular targets and mechanistic insights for developing UC therapeutics.

Key words: ulcerative colitis; *Tripterygium wilfordii* polycoride; S100A8; NF- κ B pathway; inflammation

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种自身免疫性疾病, 近年来其发病率在全球范围内呈上升趋势^[1]。当前 UC 的主要治疗手段以药物干预为主, 包括 5-氨基水杨酸、糖皮质激素、免疫调节剂和生物制剂等。然而, 这些一线药物在临床应用中存在疗效有限和不良反应明显的问题, 限制了其长期使用。因此, 开发和研究新的有效药物已成为重要的研究方向。雷公藤多苷 (*Tripterygium wilfordii* polycoride, TWP) 片是从卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 中提取精制的中药制剂, 具有显著的抗炎和免疫调节作用^[2]。临床研究发现 TWP 能够显著缓解 UC 的炎症活动^[3]。进一步研究发现 TWP 可以抑制 Toll 样受体 4 (Toll-like receptors 4, TLR4) / 髓样分化因子 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 非依赖性信号通路的激活, 下调炎症因子的表达, 改善 UC 的肠道病变, 其抗炎效果呈剂量相关性^[4]。但 TWP 治疗 UC 的作用机制尚不清晰。因此, 揭示 TWP 调控 UC 的分子机制具有重要意义。

表达谱芯片作为用于研究基因表达差异的技术, 通过高通量检测特定细胞或组织在某一状态下的基因表达情况, 被广泛应用于医学研究。通过大鼠结肠表达谱芯片检测分析, 可以在基因表达层面上揭示 TWP 的潜在作用靶点和调控网络。本研究旨在借助这一技术手段, 识别在 UC 模型与 TWP 干预过程中共同依赖的关键基因和蛋白, 以期阐明 TWP 对 UC 炎症的调控路径, 为开发更加有效的 UC 药物干预策略提供新的科学依据。

1 材料

1.1 动物与细胞

90 只 SPF 级 Wistar 大鼠, 6~8 周龄, 体质量 (200±20) g, 购自上海斯莱克公司实验动物有限责任公司, 许可证号 SCXK (沪) 2018-0008。动物饲养于浙江中医药大学动物实验中心, 许可证号 SYXK (浙) 2021-0012, 温度 20~24 °C, 相对湿度 40%~60%, 光照及黑暗时间各 12 h。动物实验由浙江中医药大学动物伦理委员会批准 (伦理号

ZSLL-2017-053)。

人单核细胞白血病 THP-1 细胞购自 ATCC。

1.2 药品与试剂

TWP 片 (国药准字 Z33020422, 批号 171118) 购自浙江得恩德制药股份有限公司; 硫唑嘌呤 (azathioprine, AZA) 片 (国药准字 H33020153, 批号 609130) 购自美国 Aspen 公司; 2,4,6-三硝基苯磺酸 (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS, 批号 2508-19)、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS, 批号 MFCD0016440) 购自美国 Sigma 公司; 无水乙醇 (批号 17022402) 购自西陇科学股份有限公司; 水合氯醛 (批号 20160113) 购自国药集团; RNA 提取试剂盒 (批号 A5A1617) 购自杭州艾科瑞生物科技有限公司; RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (批号 91284674)、PowerUp SYBR Green Reagent (批号 2661045) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; S100 钙结合蛋白 A8 (S100 calcium binding protein A8, S100A8) 抗体 (1:400, 批号 00125418) 购自美国 Proteintech 公司; 核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) p65 抗体 (1:5 000, 批号 ab32536)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 抗体 (1:1 000, 批号 GR3359225-3) 购自英国 Abcam 公司; p-NF- κ B p65 抗体 (1:1 000, 批号 3033) 购自美国 CST 公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (1:5 000, 批号 AF7021) 购自 Affinity 公司; 羊抗兔鼠通用二抗 (批号 CR250310)、Flare520 (批号 CR250411)、DAPI (批号 CR250215)、抗荧光淬灭封片剂 (批号 CR250420) 购自杭州浩克生物技术有限公司。

1.3 仪器

HM340E 型石蜡切片机 (德国 Leica 公司); Olympus IX51 型免疫荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); lightcycler 480II 型荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司); Nanodrop one 微量核酸蛋白分析仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); FluorChem Q 蛋白扫描仪 (美国 ProteinSimple 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

90 只 Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组、AZA (6 mg/kg) 组和 TWP 低、中、高剂量 (3、6、12 mg/kg, 分别相当于临床剂量的 1/2、1、2 倍) 组, 每组 15 只。采用 TNBS/乙醇法构建 UC 大鼠模型, 动物适应性喂养 1 周后, 禁食 24 h, ip 10% 水合氯醛 (3 mL/kg) 麻醉, 将石蜡油润滑过的深静脉置管由肛门缓慢插入结肠约 8 cm 处, 模型组和给药组大鼠用 15% TNBS (2 mL/kg) 和 0.25 mL 50% 乙醇进行灌肠, 对照组用等体积的生理盐水进行灌肠, 灌肠结束加推 0.3 mL 空气, 用棉签堵住大鼠肛门, 轻柔大鼠腹部 1 min 并倒置 5 min, 造模结束后将大鼠平放, 自然清醒后常规饮食。造模 3 d 后, 各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续给药 14 d。末次给药 24 h 后, 处死大鼠, 留取结肠组织标本进行相关检测。

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

从造模第 1 天开始, 每天记录大鼠的一般情况, 包括体质量、大便性状、毛发光泽、精神状态、易激惹等。采用大便潜血检测试剂盒测定粪便出血量, 按表 1 进行 DAI 评分^[5]。

表 1 DAI 评分标准

Table 1 DAI scoring criteria

分数	体质量下降率 (x) /%	大便性状	便血
0	0 或增加	正常	阴性
1	$x < 5\%$	正常	潜血±
2	$5\% \leq x < 10\%$	稀便	潜血+
3	$10\% \leq x < 20\%$	稀便	潜血++
4	$x > 20\%$	腹泻	血便

DAI = (体质量下降分数 + 大便性状分数 + 大便隐血分数) / 3。

DAI = (body weight loss score + stool characteristics score + stool occult blood score) / 3.

