

刺桐碱通过抑制肠上皮炎症反应并改善肠屏障功能缓解小鼠克罗恩病样结肠炎

黄晴晴^{1,4}, 杨晶晶⁴, 姜雪凝⁴, 张文静¹, 汪煜⁴, 左芦根^{2,4}, 王炼^{2,4}, 王月月^{1,4}, 张小凤^{3,4}, 宋雪^{3,4}, 胡建国^{1,4}
蚌埠医科大学第一附属医院¹检验科,²胃肠外科,³中心实验室,安徽蚌埠 233004;⁴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 233004

摘要:目的 探讨刺桐碱(HYP)对小鼠克罗恩病(CD)样结肠炎的作用及其分子机制。方法 本研究采用2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)诱导构建小鼠CD样结肠炎模型。将30只C57BL/6J雄性小鼠随机分为3组:WT组、TNBS组和HYP组,10只/组。TNBS组和HYP组采用TNBS诱导结肠炎,HYP组每日灌胃15 mg/kg HYP,其余2组给予等量生理盐水。通过疾病活动指数(DAI)评分、体质量变化、结肠长度及组织病理学评分等指标,评估HYP对小鼠CD样结肠炎的治疗效果。在体外实验中,采用LPS刺激的Caco-2细胞建立肠上皮炎症模型,分为Control组、LPS组和LPS+HYP组。采用qRT-PCR、免疫荧光等技术检测HYP对肠上皮炎症反应及屏障功能的影响。进一步通过GO和KEGG富集分析预测HYP的作用机制,并利用Western blotting验证关键信号通路的调控。结果 体内研究结果显示,HYP干预可改善TNBS诱导的小鼠结肠炎症状,具体表现为:体质量下降趋势减缓、结肠长度缩短程度改善、DAI评分及组织炎症评分降低,同时结肠黏膜中促炎因子表达水平下调($P<0.05$)。在肠屏障功能方面,HYP干预后TNBS模型小鼠结肠组织TEER值升高,细菌移位率(肠系膜淋巴结、肝脏、脾脏)降低,血清中I-FABP和FITC-Dextran的浓度下降($P<0.05$)。此外,HYP干预还可增加结肠组织杯状细胞数量,并上调MUC2和紧密连接蛋白(Claudin-1,ZO-1)表达($P<0.05$)。体外研究结果显示,与LPS组相比,HYP处理可抑制Caco-2细胞促炎因子表达并恢复紧密连接蛋白水平($P<0.05$)。Western blotting分析显示,HYP在体内外模型中均能下调TLR4/MyD88信号通路关键蛋白的表达($P<0.05$)。结论 HYP可能通过抑制肠上皮炎症反应并改善肠屏障功能,从而缓解小鼠CD样结肠炎。

关键词: 克罗恩病;结肠炎;刺桐碱;肠屏障;肠上皮细胞

Hypaphorine alleviates Crohn's disease-like colitis in mice by inhibiting intestinal epithelial inflammatory response and protecting intestinal barrier function

HUANG Qingqing^{1,4}, YANG Jingjing⁴, JIANG Xuening⁴, ZHANG Wenjing¹, WANG Yu⁴, ZUO Lugen^{2,4}, WANG Lian^{2,4}, WANG Yueyue^{1,4}, ZHANG Xiaofeng^{3,4}, SONG Xue^{3,4}, HU Jianguo^{1,4}

¹Clinical Laboratory, ²Department of Gastrointestinal surgery, ³Central Laboratory, First Affiliated Hospital of Bengbu Medical University, Bengbu 233004, China; ⁴Anhui Provincial Key Laboratory of Basic and Translational Research of Inflammation-related Diseases, Bengbu 233004, China

Abstract: Objective To investigate the effect of hypaphorine (HYP) on Crohn's disease (CD)-like colitis in mice and its molecular mechanism. **Methods** Thirty male C57BL/6J mice were equally randomized into WT, TNBS, and HYP groups, and in the latter two groups, mouse models of CD-like colitis were established using TNBS with daily gavage of 15 mg/kg HYP or an equivalent volume of saline. The treatment efficacy was evaluated by assessing the disease activity index (DAI), body weight changes, colon length and histopathology. The effect of HYP was also tested in a LPS-stimulated Caco-2 cell model mimicking intestinal inflammation by evaluating inflammatory responses and barrier function of the cells using qRT-PCR and immunofluorescence staining. GO and KEGG analyses were conducted to explore the therapeutic mechanism of HYP, which was validated in both the cell and mouse models using Western blotting. **Results** In the mouse models of CD-like colitis, HYP intervention obviously alleviated colitis as shown by significantly reduced body weight loss, colon shortening, DAI and inflammation scores, and expressions of pro-inflammatory factors in the colon tissues. HYP treatment also significantly increased the TEER values, reduced bacterial translocation to the mesenteric lymph nodes, liver, and spleen, lowered serum levels of I-FABP and FITC-dextran, increased the number of colonic tissue cup cells, and upregulated colonic expressions of MUC2 and tight junction proteins (claudin-1 and ZO-1) in the mouse models. In LPS-stimulated Caco-2 cells, HYP treatment significantly inhibited the expressions of pro-inflammatory factors and increased the expressions of tight junction proteins. Western blotting showed that HYP downregulated the expressions of the key proteins in the TLR4/MyD88 signaling pathway in both the *in vitro* and *in vivo* models. **Conclusion** HYP alleviates CD-like colitis in mice possibly by suppressing intestinal epithelial inflammation and improving gut barrier function.

