

球松素靶向肠上皮细胞 PI3K/AKT/CCL₂ 轴抑制巨噬细胞肠道浸润缓解葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠结肠炎

张可妮¹, 乔通¹, 尹林¹, 黄菊^{2,3}, 耿志军^{2,3}, 左芦根³, 胡建国^{1,3}, 李静^{1,3}

蚌埠医科大学第一附属医院¹检验科,²中心实验室,³炎症相关性疾病基础与转化研究安徽省重点实验室,安徽蚌埠 233000

摘要:目的 探讨天然黄酮类化合物球松素(PSB)调控巨噬细胞肠道浸润缓解葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的小鼠结肠炎的作用机制。方法 将30只C57BL/6雄性小鼠随机分为对照组(WT)、DSS模型组(DSS)及PSB干预组(30、60、120 mg/kg),6只/组。通过体质量变化、疾病活动指数(DAI)、结肠长度及组织病理学评分评估结肠炎表型;免疫荧光检测紧密连接蛋白ZO-1/Claudin-1表达;流式细胞术定量分析结肠巨噬细胞(CD45⁺F4/80⁺CD11b⁺)浸润及极化表型(M1:iNOS⁺;M2:CD206⁺);ELISA及RT-qPCR检测炎症因子(TNF- α 、IL-6)及趋化因子(CCL₂、CXCL₁₀、CX₃CL₁)表达;Western blotting分析PI3K/AKT磷酸化水平;体外浓度梯度实验明确PSB抑制CCL₂的最佳剂量;Transwell实验验证CCL₂介导的巨噬细胞迁移;结合网络药理学预测关键靶点通路。结果 预实验确定PSB 60 mg/kg为最佳治疗剂量,缓解DSS诱导的结肠炎症状;与DSS组相比,PSB组体质量下降减少($P<0.05$),DAI评分降低($P<0.05$),结肠长度恢复($P<0.05$)。PSB上调紧密连接蛋白ZO-1/Claudin-1表达($P<0.05$),抑制结肠固有层巨噬细胞浸润(F4/80阳性细胞显著减少, $P<0.05$)并调控其极化(抑制M1促炎亚群,激活M2修复亚群, $P<0.05$)。分子机制分析结果显示,PSB抑制肠上皮细胞PI3K/AKT磷酸化水平($P<0.05$),抑制趋化因子CCL₂表达($P<0.05$),并阻断CCL₂介导的RAW264.7细胞迁移,该效应可被外源性CCL₂逆转。网络药理学富集分析及体外补救实验证明PI3K/AKT及CCL₂趋化因子信号通路为核心调控靶点。结论 球松素通过靶向抑制肠上皮细胞PI3K/AKT通路活化,减少CCL₂分泌,进而阻断巨噬细胞趋化迁移并调控其极化表型,缓解DSS诱导的小鼠结肠炎,为炎症性肠病的天然化合物干预提供新策略。

关键词:球松素;葡聚糖硫酸钠;结肠炎;巨噬细胞浸润;PI3K/AKT信号通路;CCL₂

Pinostrobin targets the PI3K/AKT/CCL₂ axis in intestinal epithelial cells to inhibit intestinal macrophage infiltration and alleviate dextran sulfate sodium-induced colitis in mice

ZHANG Keni¹, QIAO Tong¹, YIN Lin¹, HUANG Ju^{2,3}, GENG Zhijun^{2,3}, ZUO Lugen³, HU Jianguo^{1,3}, LI Jing^{1,3}

¹Department of Clinical Laboratory, ²Central Laboratory, ³Anhui Provincial Key Laboratory of Basic and Translational Research on Inflammatory Diseases, First Affiliated Hospital of Bengbu Medical University, Bengbu 233000, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism through which pinostrobin (PSB) alleviates dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. **Methods** C57BL/6 mice were randomized into control group, DSS model group, and PSB intervention (30, 60, and 120 mg/kg) groups. Colitis severity of the mice was assessed by examining body weight changes, disease activity index (DAI), colon length, and histopathology. The expressions of tight junction proteins ZO-1 and claudin-1 in the colon tissues were examined using immunofluorescence staining, and macrophage infiltration and polarization were analyzed with flow cytometry. ELISA and RT-qPCR were used for detecting the expressions of inflammatory factors (TNF- α and IL-6) and chemokines (CCL₂, CXCL₁₀, and CX₃CL₁) in the colon tissues, and PI3K/AKT phosphorylation levels were analyzed with Western blotting. In cultured Caco-2 and RAW264.7 cells, the effect of PSB on CCL₂-mediated macrophage migration was assessed using Transwell assay. Network pharmacology analysis was performed to predict the key pathways that mediate the therapeutic effect of PSB. **Results** In DSS-induced mouse models, PSB at 60 mg/kg optimally alleviated colitis, shown by reduced weight loss and DAI scores and increased colon length. PSB treatment significantly upregulated ZO-1 and claudin-1 expressions in the colon tissues, inhibited colonic macrophage infiltration, and promoted the shift of macrophage polarization from M1 to M2 type. In cultured intestinal epithelial cells, PSB significantly inhibited PI3K/AKT phosphorylation and suppressed chemokine CCL₂ expression. PSB treatment obviously blocked CCL₂-mediated macrophage migration of RAW264.7 cells, which could be reversed by exogenous CCL₂. Network pharmacology analysis and rescue experiments confirmed PI3K/AKT and CCL₂ signaling as the core targets of PSB. **Conclusion** PSB alleviates DSS-induced colitis in mice by targeting intestinal epithelial PI3K/AKT signaling, reducing CCL₂ secretion, and blocking macrophage chemotaxis and migration, highlighting the potential of PSB as a novel natural compound for treatment of inflammatory bowel disease.

Keywords: pinostrobin; dextran sulfate sodium; colitis; infiltration of macrophages; PI3K/AKT signaling pathway; CCL₂

收稿日期:2025-05-14

基金项目:安徽省临床医学研究转化项目(202427b10020088);炎症相关性疾病基础与转化研究安徽省重点实验室开放课题(YZ2024D10);安徽省高校优秀青年基金项目(2022AH030138);安徽省教育厅优秀青年教师培育项目(YQYB2023019)

作者简介:张可妮,在读硕士研究生,E-mail:kenizhang0906@163.com

通信作者:李静,副教授,硕士生导师,E-mail:lijingbyfy@bbmu.edu.cn

炎症性肠病(IBD)是一种以肠道慢性炎症和组织损伤为特征的复发性疾病,其发病机制涉及肠黏膜屏障功能障碍、免疫细胞异常浸润及促炎因子级联反应^[1-3]。尽管靶向肿瘤坏死因子- α (TNF- α)或趋化因子的生物制剂已用于临床,但部分患者仍面临治疗抵抗或感染风

险增加等挑战^[4,5]。因此,探索调控肠道免疫微环境的新型治疗靶点及天然活性化合物,对IBD的精准干预具有重要意义^[6]。

近年研究发现,PI3K/AKT信号通路在IBD进展中发挥双重调控作用:一方面通过激活NF- κ B等转录因子促进促炎因子和趋化因子释放^[7,8],另一方面通过诱导肠上皮细胞凋亡加剧屏障损伤^[9]。值得注意的是,趋化因子CCL₂作为单核/巨噬细胞趋化的关键介质,可通过与其受体CCR₂结合驱动巨噬细胞向炎症部位迁移,形成促炎正反馈环路^[10]。临床证据表明,IBD患者肠道组织中CCL₂表达水平与疾病严重程度呈正相关,但直接靶向CCL₂的抑制剂仍面临脱靶效应及疗效不稳定等问题^[11]。因此,从上游信号调控角度同时抑制PI3K/AKT通路活化与CCL₂表达,可能为IBD治疗提供更优化的策略。

球松素(PSB)是一种天然黄酮类化合物,广泛存在于乔松心材、山核桃、木豆叶以及蜂蜜、蜂胶、泰国姜等可食用植物材料中^[12,13]。既往研究提示其具有抗炎和抗氧化活性^[14,15],但其对IBD的干预潜力及机制尚未阐明。本研究整合动物实验、细胞模型及网络药理学分析,系统评估PSB对DSS诱导结肠炎的保护作用,并聚焦"肠上皮-巨噬细胞"交互作用,揭示其通过PI3K/AKT/CCL₂轴调控免疫微环境的具体机制。研究成果不仅为天然化合物干预IBD提供新的实验依据,也为开发多靶点调控肠道免疫稳态的治疗策略奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 本研究选用30只雄性野生型C57BL/6小鼠(SPF级,江苏集萃药康生物科技股份有限公司)。小鼠体质量20~25 g,周龄6~7周。实验动物于屏障环境(温度22±2 °C,相对湿度50%±10%,12 h明暗循环)中分笼饲养,自由摄食灭菌标准饲料及无菌饮用水。所有动物在实验前进行4 d适应性饲养。本研究所有实验操作均经蚌埠医科大学实验动物伦理委员会审批通过(伦理批号:伦动科批字[2025]第398号)。