2.3 结肠黏膜损伤病理组织学评价

解剖后, 测量结肠长度, 沿肠系膜纵向切开距回盲部 2 cm 的结肠, 用冰 PBS 冲洗, 并用滤纸吸干水分, 用 10% 中性福尔马林溶液固定 2 cm 处结肠组织, 包埋在石蜡中, 并以 4 μ m 连续切片。苏木素-伊红 (HE) 染色后, 于显微镜下观察结肠组织的病理变化, 按 Geboes 标准^[6]进行评分。

2.4 表达谱芯片筛选差异表达基因 (differential expressed genes, DEGs)

利用 Affymetrix 开发的 Affymetrix GeneChip[®]

Rat Genome 230 2.0 芯片, 进行大鼠结肠组织转录组分析。此芯片包含了大鼠基因组 31 000 个探针组, 代表 28 000 个明晰的大鼠基因。其芯片数据库来源于 GenBank、dbEST、RefSeq 等权威数据库, 并且探针序列经过与贝勒医学院公布的大鼠基因组组装草图 (2002) 比对分析而精炼。

课题组前期研究发现, TWP 高剂量组对 UC 大鼠的抗炎效果优于 TWP 低、中剂量组^[7], 故本研究从对照组、模型组、TWP 高剂量组各选取 3 只大鼠进行结肠表达谱芯片检测, 使用 Gene Spring Software 11.0 将原始数据归一化处理, 通过 limma 包对对照组、模型组、TWP 高剂量组的表达谱芯片数据进行差异分析, 以 $P < 0.05$ 、 $|\log_2$ 差异倍数 (fold change, FC) > 1 为标准, 筛选 DEGs, 采用 ComplexHeatmap 包对 DEGs 的表达进行热图可视化。

2.5 DEGs 的富集分析和网络互作分析

基于京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 数据库分析 DEGs 在通路上的表达情况, 采用 ClusterProfiler 包执行, ggplot2R 包进行可视化。基于 IPA 中的 Ingenuity[®] Knowledge Base 数据库对 DEGs 进行分子间网络互作、调控因子、调控网络分析。

2.6 结肠组织总 RNA 提取及 qRT-PCR 检测

用 Trizol 试剂提取大鼠结肠组织总 RNA, 微量核酸蛋白分析仪测定 RNA 浓度, 选取 2 μ g RNA, 使用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录成 cDNA。使用 PowerUp SYBR Green Reagent 进行 qRT-PCR 检测。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算目的基因相对表达水平。引物序列见表 2。

2.7 免疫荧光检测结肠组织 S100A8 表达

通过切片机将包埋肠道组织的石蜡块切成 4 μ m 厚的切片, 在 58 $^{\circ}$ C 烤箱中烤片 4~6 h, 随后进行常规脱蜡至水及抗原修复。滴加 5% 牛血清白蛋白, 室温封闭 30 min; 滴加 S100A8 抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 滴加 POLY-HRP 羊抗兔鼠通用二抗及 Flare520, 于室温孵育 2 h; PBS 洗片 3 次, 每次 5 min, 自然风干后, 使用抗荧光淬灭封片剂 (含 DAPI) 封片。于荧光显微镜下观察并拍照, 每组至少取 3 个视野, 使用 Image J 软件对荧光强度进行量化。

2.8 细胞培养

THP-1 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培

表2 引物序列
Table 2 Primer sequences

基因	种属	序列 (5'-3')
<i>Nfe2</i>	大鼠	F: CAGGCGGAGGAGCGAGTATG R: TCAGTGGGCGGAAGAGTATAGTTG
<i>Gzmc</i>	大鼠	F: TCGGAGGCAATGAGGTCAGTC R: CGAAGTTGTCTCTCACCAGGAAG
<i>Prok2</i>	大鼠	F: GGAAAGAAGAAGGGCGAAGAGAAG R: TGGCAGGCAGGGACAAGTG
<i>Cxcl2</i>	大鼠	F: GCTGTACTGGTCTCTGCTCCTC R: TGGTAGGGTCGTCAGGCATTG
<i>S100A8</i>	大鼠	F: GGCAACTGAACTGGAGAAGGC R: CCATTTTCCTGAAGTCATCCCTGTAG
<i>β-actin</i>	大鼠	F: GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA R: GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG
<i>β-actin</i>	人	F: CTCCATCCTGGCCTCGCTGT R: GCTGTCACCTTCACCGTTCC
<i>NF-κB</i>	人	F: TATTTGAAACACTGGAAGCACG R: CCGGAAGAAAAGCTGTAAACAT
<i>TNF-α</i>	人	F: AGCCCTGGTATGAGCCCATCTATC R: TCCCAAAGTAGACCTGCCAGAC

Nfe2-红细胞核因子 2; Gzmc-颗粒酶 C; Prok2-促动力素 2; Cxcl2-趋化因子配体 2。

Nfe2-nuclear factor erythroid 2; Gzmc-granzyme C; Prok2-prokineticin 2; Cxcl2-C-X-C motif chemokine ligand 2。

培养基，置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养，取对数生长期的细胞用于实验。

2.9 慢病毒转染构建 S100A8 敲减细胞

敲减的慢病毒载体由上海吉凯基因公司合成，S100A8 敲减 (S100A8-KD) 转染序列为 5'-TCAACACTGATGGTGCAGTTA-3'。转染时细胞密度为 1 × 10⁴ 个/mL，感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 30，转染 72 h 后，在倒置荧光显微镜下观察细胞内绿色荧光蛋白的表达用以评估转染效率，转染效率约为 80%。随后用 2 μg/mL 嘌呤霉素干预 48 h 以筛选成功转染的细胞，通过 qRT-PCR 及 Western blotting 来验证病毒转染的效率，转染成功的细胞用于后续实验。