Keywords: Crohn's disease; colitis; hypaphorine; intestinal barrier; intestinal epithelial cells

收稿日期:2025-04-15

基金项目:国家级大学生创新创业训练计划项目(202310367057);安徽省卫生健康委科研项目(AHWJ2024Aa40007, AHWJ2024Aa10051);安徽省临床医学研究转化专项(202427b10020093, 202427b10020094);

作者简介:黄晴晴,在读硕士研究生, E-mail: hqq10100@163.com

通信作者:胡建国,教授,博士生导师, E-mail: jghu9200@bbmc.edu.cn

克罗恩病(CD)是炎症性肠病(IBD)的主要亚型之一,其典型病理特征为肠道免疫失衡和透壁性炎症^[1]。尽管其确切发病机制尚未完全阐明,但研究表明,遗传易感性、环境因素、肠屏障损伤及肠道微生物群的异常相互作用共同参与疾病的发生与发展^[2]。其中,肠道屏障的破坏在CD的发病机制中发挥着至关重要的作

用^[3]。肠机械屏障由上皮细胞和紧密连接蛋白(如 Claudin-1、ZO-1 等)共同构成,其结构完整性是抵御病原体及其内毒素入侵的关键^[4]。在肠上皮炎症反应过程中,促炎因子(如 TNF- α 和 IL-1 β 等)通过下调紧密连接蛋白的表达并干扰其正常分布,直接破坏肠屏障功能,促使肠道内细菌及抗原易位,进而加重肠道炎症^[5]。因此,靶向调控肠上皮炎症并保护肠屏障已成为治疗 CD 的潜在策略^[6]。目前,CD 的临床治疗主要依赖于药物干预,包括氨基水杨酸制剂、糖皮质激素、免疫抑制剂(如硫唑嘌呤、甲氨蝶呤)以及生物制剂(如抗 TNF- α 单抗^[7-9])。然而,现有治疗方案仍存在疗效不足、副作用明显、个体差异大等局限性^[10-12]。天然药物单体凭借多靶点调控和低毒性等优势,在 CD 治疗领域展现出潜在的应用价值^[13-15]。

刺桐碱(HYP)是一种从传统药用植物牛大力和王不留行中提取的吲哚类生物碱^[16, 17]。既往文献报道,HYP 能够通过下调 TLR4 信号通路显著缓解 LPS 诱导的内皮炎症反应^[18];此外,其还可通过调控 DUSP1/p38/JNK 通路,在 LPS 介导的急性肺损伤中发挥抗炎作用^[19]。然而,现有研究主要局限于 HYP 的单一抗炎功能,而 CD 的治疗需同时靶向炎症抑制和肠屏障修复。基于此,本研究旨在探究 HYP 能否通过调节肠上皮炎症反应并改善肠屏障功能,从而缓解小鼠 CD 样结肠炎。通过建立 TNBS 诱导的小鼠结肠炎模型和 LPS 诱导的 Caco-2 细胞模型,结合分子生物学和免疫学技术,系统性评估 HYP 对肠上皮炎症、肠屏障功能以及 TLR4 信号通路的影响,以期 HYP 作为 CD 治疗新策略提供重要的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物和细胞 6~8 周龄的 C57BL/6J 雄性小鼠(20~25 g)购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司。小鼠在标准条件下饲养(温度 20~24 °C,湿度 40%~60%,12 h 光照/黑暗周期),自由摄食和饮水。所有动物实验均经蚌埠医科大学伦理委员会批准(伦理批号:伦动科批字[2024]第 421 号)。人结肠癌细胞系 Caco-2 来源于中国医学科学院肿瘤细胞库,在 DMEM 高糖培养基(含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素)中,于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养。

1.1.2 试剂 TNBS, LPS(Sigma-Aldrich);FITC-dextran (TargetMol);TB Green Premix Ex Taq II, PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser(Takara Bio);兔抗 Claudin-1 多克隆抗体、山羊抗兔 IgG H&L (Alexa Fluor® 647)、山羊抗兔 IgG H&L (FITC)、山羊抗小鼠 IgG H&L (Alexa Fluor® 555)及兔抗 MUC2 单克隆抗

体(Abcam);小鼠抗 ZO-1 单克隆抗体(Invitrogen);兔抗 TLR4 多克隆抗体及小鼠抗 MyD88 单克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司);刺桐碱(上海源叶生物科技有限公司);CCK-8 细胞增殖-毒性检测试剂盒、苏木素-伊红(H&E)高清恒染试剂盒及 AB-PAS 染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);小鼠 I-FABP/TNF- α /IL-6/IL-1 β ELISA 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);50 \times Cocktail 蛋白酶抑制剂(武汉赛维尔生物科技有限公司);BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);小鼠抗 β -actin 单克隆抗体、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 及 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 模型及分组

1.2.1 TNBS 诱导的小鼠结肠炎模型及分组 构建 TNBS 诱导的小鼠结肠炎模型,具体操作如下^[20]:将 30 只 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为 3 组:WT 组、TNBS 组和 HYP 组,10 只/组。对 TNBS 组和 HYP 组小鼠进行造模处理,WT 组灌肠等量生理盐水。造模前,小鼠禁食不禁水 24 h;采用腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉小鼠后,用注射器抽取 100 μ L 的 2.5% TNBS 乙醇溶液,采用聚乙烯软管经肛门缓慢注入小鼠直肠内,并保持头低臀高位 5 min;造模后,HYP 组小鼠连续 6 d 每日灌胃 100 μ L HYP 溶液(15 mg/kg)^[19, 21, 22],WT 组和 TNBS 组小鼠每日灌胃等体积生理盐水。造模当天和造模后第 7 天记录小鼠体重,实验期间观察并记录各组小鼠粪便形状和便血情况,采用疾病活动指数(DAI)评分标准评估结肠炎严重程度^[23]。造模后第 7 天,麻醉各组小鼠并取血清,分装后-80 °C 保存,随后颈椎脱臼处死小鼠,迅速分离结肠组织,测量长度并拍照,5 只/组于 4% 多聚甲醛中固定,另 5 只刮取肠黏膜组织于-80 °C 保存备用。

1.2.2 LPS 刺激的 Caco-2 细胞炎症模型及分组 设置 Control 组、LPS 组及 LPS+HYP 组,将 Caco-2 细胞分别接种于 6 孔板(4×10^5 /孔)和 24 孔板(5×10^4 /孔),各组细胞生长至 70%~80% 后弃去原有培养基,Control 组加入新鲜培养基,LPS 组加入含 10 μ g/mL LPS 的完全培养基^[24],LPS+HYP 组加入含 10 μ g/mL LPS 联合 12.5 μ mol/L HYP 的完全培养基^[18],刺激 24 h 后,收集 24 孔板中的细胞培养上清液并离心用于 ELISA 检测,6 孔板中弃去上清液分别加入 TRIzol 试剂,用于后续 qRT-PCR 分析。

1.3 方法

1.3.1 HE 染色和结肠组织炎症评分 各组结肠组织经 4% 多聚甲醛固定 24 h 后,沿纵轴卷曲成“瑞士卷”状,依次经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡浸渍后包埋。使用切片机制备 3 μ m 厚度的连续切片,严格按照 HE 染色

