

紫萝卜花青素对溃疡性结肠炎小鼠的保护作用

刘晓丽¹,高彩芳²,沈浩¹,柳玉琴³,牛壮壮¹,冯茹^{2*},孙菁华^{4*}

(1.山西医科大学药学院,山西太原030001;

2.山西白求恩医院(山西医学科学院)山西医科大学第三医院 同济山西医院,山西太原030032;

3.山西医科大学基础医学院生化教研室,山西太原030001;

4.山西医科大学第一临床医学院,山西太原030001)

摘要:溃疡性结肠炎(Ulcerative Colitis, UC)是一种常见的炎症性肠疾病,严重威胁人类健康,尽管临床药物在治疗UC上取得了一些进展,但由于它们的副作用较大,因此寻找更安全、有效的新型治疗方法和治疗靶标仍然至关重要。本研究首先从紫萝卜中提取并纯化紫萝卜花青素(Purple Radish Anthocyanins, PRA)并用于UC小鼠的治疗。超氧阴离子清除率、活性氮自由基清除率及总抗氧化能力等测试证实PRA具有强大的抗氧化能力。通过葡聚糖硫酸钠(Dextran Sulfate Sodium, DSS)构建急性UC小鼠模型,采用低、中、高剂量PRA(50、100及200 mg/kg)进行口服治疗。研究结果表明PRA能够缓解小鼠UC症状,PRA通过多途径对UC小鼠提供保护作用:降低关键的促炎因子如肿瘤坏死因子(Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α)、白介素6(Interleukin-6, IL-6)和白介素1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)的水平;增加抗氧化酶如谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione Peroxidase, GSH-Px)与超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)的活性;减少脂质过氧化产物丙二醛(Malondialdehyde, MDA)的含量;以及上调结肠上皮细胞紧密连接蛋白ZO-1的表达,从而维持肠道屏障完整性。此外,UC小鼠的治疗效果与PRA的剂量呈正相关,200 mg/kg剂量下的PRA效果最佳。这些研究成果不仅拓展了PRA的生物学功能,同时为UC的治疗提供了新的选择。

关键词:紫萝卜花青素;溃疡性结肠炎;抗氧化活性;炎症因子

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:0253-2395(2026)02-0353-12

Protective Effect of Purple Radish Anthocyanins on Ulcerative Colitis

LIU Xiaoli¹, GAO Caifang², SHEN Hao¹, LIU Yuqin³, NIU Zhuangzhuang¹, FENG Ru^{2*}, SUN Jinghua^{4*}

(1. College of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

2. Shanxi Bethune Hospital, Shanxi Academy of Medical Sciences, Third Hospital of Shanxi Medical University, Tongji Shanxi Hospital, Taiyuan 030032, China;

3. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Science, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

4. The First Clinical College of Medicine, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract: Ulcerative colitis (UC) is a prevalent inflammatory bowel disease posing a significant threat to human health. Although some progress has been made in the treatment of UC with clinical drugs, due to their significant side effects, the search for novel treatments and therapeutic targets that are safer and more effective remains crucial. In this study, purple radish anthocyanins (PRA)

收稿日期:2024-04-01;修回日期:2024-08-10

基金项目:国家自然科学基金(32271429);山西省自然科学基金(202203021211243;202303021212344)

作者简介:刘晓丽(1991-),女,山西太原人,硕士研究生,研究方向为纳米医学。E-mail:liuxiaoli135531@163.com

*通信作者:冯茹(FENG Ru),E-mail:fengru812@163.com;孙菁华(SUN Jinghua),E-mail:sunjh0000@163.com

引文格式:刘晓丽,高彩芳,沈浩,等.紫萝卜花青素对溃疡性结肠炎小鼠的保护作用[J].山西大学学报(自然科学版),2026,49(2):353-364. DOI:10.13451/j.sxu.ns.2024123.

were extracted and purified from purple radish anthins and used for treating UC mice. The robust antioxidant capacity of PRA was demonstrated through its high clearance rates of superoxide anion and active nitrogen radicals, as well as total antioxidant capacity. Dextran sulfate sodium (DSS) induced acute ulcerative colitis mice model was orally administered with low, medium and high doses of PRA (50, 100, 200 mg/kg). The findings showed that PRA effectively alleviates UC symptoms in mice by reducing key pro-inflammatory factors such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 β (IL-1 β), increasing the activity of antioxidant enzymes like glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD), decreasing malondialdehyde content, and up-regulating the expression of tight junction protein ZO-1 in colon epithelial cells to maintain intestinal barrier integrity. Furthermore, the therapeutic effect on UC mice positively correlates with the dose of PRA, with optimal efficacy observed at a dose of 200 mg/kg. These results not only expand our understanding of the biological function of PRA but also offer a novel option for UC treatment.

Key words: purple radish anthocyanins; ulcerative colitis; antioxidant activity; Inflammatory factor

0 引言

溃疡性结肠炎(Ulcerative Colitis, UC)是一种易复发的肠道免疫性疾病,主要症状包括急性腹痛、腹泻、紧迫感以及黏液脓血便。近年来,全球的UC患病率不断上升^[1-2],并且已有研究表明UC与直肠癌的发病率相关^[3-4]。UC发病机制并不明确,和遗传因素、免疫因素、环境因素、肠道菌群都有一定的关系^[5]。目前,临床上治疗UC的药物主要包括氨基水杨酸、免疫调节剂、糖皮质激素及生物制剂等^[6]。然而,这些药物可能导致肾脏毒性、肝毒性及不育症等副作用^[3-4]。因此,迫切需要挖掘安全有效的UC治疗药物。

花青素,亦称花色素,是一种源自自然的食用色素,以其安全性、无毒性、环保特性和资源丰富而备受瞩目。这种色素在食品和医药等领域展现出了巨大的应用潜力^[5]。研究表明花青素具有缓解动脉粥样硬化的能力^[7-8],并具备抗突变、抗肿瘤、抗癌、抗菌消炎等多重功效^[9],同时还能清除自由基,发挥出色的抗氧化作用^[10]。随着生物技术与农业的不断发展,越来越多富含花青素的谷物、蔬菜、豆类、水果被发现,这些食物与我们的日常生活紧密相连。紫萝卜是一种广泛种植、产量高、性价比优越且营养丰富的蔬菜。它含有丰富的多酚类物质,特别是稳定性高、生物活性好的酰化花青素,对人体健康十分有益^[11]。动物实验研究和人体临床试验证据表明,从水果和蔬菜中提取的花青素可以预防肠道炎症,并对结肠健康有益^[12-15]。花青素的活性受多种因素影响,例如

pH值、糖苷键结构、消化酶的作用和肠道微生物群的组成^[16-17]。花青素的生物利用度是其发挥功能活性的基础,指的是花青素经过消化道吸收并进入血液循环的量。然而,由于花青素的化学性质不稳定且容易被降解,这限制了其生物可及性和生物利用度。

本实验旨在深入研究紫萝卜中花青素(Purple Radish Anthocyanins, PRA)的提取工艺,以及其清除活性氧自由基的能力和胃液稳定性等特性。同时,评价了不同剂量的PRA对葡聚糖硫酸钠(Dextran Sulfate Sodium, DSS)诱导的UC小鼠的治疗效果。实验结果显示,PRA能有效减轻结肠组织损伤、抑制促炎因子的产生、减轻氧化应激,并提高肠紧密连接蛋白的表达。这项研究为深入开发和研究UC的治疗方法提供了坚实的理论基础。

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 药品和试剂

紫萝卜(冠县沃泽农业科技有限公司);盐酸(质量分数37%,国药化学试剂北京有限公司,货号H9892);大孔树脂(LSA-10,北京中冉旭升科技发展有限公司,货号HA-0945-500g);质量浓度0.1g/mL水合氯醛(上海源叶生物科技有限公司,货号R21477);葡聚糖硫酸钠(DSS)(上海毕得医药科技有限公司,货号BD123894);福尔马林(北京索莱宝有限公司,货号G2161);1,1-二苯基-2-苦基肼自由基(DPPH Free Radical,上海梯希爱化成工业发展有限公司,CASRN1898-66-4);总抗氧化能力