2.10 qRT-PCR 检测 NF-κB 和 TNF-α mRNA 表达

取对数生长期的细胞以 3 × 10⁵ 个/mL 接种至 6 孔板中，加入 LPS (10 μg/mL) 干预细胞 48 h，收集细胞。按“2.6”项下方法检测 NF-κB 和 TNF-α mRNA 表达。引物序列见表 2。

2.11 Western blotting 检测 p-NF-κB p65、NF-κB p65 和 TNF-α 蛋白表达

按“2.9”项下方法进行处理，收集细胞，用含 1 mmol/L 蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液提取总蛋白质，BCA 试剂盒进行蛋白定量。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，用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h，TBST 洗涤 3 次，每次 5 min，分别加入一抗，4 °C 孵育过夜；TBST 洗涤 3 次后，加入二抗，室温孵育 1 h，使用 ECL 增强化学发光试剂进行曝光，用 Image J 软件进行灰度值分析。

2.12 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，使用 GraphPad Prism 5.0 软件分析数据，通过单因素方差分析 (ANOVA) 评估组间统计学上的显著差异，单因素方差分析后的两两比较采用 Tukey 检验。

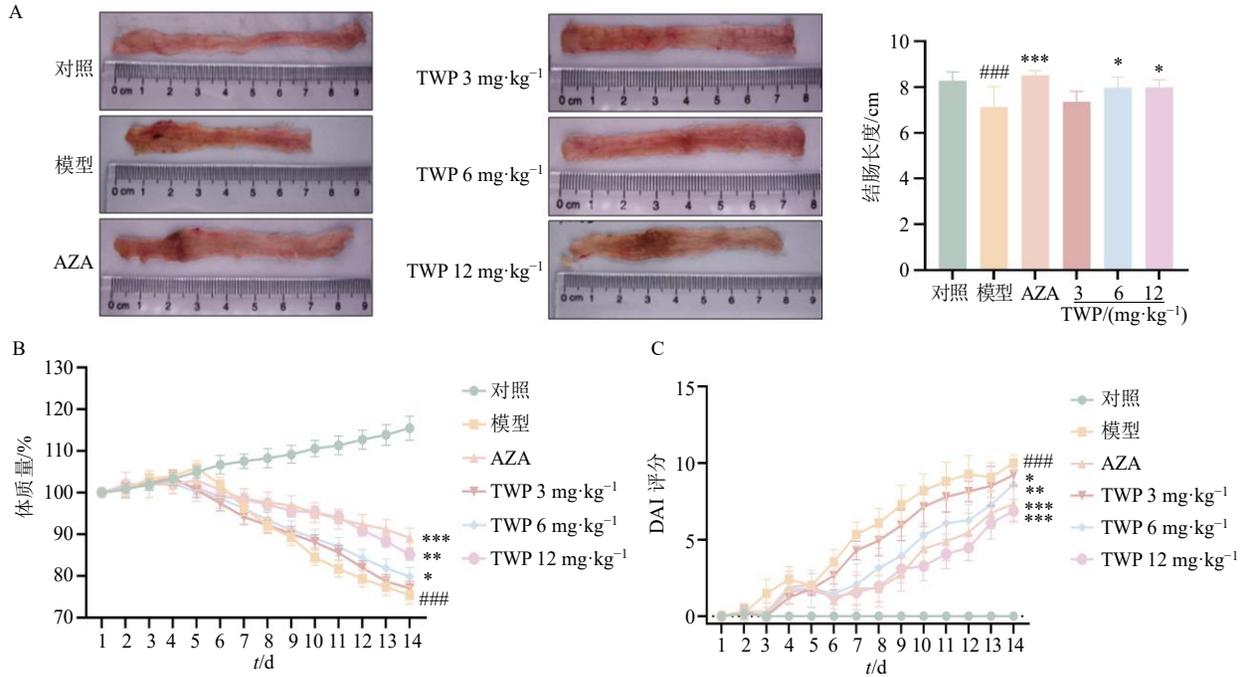
3 结果

3.1 TWP 减轻 UC 大鼠结肠炎症表现

如图 1-A 所示，与对照组比较，模型组大鼠结肠长度显著缩短 ($P < 0.001$)；与模型组比较，AZA 组和 TWP 中、高剂量组大鼠结肠长度显著增加 ($P < 0.05$ 、0.001)。如图 1-B、C 所示，与对照组比较，模型组大鼠体质量显著减轻 ($P < 0.001$)，DAI 评分显著升高 ($P < 0.001$)；与模型组比较，AZA 组和 TWP 中、高剂量组大鼠体质量显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)，各给药组 DAI 评分显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。如图 2 所示，模型组大鼠结肠组织出现显著的巨噬细胞、中性粒细胞等炎症浸润表现，中剂量 TWP 或 AZA 干预后均显著减轻了 UC 大鼠结肠炎症表现 ($P < 0.01$ 、0.001)。

3.2 基于表达谱芯片分析 UC 炎症及 TWP 治疗应答相关的 DEGs

基于表达谱芯片分析，研究了模型组 vs 对照组、TWP 高剂量组 vs 模型组 DEGs 的表达情况。模型组 vs 对照组上调的 DEGs 共有 1 667 个 (图 3-A)，TWP 高剂量组 vs 模型组下调的 DEGs 共有 1 416 个 (图 3-B)，将模型组 1 667 个上调 DEGs 和 TWP 高剂量组 1 416 个下调 DEGs 取交集，共得到 1 056 个共同 DEGs (图 3-C)。同一背景下展示了 1 056 个共同 DEGs 在对照组、模型组、TWP 高剂量组的表达模式 (图 3-D)，凸显了这些共同 DEGs 的表达特征，即在模型组中高表达，在对照组和 TWP 高剂量组中低表达。这些 DEGs 可能揭示了 UC 疾病炎症和 TWP 调控炎症的潜在共同靶点。基于 KEGG 数据库，将 1 056 个共同 DEGs 读入 R 软件，依赖 clusterProfiler 包进行功能富集分析，富集结果 (图 3-E) 显示，DEGs 涉及多条炎症通路，包括 NF-κB 通路、细胞因子与细胞因子受体的相互作用通路等。



与对照组比较: ### $P < 0.01$ #### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 图2、4、5同。

$P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as Figs. 2, 4, 5.