试剂盒说明书进行操作。采用全自动数字玻片扫描系统(VS200)扫描,并参照既往文献报道的组织病理学评分标准进行评估^[25]。

1.3.2 跨上皮电阻(TEER)测定 新鲜结肠组织用PBS冲洗后置于Krebs缓冲液(37 °C,pH 7.33~7.37)中,切成长2.8 mm、宽11 mm片段,放入Ussing chamber系统。两腔充满Krebs缓冲液,血清侧加10 mmol/L葡萄糖,管腔侧加10 mmol/L甘露醇。调节电压和电流,测定TEER值,平衡15 min后读数。将Caco-2细胞(Control组、LPS组、LPS+HYP组)接种于3 μm孔径Transwell小室,插入24孔板。上下室加入完全培养基,每2天换液,培养21 d形成单层。使用细胞电阻仪测定TEER值,评估屏障完整性。

1.3.3 细菌移位 无菌分离小鼠肠系膜淋巴结、肝脏和脾脏,各取0.1 g(每脏器3份)加入0.9 mL生理盐水制成匀浆。取100 μL匀浆涂布于培养基,37 °C培养24 h。菌落数>10² CFU/g为阳性,计算各组各脏器阳性样本数与总样本数的百分比,即细菌移位率。

1.3.4 异硫氰酸-葡聚糖荧光素(FITC-dextran)检测 取检前,各组小鼠禁食4 h,灌胃FITC-dextran(600 mg/kg)。4 h后采集小鼠心脏血液,室温静置1 h,离心分离血清,使用荧光分光光度计检测血清中FITC-dextran浓度。

1.3.5 AB-PAS染色 首先将切片脱蜡水化,随后浸入阿利新蓝染液中室温染色10 min,滴加1%过碘酸氧化5 min后,浸入Schiff试剂室温避光染色10 min。苏木素染核1 min,1%盐酸乙醇分化2 s,1%氨水返蓝15 s。经梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片后扫描成数字玻片。采用Image J计算隐窝中杯状细胞数量。

1.3.6 免疫组化染色 采用免疫组化染色检测小鼠结肠组织中MUC2的表达水平。切片脱蜡水化后,经柠檬酸钠缓冲液抗原修复30 min,3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶30 min,10%山羊血清封闭30 min。滴加一抗(MUC2,1:1000)4 °C孵育过夜,PBS洗涤后滴加二抗(HRP标记的山羊抗兔IgG,1:2000)室温孵育1 h,DAB显色3 min,光学显微镜下观察,MUC2阳性信号呈棕色,随后进行苏木素染核10 min,经分化、返蓝、脱水、透明后封片。采用Image J计算IOD值。

1.3.7 小鼠结肠组织免疫荧光染色 采用免疫荧光染色检测小鼠结肠组织中Claudin-1和ZO-1的表达水平。各组小鼠结肠组织石蜡切片经脱蜡水化后,95 °C下柠檬酸钠缓冲液抗原修复1 h。5% BSA封闭1 h后,加入一抗(Claudin-1,1:400;ZO-1,1:200)4 °C孵育过夜。PBS洗涤后,加入荧光二抗[山羊抗兔IgG H&L(Alexa Fluor 647),1:1000;山羊抗小鼠IgG H&L(Alexa Fluor 555),1:1000]室温避光孵育1 h。DAPI染核5 min,封片后于Leica倒置荧光显微镜下扫描染色结果。

1.3.8 实时荧光定量PCR(qRT-PCR) 采用qRT-PCR检测小鼠肠黏膜组织和Caco-2细胞炎症因子的mRNA表达水平。使用TRIzol法提取各组小鼠肠黏膜组织和Caco-2细胞的总RNA,按照PrimeScript RT reagent Kit说明书进行反转录反应,合成cDNA。qRT-PCR反应体系配制如下:TB Green Premix Ex Taq II (2×)12.5 μL,正反向引物(10 μmol/L)各1 μL,cDNA溶液2.5 μL,加ddH₂O至25 μL。反应条件:95 °C预变性30 s;95 °C 5 s,60 °C 10 s,40个循环。采用2^{-ΔΔCt}法进行相对定量分析,以GAPDH作为内参基因。引物序列均由上海生工合成(表1)。

表1 引物序列

Tab.1 Primer sequences for qRT-PCR in this study

Gene name	Primer sequences
TNF-α	Forward:5'-CAGGCGGTGCCTATGTCTC-3'
	Reverse:5'-CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG-3'
IL-6	Forward:5'-TCTATACCACTTCACAAGTCGGA-3'
	Reverse:5'-GAATTGCCATTGCACAACCTCTTT-3'
IL-1β	Forward:5'-GAAATGCCACCTTTTGACAGTG-3'
	Reverse:5'-TGGATGCTCTCATCAGGACAG-3'
GAPDH	Forward:5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTG-3'
	Reverse:5'-GGGGTCGTTGATGGCAACA-3'

1.3.9 ELISA 取各组小鼠肠黏膜组织,按组织质量与RIPA裂解液1:10的比例(0.1 g/mL)加入预冷的RIPA裂解液,在冰上用组织匀浆器充分匀浆,离心后取上清。同时,取出各组小鼠血清和体外培养各组Caco-2细胞培养上清液,按照ELISA试剂盒操作步骤,分别检测以下指标:小鼠肠黏膜组织和Caco-2细胞培养上清液中TNF-α、IL-6和IL-1β的表达水平;小鼠血清中肠型脂肪结合蛋白(I-FABP)的表达水平。

1.3.10 细胞免疫荧光染色 将Caco-2细胞接种于放置细胞爬片的24孔板中,实验分为Control组、LPS组和LPS+HYP组。干预24 h后,依次进行4%多聚甲醛固定、0.2% TritonX-100通透处理,其余步骤同1.3.7,一抗(Claudin-1,1:400;ZO-1,1:200),荧光二抗[山羊抗兔IgG H&L(FITC),1:1000;山羊抗小鼠IgG H&L(Alexa Fluor 555),1:1000]。

1.3.11 基因本体(GO)和京都基因和基因组数据库(KEGG)富集分析 本研究采用多数据库联合分析策略对HYP分子靶点及CD治疗靶点进行系统性预测与分析。首先,利用SwissTargetPrediction(<http://swisstargetprediction.ch/>)、SuperPred(<https://prediction.charite.de/>)、PharmMapper(http://www.lilab-ecust.cn/pharm_mapper/)3大数据库对HYP潜在作用靶点进行预测。