1.1.2 试剂及仪器 PSB(陶术生物)、DSS(MP Biomedicals)、牛血清白蛋白(Sigma);苏木伊红染色(HE)试剂盒、CCK-8试剂和胰蛋白酶消化液(不含酚红)购自索莱宝;酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(武汉博士德生物工程公司);TB Green(Takara);RNA提取试剂盒(Vazyme);实时荧光定量逆转录PCR(RT-qPCR)引物(上海生工);BCA蛋白试剂盒(碧云天);ZO-1、Claudin-1、山羊抗兔IgG H&L(FITC)、山羊抗小鼠IgG H&L(FITC)和山羊抗兔IgG H&L(Alexa Flour®555)抗体(Abcam);APC-Cy7标记的CD45抗

体、BV605标记的CD11b抗体、PE-Cy7标记的F4/80抗体、BV421标记的iNOS抗体和AF488标记的CD206抗体(eBioscience);AKT、p-AKT和兔抗鼠F4/80(Proteintech),PI3K和p-PI3K(Cell Signaling Technology);兔抗鼠GAPDH、HRP-偶联的山羊抗兔IgG和HRP-偶联的山羊抗小鼠IgG(ZSGB-BIO);RPMI 1640培养基、MEM培养基、DMEM培养基和胎牛血清(FBS)(Gibco);小鼠肠道组织解离试剂(Absin);胰蛋白酶细胞消化液(0.25%)(OriCell);CCL₂重组蛋白和LY294002(MCE);流式细胞仪(BD FACSCanto);荧光倒置显微镜(徕卡DMI8);实时荧光定量PCR仪(QuantStudio DX);全自动化学发光成像系统(ChemiDoc MP);玻片扫描仪(Olympus VS200);精密电子天平(赛多利斯BSA124S-CW);组织匀浆器(北京天根公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 DSS结肠炎模型构建及实验分组 采用完全随机设计(随机数字表法),将30只小鼠按体质量分层后均分为5组($n=6$):野生型对照组(WT)、DSS模型组(DSS)、球松素干预组:PSB-30 mg/kg、PSB-60 mg/kg、PSB-120 mg/kg^[16]进行实验。DSS诱导方案如下:(1)造模:DSS组和PSB组小鼠自由饮用含2.5%(w/v)的DSS的灭菌水每日更换新鲜配制溶液(30 mL/笼),持续7 d。(2)药物干预:自造模当日起,PSB组每日固定时间(9:00~11:00 AM)以0.1 mL体积灌胃分别给予30、60、120 mg/kg PSB,每日按25 g/只小鼠分别给予0.75、1.5、3 mg PSB,溶于100 μ L溶剂(1%DMSO原液+99%生理盐水溶液)中;DSS组和WT组同步灌胃等体积溶剂。灌胃操作前禁食4 h(自由饮水)。药物干预持续7 d。(3)样本采集:末次给药后禁食12 h,以2%异氟烷麻醉后行颈椎脱臼处死。迅速剖取结肠组织和脾脏组织:①测量结肠长度(肛门至回盲部连接处);②纵向剖分结肠,一部分置于福尔马林溶液中固定以备后续组织学分析(HE染色和炎症评分、免疫荧光和免疫组织化学染色);③另一半结肠取近端1 cm刮取肠黏膜用于后续分子生物学检测[ELISA检测炎症因子和趋化因子蛋白、RT-qPCR(mRNA)、Western blotting(PI3K/AKT)];④远端肠段使用小鼠肠道组织解离试剂盒提取肠单个核细胞用于流式细胞术分析(巨噬细胞浸润比例及极化表型);⑤分离小鼠脾脏用于脾指数测量。

1.2.2 小鼠肠炎症状评估 体质量测量:每日09:00采用精密电子天平测定并记录小鼠体质量(g)。肠炎疾病活动指数(DAI):根据小鼠体质量变化、粪便形态和出血情况评估肠炎症状,DAI的计算公式为:(体质量变化指数+粪便形态评分+出血情况评分)/3,评分范围0~4分,分数越高表示肠炎的症状越严重^[17]。结肠形态学评估:

小鼠处死后立即将结肠平铺于4℃预冷刻度板,测量肛门至回盲部长度,3次测量取均值。脾脏免疫指数:新鲜脾脏经预冷的PBS冲洗后,滤纸吸至恒重,采用微量天平称质量,按公式计算:脾脏指数=[脾质量(mg)/终末体质量(g)]×100%。

1.2.3 HE染色和炎症评分 小鼠结肠组织经福尔马林固定48 h后,使用TBST冲洗,按照既往文献报道制作改良型“瑞士卷”固定法^[18, 19]:结肠组织经固定后剥离表面肠系膜及血管附属物,PBS清洗肠内容物。近端肠段锚定于双齿叉针具,匀速回旋卷绕形成连续黏膜面。垂直定位后,将其整体转移至包埋盒进行组织固化。结肠组织经梯度乙醇脱水,石蜡包埋后进行切片,采用旋转切片机制备3 μm厚度切片,严格依据HE染色试剂盒操作说明书完成苏木精-伊红染色。染色样本使用中性价介质封固于载玻片上,于显微镜下观察进行结肠组织病理学评分,该评估体系采用四级评分标准(0~4分),0分表示无炎症;1分表示黏膜固有层轻微细胞浸润;2分表示有单核细胞浸润致隐窝分离和轻度黏膜增生;3分表示炎性细胞大量浸润,黏膜结构紊乱、杯状细胞减少;4分出现隐窝脓肿和溃疡。其中评分等级与组织学损伤程度呈正相关^[20, 21]。

1.2.4 ELISA法测定小鼠结肠炎症因子蛋白表达水平 分离小鼠结肠黏膜组织并称重,按照组织质量与裂解液1:10的比例加入RIPA裂解液(含蛋白酶抑制剂)。将肠黏膜组织充分研磨至匀浆状态,冰上裂解30 min完成蛋白提取。经12 000 r/min高速离心10 min后收集上清液;收集DSS刺激24 h的Caco-2细胞培养上清,离心去除沉淀,采用ELISA法按照试剂盒说明书完成标准品梯度稀释和样品加样流程。酶标仪检测吸光度值 $A_{450\text{nm}}$,根据标准曲线定量分析结肠黏膜组织中促炎因子(IL-6和TNF-α)和趋化因子(CCL₂、CXCL₁₀和CX₃CL₁)及体外实验中细胞培养上清中CCL₂的浓度水平。

1.2.5 RT-qPCR检测小鼠结肠炎症介质的mRNA水平 组织样本:取小鼠结肠黏膜组织,每50 mg组织加入1 mL Trizol,用组织匀浆器震碎组织(于冰上操作,避免温度升高使RNA降解),室温裂解15 min后加入1/5体积氯仿。细胞样本:吸弃DSS刺激24 h的Caco-2细胞培养液,PBS(1 mL/孔)洗涤1次,加入1 mL/孔 Trizol,室温静置15 min后吹打充分裂解,加入1/5体积氯仿;组织和细胞样本均剧烈振荡15 s,冰上静置15 min,4℃离心13 000 r/min,15 min;使用异丙醇沉淀总RNA,测量浓度后遵循试剂盒说明书完成反转录反应,获得cDNA,使用TB Green Premix Ex Taq II检测试剂盒执行扩增程序检测IL-6、TNF-α、CCL₂、CXCL₁₀和CX₃CL₁的mRNA水平。为明确PSB对CCL₂的表达,采用DSS刺激的Caco-2细胞模型进行浓度梯度分析:分别加入

含不同浓度PSB(0、6.25、12.5、25、50、100、200 μmol/L)的培养基,每个浓度设3个复孔,药物干预24 h后按上述“细胞样本”流程提取总RNA检测CCL₂的mRNA水平。经预变性30 s(95℃)、变性5 s(95℃)、退火30 s(60℃)反应后,重复40个循环,以GAPDH作为内参基因,通过2^{-ΔΔCt}相对定量分析法对目的基因表达水平进行标准化计算。RT-qPCR引物均由上海生工合成(表1)。