图1 TWP对UC大鼠结肠长度(A)、体质量(B)和DAI评分(C)的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effect of TWP on colon length (A), body weight (B) and DAI score (C) in UC rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

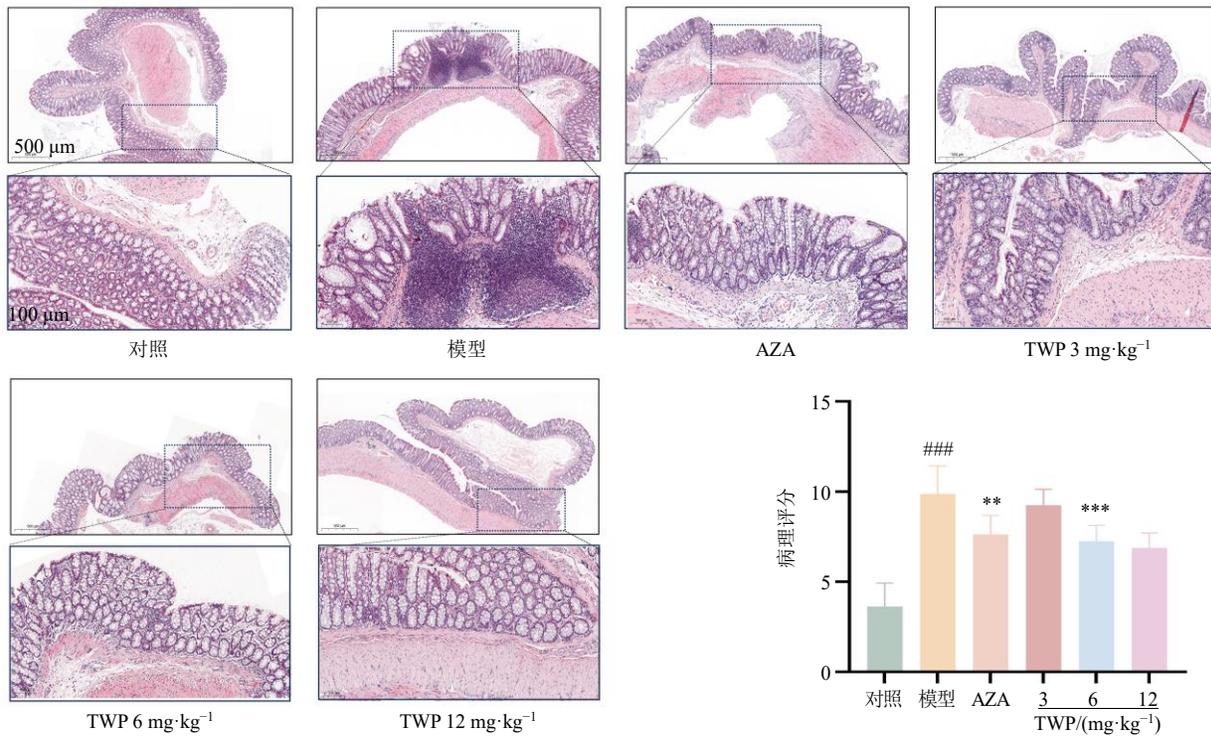
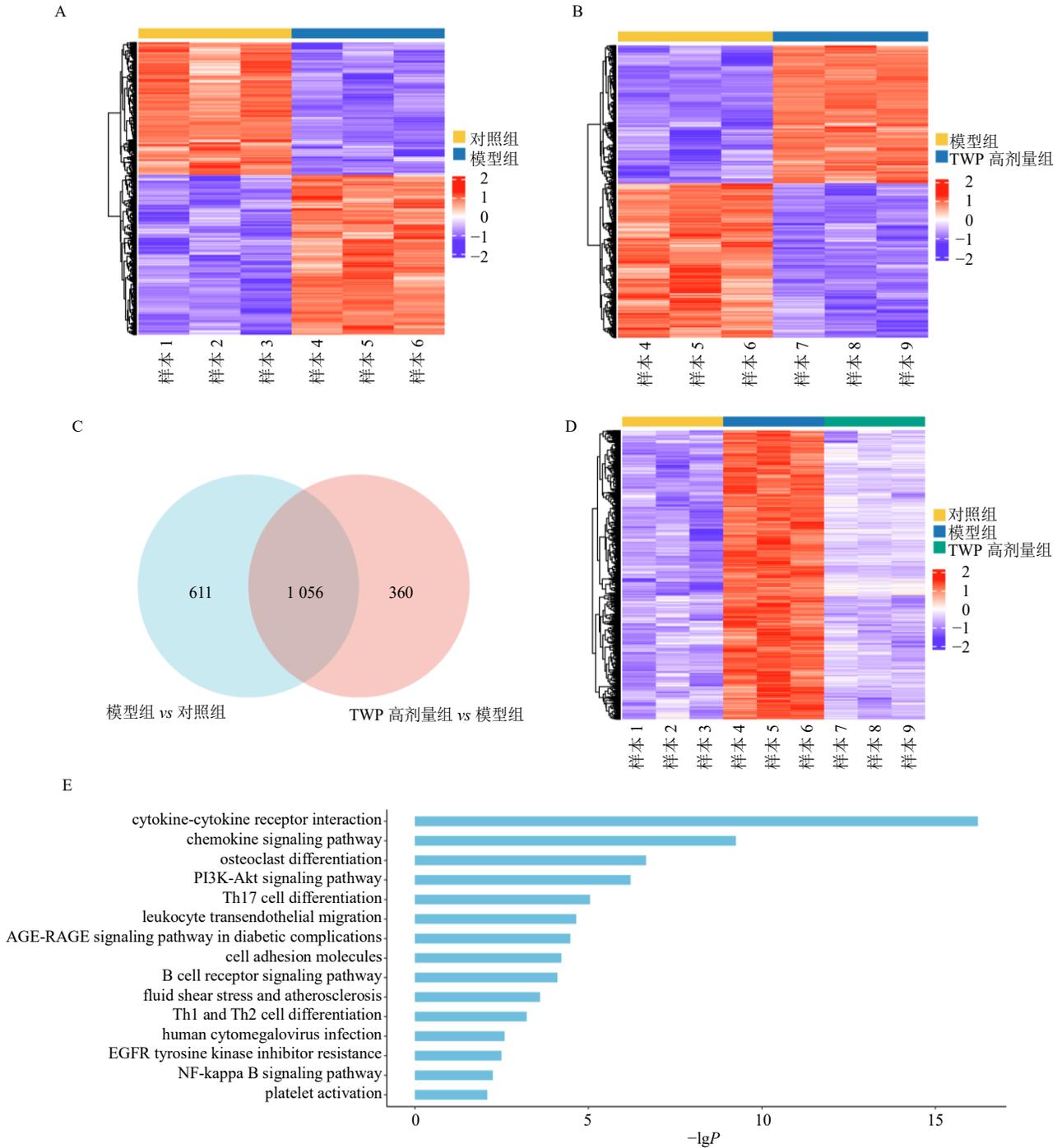