(T-AOC)测定试剂盒(南京建成生物有限公司,货号A015-2-1);超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)清除试剂盒(南京建成生物有限公司,货号A052-1-1);谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测试盒(南京建成生物有限公司,货号A006-2-1);超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(南京建成生物有限公司,货号A001-3);丙二醛(MDA)测试盒(南京建成生物有限公司,货号A003-1);肿瘤坏死因子(TNF- α)测试盒(南京建成生物有限公司,货号H052-1-2);白介素-6(IL-6)测试盒(南京建成生物有限公司,货号H007-1-2);白介素-1 β (IL-1 β)测试盒(南京建成生物有限公司,货号H002-1-2)。

1.1.2 仪器

超声波清洗器(DS-7510DTH,上海生析超声有限公司);马尔文纳米粒度电位仪(ZS90, Malvern Instruments);紫外可见分光光度计(UV-6100,上海美谱达仪器有限公司);高效液相色谱法(S3000, Achromat Science and Technology);正置显微镜(Eclipse Ci-S, Nikon corporation Tokyo);酶标仪(Epoch2, Bio Tek)。

1.1.3 动物

所有小鼠均按照山西医科大学伦理委员会的指导方针进行(山西医科大学伦理委员会编号:SYDL2019002)。30只雄性C57BL/6小鼠(SPF(Specific Pathogen Free)级,14~16周龄,20 g~25 g)由山西医科大学动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 PRA的制备、纯化

将新鲜的紫萝卜切丝,60℃烘干并研磨成粉末;以pH=2~3的盐酸-75%乙醇溶液(体积分数)为提取液,料液比为1:5,温度为60℃,功率为450 W的超声条件下,提取30 min,共提取两次^[18-19]。提取液经抽滤去除残渣后注入已活化的大孔树脂(LSA-10)柱内吸附20 h,随后以体积分数60%乙醇溶液为洗脱液进行洗脱,纯化后再经50℃旋转蒸发浓缩后,放置至55℃真空干燥箱内36 h,得到PRA粉末,放置到4℃冷藏备用。

1.2.2 高效液相色谱分析

采用高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)对产品中花青素定

性分析,并结合相关文献推测其组分^[19]。将1.0 mg花青素溶于5 mL蒸馏水中,用0.45 μm 滤过膜过滤,并超声至无气泡;取20 μL 注入AlphasilVC-C18色谱柱(5 μm , 4.6 mm \times 150 mm),流动相为乙腈(溶剂A)和磷酸:甲酸:乙腈:蒸馏水(体积比1:10:5:84,)(溶剂B),流速为1.0 mL/min,柱温40℃,在530 nm处检测吸光度。洗脱方案如下:0 min:1% A、99% B;10 min:12% A、88% B;20 min:15% A、85% B;25 min:32% A、68% B;30 min:1% A、99% B(百分数均指体积分数)。

1.2.3 模拟胃液中的稳定性实验

取23.4 mL浓盐酸加水稀释至100 mL,取稀盐酸16.4 mL,调节至pH=2,再向其加入1.0 g胃蛋白酶,搅拌均匀,用无菌水定容至100 mL得到模型人工胃液,用0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌,备用。取PRA粉末加入模拟人工胃液中,配成25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,置于37℃恒温摇床中180 r/min振荡120 min,分别在0、30、60、120 min时取3 mL溶液进行紫外吸收光谱测定,以模拟胃液作为空白对照。

1.2.4 二苯基苦基苯肼(DPPH)实验

准确称取2.0 mg DPPH,溶解于40 mL无水乙醇中,配成浓度为0.05 mg/mL的DPPH无水乙醇,将上述合成的PRA粉末溶于水,分别配成12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液。将2 mL PRA溶液分别与1 mL DPPH无水乙醇溶液在黑暗环境中充分混合30 min,以各浓度2 mL PRA溶液与1 mL无水乙醇溶液混合后溶液为基线,测定在517 nm波长处的吸光度。 A_0 为不含样品的DPPH无水乙醇组, A_1 为含样品的DPPH无水乙醇组。清除率的计算公式如下:DPPH清除率(%) = $[1 - (A_1 - A_0) / A_0] \times 100\%$ 。

1.2.5 超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)清除能力测定

根据超氧阴离子检测试剂盒的说明书配制显色剂和应用液,将PRA溶液与应用液混合。根据说明书中添加的不同溶液,分别配成各浓度的对照管和测定管。PRA溶液的最终浓度为12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。用涡旋混匀器混匀,放入37℃恒温水浴40 min。加入显色剂,室温静置10 min。蒸馏水为基线调零,530 nm处测定对照管和测定管的紫外吸光值,

分别为 $A_{\text{对照管}}$ 和 $A_{\text{测定管}}$ 。超氧阴离子清除率计算公式为： $\cdot\text{O}_2^-$ 清除效率 (%) = $(1 - A_{\text{测定管}} / A_{\text{对照管}}) \times 100\%$ 。

1.2.6 总抗氧化能力检测试剂盒测定

按照总抗氧化能力检测试剂盒说明书制备 2, 2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)法 (2, 2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) method, ABTS) 工作液和试剂 4 应用液, 将工作液与试剂 4 应用液和 PRA 溶液加入 96 孔板中, 室温暗箱孵育 6 min。PRA 溶液的最终浓度分别为 12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。利用酶标仪测定 450 nm 处的吸收值, 并根据标准曲线计算出 PRA 的总抗氧化能力。

1.2.7 DSS 诱导的 UC 小鼠模型及实验设计

所有小鼠置于温度 (22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 和湿度 (50 ± 5)% 控制的环境中, 光照/黑暗循环 12 h。适应一周后, 将 30 只小鼠随机分为对照组 (Control 组)、模型组 (DSS 组)、柳氮磺吡啶 50 mg/kg (DSS+Sulfa 组)、PRA50 mg/kg (DSS+PRA-LD 组)、PRA100 mg/kg (DSS+PRA-MD 组) 和 PRA200 mg/kg (DSS+PRA-HD 组) 5 组 (每组各 6 只)。将 2.5 g DSS 溶于 100 mL 水中配成质量浓度 25 g/L DSS 溶液, 替代 C57BL/6 的日常饮用水, 自由饮用连续 7 d。1 d~10 d, 各组小鼠自由饮水, 11 d~17 d, 除对照组外, 其余四组饮水量为 25 g/L DSS 溶液 7 d, 同时 1 d~17 d 各组均用下列药物进行灌胃: 蒸馏水 (Control 组), 蒸馏水 (DSS 组), 柳氮磺吡啶 50 mg/kg, PRA50 mg/kg, PRA100 mg/kg, PRA200 mg/kg, 每天 1 次, 连续 17 d。实验第 18 d, 颈椎脱臼法处死所有小鼠, 采集末端结肠标本备用。

1.2.8 疾病活动性指数 (Disease activity index, DAI)、结肠长度的评价

在 DSS 处理期间, 每天记录体重、粪便特征和粪便中是否有血, 并按 0 到 4 分进行评分: 体重减轻 (0: 0~1%; 1: 1%~5%; 2: 5%~10%; 3: 10%~15%; 4: >15%, 百分数指质量分数); 大便稠度 (0: 正常; 2: 稀便; 4: 腹泻); 大便出血情况 (0: 正常; 2: 有血; 4: 总出血)。DAI 以上参数的平均分计算^[20]。实验结束后处死动物, 切除结肠, 测量盲肠结肠交界处到直肠近

端的距离并拍照。

1.2.9 病理学检测 (H&E 染色)