其次,通过 DisGeNet (<http://disgenet.cn/>)、DrugBank Online (<https://go.drugbank.com/>)、Therapeutic Target Database (<https://db.idrblab.net/ttd/>)、PharmGKB (<https://www.pharmgkb.org/>)、GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 5 大数据库获取 CD 相关治疗靶点。将上述预测靶点取交集,采用 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) 进行 GO 和 KEGG 富集分析,以预测 HYP 的相关生物学功能和治疗 CD 潜在的作用机制。

1.3.12 Western blotting 分别收集各组小鼠肠黏膜组织及 Caco-2 细胞样本,加入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液进行充分裂解。4 °C 条件下 12 000×g 离心 15 min 后,收集上清液。采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,调整为等量蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳分离。随后通过湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上,使用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h。加入一抗(Claudin-1, 1:1000; ZO-1, 1:1000; TLR4, 1:1000; MyD88, 1:1000; β -actin, 1:3000) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤后加入二抗(HRP 标

记的山羊抗兔/小鼠 IgG, 1:3000) 室温孵育 1 h, 最后使用 ECL 化学发光试剂进行显影, 通过数码凝胶图像处理系统采集并使用 Image J 分析条带灰度值。

1.4 统计学分析

本研究采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计量资料符合正态分布者以均数±标准差表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HYP 给药可缓解 TNBS 模型小鼠 CD 样结肠炎

与 WT 组相比, TNBS 组小鼠出现体质量减轻和便血症状, 而 HYP 治疗可改善 TNBS 模型小鼠的体质量下降程度并降低 DAI 评分 ($P < 0.05$, 图 1A、B)。结肠长度显示, 与 TNBS 组相比, HYP 组小鼠结肠缩短程度减轻 ($P < 0.05$, 图 1C、D)。HE 染色结果表明, HYP 治疗可修复肠绒毛和隐窝结构、减少炎性细胞浸润, 改善 TNBS 模型小鼠结肠组织的病理损伤并降低炎症评分 ($P < 0.05$, 图 1E、F)。

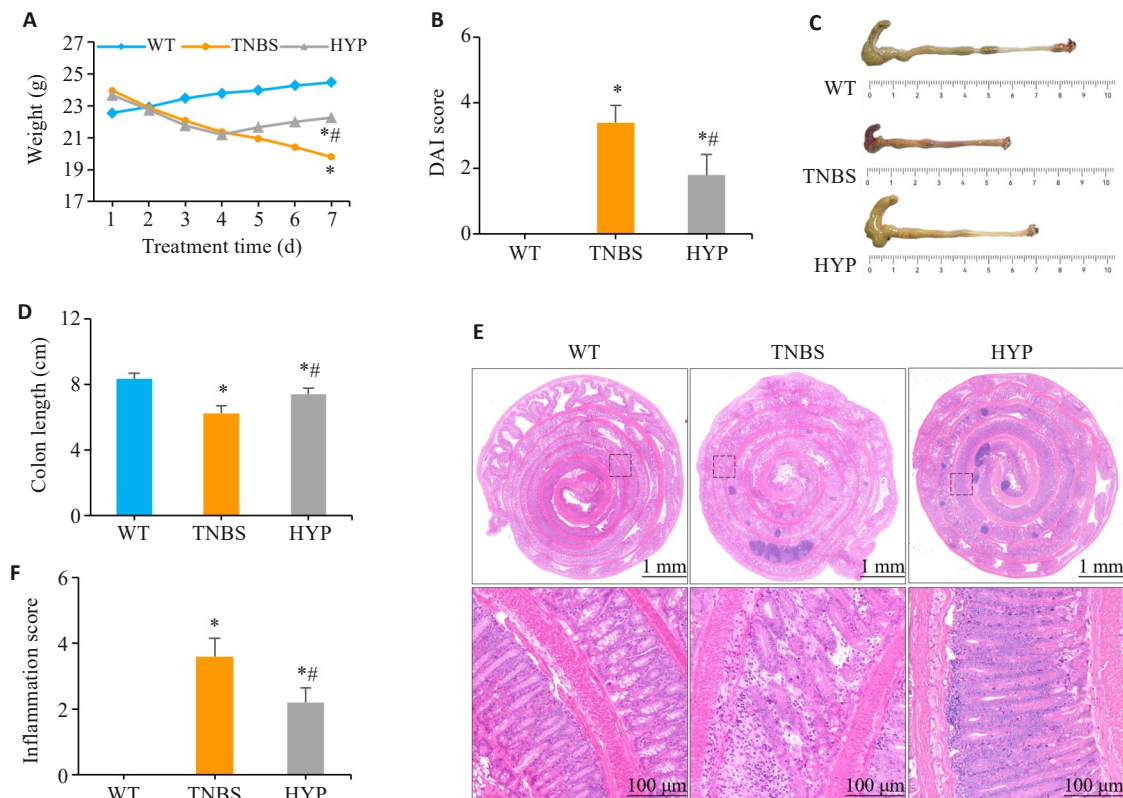


图1 HYP 给药可缓解 TNBS 模型小鼠 CD 样结肠炎

Fig. 1 HYP treatment alleviates CD-like colitis in TNBS-treated mice. A: Body weight changes. B: DAI score. C: Gross observation of the dissected colon from each groups. D: Colon length in each group. E: HE staining of colonic sections of the mice from each group (scale bar=1 mm or 100 μ m). F: Colonic inflammation scores in each group. * $P < 0.05$ vs WT, ** $P < 0.05$ vs TNBS.

2.2 HYP 给药降低 TNBS 模型小鼠结肠黏膜中炎症介质水平

qRT-PCR 和 ELISA 结果显示,与 WT 组相比,

TNBS 模型小鼠结肠黏膜组织中促炎因子(TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β)的表达水平升高,经 HYP 干预后促炎因子水平下降($P < 0.05$,图2)。