图2 TWP对UC大鼠结肠组织病理变化的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Effect of TWP on pathological changes of colon tissue in UC rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)



A-模型组 vs 对照组的 DEGs; B-模型组 vs TWP 高剂量组的 DEGs; C-对照组 vs 模型组与模型组 vs TWP 高剂量组 DEGs 的韦恩图; D-DEGs 在对照组、模型组和 TWP 高剂量组中的表达水平; E-DEGs 的富集分析。

A-DEGs in model group vs control group; B-DEGs in model group vs TWP high-dose group; C-Venn diagram of DEGs between control group vs model group and model group vs TWP high-dose group; D-expression levels of DEGs in control group, model group and TWP high-dose group; E-enrichment analysis of DEGs.

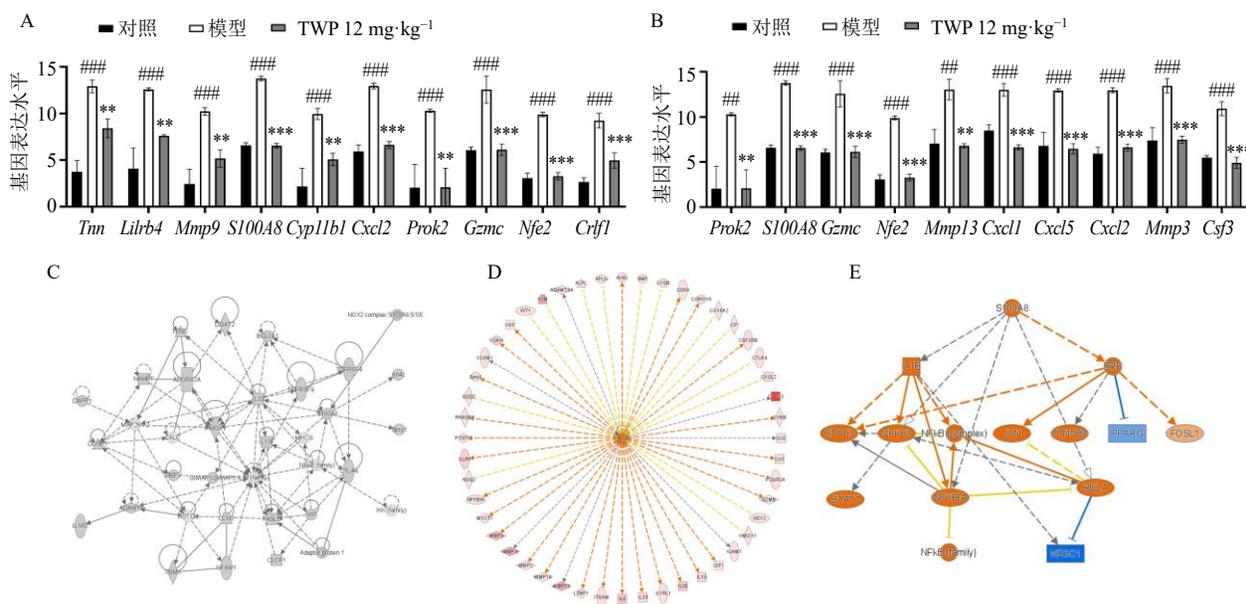
图 3 基于表达谱芯片分析 UC 炎症及 TWP 治疗应答相关的 DEGs

Fig. 3 Analysis of DEGs related to UC inflammation and TWP treatment response based on expression profiling chip

3.3 对 UC 炎症反应和 TWP 干预敏感的基因

挑选模型组上调的前 10 个 DEGs 和 TWP 高剂量组下调的前 10 个 DEGs 进行基因表达水平分析 (图 4-A、B), 发现 *S100A8*、*Cxcl2*、*Prok2*、*Gzmc*、

Nfe2 基因的表达模式体现了模型组上调前 10 和 TWP 高剂量组下调前 10 的联动关系, 其中联动效应最显著的是 *S100A8*, 其在模型组中表达较对照组上升 143 倍, 经 TWP 干预后 *S100A8* 的表达量下降



A-模型组上调的前 10 个 DEGs 的表达情况；B-TWP 组下调的前 10 个 DEGs 的表达情况；C-基因互作分析；D-调控因子分析；E-调控网络分析。

A-expression of top 10 DEGs up-regulated by model group; B-expression of top 10 DEGs down-regulated by TWP group; C-intermolecular interaction analysis; D-regulatory factor analysis; E-regulating network analysis.