在实验结束时, 迅速获取肠道组织样本, 使用精细的镊子细致地去除多余的结缔组织, 并通过生理盐水冲洗去除残留的血迹。接着, 将样本浸入福尔马林溶液中进行固定处理, 并采用石蜡包埋技术保存。对于石蜡包埋的样本, 需进行脱蜡处理以备染色: 先将切片浸泡在环保型脱蜡液 I 中约 20 min, 再转移到环保型脱蜡液 II 中同样处理 20 min。之后, 将切片分别在无水乙醇 I 和无水乙醇 II 中各浸泡 5 min, 最后在体积分数 75% 酒精中浸泡 5 min, 并使用自来水彻底清洗。对于冰冻切片, 需从 -20°C 的低温环境中取出, 待其恢复至室温后, 使用专门的固定液进行 15 min 的固定, 并用流动的水清洗。在预处理阶段, 将切片浸泡在高清恒染预处理液中约 1 min。随后进行苏木素染色: 将切片在苏木素染液中浸泡 3 min~5 min, 用自来水清洗, 然后在分化液中分化, 再次用自来水清洗, 并在返蓝液中返蓝, 最后用流动的水清洗。接下来进行伊红染色: 将切片在体积分数 95% 的酒精中脱水 1 min, 然后放入伊红染液中染色 15 s。最后, 进行脱水封片: 将切片依次放入无水乙醇 I、无水乙醇 II、无水乙醇 III、正丁醇 I、正丁醇 II、二甲苯 I 和二甲苯 II 中, 每个步骤 2 min, 以达到透明效果。最后使用中性树胶封片, 并在显微镜下进行镜检和图像采集分析。

1.2.10 免疫荧光分析

对结肠组织进行了固定和包埋处理。继而, 对石蜡切片进行脱蜡处理, 以准备后续的染色步骤: 将切片依次放入环保型脱蜡液 I、II、III 中各 10 min, 以及无水乙醇 I、II、III 中各 5 min, 最后用蒸馏水清洗。随后进行抗原修复处理, 使用 pH 8.0 的 EDTA (Ethylenedia Minetetraacetic Acid) 缓冲液, 在微波炉中中火加热 9 min 后停止加热 8 min, 再转为中火加热 7 min。修复完成后, 让玻片自然冷却, 并将其放入 pH 7.4 的 PBS (Phosphate Buffered Saline) 中, 在脱色摇床上洗涤 3 次, 每次 5 min。接着进行血清封闭, 用组化笔在组织周围画圈, 并滴加 BSA, 封闭时间为 30 min。之后, 加入配制

好的一抗,将切片平放在湿盒中,在4℃下孵育过夜。第二天,将玻片置于PBS中,在脱色摇床上洗涤3次,每次5 min,然后加入相应的二抗,在避光条件下室温孵育50 min。为了复染细胞核,将玻片置于PBS中,在脱色摇床上洗涤3次,每次5 min,加入DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)染液,避光室温孵育10 min。为了淬灭组织的自发荧光,将玻片置于PBS中,在脱色摇床上洗涤3次,每次5 min,加入自发荧光淬灭剂B液,处理5 min后,用流水冲洗10 min。最后,使用抗荧光淬灭封片剂进行封片,以完成组织切片的制备。并在显微镜下进行镜检和图像采集分析。

1.2.11 炎症细胞因子的测定及生物化学分析

取1 cm结肠组织用冰冷的PBS冲洗,称重约50 mg~100 mg,记录体重,并用PBS稀释蛋白酶抑制剂100倍,取1 mL蛋白酶抑制剂稀释液加入组织匀浆机中匀浆,匀浆液在4℃下3 000 r/min离心10 min,获得上清液。使用小鼠特异性酶联免疫吸附测定(Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)试剂盒检测TNF- α 、IL-6和IL-1 β 。蛋白质含量采用BCA蛋白测定试剂盒测定,结果以pg/ μ g蛋白表示。此外,采用相应的商业试剂盒评估结肠匀浆中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性、超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)水平。

1.2.12 体内安全性评估

雄性C57BL/6小鼠PRA(200 mg/kg)治疗17天后,第18天每组小鼠采取眼球取血的方式进行血液采集,血液样本用4℃高速离心机以3 500 r/min的速度离心10 min,取出上清,进行血生化评价:谷丙转氨酶(Alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(Aspartate aminotransferase, AST)、白蛋白(albumin, ALB)、血尿素氮(Blood urea nitrogen, BUN)、血肌酐(Serum creatinine, SCR);另外采集主要脏器(心、肝、脾、肺、肾)进行组织病理学评价。

1.2.13 统计分析

所有数据均采用SPSS 25.0进行统计分析,所有结果均以均数 \pm 标准差($\bar{M} \pm SD$)表示。采用单因素方差分析进行组间比较,设置95%置信区间,当 $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 PRA的提取、分离和纯化

为了避免PRA的氧化并提高提取效率,制备过程需要迅速进行。首先,在体积分数95%乙醇浸泡大孔树脂LSA-10超过24 h,然后依次使用质量分数5% HCl溶液酸化和质量分数4% NaOH溶液碱化处理,之后用大量蒸馏水冲洗至中性,并将活化后的大孔树脂湿法装柱,备用。制备好PRA粗提取液后进行上样,上样速率为1 mL/min,上样后静置约20 h使得大孔树脂对花青素充分吸附。随后进行洗脱,洗脱剂采用体积分数60%乙醇,洗脱速率为2 mL/min,并根据颜色变化调整洗脱量。当下样颜色从暗紫色变为浅紫色时停止洗脱,并取暗紫色部分作为纯化完成液。随后经旋转蒸发仪减压蒸馏和真空干燥即可得PRA粉末。将提取得到的PRA配成低、中、高剂量溶液,并口服给予DSS诱导的UC小鼠进行实验,实验示意图如图1所示。

2.2 PRA组分分析与抗氧化能力

依据参考文献[21]及图2(a)HPLC结果,初步判断紫萝卜含有的花青素主要是矢车菊素花色苷,且主要的成分为矢车菊素-3-半乳糖基-葡萄糖苷-阿魏酸与矢车菊素-3-半乳糖基-木糖基-葡萄糖基-芥子酸。

图2(b)为PRA在水溶液中的紫外吸收光谱图,可观察到在528 nm处存在明显的吸收峰,与文献[22]报道花青素的紫外-可见吸收光谱一致。此外,图2(c)为PRA在模拟胃液中的紫外吸收光谱。结果显示随着时间推移,即0 min、30 min、60 min、90 min及120 min后,PRA的紫外吸收光谱未发生明显变化,这表明PRA能够在恶劣的胃酸环境下保持稳定,并能够通过口服途径进行肠道递送以治疗UC。

本研究以 $\cdot O_2^-$ 、DPPH \cdot 、ABTS $^+$ 作为典型的活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)及其衍生物,探讨PRA的自由基清除能力。首先研究了PRA对 $\cdot O_2^-$ 的清除性能。如图2(d)所示,随着PRA浓度的升高, $\cdot O_2^-$ 的清除能力明显提高,且PRA的 $\cdot O_2^-$ 清除能力与其浓度成正比。图2(e)为PRA的DPPH清除率,PRA浓度在100 μ g/mL以上时,DPPH的清除率达