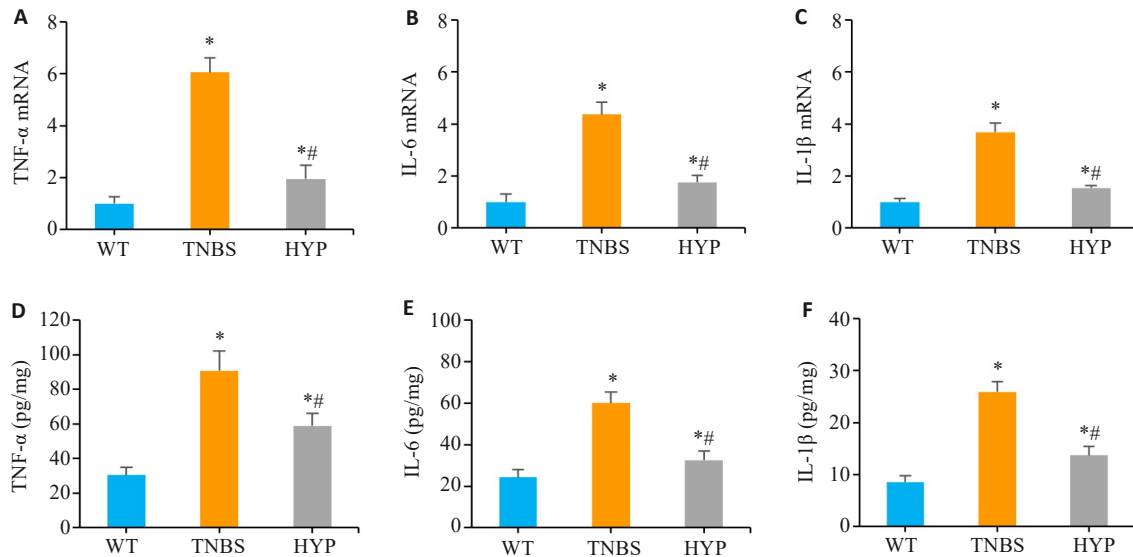


图2 HYP 给药降低 TNBS 模型小鼠结肠黏膜中炎症介质水平

Fig.2 HYP treatment reduces the levels of inflammatory mediators in the colonic mucosa of TNBS-treated mice.

A-C: Expression levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β mRNAs in mouse colonic mucosal tissue. D-F: Expression levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β proteins in mouse colonic mucosal tissue. * $P < 0.05$ vs WT, ** $P < 0.05$ vs TNBS.

2.3 HYP 给药改善 TNBS 模型小鼠肠屏障损伤

与 TNBS 组相比,HYP 干预可提高小鼠结肠组织 TEER 值($P < 0.05$,图3A),同时降低肠系膜淋巴结、肝脏和脾脏中的细菌移位率($P < 0.05$,图3B~D),以及血清中 I-FABP 和 FITC-Dextran 浓度($P < 0.05$,图3E、F)。AB-PAS 染色结果表明,HYP 干预可增加 TNBS 模型小鼠结肠组织中杯状细胞数量,促进黏液蛋白表达($P < 0.05$,图3G、H)。免疫组化染色结果进一步表明,HYP 干预可增加 TNBS 诱导的小鼠结肠组织中 MUC2 的表达($P < 0.05$,图3G、I)。免疫荧光染色和 Western blotting 结果显示,HYP 治疗可提高 TNBS 模型小鼠结肠组织中 Claudin-1 和 ZO-1 表达水平($P < 0.05$,图3J~M)。

2.4 HYP 干预降低 LPS 诱导的 Caco-2 细胞中炎症介质水平

qRT-PCR 和 ELISA 结果显示,与 LPS 组相比,HYP 处理可降低细胞中促炎因子(TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β)释放水平($P < 0.05$,图4A~F)。

2.5 HYP 干预改善 LPS 诱导的 Caco-2 细胞屏障损伤

与 LPS 组相比,HYP 干预可提高 Caco-2 细胞 TEER 值($P < 0.05$,图5A)。细胞免疫荧光染色结果显示,在 Control 组中,Claudin-1 和 ZO-1 均匀分布在 Caco-2 细胞膜上,LPS 刺激后 Claudin-1 和 ZO-1 荧光信号减弱、分布紊乱,HYP 处理可恢复紧密连接蛋白的表达和分布($P < 0.05$,图5B)。Western blotting 结果表明,

与 LPS 组相比,LPS+HYP 组 Claudin-1 和 ZO-1 的蛋白水平上调($P < 0.05$,图5C~E)。

2.6 HYP 缓解 CD 样肠炎可能与炎症反应和 TLR 信号通路有关

GO 和 KEGG 富集分析结果显示,交集靶点富集于“炎症反应”和“TLR 信号通路”,提示 HYP 可能通过调节 TLR 信号通路及相关基因表达发挥其抗炎作用,从而对 CD 有治疗效果($P < 0.05$,图6A、B)。

2.7 HYP 可下调 TLR4/MyD88 信号通路

在 TNBS 诱导的小鼠 CD 样结肠炎模型中,Western blotting 结果表明,与 WT 组相比,TNBS 组小鼠结肠黏膜中 TLR4 和 MyD88 蛋白水平升高,而 HYP 干预可下调其表达水平($P < 0.05$,图7A~C)。在 LPS 刺激的 Caco-2 细胞炎症模型中,Western blotting 结果表明,HYP 处理可降低 LPS 组 Caco-2 细胞中 TLR4 和 MyD88 蛋白水平($P < 0.05$,图7D~F)。

3 讨论

本研究的主要结果如下:HYP 干预可改善小鼠 CD 样结肠炎症状;HYP 可减轻肠上皮炎症反应和保护肠屏障功能;HYP 治疗 TNBS 模型小鼠结肠炎的作用可能部分通过调控 TLR4/MyD88 信号通路实现。