图 4 S100A8 对 UC 炎症反应及 TWP 干预敏感 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 S100A8 is sensitive to UC response and TWP intervention ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

148 倍,并且在炎症环境中 TWP 的干预使得 *S100A8* 出现了不同方向的剧烈变化,提示 *S100A8* 可能是 UC 炎症的核心基因,而 TWP 对其具有明显的调控作用。

采用上述 DEGs 同步输入 IPA 进行分子间相互作用网络分析,根据图 4-C 所示, *S100A8* 基因通过互作网络调节 NF- κ B 家族、白细胞介素-12 (interleukin-12, IL-12) 家族等蛋白表达。根据 IPA 的调控因子分析(图 4-D)和调控网络分析(图 4-E),显示 *S100A8* 调控着 NF- κ B 通路及下游基因差异表达。因此,表达谱芯片分析提示, TWP 可能是通过 *S100A8* 这个重要炎症介质,从而调控 UC 中与 *S100A8* 致炎密切相关的下游一系列基因表达或者信号通路的变化。

3.4 TWP 对 UC 大鼠结肠组织中联动基因表达的影响

通过 qRT-PCR 检测了 *S100A8*、*Cxcl2*、*Prok2*、*Gzmc*、*Nfe2* 基因在各组大鼠结肠组织的表达情况(图 5-A),结果显示各基因表达在模型组大鼠结肠组织中出现不同程度的升高 ($P < 0.001$), TWP 干预后各基因表达均出现不同程度的下降 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001),其中 *S100A8* 在模型组大鼠结肠中升

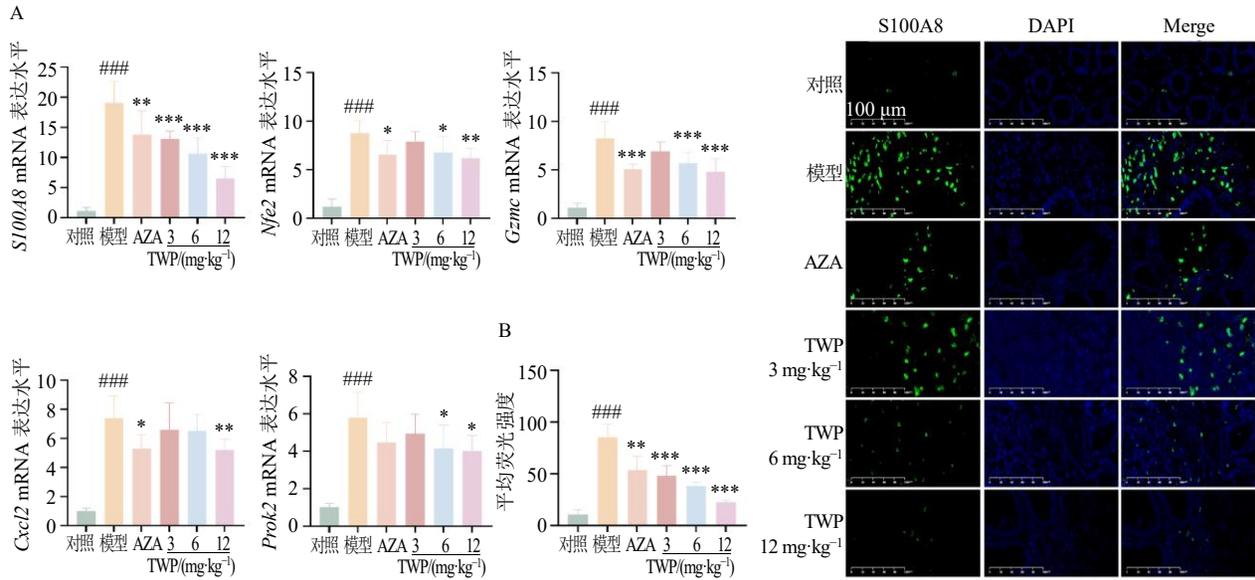
高最显著,并且 TWP 能显著抑制其表达,并呈剂量相关性。采用免疫荧光检测 *S100A8* 在各组结肠组织中的表达情况(图 5-B),与对照组比较,模型组 *S100A8* 表达显著升高 ($P < 0.001$); TWP 干预后 *S100A8* 表达显著降低 ($P < 0.001$),且呈剂量相关性。表明 TWP 能显著调控其在 UC 中的联动基因 *S100A8* 的表达。

3.5 敲减 S100A8 显著抑制 LPS 诱导的 THP-1 细胞中 NF- κ B 通路激活

如图 6 所示,与 LPS 对照组和 NC-KD+LPS 组相比, *S100A8*-KD+LPS 组 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 值显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), TNF- α mRNA 及蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.001),表明敲减 *S100A8* 可以显著抑制 LPS 诱导的 THP-1 细胞中 TLR4/NF- κ B 通路激活,减轻细胞炎症反应。

4 讨论

TWP 已被证明具有抗炎特性,能缓解 UC 炎症活动^[3-4,8],但其具体的作用机制尚不明确。本研究采用 TNBS/乙醇法建立 UC 大鼠模型,通过对模型组 vs 对照组以及 TWP 高剂量组 vs 模型组进行表达谱芯片检测。从生物学意义来讲,1 个对 UC 有重要作用的靶基因,应该是 1 个在 UC 组织中表达