表1 RT-qPCR的引物序列

Tab.1 Primer sequences for RT-qPCR

Gene name	Gene ID	Primer sequences (5'-3')
<i>IL-6</i>	16193	F:TCTATACCACTTCACAAGTCGGA R:GAATTGCCATTGCACAACCTCTTT
<i>TNF-α</i>	21926	F:CAGGCGGTGCCTATGTCTC R:CGATCACCCGAAGTTCAGTAG
<i>CCL₂</i>	20296	F:TAAAAACCTGGATCGGAACCAAA R:GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT
<i>CXCL₁₀</i>	15945	F:CCAAGTGTGCCGTCATTTTC R:TCCCTATGGCCCTCATTCTCA
<i>CX₃CL₁</i>	20312	F:CTGCCCTACTAAAAATGGTGG R:GAATTGCCATTGCACAACCTCTTT
<i>GAPDH</i>	14433	F:TGGCCTTCCGTGTTCTCTAC R:GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA

1.2.6 免疫荧光法检测肠屏障紧密连接蛋白表达和定位 取小鼠结肠石蜡切片,经3 h烤片、脱蜡水化(保证切片始终处于湿润状态)、ddH₂O冲洗、抗原修复、5% BSA封闭、孵育一抗(ZO-1, 1:200; Claudin-1, 1:400;用5% BSA稀释,每个组织约50 μL),湿盒4℃过夜。次日,恢复室温后,PBS洗3遍,室温孵育二抗[山羊抗兔IgG H&L(FITC), 1:1000;山羊抗小鼠IgG H&L(Alexa Flour®555), 1:1000;DAPI(1 μg/mL)染细胞核]1.5 h, PBS清洗3遍后用抗荧光淬灭封片剂封片,徕卡倒置荧光显微镜拍照(放大200倍)。

1.2.7 免疫组织化学染色 结肠组织石蜡切片经脱蜡、抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、封闭(5%山羊血清封闭)、孵育一抗(兔抗鼠F4/80, 1:2000),滴加辣根过氧化物酶标记的二抗,DAB染色后使用苏木素复染细胞核,使用梯度酒精和二甲苯脱水,中性树脂封片,Olympus玻片扫描仪获取全视野结果。

1.2.8 肠黏膜中巨噬细胞比例流式检测 取新鲜小鼠肠道组织约100 mg,置于无菌离心管中,剪碎至1~2 mm³,加入1 mL小鼠肠道组织解离试剂,于37℃、180 r/min恒温摇床中震荡消化2 h。消化完成后,经70 μm无菌过滤器过滤,滤液以1200 r/min离心5 min,弃上清。细胞沉淀用预冷PBS洗涤2次后重悬制备单细胞悬液。

分别加入APC-Cy7标记的CD45抗体、BV605标记的CD11b抗体、PE-Cy7标记的F4/80抗体,室温避光孵育30 min,洗去未结合抗体,细胞经固定破膜后,进行胞内避光染色(BV421标记的iNOS抗体和AF488标记的CD206抗体)后洗去未结合抗体,200 μ L PBS重悬样本上机检测,使用BD FACSCanto流式细胞仪采集数据,原始数据经FlowJo V10软件进行分析。实验全程注意避光操作,所有离心步骤均保持4 $^{\circ}$ C低温环境,确保细胞活性及抗原表位稳定性。

1.2.9 网络药理学 基于Pubchem、中国知网数据库获取球松素的SMILES分子表征,将该化学结构信息输入SEA及Super-PRED在线预测系统,在SEA分析中,目标靶点ID只保留带HUMAN的靶点备用开展潜在靶点识别,我们采用了其默认的显著性阈值(E-value <1e-5)筛选潜在靶点。对于Super-PRED分析,我们设定了置信度分数阈值>0.6作为阳性预测结果的筛选标准。经Uniprot数据库统一标识转换后,整合数据并且去重,得到候选药物靶标。针对“炎症性肠病”这一研究对象,系统检索GeneCards和CTD疾病数据库,并将从每个数据库获得的疾病相关基因进行汇总和去重,经标准化处理后构建疾病靶标库。运用Venny 2.1平台的Venn图比对功能,系统分析药物作用靶点与疾病相关靶标的重叠区域,最终得到133个交集基因。通过双向筛选确定关键调控靶点群。将筛选获得的共有靶标输入STRING生物网络平台,利用STRING数据库构建蛋白-蛋白互作网络。在提取互作关系时,我们设定了最低互作置信度阈值为0.400,生成蛋白质互作网络(PPI)。在此基础上,基于DAVID生物信息工具集,对核心靶标开展多维度功能分析:包括KEGG代谢通路系统性解析、基因本体(GO)三大范畴(生物过程、分子功能、细胞组分)的层次化富集,最终通过微信在线系统实现结果可视化。

1.2.10 Western blotting分析 组织样本:采用预冷RIPA裂解液(含蛋白酶抑制剂)裂解结肠组织,13000 r/min,离心15 min,分离出蛋白上清。细胞样本:弃去培养基,PBS(2 mL/孔)洗涤1次,加入预冷RIPA裂解液冰上裂解30 min,4 $^{\circ}$ C 12000 r/min高速离心10 min,取上清。BCA法定量蛋白浓度。加入5 \times SDS上样缓冲液进行标本前处理,经95 $^{\circ}$ C高温热变性处理后分装冻存于-80 $^{\circ}$ C低温环境。按目标蛋白分子量配制分离胶,上样后电泳分离蛋白。采用三明治转膜装置将蛋白条带转移至甲醇活化的PVDF膜上,180 V电泳30 min,以恒定电流400 mA转膜50 min。封闭使用5%脱脂奶粉-TBST溶液室温处理60 min,继而依次进行特异性抗体孵育:于4 $^{\circ}$ C条件下分别孵育p-PI3K(兔源,1:1000)、PI3K(兔源,1:1000)、p-AKT(鼠源,1:2000)、AKT(鼠源,

1:1000)及内参GAPDH(兔源,1:1000)抗体,4 $^{\circ}$ C过夜,TBST洗膜5 min \times 3次后加入二抗(HRP-偶联的山羊抗小鼠/兔IgG,1:3000),室温孵育1 h。采用ECL化学发光成像系统捕获信号,以GAPDH作为内源性参照蛋白,通过ImageJ 1.8.0软件进行条带光密度值定量分析。

1.2.11 细胞培养和CCK-8实验 Caco-2细胞:用含79% MEM、20%胎牛血清(FBS)和1%青霉素-链霉素的培养基在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的培养箱进行培养,48 h/次更换培养基,待细胞长至70%~80%密度时,经胰蛋白酶消化液(不含酚红)消化和重悬,进行传代和后续实验。

RAW264.7细胞:用含10% FBS的高糖DMEM培养基在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的培养箱进行培养,24 h/次更换培养基,待细胞长至50%~60%密度时,经含0.04% EDTA和0.25%胰蛋白酶的细胞消化液消化和重悬,进行传代和后续实验。

CCK-8实验:取对数生长期Caco-2和RAW264.7细胞,以1 \times 10⁴/孔的密度接种于96孔板。待细胞密度达60%~70%时,弃去培养基,PBS洗涤2次。分别加入含不同浓度PSB(0、1.25、2.5、5、10、20、40、80、160 μ mol/L)的培养基100 μ L/孔,每个浓度设5个复孔。药物干预24 h后,每孔加入10 μ L CCK-8试剂,37 $^{\circ}$ C孵育1 h。使用酶标仪测定吸光度A_{450nm}。设立空白组(仅含培养基)、对照组(未加PSB处理的细胞)及不同浓度PSB处理组,实验独立重复3次。细胞活力按以下公式计算:细胞活力(%)=(A_{药物处理组}-A_{空白组})/(A_{对照组}-A_{空白组}) \times 100。

1.2.12 巨噬细胞趋化实验 取对数生长期Caco-2和RAW264.7细胞,将细胞以4 \times 10⁴/mL的密度分别接种于无血清24孔板中的Transwell小室(8 μ m孔径)的下室和上室,下室根据除Caco-2细胞外加入的干预物不同分5组:Control组(仅加入无血清MEM培养基)、DSS组(含2.5% DSS的无血清MEM培养基)、DSS+PSB组(含2.5% DSS和50 μ mol/L PSB的无血清MEM培养基)、DSS+LY294002组(含2.5% DSS和10 μ mol/L LY294002的无血清MEM培养基)、DSS+PSB+LY294002组(含2.5% DSS、50 μ mol/L PSB和10 μ mol/L LY294002的无血清MEM培养基)、DSS+PSB+CCL₂组(含2.5% DSS、50 μ mol/L PSB和100 ng/mL CCL₂的无血清MEM培养基)^[22-24]。在37 $^{\circ}$ C下孵育24 h后,取出Transwell小室使用4%多聚甲醛固定、0.1%结晶紫染色小室的底层30 min后,用湿棉签轻拭擦掉Transwell小室内的细胞,于倒置显微镜拍照并计算穿过小室的细胞数量。