本研究采用 TNBS 诱导的小鼠结肠炎模型,该模型不仅能重现 CD 患者常见的腹泻、便血及进行性体质量

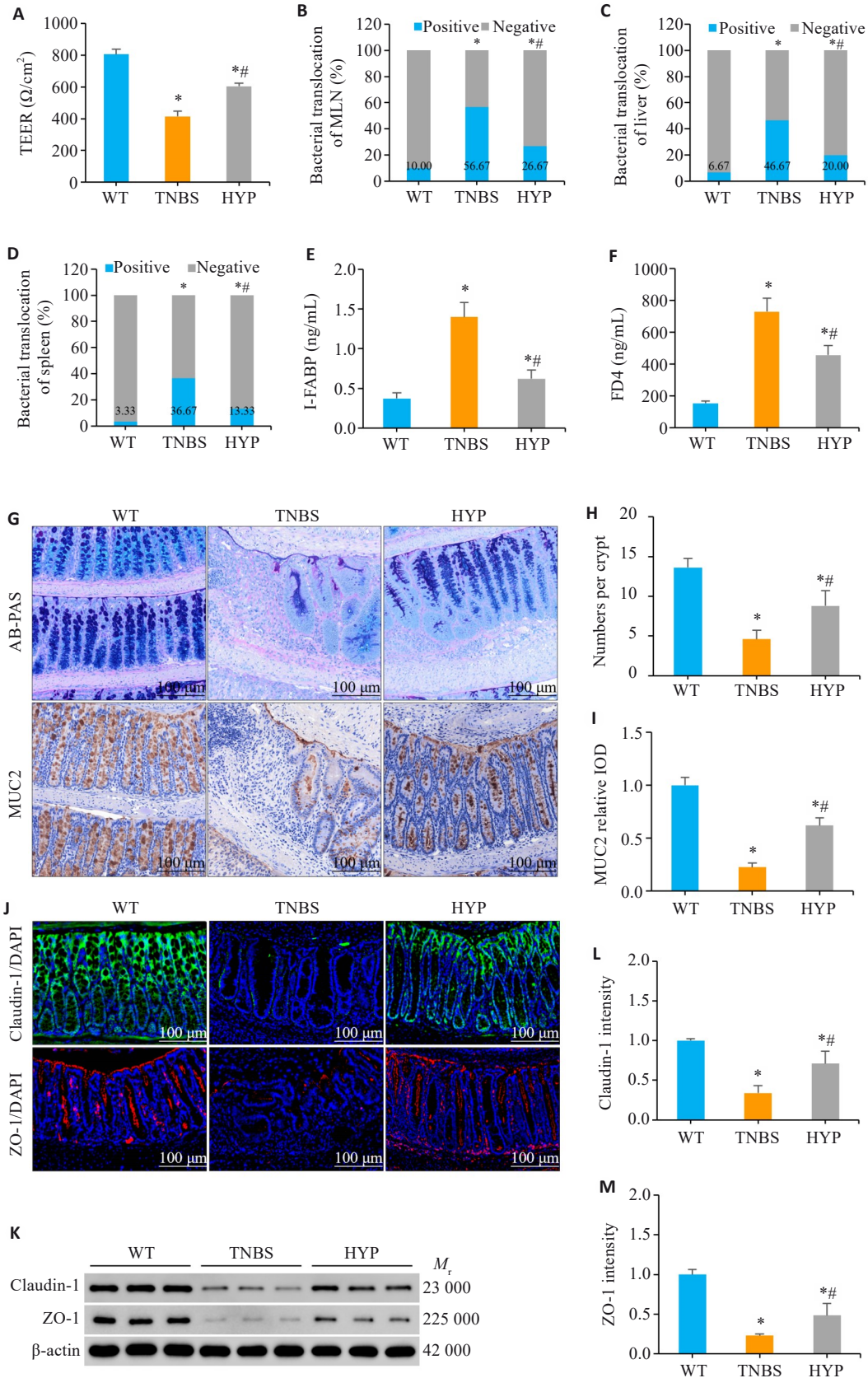


图3 HYP给药改善TNBS模型小鼠肠屏障损伤

Fig.3 HYP ameliorates intestinal barrier damage in TNBS-treated mice. **A**: TEER values of mouse colon tissues in each group. **B-D**: Bacterial translocation rate in the mesenteric lymph nodes, liver, and spleen. **E, F**: Serum levels of I-FABP and FD4 in each group. **G**: AB-PAS and immunohistochemical staining of colonic sections (scale bar=100 μm). **H, I**: Number of goblet cells per crypt and MUC2 expression level in mouse colon tissue in the 3 groups. **J, L**: Immunofluorescence staining of colonic sections from each group (scale bar=100 μm). **K, M**: Expression levels of claudin-1 and ZO-1 in mouse colon tissues in each group. * $P<0.05$ vs WT, # $P<0.05$ vs TNBS.

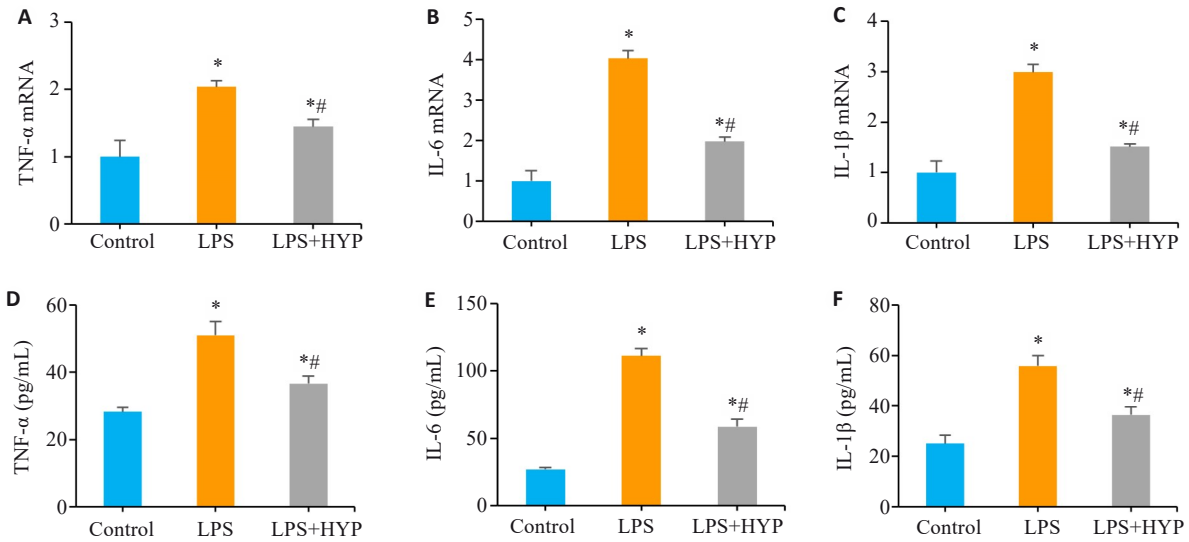


图4 HYP干预降低LPS诱导的Caco-2细胞中炎症介质水平

Fig.4 HYP treatment reduces inflammatory mediator levels in LPS-induced Caco-2 cells. A-C: Expression levels of TNF-α, IL-6 and IL-1β mRNAs in Caco-2 cells with different treatments. D-F: Protein levels of TNF-α, IL-6 and IL-1β in Caco-2 cells with different treatments. **P*<0.05 vs Control, #*P*<0.05 vs LPS.