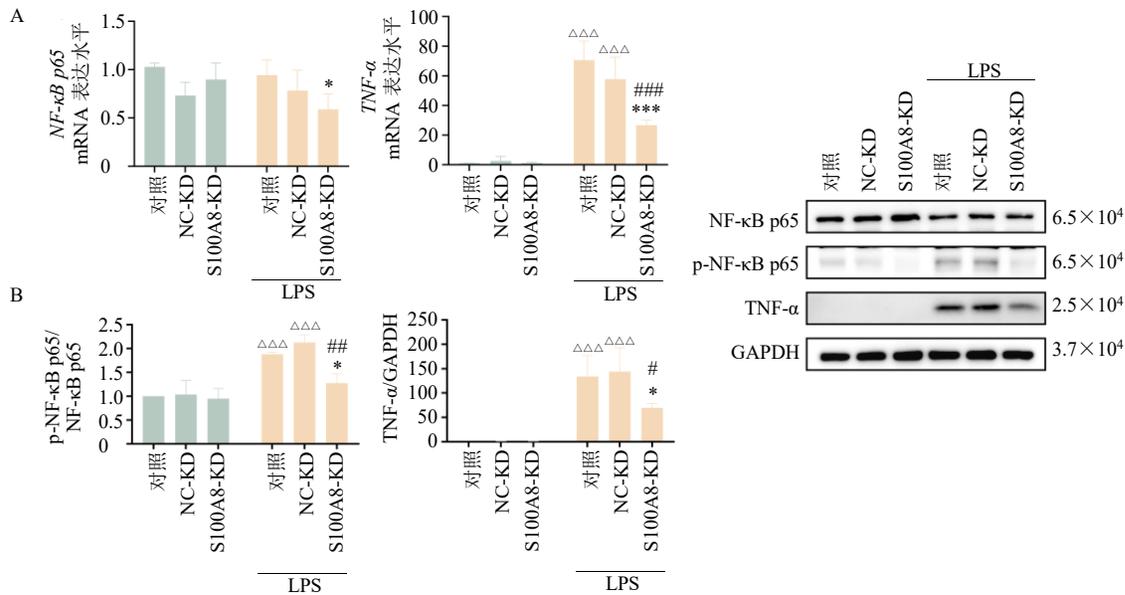


A-qRT-PCR 检测各组大鼠结肠组织中 *S100A8*、*Cxcl2*、*Prok2*、*Gzmc* 和 *Nfe2* 的 mRNA 表达水平；B-免疫荧光各组大鼠结肠组织中 *S100A8* 表达 ($\times 10$)。

A-mRNA expression levels of *S100A8*, *Cxcl2*, *Prok2*, *Gzmc* and *Nfe2* in colon tissues of rats in each group detected by qRT-PCR; B- *S100A8* expression in colon tissues of rats in each group detected by immunofluorescence ($\times 10$).

图 5 联动基因的表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 5 Expressions of linked genes ($\bar{x} \pm s, n = 8$)



A-qRT-PCR 检测 *NF-κB p65* 和 *TNF-α* 的 mRNA 表达水平；B-Western blotting 检测 *NF-κB p65*、*p-NF-κB p65* 和 *TNF-α* 的蛋白表达水平；与无 LPS 处理的相同组别比较： $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ ；与 LPS 对照组比较： $*P < 0.05$ $***P < 0.001$ ；与 NC-KD+LPS 组比较： $\#P < 0.05$ $##P < 0.01$ $###P < 0.001$ 。

A-mRNA expression levels of *NF-κB p65* and *TNF-α* detected by qRT-PCR; B-protein expression levels of *NF-κB p65*, *p-NF-κB p65* and *TNF-α* detected by Western blotting; $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs same group without LPS treatment; $*P < 0.05$ $***P < 0.001$ vs LPS control group; $\#P < 0.05$ $##P < 0.01$ $###P < 0.001$ vs NC-KD + LPS group.

图 6 敲减 *S100A8* 对 THP-1 细胞中 *NF-κB* 通路的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of *S100A8* knockdown on *NF-κB* pathway in THP-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

量发生剧烈上升或下降变化的基因;而要与TWP治疗应答具有关联的靶基因,应该是经TWP治疗后趋于或恢复正常的基因。按照这个标准,本研究发现*S100A8*、*Cxcl2*、*Prok2*、*Gzmc*、*Nfe2*基因的表达模式符合在模型组中表达量与对照组相比上调(前10名),并且在TWP高剂量组中表达量与模型组变化相反(前10名)。*S100A8*是一种钙结合蛋白,与其同源蛋白*S100A9*形成异二聚体,*S100A8/A9*的粪便水平已被证明与UC的炎症水平有着较好的相关性,可以反映UC肠道炎症活动度^[9-10]。*S100A8*在*S100A8/A9*异二聚体中仍是主要的活性成分,被认为是致炎因子,内源性*S100A8*生理状态下主要在中性粒细胞和单核细胞的胞质中表达,炎症刺激时被释放到细胞外区间发挥致炎作用,它更是中性粒细胞的潜在趋化因子,促进骨髓中性粒细胞向血液的迁移并聚集于炎症反应局部,在炎症过程中有举足轻重的地位^[11-13]。*Cxcl2*作为趋化因子,能够诱导免疫细胞聚集到炎症部位,加重肠道炎症反应^[14]。*Prok2*是一种炎症细胞因子样分子,胃肠道炎症会导致*Prok2*水平升高^[15]。*Gzmc*是一种细胞毒性蛋白酶,参与细胞毒性淋巴细胞介导的免疫反应^[16]。*Nfe2*转录因子调节氧化/外源性应激反应并抑制炎症^[17]。这些基因表达的协同升高反映了UC发病过程中炎症级联反应的激活、免疫细胞的过度浸润以及组织损伤的加重,而TWP治疗后这些基因表达的下降则提示其具有抑制炎症和免疫反应的治疗作用。

为了进一步验证以上基因与UC的关系,在动物实验中进行了相关检测,结果显示各基因在UC大鼠结肠中出现不同程度的升高,但*S100A8* mRNA表达增加更为显著,TWP干预后各基因均出现不同程度的下降,其中*S100A8* mRNA表达对于各剂量的TWP干预均有较好的反应,呈现出显著的剂量相关性。因此相比于其他基因,*S100A8*对于TWP干预具有良好的反应性。采用免疫荧光检测大鼠结肠中*S100A8*表达,发现*S100A8*荧光表达在模型组中显著增加,随着TWP的干预,其荧光表达逐渐降低,TWP高剂量组中表达最弱。

IPA结果进一步提示,*S100A8*可能与NF- κ B通路关联。目前研究也发现*S100A8*通过激活下游MyD88/NF- κ B信号通路,介导神经系统炎症、胆管癌转移等多种疾病^[11-13,18]。为了研究*S100A8*与NF- κ B通路的相关性,通过慢病毒转染构建了*S100A8*