95%以上,证明PRA有良好的自由基清除能力。如图2(f)为PRA的总抗氧化能力(T-AOC),结果显示PRA对 $ABTS^+ \cdot$ 具有显著

的清除能力。综上所述,PRA具有显著的广谱ROS清除能力,提示PRA可能具有抗氧化应激的能力。

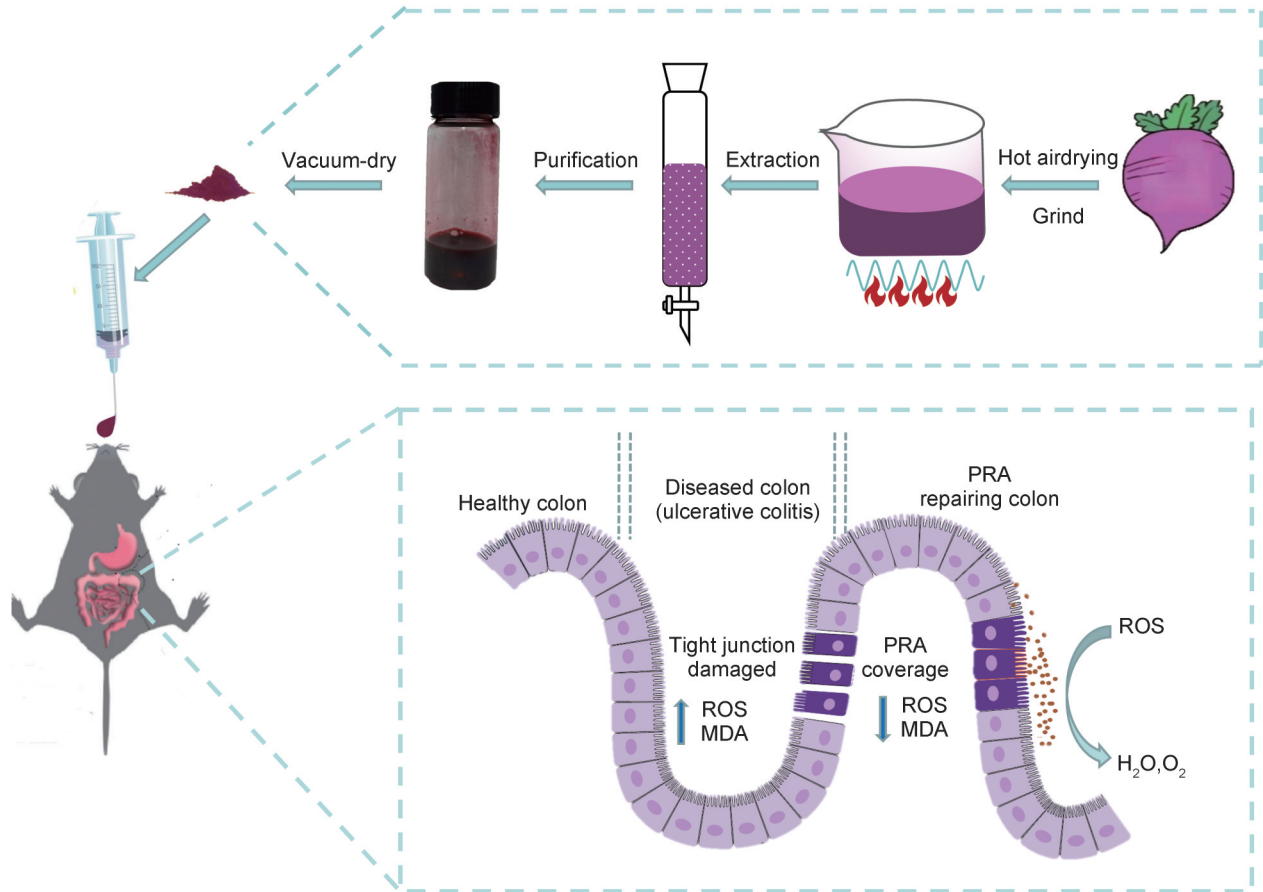


图1 PRA制备过程及PRA治疗UC示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the preparation process of PRA and PRA treatment for UC

2.3 PRA缓解结肠炎性损伤

本研究采用了连续17天灌胃的方法来探究PRA在UC小鼠的作用,比较了PRA与柳氮磺吡啶体内研究的抗结肠炎作用,动物实验设计如图3(a)所示,DSS干预期间记录了小鼠每天的体重变化。图3(b)的结果显示,与对照组相比,DSS组体重显著下降15.4%,表明成功建立了UC小鼠模型。与对照组相比,Sulfa组、低、中、高剂量的PRA组体重分别下降分别为12.1%、10.9%、10.1%和7.6%,表明柳氮磺吡啶及PRA均可缓解UC小鼠的体重下降,其中剂量为200 mg/kg的PRA组效果最佳,说明PRA对UC具有一定的缓解作用。图3(c)展示了不同组小鼠肛门的代表性照片,可以观察到DSS组小鼠的鲜血便明显,而柳氮磺吡啶及PRA

低、中剂量组小鼠的便血情况有所改善,PRA高剂量组明显改善了小鼠便血的情况。此外,DAI评分被广泛应用于评估UC严重程度,DAI越高说明小鼠肠道组织损伤越严重。图3(d)显示了各组小鼠的DAI评分,DSS组DAI评分随着时间的延长而逐渐增加,第17天时达 (10 ± 1.41) 分,明显高于正常对照组;然而,与DSS模型组相比,柳氮磺吡啶、低、中、高剂量的PRA组DAI评分分别为 (9.0 ± 1.03) 、 (7.4 ± 1.67) 、 (6.66 ± 1.14) 、 (3.66 ± 1.87) 分,表明PRA可以显著降低UC小鼠的DAI评分,且具有剂量依赖性。因此,PRA在缓解结肠炎引起的腹泻和便血方面表现出一定的缓解作用。在DSS诱导的结肠炎模型中,结肠长度是评估疾病严重程度的标志^[23]。图3(e—f)显

示了DSS模型组小鼠结肠长度明显缩短,而柳氮磺吡啶及PRA治疗可以缓解结肠炎小鼠结肠长度的缩短,明显改善了结肠炎情况。脾脏指数在UC的发病阶段可作为疾病发展的指标。如图3(g—h)显示,DSS组的脾脏指数较对照组

显著上升,给予药物治疗后各组下降,200 mg/kg的PRA治疗最为明显,这与解剖时脾脏照片呈现的大小关系基本一致。综上所述,柳氮磺吡啶及PRA可减轻DSS诱导的UC的严重程度,其中剂量为200 mg/kg的PRA效果最佳。

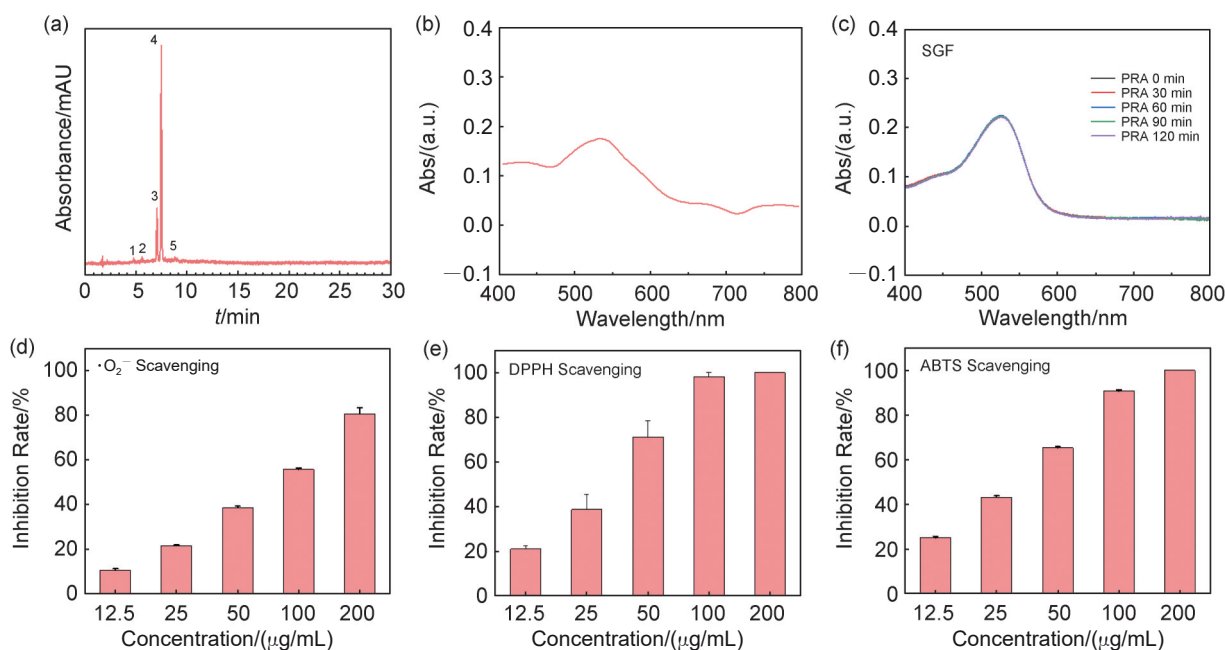


图2 PRA表征及抗氧化能力

(a) PRA的HPLC图;(b) PRA的紫外吸收光谱;(c) PRA在模拟胃液中的紫外吸收光谱;(d—f) 分别为PRA的 $\cdot\text{O}_2^-$ 清除率、DPPH清除率、总抗氧化能力(ABTS)。