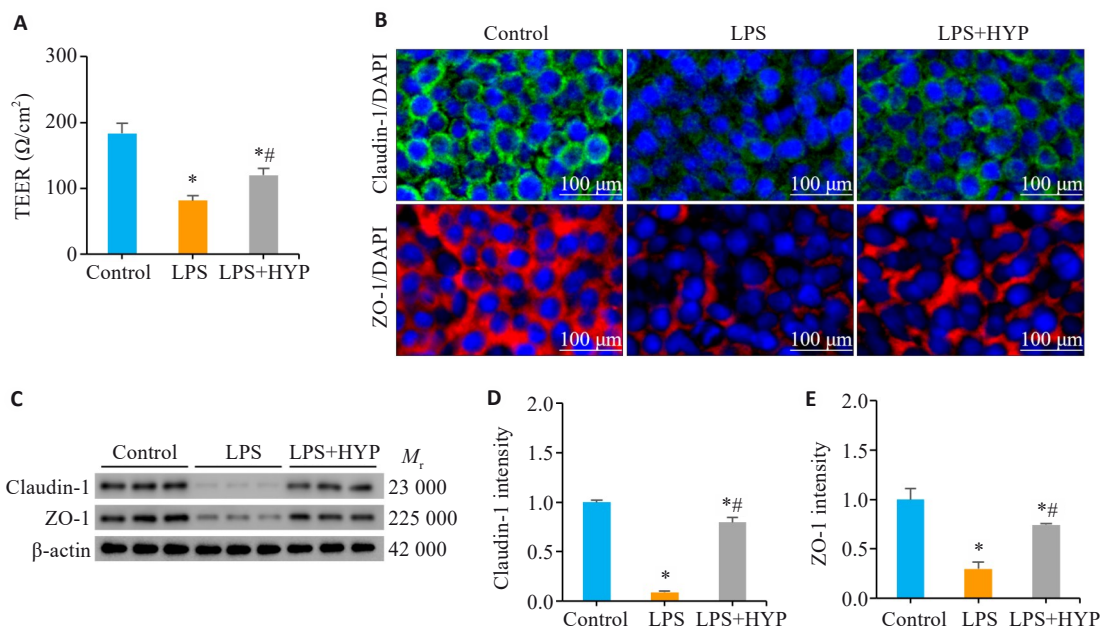


图5 HYP干预改善LPS诱导的Caco-2细胞屏障损伤

Fig.5 HYP treatment ameliorates LPS-induced barrier damage in Caco-2 cells. A: TEER value of Caco-2 cells. B: Immunofluorescence staining of Caco-2 cells with different treatments (scale bar=100 μm). C-E: Expression levels of claudin-1 and ZO-1 in Caco-2 cells with different treatments. **P*<0.05 vs Control, #*P*<0.05 vs LPS.

下降等典型症状,还能高度模拟CD患者的关键病理特征,表现为肠壁炎症细胞浸润、溃疡形成和隐窝结构破坏^[26,27]。研究结果显示,HYP可缓解TNBS模型小鼠结肠炎症状,包括体质量和结肠长度增加、DAI评分和组织学炎症评分降低。既往文献报道,吡啶类生物碱HYP在糖尿病大鼠慢性创面模型中表现出显著的抗炎作用,其机制涉及抑制创面局部促炎因子(TNF-α和IL-1β等)促炎因子表达,进而改善炎症微环境并促进创面愈合^[28]。基于这一发现,本研究体内外进一步检测

TNF-α、IL-6和IL-1β释放水平,提示HYP可能通过拮抗肠上皮细胞炎症发挥肠道保护作用。

肠屏障是维持肠道稳态的关键防线,由生物屏障、黏液屏障、上皮屏障和免疫屏障共同组成^[29]。其中,肠上皮屏障是肠道物理防御的核心结构,由上皮细胞及其连接结构组成,通过维持结构完整性和高TEER值实现屏障功能^[30]。此外,杯状细胞分泌的MUC2可在肠腔表面形成黏液层,既构成物理性隔离屏障,又通过糖链结合病原体发挥化学屏障作用^[31,32]。在CD病理进程中,

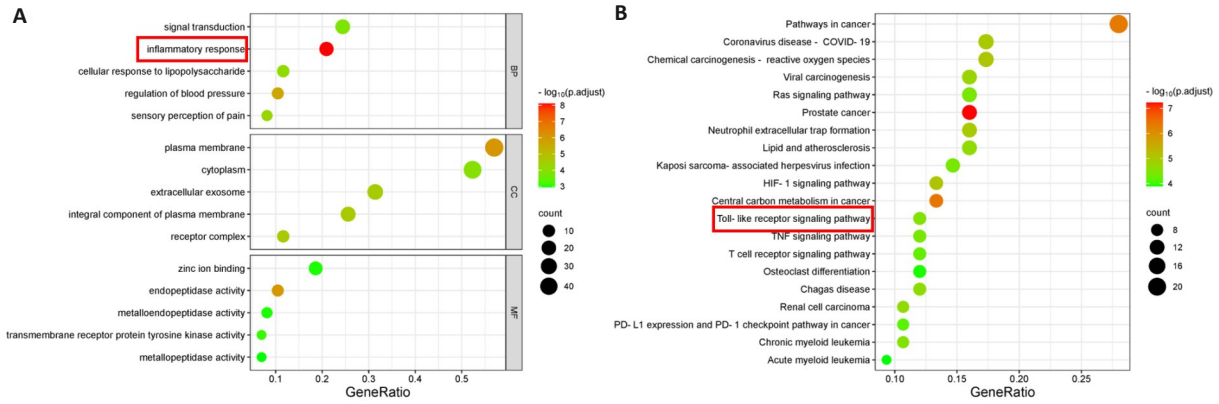


图6 HYP缓解CD样肠炎可能与炎症反应和TLR信号通路有关

Fig.6 Therapeutic mechanism of HYP for CD may involve inflammatory response and TLR signaling pathway. A, B: GO and KEGG enrichment analyses.