1.3 统计学分析

实验数据的统计学处理通过SPSS 26.0软件完成。计量资料以均数 \pm 标准差呈现,组间比较采用单因素方差分析或t检验。基于预先设定的显著性水平($\alpha=0.05$),

当假设检验的 P 值低于临界阈值时,判定组间差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PSB缓解了DSS诱导的小鼠结肠炎症状

结果显示,DSS组小鼠较WT组出现体质量下降(图1A, $P<0.05$)、DAI评分升高(图1B, $P<0.05$)、结肠长度缩短(图1C、D, $P<0.05$)及脾脏指数增加(图1E~G, $P<0.05$),提示结肠炎模型构建成功。球松素干预组

(PSB)较DSS组表现出改善:体质量下降幅度降低(图1A, $P<0.05$),预实验结果表明,当用药浓度达到60 mg/kg时,可获得最佳治疗效果,据此,后续实验中PSB干预组的最佳剂量确定为60 mg/kg。DAI评分按照用药剂量PSB-30 mg/kg、PSB-60 mg/kg、PSB-120 mg/kg分别由 3.67 ± 0.52 降至 3.50 ± 0.55 、 2.17 ± 0.41 和 1.83 ± 0.75 (图1B, $P<0.05$),结肠长度恢复至 8.93 ± 0.80 cm(图1C、D, $P<0.05$),同时脾脏指数降至 3.19 ± 0.27 (图1E~G, $P<0.05$)。

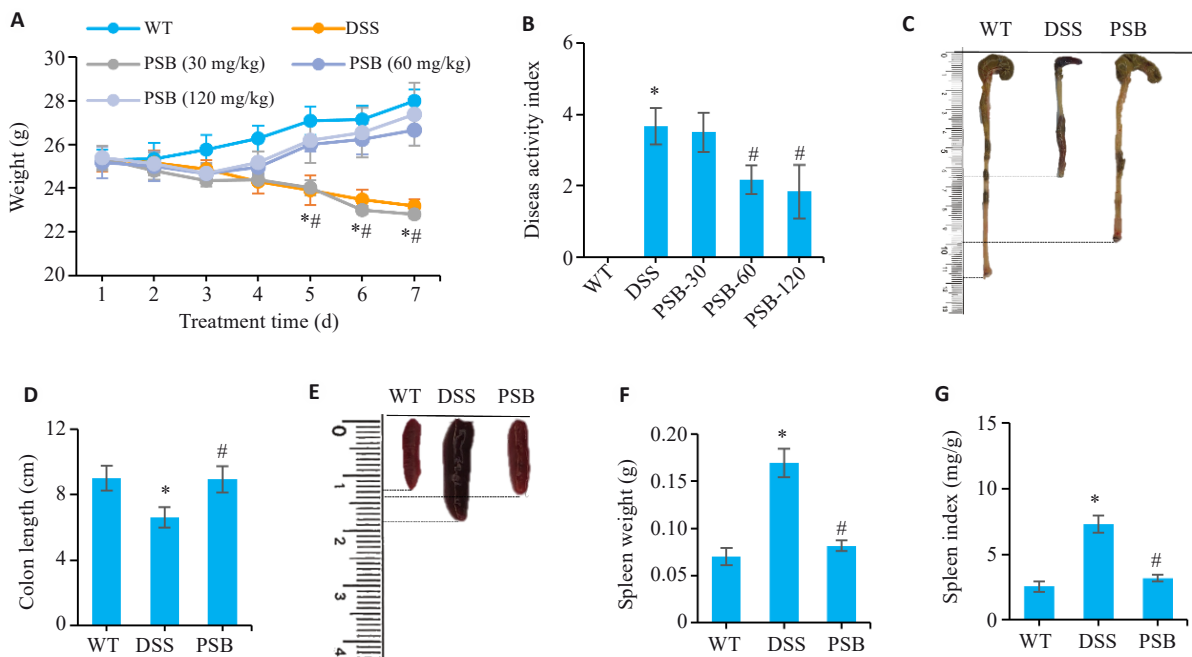


图1 PSB对小鼠DSS诱导的结肠炎症状的影响

Fig. 1 Effect of pinostrobin (PSB) on symptoms of dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis in mice. A: Daily body weight changes in wild-type (WT), DSS, PSB-30 mg/kg, PSB-60 mg/kg and PSB-120 mg/kg groups. B: Disease activity index (DAI) scores in the 5 groups. C: Representative images of the mouse colon. D: Colon lengths of the mice. E: Representative images of mouse spleens. F: Spleen weight. G: Spleen index. * $P<0.05$ vs WT; # $P<0.05$ vs DSS.

2.2 PSB干预能降低组织损伤,抑制DSS诱导的组织炎症介质释放

对小鼠结肠组织进行HE染色并评估炎症评分,结果显示PSB干预能够有效减少DSS诱导的结肠黏膜炎症细胞浸润,并降低炎症评分(图2A、B, $P<0.05$)。RT-qPCR和ELISA法检测了小鼠结肠组织中PSB干预对炎症介质(TNF- α 和IL-6)的mRNA和蛋白表达水平。与对照组相比,DSS组小鼠结肠黏膜中TNF- α 和IL-6表达升高(图2C、D, $P<0.05$),而PSB干预后,结肠组织炎症介质释放水平降低(图2C、D, $P<0.05$)。

2.3 PSB干预改善DSS小鼠肠屏障损伤

免疫荧光检测结果显示,DSS干预导致小鼠结肠上皮细胞表面的紧密连接蛋白(ZO-1和Claudin-1)发生移位(图3A),并且其表达水平下降(图3B、C, $P<0.05$)。经过PSB干预后,这两种蛋白的表达量升高,并重新定

位于上皮细胞表面(图3A~C, $P<0.05$)。

2.4 PSB调控巨噬细胞浸润与极化状态减轻结肠炎损伤

免疫组化染色及对F4/80平均光密度值分析显示,DSS组小鼠肠黏膜组织中F4/80表达水平升高,而PSB组中其表达降低(图4A、B, $P<0.05$)。通过分离小鼠肠组织单个核细胞并进行流式细胞术检测分析结果显示,PSB处理不仅降低了小鼠肠组织中巨噬细胞的比例(图4C~E, $P<0.05$),同时抑制M1促炎亚群并激活M2修复亚群(图4F~I, $P<0.05$)。

2.5 PSB网络药理学结果分析

通过Venny图比较发现,PSB和IBD共有133个交集基因(图5A)。利用String数据库对这些基因编码的蛋白进行蛋白质互作分析,得到PPI网络(图5B)。通路富集分析结果显示,PSB可能通过PI3K/AKT及趋化因

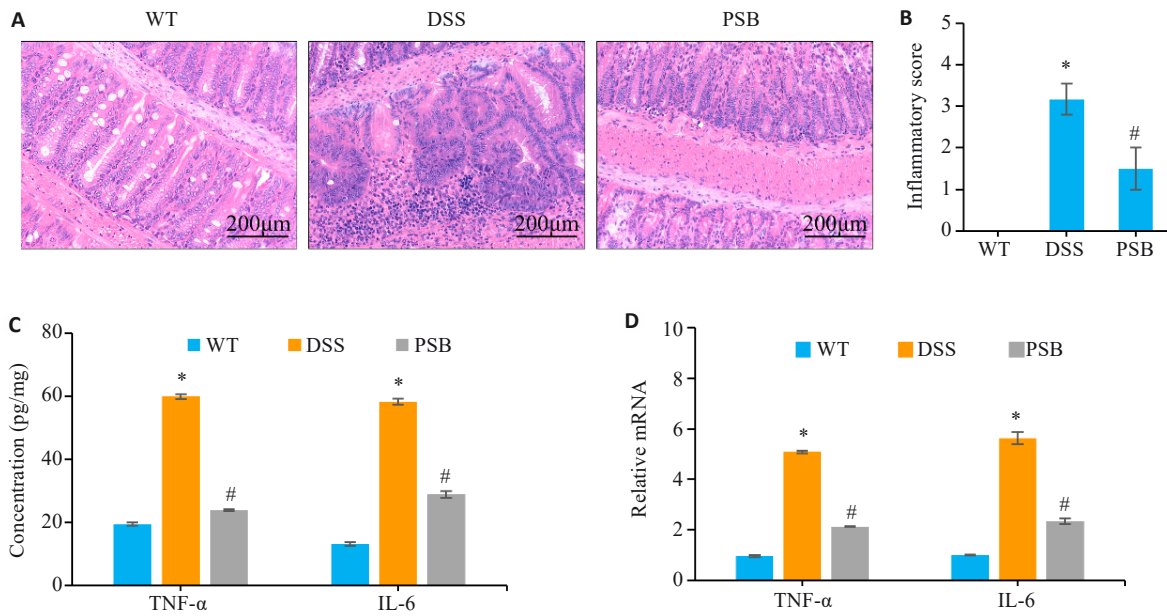


图2 PSB对小鼠实验性结肠炎肠组织损伤及炎症的影响

Fig.2 Effect of PSB on intestinal tissue injury and inflammation in the mouse models of colitis. A: HE staining of mouse colon tissues. B: Inflammation scores of mouse colon tissue. C: Levels of inflammatory factors (TNF-α and IL-6) in the colonic mucosa detected by ELISA. D: Relative mRNA expressions of TNF-α and IL-6 in the colonic mucosa detected by RT-qPCR. * $P < 0.05$ vs WT; # $P < 0.05$ vs DSS.