Fig. 2 PRA characterization and antioxidant capacity

(a) HPLC diagram of PRA; (b) Ultraviolet absorption spectrum of PRA; (c) PRA ultraviolet absorption spectrum in simulated gastric juice; (d-f) $\cdot\text{O}_2^-$ inhibition rate of PRA, DPPH inhibition rate, and total antioxidant capacity (T-AOC) activity of PRA.

通过测定结肠组织中的炎症细胞因子(TNF- α 、IL-6和IL-1 β)以评估PRA的潜在抗炎作用。与对照组相比,DSS模型组的炎性细胞因子水平显著升高。相比之下,经PRA治疗后,结肠组织中炎性细胞因子水平显著降低,与PRA剂量呈正相关。此外,柳氮磺吡啶处理降低了IL-1 β 和IL-6,但不降低TNF- α (图4(a)—(c))。这表明,PRA处理可以有效减轻DSS诱导的小鼠结肠炎的炎症程度,且200 mg/kg剂量的PRA对UC的保护作用较强,同时也表明PRA的效果明显高于柳氮磺吡啶。

通过检测三种主要氧化应激标志物(MDA、SOD、GSH-Px)水平来评估PRA的抗氧化作用。如图4(d)所示,模型组小鼠结肠组织GSH-Px活性(1.59 \pm 0.22)明显低于对照组,相比之下,所有治疗组的GSH-Px活性有所升高。

由图4(e)显示,与正常组相比,DSS组SOD水平明显降低,而所有治疗组中,PRA-HD组的SOD水平提升最为显著。MDA的含量可反映脂质过氧化的程度,正常情况下其在组织细胞内的水平较低,而DSS组MDA水平升高。经过治疗后,各组MDA水平均有所降低,其中PRA-HD组MDA水平降低为显著,如图4(f)所示。这些结果证实柳氮磺胺吡啶及PRA治疗可有效抑制结肠组织的氧化应激,PRA剂量与氧化应激指标变化呈线性相关,且200 mg/kg剂量的PRA三种氧化应激指标更接近于正常组小鼠。

通过对各组小鼠的组织病理学分析来评估PRA对结肠炎小鼠的影响。H&E染色如图5(a)所示,对照组结肠组织结构正常,柱状上皮致密,肠隐窝完整,未见组织学异常。相反,DSS模型组结肠糜烂,上皮破坏,黏膜损伤,隐窝消失,黏

膜下层和肌层炎症细胞浸润。然而, Sulfa 组及 PRA 各剂量治疗组均减轻这些症状。这些结果

表明, PRA 治疗, 特别是 200 mg/kg 的剂量, 对减轻 DSS 诱导的结肠组织损伤最有效。

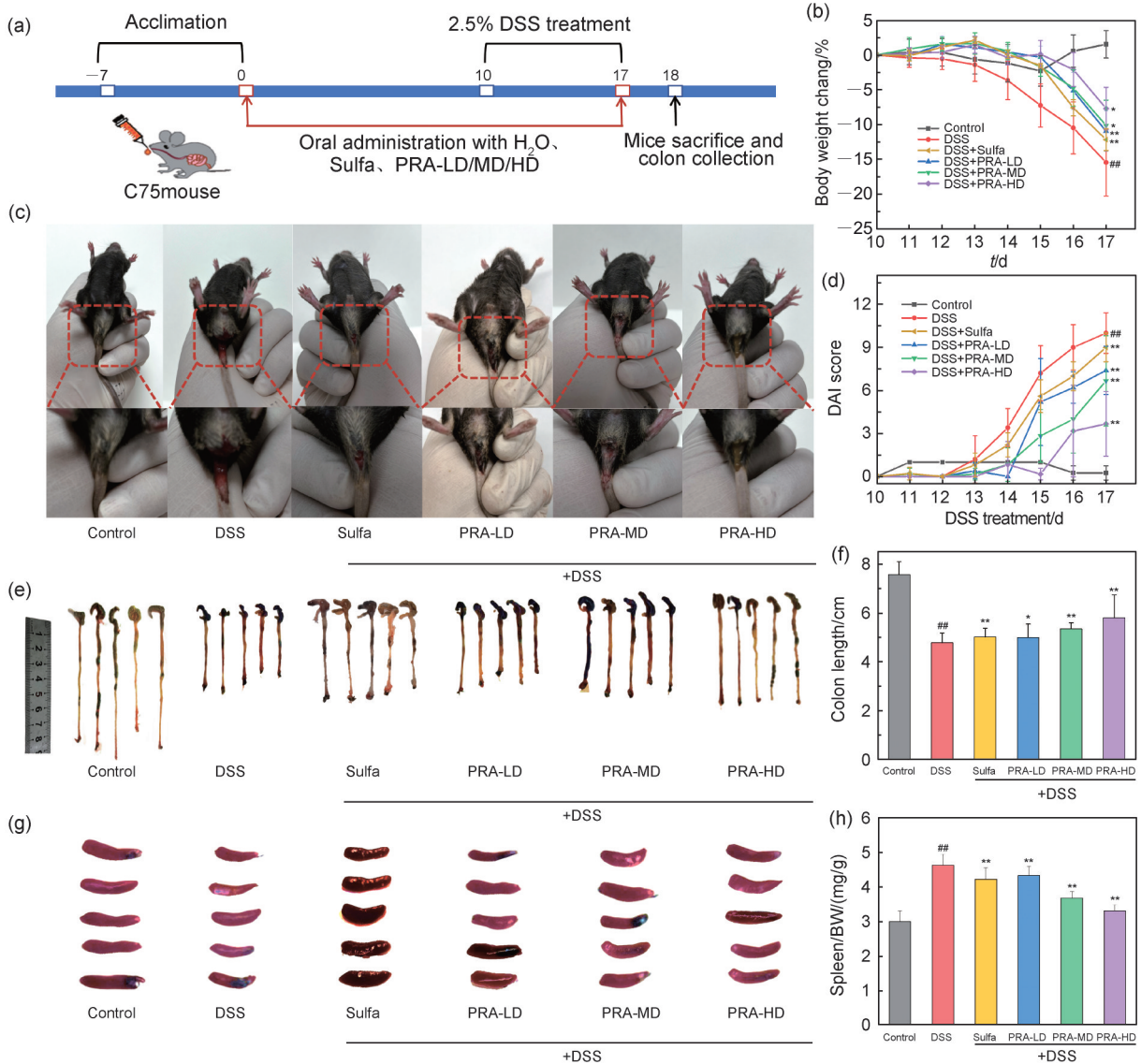


图3 PRA对DSS诱导的UC小鼠的治疗作用

(a) 实验设计示意图; (b) 小鼠体重; (c) 小鼠肛门及便血照片; (d) 疾病活动指数(DAI)评分; (e) 第18天各组小鼠结肠长度代表性照片; (f) 小鼠结肠长度定量分析; (g) 各组小鼠脾脏代表照片; (h) 各组小鼠脾/体重比。均值±标准差, n = 6。

##P < 0.01 对比正常组; *P < 0.05, **P < 0.01 对比模型组。

Fig. 3 Therapeutic effect of PRA on DSS-induced UC in mice

(a) Schematic diagram of experimental design; (b) Body weight of mice; (c) Photos of blood in the anus and stool of mice; (d) Disease activity index (DAI) score; (e) Representative photos of colon length of mice in each group on day 18; (f) Mouse colon length; (g) Representative photos of spleen of mice in each group; (h) Spleen / body weight ratio of mice in each group. Mean ± SD, n = 6.