敲减的THP-1细胞模型,以LPS诱导细胞炎症,结果发现相比于正常细胞,*S100A8*敲除细胞中NF- κ B通路并未被相应激活,末端炎症因子也未相应增加。这说明*S100A8*能调控NF- κ B通路,进而在疾病中起到炎症调控的作用。已有研究发现TWP调控信号通路的转导,抑制NF- κ B等UC标志性炎症蛋白的表达,从而发挥抗炎和免疫抑制作用^[19]。*S100A8*通过激活NF- κ B通路,诱导树突状细胞、Th1细胞活化,导致结肠炎症反应,而*S100A8*被降解后,肠道炎症活动随之减轻^[20]。并且IPA分子网络分析和调控网络分析也提示*S100A8*与NF- κ B通路关系密切,能调节下游基因差异表达。因此,有必要将UC发病以及TWP治疗UC均相关的靶基因瞄准到*S100A8*及下游的NF- κ B通路上。

本研究基于TWP免疫调控作用能缓解UC的炎症活动,聚焦UC炎症活动与TWP干预两者间共同依赖的基因与蛋白,通过大鼠结肠表达谱芯片检测分析发现*S100A8*是UC关键基因,也是TWP调控UC炎症的重要靶基因,另外IPA结果提示*S100A8*在UC炎症和TWP干预的机制,可能与NF- κ B通路高度相关。最后实验验证*S100A8*在大鼠UC活动期、TWP治疗后的表达水平与芯片表达谱的表达模式一致。综上,*S100A8*可能是UC炎症的核心基因,而TWP对其具有明显的调控作用,调控机制可能与下游NF- κ B通路相关。

致谢:浙江得恩德制药股份有限公司提供本研究所用雷公藤多苷。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Gros B, Kaplan G G. Ulcerative colitis in adults: A review [J]. *JAMA*, 2023, 330(10): 951-965.
- [2] Zhang D, Qu L, Wang Z, et al. Identification of the chemical components and metabolites of *Tripterygium glycoside* tablets in mice by HPLC-Q/TOF MS [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2019, 1125: 121721.
- [3] 钦丹萍, 王耀东, 倪桂宝, 等. 雷公藤多苷抑制炎症性肠病炎症活动的临床研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2018, 38(7): 779-785.
- [4] 钦丹萍, 周毅骏, 孙佩娜, 等. 雷公藤多苷对溃疡性结肠炎大鼠 TLR4/MyD88 非依赖信号通路的作用研究 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(6): 1093-1099.
- [5] Koetzner L, Grover G, Boulet J, et al. Plant-derived polysaccharide supplements inhibit dextran sulfate

- sodium-induced colitis in the rat [J]. *Dig Dis Sci*, 2010, 55(5): 1278-1285.
- [6] Geboes K, Riddell R, Ost A, *et al.* A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis [J]. *Gut*, 2000, 47(3): 404-409.
- [7] 周毅骏, 钦丹萍, 杨强, 等. 雷公藤多苷对 TNBS/乙醇溃疡性结肠炎大鼠脂质过氧化损伤的保护作用 [J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(5): 77-82.
- [8] Zhou Y J, Qin D P, Wang Y D, *et al.* Amelioration of *Tripterygium wilfordii* polycoride on TNBS/ethanol-induced ulcerative colitis via inhibiting lipid peroxidation and its downstream inflammatory mediators [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(4): 344-352.
- [9] Wang S W, Song R, Wang Z Y, *et al.* S100A8/A9 in inflammation [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1298.
- [10] 赵旦娅, 钦丹萍, 邵诗思, 等. 基于 S100A8/TLR4/NF- κ B 通路研究雷公藤多苷对溃疡性结肠炎铁死亡的影响 [J]. *中草药*, 2025, 56(10): 3523-3534.
- [11] Yang J, Xiang Z J, Zhang J, *et al.* miR-24 alleviates MI/RI by blocking the S100A8/TLR4/MyD88/NF- κ B pathway [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2021, 78(6): 847-857.
- [12] Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, *et al.* Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock [J]. *Nat Med*, 2007, 13(9): 1042-1049.
- [13] Lu S M, Yu C J, Liu Y H, *et al.* S100A8 contributes to postoperative cognitive dysfunction in mice undergoing tibial fracture surgery by activating the TLR4/MyD88 pathway [J]. *Brain Behav Immun*, 2015, 44: 221-234.
- [14] Wang J Y, Sun M M, Liu X, *et al.* Transcriptome analysis identifies genetic risk markers and explores the pathogenesis for inflammatory bowel disease [J]. *Biochim Biophys Acta BBA Mol Basis Dis*, 2024, 1870(3): 167013.
- [15] Watson R P, Lilley E, Panesar M, *et al.* Increased prokineticin 2 expression in gut inflammation: Role in visceral pain and intestinal ion transport [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2012, 24(1): 65-75.
- [16] Revell P A, Grossman W J, Thomas D A, *et al.* Granzyme B and the downstream granzymes C and/or F are important for cytotoxic lymphocyte functions [J]. *J Immunol*, 2005, 174(4): 2124-2131.
- [17] Kobayashi E H, Suzuki T, Funayama R, *et al.* Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11624.
- [18] Pan S G, Hu Y, Hu M J, *et al.* S100A8 facilitates cholangiocarcinoma metastasis via upregulation of VEGF through TLR4/NF- κ B pathway activation [J]. *Int J Oncol*, 2020, 56(1): 101-112.
- [19] 王包晟, 吴本升, 蒋峰, 等. 中医药干预 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路治疗溃疡性结肠炎研究综述 [J]. *山东中医药大学学报*, 2021, 45(4): 559-565.
- [20] Fujita Y, Khateb A, Li Y, *et al.* Regulation of S100A8 stability by RNF5 in intestinal epithelial cells determines intestinal inflammation and severity of colitis [J]. *Cell Rep*, 2018, 24(12): 3296-3311.

[责任编辑 李亚楠]