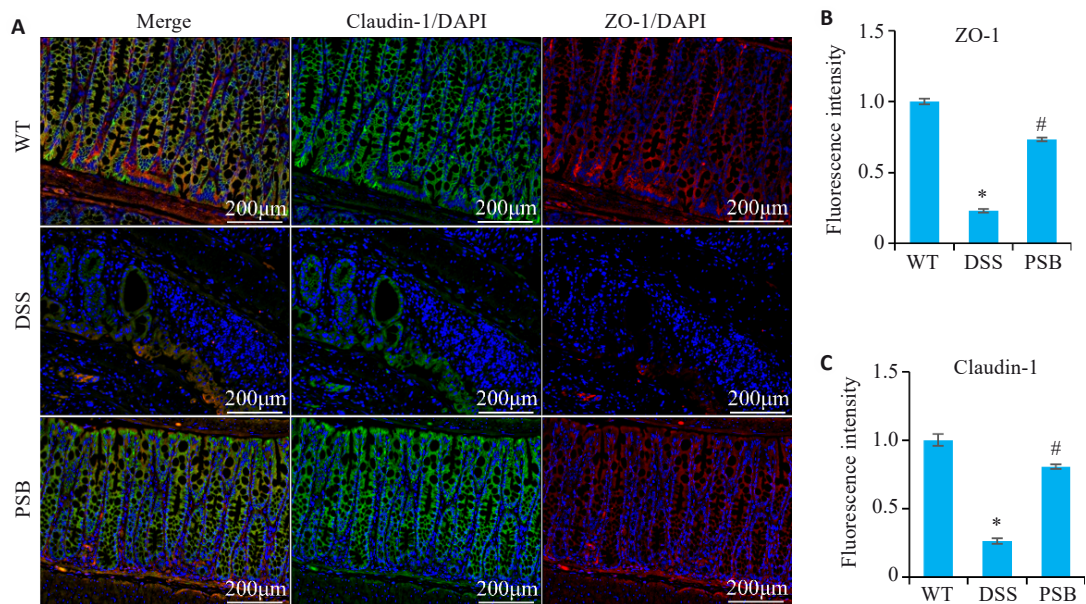


图3 PSB对小鼠实验性结肠炎肠屏障损伤的影响

Fig. 3 Effect of PSB on intestinal barrier damage in mice with DSS-induced colitis. A: Immunofluorescence staining of ZO-1 and Claudin-1 in the colon of the mice. B: Fluorescence intensity of ZO-1. C: Fluorescence intensity of claudin-1. * $P < 0.05$ vs WT; # $P < 0.05$ vs DSS.

子信号通路发挥对IBD的调控作用(图5C、D)。

2.6 PSB 干预可以影响调控巨噬细胞的趋化因子和 PI3K/AKT 信号通路

PCR结果显示:与DSS组小鼠相比,PSB组小鼠肠黏膜中参与诱导巨噬细胞趋化的因子CCL₂、CXCL₁₀、CX₃CL₁的蛋白表达水平和mRNA均下降,其中CCL₂蛋白表达水平和mRNA均降低(图6A、B, $P < 0.05$)。Western blotting检测结果表明:与DSS组相比,PSB组

p-PI3K和p-AKT表达降低(图6C、D, $P < 0.05$)。

2.7 PSB 通过阻断肠上皮细胞PI3K/AKT/CCL₂信号抑制巨噬细胞趋化

体外实验中验证了PSB无细胞毒性,CCK-8检测显示,PSB($\leq 160 \mu\text{mol/L}$)处理24h对Caco-2和RAW264.7细胞存活率无影响(图7A、B)均 $> 95\%$ 。检测了不同浓度PSB(0、6.25、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$)对DSS诱导的Caco-2细胞CCL₂mRNA表达的影

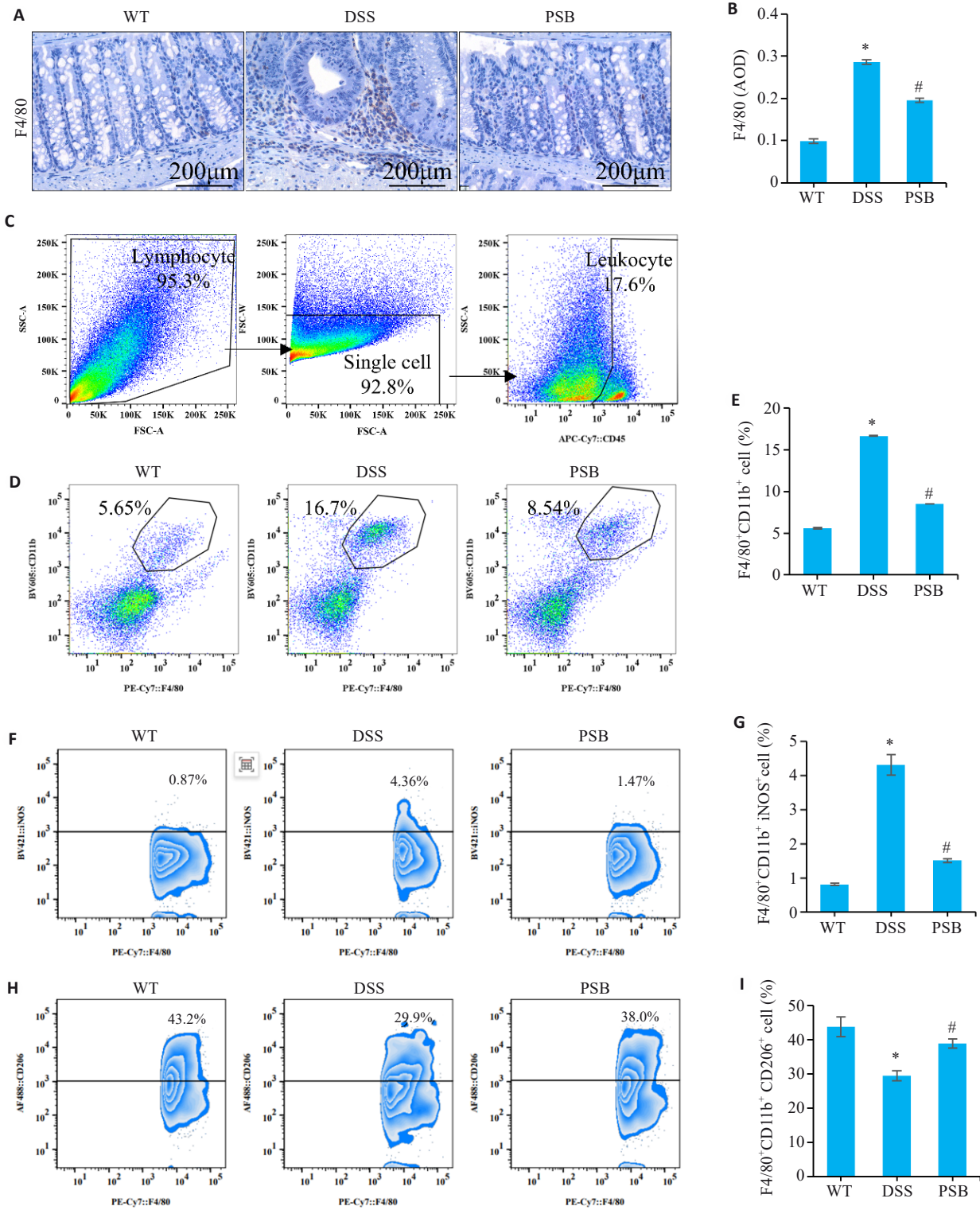


图4 PSB抑制对小鼠实验性结肠炎巨噬细胞浸润和极化的影响

Fig. 4 Effect of PSB on macrophage infiltration and polarization in the mouse models of colitis. A: Expression of F4/80 analyzed by immunohistochemical staining. B: Average optical density (AOD) of F4/80. C: Flow cytometry gating strategy. D, E: Assessment of macrophage percentage (CD45⁺F4/80⁺CD11b⁺ population) in mouse intestinal tissue by flow cytometry. F, G: Assessment of M1 macrophage percentage (F4/80⁺CD11b⁺iNOS⁺ population) in mouse intestinal tissue by flow cytometry. H, I: Assessment of M2 Macrophage percentage (F4/80⁺CD11b⁺CD206⁺ population) in mouse intestinal tissue by flow cytometry. *P<0.05 vs WT; #P<0.05 vs DSS.