##P < 0.01 vs normal group; *P < 0.05, **P < 0.01 vs model group.

根据文献研究, ZO-1 (Zonula Occludens-1) 蛋白是肠道紧密连接相关的重要蛋白, 它在维持肠道屏障完整性和防止上皮渗漏中扮演关键角色^[22]。本研究采用了免疫荧光方法来探究

PRA对肠道屏障ZO-1蛋白表达水平的影响, 结果如图5(b)所示, DSS组的上皮屏障受到严重破坏, ZO-1信号分布异常。然而, 随着PRA给药剂量的增加, 结肠炎小鼠结肠组织中ZO-1

蛋白的表达量逐渐增加。尤其是高剂量 PRA 处理能够显著上调结肠炎小鼠 ZO-1 蛋白的表达水平。综上所述,这些结果表明 PRA 通过促

进 ZO-1 蛋白的表达来修复受损的肠道黏膜屏障,且 PRA 剂量为 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,肠道 ZO-1 蛋白表达接近于正常小鼠。

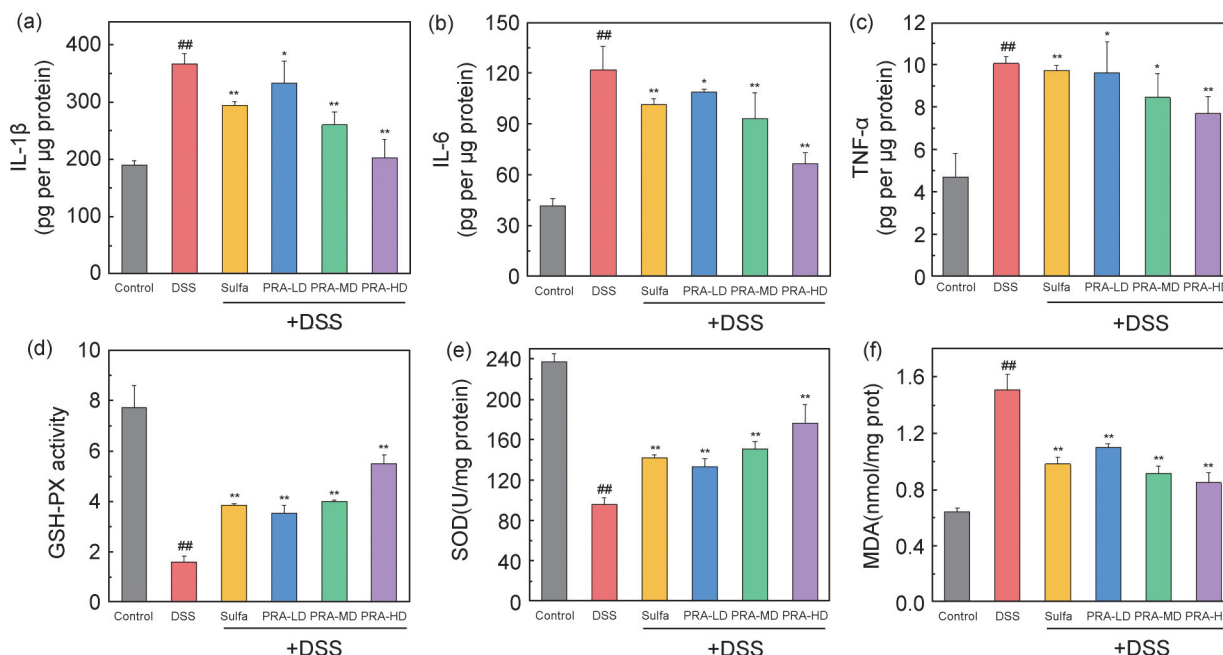


图4 PRA对UC小鼠结肠组织中炎性细胞因子和酶活性的影响

(a—c) 分别为各组细胞因子IL-1β、IL-6、TNF-α水平;(d—f) 分别为结肠组织谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)水平。均值 ± 标准差, n = 6。^{##}P < 0.01对比正常组; *P < 0.05, ^{**}P < 0.01对比模型组。

Fig. 4 The effect of PRA on inflammatory cytokines and enzymes in colon tissue of UC mice

(a-c) The levels of cytokines IL-1β, IL-6 and TNF-α in each group, respectively; (d-f) The activities of glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in colon tissues of each group, respectively. Mean ± SD, n = 6.

^{##}P < 0.01 vs normal group; *P < 0.05, ^{**}P < 0.01 vs model group.

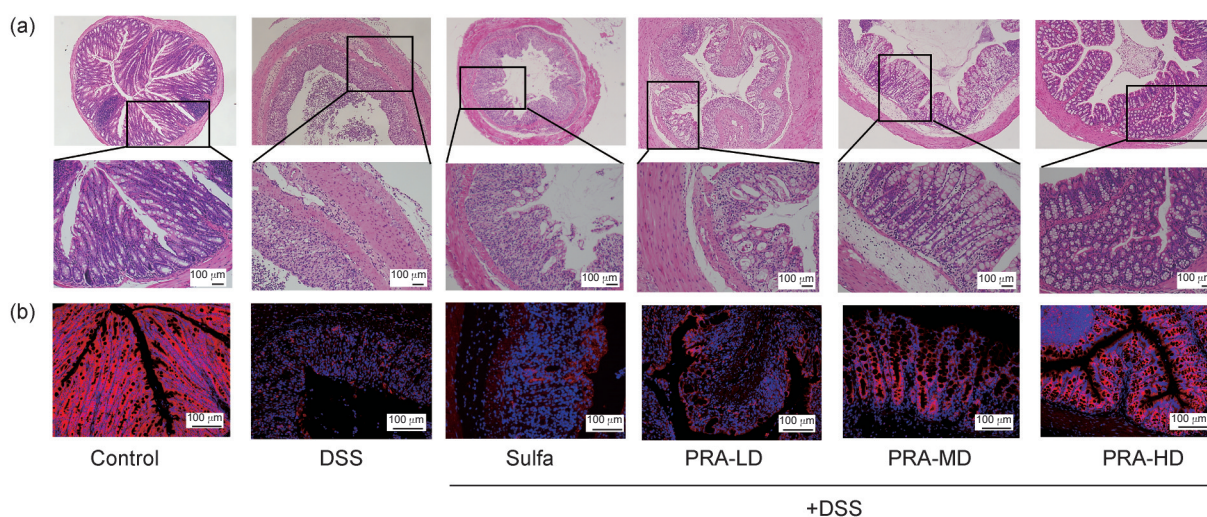


图5 PRA对UC小鼠结肠组织病理损伤的影响

(a) 结肠组织代表性H&E染色,比例尺 = 100 μm;(b) 小鼠结肠中ZO-1蛋白表达的代表性免疫荧光图像,比例尺 = 100 μm。

Fig. 5 The effect of PRA on pathological damage of colonic tissue in UC mice

(a) Representative H&E staining section of colon, scale = 100 μm; (b) Representative immunofluorescence images of ZO-1 protein expression in mouse colon, scale = 100 μm.