响,结果显示(图 7C),PSB抑制 CCL₂ 表达,其中当浓度 ≥50 μmol/L 时,抑制作用达到稳定。基于上述剂量效应结果,选择 50 μmol/L PSB 进行后续机制研究。

Western blotting 分析显示,DSS 组 Caco-2 细胞中 p-P13K 和 p-AKT 蛋白表达升高 (P<0.05),而 PSB (50 μmol/L) 处理后磷酸化水平降低 (P<0.05)。另外,PI3K/

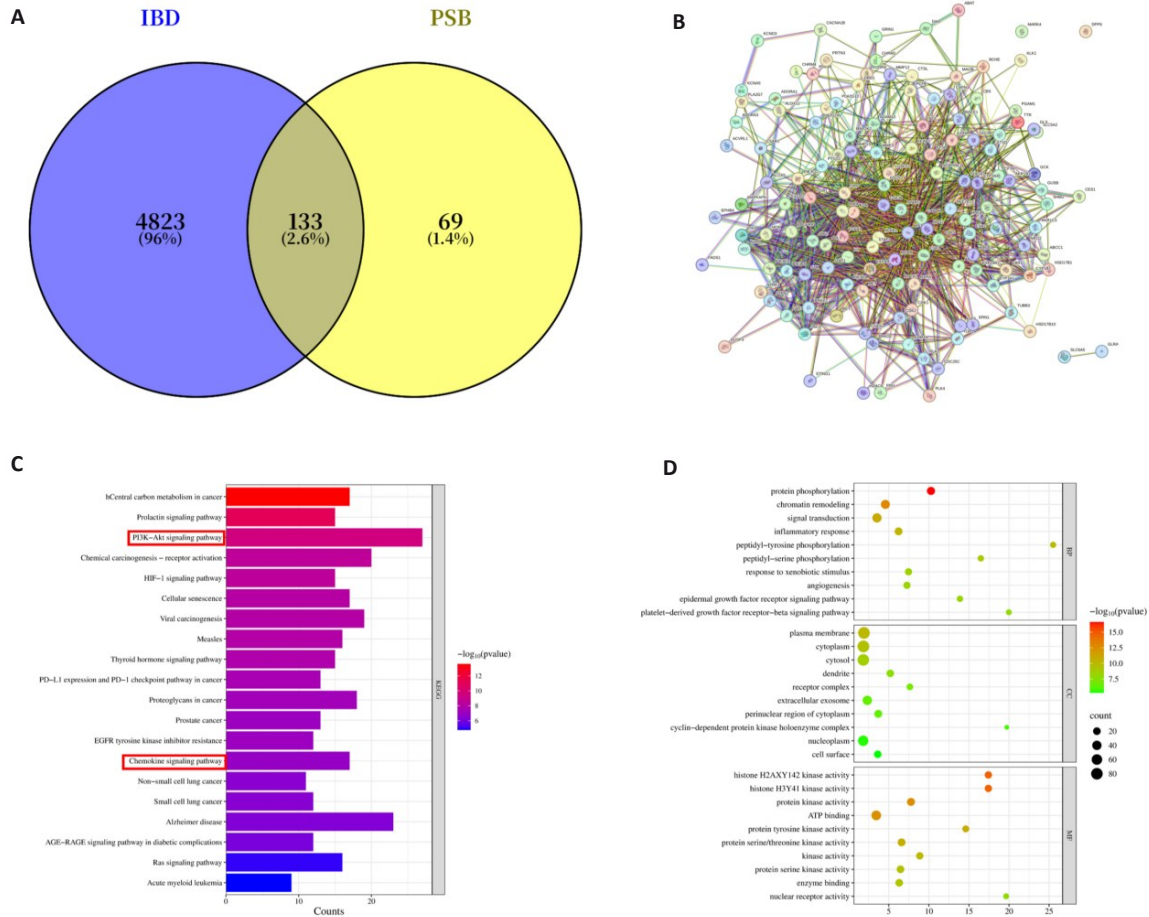


图5 PSB网络药理学分析

Fig. 5 PSB network pharmacology. A: Venn diagram. B: PPI network diagram. C: KEGG analysis. D: GO analysis (BP, CC, MF).

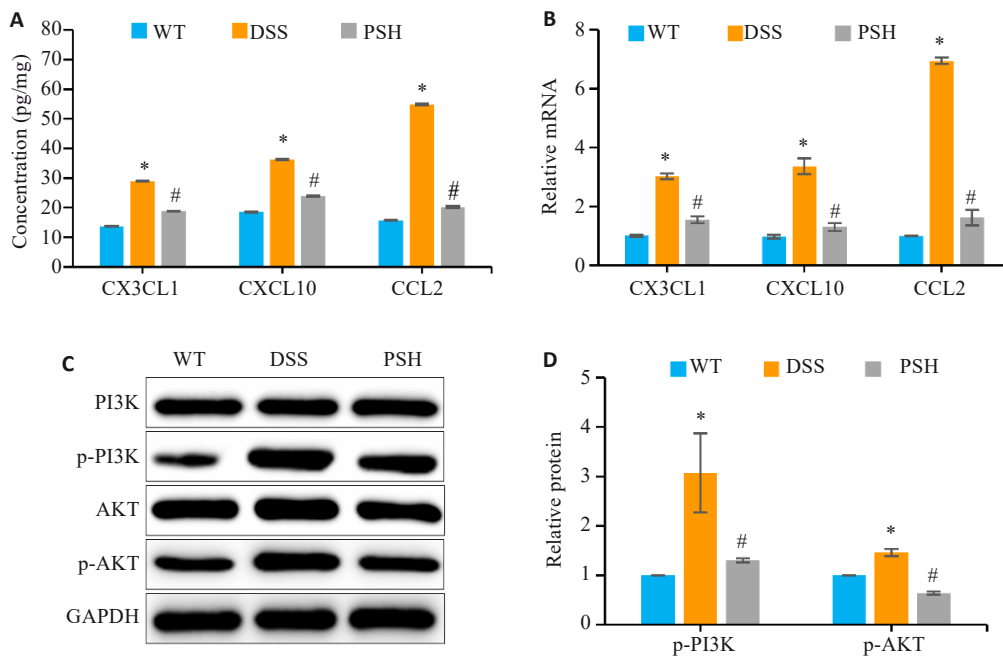


图6 PSB对巨噬细胞趋化因子和PI3K/AKT信号通路的影响

Fig.6 Effects of PSB on macrophage chemokines and the PI3K/AKT signaling pathway. A: Levels of chemokines (CCL₂, CXCL₁₀ and CX₃CL₁) in the colonic mucosa detected by ELISA. B: Relative mRNA expressions of chemokines (CCL₂, CXCL₁₀ and CX₃CL₁) in the colonic mucosa detected by RT-qPCR. C, D: Western blot analysis of p-PI3K and p-AKT, the key proteins of the PI3K/AKT pathway, in mouse intestinal mucosal tissues. **P*<0.05 vs WT; #*P*<0.05 vs DSS.

AKT信号通路抑制剂LY294002干预可阻断DSS诱导的PI3K和AKT磷酸化,且与PSB联用无叠加效应,提示PSB通过抑制PI3K/AKT通路发挥作用(图7C)。RT-qPCR和ELISA结果显示,DSS刺激后,Caco-2细胞CCL₂mRNA和分泌蛋白水平分别升高7.02倍和5.44倍($P<0.05$)。PSB(50 μmol/L)抑制CCL₂表达($P<0.05$),

且与LY294002效果一致(图7D,E)。Transwell迁移实验显示:与DSS处理的Caco-2共培养后,RAW264.7迁移细胞数增加($P<0.05$),PSB干预使细胞迁移率明显降低($P<0.05$),且与LY294002效果一致,而加入CCL₂重组蛋白后迁移细胞数量升高,逆转了PSB对细胞迁移的抑制作用(图7F,G)。

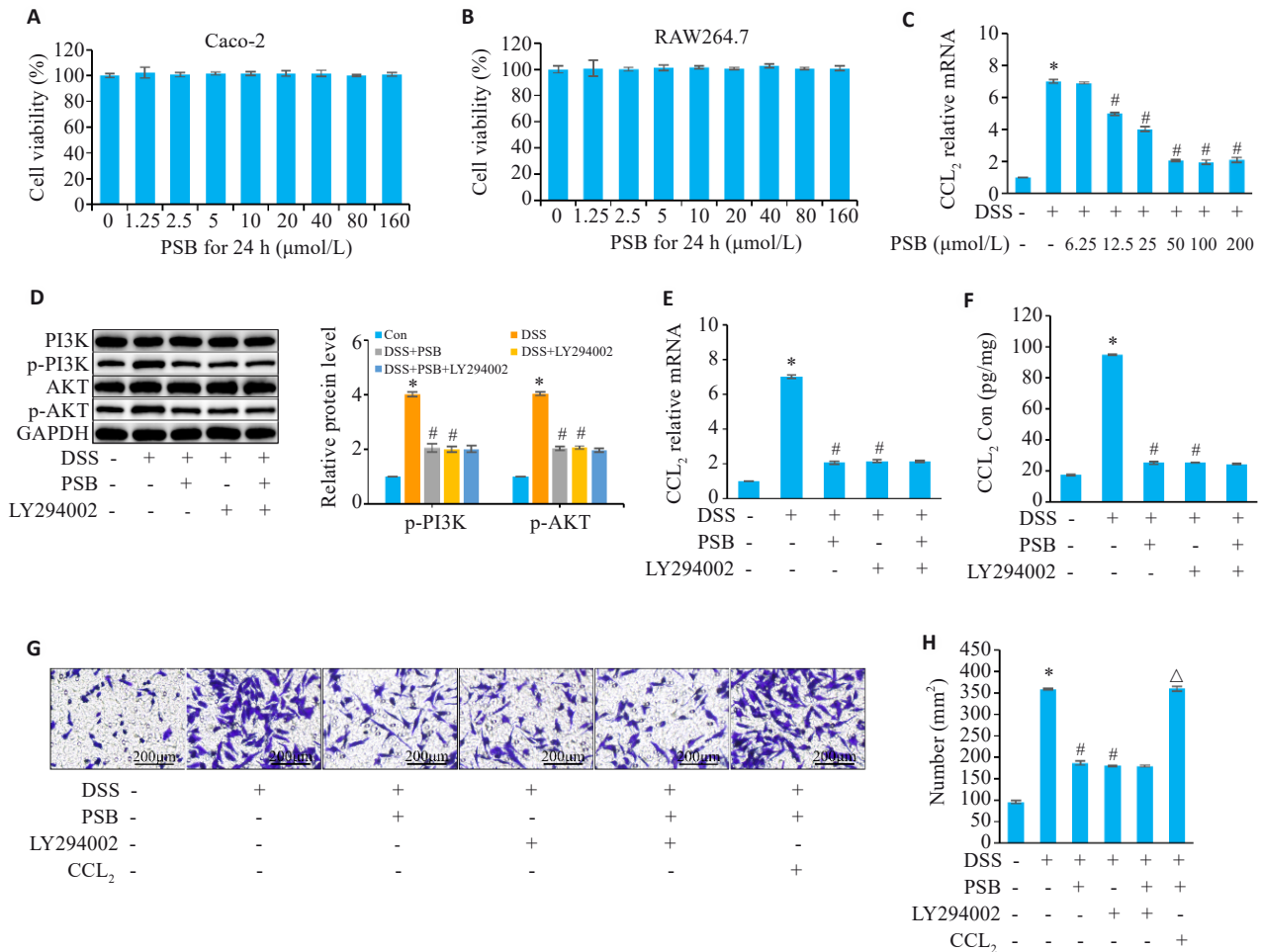


图7 PSB调控肠上皮细胞PI3K/AKT/CCL₂信号轴对巨噬细胞趋化的影响

Fig.7 Effect of PSB on the chemotaxis of macrophages by regulating the PI3K/AKT/CCL₂ signaling axis in intestinal epithelial cells. **A, B:** Determination of the cytotoxicity of PSB in Caco-2 and RAW264.7 cells by CCK-8 assay. **C:** Concentration-dependent inhibition of DSS-induced CCL₂ mRNA expression by PSB (RT-qPCR). **D:** Western blot bands and quantitative analysis (p-PI3K and p-AKT). **E, F:** Expression levels of CCL₂ mRNA (RT-qPCR) and protein (ELISA). **G, H:** Transwell migration images (crystal violet staining) and statistics of the number of migrated cells. * $P<0.05$ vs Con; # $P<0.05$ vs DSS; $\Delta P<0.05$ vs DSS+PSB.

3 讨论

本研究通过动物模型、细胞实验及网络药理学分析,首次揭示了天然黄酮类化合物球松素(PSB)通过抑制肠上皮细胞PI3K/AKT/CCL₂信号轴,阻断巨噬细胞趋化并调控其极化状态(抑制M1型、促进M2型转换),从而缓解DSS诱导的结肠炎。这一发现不仅拓展了PSB在IBD治疗中的药理机制认知,也为靶向“肠上皮-免疫细胞”交互作用的治疗策略提供了新的理论依据。

既往研究证实,PI3K/AKT通路抑制剂(如

LY294002)可通过抑制NF- κ B活化减轻肠道炎症,但其临床转化受限于系统毒性及对肠屏障修复的负面影响^[22]。DSS诱导的小鼠肠黏膜组织中肠上皮细胞是趋化因子的主要来源^[25,26]。本结果发现,PSB在60 mg/kg最佳剂量下显著抑制PI3K/AKT磷酸化的同时,能够上调紧密连接蛋白ZO-1和Claudin-1的表达,提示其兼具抗炎与屏障修复的双重功能。这一特性与黄连素^[27]、姜黄素^[28]等天然化合物类似,但PSB的独特之处在于其通过调控肠上皮源性趋化因子CCL₂,以浓度依赖性方式

直接干预巨噬细胞迁移。这种“上游信号抑制-下游细胞趋化阻断”的级联效应,可能较单一靶点抑制剂更具治疗优势。

尽管CCL₂/CCR₂轴已被确认为IBD巨噬细胞浸润的关键驱动因素^[29],但现有干预策略多聚焦于直接中和CCL₂或阻断其受体。例如,抗CCL₂单抗Carlumab虽可减少单核细胞浸润,却因代偿性CCL₇/CCL₈上调导致疗效受限^[30]。本研究发现,PSB通过抑制PI3K/AKT通路显著降低肠上皮细胞CCL₂表达,且该作用与LY294002效果相当,表明其可能通过调控转录因子(如NF-κB或STAT3)影响CCL₂启动子活性。这一机制与白藜芦醇通过SIRT1/NF-κB通路抑制CCL₂的报道^[31,32]具有相似性,但本研究首次在肠上皮细胞中建立了PI3K/AKT/CCL₂的因果关系,并证实其与巨噬细胞极化的功能关联。

近年研究强调,肠上皮细胞不仅是物理屏障,更是免疫微环境调控的“信号枢纽”^[33]。本研究发现,DSS处理的Caco-2细胞通过分泌CCL₂促进RAW264.7迁移,而PSB干预可特异性阻断这一过程,这与Atarashi等^[34]关于肠上皮源性趋化因子驱动Th17细胞浸润的发现形成互补。值得注意的是,当使用外源性CCL₂重组蛋白干预后,可逆转PSB对巨噬细胞趋化及极化的抑制作用,进一步验证了CCL₂在此交互网络中的核心地位。这一结果与He等^[35]在克罗恩病患者中的临床观察一致(肠道CCL₂水平与巨噬细胞密度正相关),提示靶向肠上皮CCL₂分泌可能成为IBD治疗的新方向。