2.4 PRA的生物安全性

本研究中的PRA是从可食用的紫萝卜中提取,为验证其生物学安全性,本实验观察连续17天接受高剂量PRA处理后小鼠的主要器官的组织病理学以及肝肾功能指标变化。组织病理学变化如图6(a)所示,结果显示对照组与PRA组

之间组织病理学几乎没有差异。此外,血清生化检测结果如图6(b)示,PRA处理后小鼠的肝肾功能指标,包括谷丙转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、白蛋白(ALB)、血尿素氮(BUN)、血肌酐(SCR)均在正常范围内。结果表明,PRA具有较好的生物安全性。

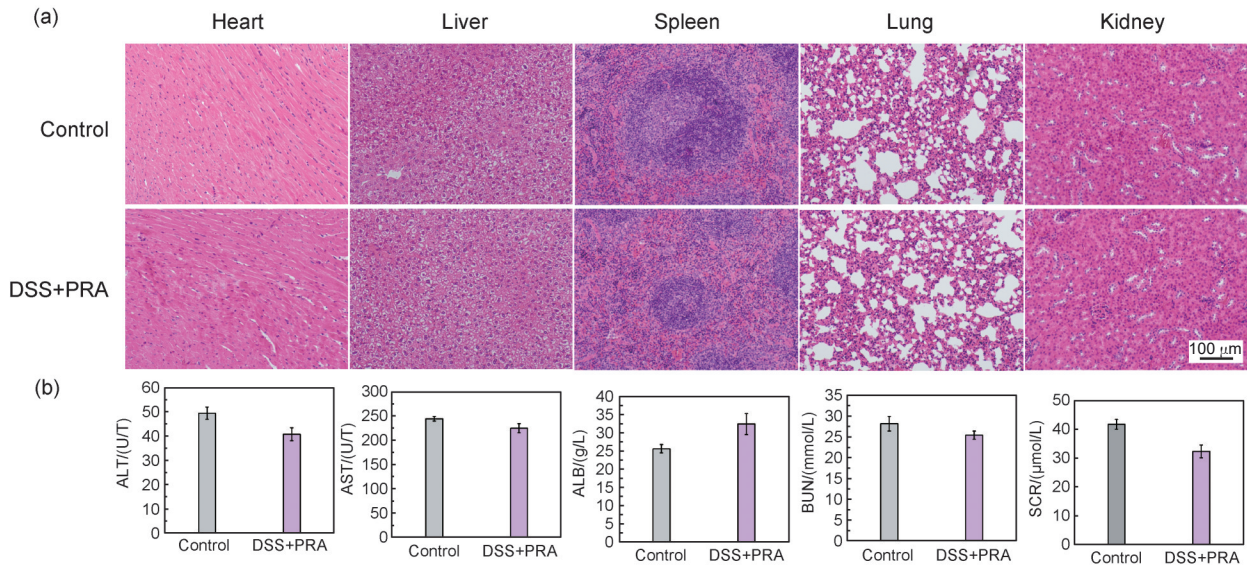


图6 PRA的生物安全性评估

(a) 小鼠主要器官的代表性H&E染色图像。标尺:100 μm; (b) 血清生化检测。

Fig. 6 Biosafety assessment of PRA

(a) Representative H&E stained images of major organs of mice. Scale: 100 μm; (b) Biochemical detection of serum.

3 分析与讨论

本实验旨在探究紫萝卜中PRA的提取和纯化技术,并进一步确认其主要成分为矢车菊素花色苷,与此前的研究结果相一致^[12]。通过测定DPPH自由基清除率、 $\cdot\text{O}_2^-$ 清除率以及总抗氧化能力(T-AOC)等指标,证实了PRA具有显著的抗氧化活性。同时,研究发现PRA具有抗酸性,能够在胃酸环境下保持稳定,为其口服治疗UC提供了可能性。

动物实验表明,PRA对结肠组织具有显著的保护作用,小鼠便血情况与DAI评分结果均显示,PRA能有效缓解DSS诱导的UC,尤其是200 mg/kg剂量的PRA治疗效果最佳。

在UC的发病机制中,促炎细胞因子(如TNF- α 、IL-6和IL-1 β 等)的升高是关键因素^[25]。本研究中,DSS组小鼠的促炎细胞因子水平显著升高,而经过PRA治疗后,这些促炎

细胞因子水平明显降低,且呈剂量依赖性,进一步证明了PRA对UC的治疗效果。进一步的研究显示,MDA作为脂质过氧化反应的副产物,对肠道上皮细胞具有有害影响^[26]。在接受PRA治疗的小鼠中,MDA的含量明显低于DSS处理组,这表明PRA能够减轻上皮细胞的脂质过氧化,从而对肠道上皮细胞起到保护作用。同时,SOD和GSH-Px是关键抗氧化酶,它们能够清除体内的活性氧自由基,从而减少组织的氧化应激损伤^[27]。在本研究中,未接受PRA治疗的小鼠体内这两种酶的活性明显低于健康小鼠,说明抗氧化酶活性降低会导致无法有效清除肠道细胞中的活性氧自由基,进而可能加剧炎症反应。相反,经过PRA治疗的小鼠体内这两种酶的活性得到了显著提升,这与肠炎症状的减轻是一致的,这一效果可归因于PRA的强效抗氧化活性。

肠道屏障的破坏与结肠上皮细胞ZO-1蛋

白的减少密切相关^[28]。本研究发现,DSS诱导的结肠炎小鼠中ZO-1蛋白水平下调,导致肠上皮完整性受损。然而,经过PRA处理后,ZO-1蛋白的表达得以上调,从而恢复了肠道屏障的功能。

最后,通过对PRA生物安全性进行评估,证实了PRA具有良好的生物安全性。这表明PRA在新药物或膳食补充剂的研发过程中具有广泛的应用前景,有助于推动PRA新药物的开发。

4 结论

从紫萝卜中分离并提纯得到PRA,具有优异的稳定性和生物安全性,其能够清除炎症部位的活性氧自由基,逆转上皮细胞脂质过氧化过程,并维持肠道屏障完整性,在UC治疗方面表现出潜力。本研究开发的PRA药物不仅安全稳定,还能为UC患者提供新的治疗选择,具有重要医学意义。

参考文献:

- [1] LAMB C A, KENNEDY N A, RAINE T, *et al.* British Society of Gastroenterology Consensus Guidelines on the Management of Inflammatory Bowel Disease in Adults[J]. *Gut*, 2019, **68**(Suppl 3): s1-s106. DOI: 10.1136/gutjnl-2019-318484.
- [2] 周琼阁,王凯,席作武,等.基于肠道微环境探讨中医药防治溃疡性结肠炎的机制[J].中国实验方剂学杂志,2023, **29**(7): 222-229. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20221629. ZHOU Q G, WANG K, XI Z W, *et al.* Mechanism of Traditional Chinese Medicine in Prevention and Treatment of Ulcerative Colitis: Based on Intestinal Microenvironment [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2023, **29**(7): 222-229. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20221629.
- [3] WANG Y S, WANG P, SHAO L X. Correlation of Ulcerative Colitis and Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis[J]. *J Gastrointest Oncol*, 2021, **12**(6): 2814-2822. DOI: 10.21037/jgo-21-624.
- [4] ZHANG L, GAN H T. Secondary Colon Cancer in Patients with Ulcerative Colitis: A Systematic Review and Meta-analysis[J]. *J Gastrointest Oncol*, 2021, **12**(6): 2882-2890. DOI: 10.21037/jgo-21-800.
- [5] YIN S J, YANG H F, TAO Y, *et al.* Artesunate Ameliorates DSS-induced Ulcerative Colitis by Protecting Intestinal Barrier and Inhibiting Inflammatory Response[J]. *Inflammation*, 2020, **43**(2): 765-776. DOI: 10.1007/s10753-019-01164-1.
- [6] 朱洁,侯宝龙,程雯,等.基于血清代谢组学探究色胺酮抗小鼠溃疡性结肠炎的作用机制[J].中国中药杂志,2023, **48**(8): 2193-2202. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20221213.401. ZHU J, HOU B L, CHENG W, *et al.* Mechanism of Tryptanthrin in Treatment of Ulcerative Colitis in Mice Based on Serum Metabolomics[J]. *China J Chin Mater Med*, 2023, **48**(8): 2193-2202. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20221213.401.
- [7] GHISELLI A, NARDINI M, BALDI A, *et al.* Antioxidant Activity of Different Phenolic Fractions Separated from an Italian Red Wine[J]. *J Agric Food Chem*, 1998, **46**(2): 361-367. DOI: 10.1021/jf970486b.
- [8] KAPLAN M, HAYEK T, RAZ A, *et al.* Pomegranate Juice Supplementation to Atherosclerotic Mice Reduces Macrophage Lipid Peroxidation, Cellular Cholesterol Accumulation and Development of Atherosclerosis[J]. *J Nutr*, 2001, **131**(8): 2082-2089. DOI: 10.1093/jn/131.8.2082.
- [9] YOUDIM K A, MCDONALD J, KALT W, *et al.* Potential Role of Dietary Flavonoids in Reducing Microvascular Endothelium Vulnerability to Oxidative and Inflammatory Insults (Small Star, Filled)[J]. *J Nutr Biochem*, 2002, **13**(5): 282-288. DOI: 10.1016/s0955-2863(01)00221-2.
- [10] 张镜,刁树平.海南蒲桃果实原花青素的体外抗氧化活性[J].食品科学,2012, **33**(17): 101-105. DOI: 1002-6630(2012)17-0101-05. ZHANG J, DIAO S P. In vitro Antioxidant Activity of Proanthocyanidins in Syzygium Cumini Fruits[J]. *Food Science*, 2012, **33**(17): 101-105. DOI: 1002-6630(2012)17-0101-05.
- [11] KURILICH A C, CLEVIDENCE B A, BRITZ S J, *et al.* Plasma and Urine Responses are Lower for Acylated Vs Nonacylated Anthocyanins from Raw and Cooked Purple Carrots[J]. *J Agric Food Chem*, 2005, **53**(16): 6537-6542. DOI: 10.1021/jf050570o.
- [12] MEDDA R, LYROS O, SCHMIDT J L, *et al.* Anti Inflammatory and Anti Angiogenic Effect of Black Raspberry Extract on Human Esophageal and Intestinal Microvascular Endothelial Cells[J]. *Microvasc Res*, 2015, **97**: 167-180. DOI: 10.1016/j.mvr.2014.10.008.
- [13] AKIYAMA S, NESUMI A, MAEDA-YAMAMOTO M, *et al.* Effects of Anthocyanin-rich Tea "Sunrouge" on Dextran Sodium Sulfate-induced Colitis in Mice[J]. *BioFactors*, 2012, **38**(3): 226-233. DOI: 10.1002/biof.1008.
- [14] BIEDERMANN L, MWINYI J, SCHARL M, *et al.* Bilberry Ingestion Improves Disease Activity in Mild to

- Moderate Ulcerative Colitis: An Open Pilot Study[J]. *J Crohns Colitis*, 2013, **7**(4): 271–279. DOI: 10.1016/j.crohns.2012.07.010.
- [15] KIM J M, KIM J S, YOO H, *et al.* Effects of Black Soybean [*Glycine Max* (L.) Merr.] Seed Coats and Its Anthocyanidins on Colonic Inflammation and Cell Proliferation in Vitro and in Vivo[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, **56**(18): 8427–8433. DOI: 10.1021/jf801342p.
- [16] AYVAZ H, CABAROGLU T, AKYILDIZ A, *et al.* Anthocyanins: Metabolic Digestion, Bioavailability, Therapeutic Effects, Current Pharmaceutical/Industrial Use, and Innovation Potential[J]. *Antioxidants*, 2022, **12**(1): 48. DOI: 10.3390/antiox12010048.
- [17] HERRERA-BALANDRANO D D, CHAI Z, BETA T, *et al.* Blueberry Anthocyanins: An Updated Review on Approaches to Enhancing Their Bioavailability[J]. *Trends Food Sci Technol*, 2021, **118**: 808–821. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.11.006.
- [18] PHAN K, VAN DEN BROECK E, RAES K, *et al.* A Comparative Theoretical Study on the Solvent Dependency of Anthocyanin Extraction Profiles[J]. *J Mol Liq*, 2022, **351**: 118606. DOI: 10.1016/j.molliq.2022.118606.
- [19] 杨艳. 黑萝卜花青素的提取纯化及特性研究[D]. 太原: 中北大学, 2015.
YANG Y. Extraction, Purification and Characterization of Anthocyanin from Black Radish[D]. Taiyuan: North University of China, 2015.
- [20] LV M Y, WANG Y, WAN X Y, *et al.* Rapid Screening of Proanthocyanidins from the Roots of *Ephedra sinica* Stapf and Its Preventative Effects on Dextran-sulfate-sodium-induced Ulcerative Colitis[J]. *Metabolites*, 2022, **12**(10): 957. DOI: 10.3390/metabo12100957.
- [21] TÜRKYİLMAZ M, YEMİŞ O, OZKAN M. Clarification and Pasteurisation Effects on Monomeric Anthocyanins and Percent Polymeric Colour of Black Carrot (*Daucus carota* L.) Juice[J]. *Food Chem*, 2012, **134**(2): 1052–1058. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.03.013.
- [22] 韩永斌. 紫甘薯花色苷提取工艺与组分分析及其稳定性和抗氧化性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2007.
HAN Y B. Study on Extraction Technology and Component Analysis of Anthocyanins from Purple Sweet Potato and Its Stability and Oxidation Resistance [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2007.
- [23] MEI Z W, HUANG X X, ZHANG H, *et al.* Chitin Derivatives Ameliorate DSS-induced Ulcerative Colitis by Changing Gut Microbiota and Restoring Intestinal Barrier Function[J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, **202**: 375–387. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.01.049.
- [24] SHENG K L, ZHANG G H, SUN M, *et al.* Grape Seed Proanthocyanidin Extract Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-induced Colitis through Intestinal Barrier Improvement, Oxidative Stress Reduction, and Inflammatory Cytokines and Gut Microbiota Modulation[J]. *Food Funct*, 2020, **11**(9): 7817–7829. DOI: 10.1039/d0fo01418d.
- [25] XIE C, YAN W, QUAN R Z, *et al.* Interleukin-38 is Elevated in Inflammatory Bowel Diseases and Suppresses Intestinal Inflammation[J]. *Cytokine*, 2020, **127**: 154963. DOI: 10.1016/j.cyto.2019.154963.
- [26] YILDIZ G, YILDIZ Y, ULUTAS P A, *et al.* Resveratrol Pretreatment Ameliorates TNBS Colitis in Rats[J]. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*, 2015, **9**(2): 134–140. DOI: 10.2174/1872214809666150806105737.
- [27] ARUNACHALAM K, DAMAZO A S, MACHO A, *et al.* *Piper umbellatum* L. (Piperaceae): Phytochemical Profiles of the Hydroethanolic Leaf Extract and Intestinal Anti-inflammatory Mechanisms on 2, 4, 6 Trinitrobenzene Sulfonic Acid Induced Ulcerative Colitis in Rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, **254**: 112707. DOI: 10.1016/j.jep.2020.112707.
- [28] MO J L, NI J D, ZHANG M, *et al.* Mulberry Anthocyanins Ameliorate DSS-induced Ulcerative Colitis by Improving Intestinal Barrier Function and Modulating Gut Microbiota[J]. *Antioxidants*, 2022, **11**(9): 1674. DOI: 10.3390/antiox11091674.