尽管本研究明确了PSB通过PI3K/AKT/CCL₂轴调控巨噬细胞趋化的分子机制,仍存在以下局限:首先,本研究每组6只小鼠的样本量虽能检测显著效应,但统计效能有限,可能受随机变异影响,后续需扩大样本量以提升结果稳健性。其次,已知CCL₂可促进M1型极化^[36],PSB调控巨噬细胞极化的分子机制尚未完全阐明,本研究证实PSB可降低M1型(iNOS⁺)并增加M2型(CD206⁺)巨噬细胞比例,但其作用是通过抑制CCL₂间接实现还是直接干预巨噬细胞还需进一步验证。再者,网络药理学预测的133个交集基因中,除PI3K/AKT和趋化因子通路外,其他潜在靶点(如MAPK或JAK-STAT通路)的作用仍需通过系统解析。此外,PSB的生物利用度及肠道特异性递送系统有待优化,以提升其临床适用性。

本研究系统阐明了PSB通过肠上皮PI3K/AKT/CCL₂轴抑制巨噬细胞趋化的新机制,其多靶点调控特性为IBD治疗提供了区别于传统生物制剂的替代策略。未来研究可进一步开发PSB衍生物以提高靶向性,或探索其与现有药物(如抗TNF-α抗体)的协同治疗效果。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] Zhang YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: pathogenesis[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(1): 91-9.
- [2] Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2015, 12(12): 720-7.
- [3] Chen YY, Cui WW, Li X, et al. Interaction between commensal bacteria, immune response and the intestinal barrier in inflammatory bowel disease[J]. Front Immunol, 2021, 12: 761981.
- [4] 郭琳, 耿燕, 岳远佳, 等. 猴头菌粉与5-氨基水杨酸联用抑制小鼠急性溃疡性结肠炎并提高肠道共生菌*Parabacteroides distans*丰度[J]. 菌物学报, 2021, 40(5): 1148-59.
- [5] van Deventer SJ. Review article: chemokine production by intestinal epithelial cells: a therapeutic target in inflammatory bowel disease? [J]. Aliment Pharmacol Ther, 1997, 11(Suppl 3): 116-20; discussion120-1.
- [6] Kotla NG, Rochev Y. IBD disease-modifying therapies: insights from emerging therapeutics[J]. Trends Mol Med, 2023, 29(3): 241-53.
- [7] Zhu YF, Yang SH, Zhao N, et al. CXCL8 chemokine in ulcerative colitis[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 138: 111427.
- [8] Alghamdi KS, Kassir RH, Farrash WF, et al. Key disease-related genes and immune cell infiltration landscape in inflammatory bowel disease: a bioinformatics investigation[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(17): 9751.
- [9] Geng ZJ, Zuo LG, Li J, et al. Ginkgetin improved experimental colitis by inhibiting intestinal epithelial cell apoptosis through EGFR/PI3K/AKT signaling[J]. FASEB J, 2024, 38(14): e23817.
- [10] Pozzi S, Satchi-Fainaro R. The role of CCL2/CCR2 axis in cancer and inflammation: The next frontier in nanomedicine[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2024, 209: 115318.
- [11] Trivedi PJ, Adams DH. Chemokines and chemokine receptors as therapeutic targets in inflammatory bowel disease; pitfalls and promise[J]. J Crohns Colitis, 2018, 12(suppl_2): S641-52.
- [12] Patel NK, Jaiswal G, Bhutani KK. A review on biological sources, chemistry and pharmacological activities of pinostrobin[J]. Nat Prod Res, 2016, 30(18): 2017-27.
- [13] 朱学鑫, 庞敏霞, 黄燕芬, 等. 山核桃叶球素制备工艺研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(11): 1512-6.
- [14] González AS, Soto Tellini VH, Benjumea Gutiérrez DM. Study of the dermal anti-inflammatory, antioxidant, and analgesic activity of pinostrobin[J]. Heliyon, 2022, 8(9): e10413.
- [15] Abdelwahab SI, Mohan S, Abdulla MA, et al. The methanolic extract of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. and its major compound pinostrobin induces anti-ulcerogenic property *in vivo*: possible involvement of indirect antioxidant action[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 137(2): 963-70.
- [16] Shareef SH, Al-Medhtiy MH, Al Rashdi AS, et al. Hepatoprotective effect of pinostrobin against thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats[J]. Saudi J Biol Sci, 2023, 30(1): 103506.
- [17] Murthy SN, Cooper HS, Shim H, et al. Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin[J]. Dig Dis Sci, 1993, 38(9): 1722-34.

- [18] 张敏, 刘生宝, 张诺, 等. 改进型“瑞士卷”法在小鼠肠道组织切片中的应用[J]. 中华病理学杂志, 2024, 53(04): 393-7.
- [19] Le Naour J, Montégut L, Joseph A, et al. Improved Swiss-rolling method for histological analyses of colon tissue[J]. MethodsX, 2022, 9: 101630.
- [20] Schultz M, Tonkonogy SL, Sellon RK, et al. IL-2-deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation[J]. Am J Physiol, 1999, 276(6): G1461-72.
- [21] Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS, et al. Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats[J]. J Clin Invest, 1996, 98(4): 945-53.
- [22] Mallawaarachy DM, Mactier S, Kaufman KL, et al. The phosphoinositide 3-kinase inhibitor LY294002, decreases aminoacyl-tRNA synthetases, chaperones and glycolytic enzymes in human HT-29 colorectal cancer cells[J]. J Proteomics, 2012, 75(5): 1590-9.
- [23] Athapaththu AMGK, Sanjaya SS, Lee KT, et al. Pinostrobin suppresses the α -melanocyte-stimulating hormone-induced melanogenic signaling pathway[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(1): 821.
- [24] Gomes RN, Teixeira-Cunha MGA, Figueiredo RT, et al. Bacterial clearance in septic mice is modulated by MCP-1/CCL2 and nitric oxide[J]. Shock, 2013, 39(1): 63-9.
- [25] Yu KY, Li QQ, Sun X, et al. Bacterial indole-3-lactic acid affects epithelium-macrophage crosstalk to regulate intestinal homeostasis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2023, 120(45): e2309032120.
- [26] Zhang HL, Zheng YJ, Pan YD, et al. A mutation that blocks integrin $\alpha_4\beta_7$ activation prevents adaptive immune-mediated colitis without increasing susceptibility to innate colitis[J]. BMC Biol, 2020, 18(1): 64.
- [27] Hou QK, Zhu SL, Zhang CR, et al. Berberine improves intestinal epithelial tight junctions by upregulating A20 expression in IBS-D mice[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 118: 109206.
- [28] Borges GA, Elias ST, Amorim B, et al. Curcumin downregulates the PI3K-AKT-mTOR pathway and inhibits growth and progression in head and neck cancer cells[J]. Phytother Res, 2020, 34(12): 3311-24.
- [29] Mei CX, Meng FX, Wang X, et al. CD30L is involved in the regulation of the inflammatory response through inducing homing and differentiation of monocytes via CCL2/CCR2 axis and NF- κ B pathway in mice with colitis[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 110: 108934.
- [30] Gholamalizadeh H, Ensan B, Sukhorukov VN, et al. Targeting the CCL2-CCR2 signaling pathway: potential implications of statins beyond cardiovascular diseases[J]. J Pharm Pharmacol, 2024, 76(2): 138-53.
- [31] Mostafa DK, Eissa MM, Ghareeb DA, et al. Resveratrol protects against *Schistosoma mansoni*-induced liver fibrosis by targeting the Sirt1/NF- κ B axis[J]. Inflammopharmacology, 2024, 32(1): 763-75.
- [32] Zhang H, Shan Y, Wu Y, et al. Berberine suppresses LPS-induced inflammation through modulating Sirt1/NF- κ B signaling pathway in RAW_{264.7} cells[J]. Int Immunopharmacol, 2017, 52: 93-100.
- [33] Zhao JJ, Guo MM, Yan YP, et al. The miR-7/EGFR axis controls the epithelial cell immunomodulation and regeneration and orchestrates the pathology in inflammatory bowel disease[J]. J Adv Res, 2024, 57: 119-34.
- [34] Atarashi K, Tanoue T, Ando M, et al. Th17 cell induction by adhesion of microbes to intestinal epithelial cells[J]. Cell, 2015, 163(2): 367-80.
- [35] He J, Song YJ, Li GP, et al. Fbxw7 increases CCL2/7 in CX3CR1hi macrophages to promote intestinal inflammation[J]. J Clin Invest, 2019, 129(9): 3877-93.
- [36] Carson WF, Salter-Green SE, Scola MM, et al. Enhancement of macrophage inflammatory responses by CCL2 is correlated with increased miR-9 expression and downregulation of the ERK1/2 phosphatase Dusp6[J]. Cell Immunol, 2017, 314: 63-72.

(编辑: 经 媛)