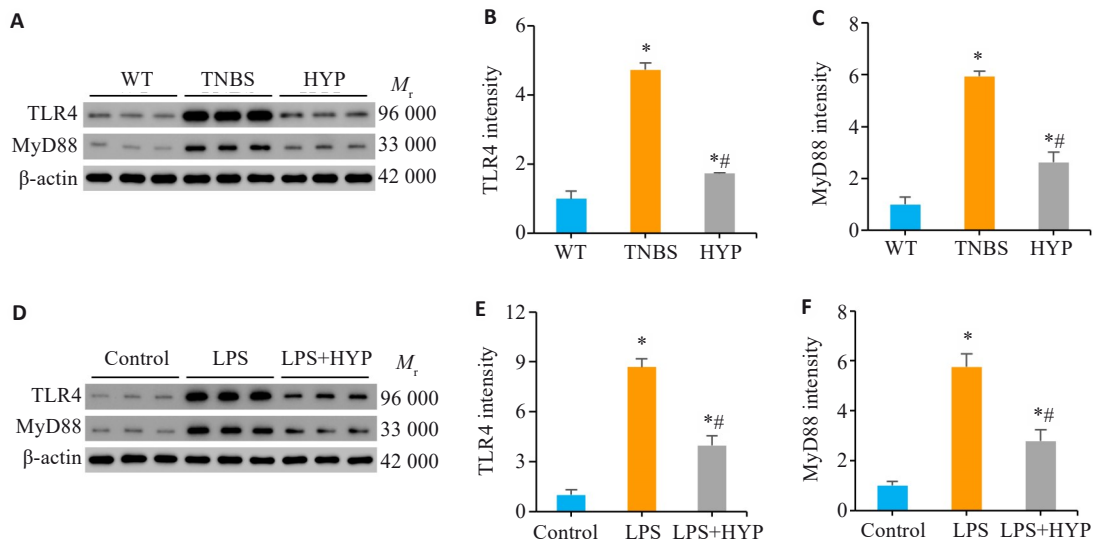


图7 HYP可下调TLR4/MyD88信号通路

Fig.7 HYP downregulates the TLR4/MyD88 signaling pathway in both the mouse and cell models. A-C: Protein levels of TLR4 and MyD88 in mouse colonic mucosa tissues. D-F: Protein levels of TLR4 and MyD88 in Caco-2 cells with different treatments. *P<0.05 vs WT or Control, #P<0.05 vs TNBS or LPS.

肠道大量释放的炎症因子会破坏肠上皮细胞和紧密连接蛋白,导致上皮细胞间通透性升高,促进微生物产物移位入血,进而加重肠道炎症^[30, 33]。本研究结果显示HYP提高了屏障关键蛋白(Claudin-1和ZO-1)的水平并降低肠道通透性,提示HYP可能通过改善炎症微环境维持屏障的完整性。然而,其具体作用机制仍有待进一步阐明。

TLR4/MyD88信号通路在CD的发病机制中起关键调控作用^[34-36]。TLR4作为先天免疫系统的重要模式识别受体,通过特异性识别革兰氏阴性菌的LPS触发炎症级联反应,其异常激活可导致促炎因子(如TNF- α 、IL-6和IL-1 β)的过度释放,从而加剧肠道炎症反应^[37]。MyD88作为TLR4下游的关键信号适配蛋白,通过招募IRAK和TRAF6等信号分子,激活NF- κ B和MAPK信

号通路,进一步放大炎症反应^[38, 39]。基于TLR4/MyD88信号通路在CD中的核心调控作用,我们推测HYP治疗CD的潜在机制可能与该通路的调控密切相关。首先通过KEGG富集分析发现,HYP治疗CD可能与TLR信号通路相关。进一步Western blotting检测结果显示,在TNBS诱导的结肠炎小鼠和LPS诱导的Caco-2细胞模型中,HYP可下调TLR4/MyD88通路关键蛋白水平。

本研究的价值在于揭示HYP通过减轻肠上皮炎症反应并保护肠屏障功能的作用,不仅为缓解CD患者结肠炎提供新的治疗思路和潜在靶点,同时也为开发基于天然药物单体的CD治疗策略提供重要的理论依据。

本研究存在以下局限性:除保护肠屏障功能外,HYP可能还通过其他途径缓解CD样结肠炎。尽管本研究证实HYP对CD的治疗效果与TLR4/MyD88通路

相关,然而其是否通过下调该通路来减轻肠上皮炎症反应及增强肠屏障功能仍需进一步验证。

综上所述,HYP可能通过拮抗肠上皮炎症反应并保护肠道屏障功能,进而缓解小鼠CD样结肠炎。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] Torres J, Mehandru S, Colombel JF, et al. Crohn's disease[J]. *Lancet*, 2017, 389(10080): 1741-55.
- [2] Roda G, Chien Ng S, Kotze PG, et al. Crohn's disease[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6(1): 22.
- [3] Leibovitz H, Lee SH, Raygoza Garay JA, et al. Immune response and barrier dysfunction-related proteomic signatures in preclinical phase of Crohn's disease highlight earliest events of pathogenesis[J]. *Gut*, 2023, 72(8): 1462-71.
- [4] Song X, Zhang XF, Zhang M, et al. The JNK/P38 signalling pathway activated by testin protects the intestinal epithelial barrier against Crohn's disease-like colitis[J]. *Chem Biol Interact*, 2024, 403: 111222.
- [5] Yang Y, Guo LQ, Wei L, et al. Da-Yuan-Yin decoction alleviates ulcerative colitis by inhibiting complement activation, LPS-TLR4/NF- κ B signaling pathway and NET formation[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 332: 118392.
- [6] Wang Y, Li M, Zha AS. Adjuvant treatment of Crohn's disease with traditional Chinese medicine: a meta-analysis[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 6710451.
- [7] Gomollón F, Dignass A, Annesse V, et al. 3rd European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease 2016: part 1: diagnosis and medical management[J]. *J Crohns Colitis*, 2017, 11(1): 3-25.
- [8] Spinelli A, Sacchi M, Fiorino G, et al. Risk of postoperative recurrence and postoperative management of Crohn's disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(27): 3213-9.
- [9] Cushing K, Higgins PDR. Management of crohn disease: a review[J]. *JAMA*, 2021, 325(1): 69-80.
- [10] Doherty G, Katsanos KH, Burisch J, et al. European Crohn's and colitis organisation topical review on treatment withdrawal ['Exit strategies'] in inflammatory bowel disease[J]. *J Crohns Colitis*, 2018, 12(1): 17-31.
- [11] Barnes EL. Postoperative Crohn's disease management[J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2020, 36(4): 277-83.
- [12] Xie J, Huang Y, Wu HG, et al. Acupuncture and moxibustion for treatment of Crohn's disease: a brief review[J]. *World J Gastroenterol*, 2022, 28(25): 3001-3.
- [13] Yuan S, Li Y, Li J, et al. Traditional Chinese medicine and natural products: potential approaches for inflammatory bowel disease[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 892790.
- [14] Sałaga M, Zatorski H, Sobczak M, et al. Chinese herbal medicines in the treatment of IBD and colorectal cancer: a review[J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2014, 15(3): 405-20.
- [15] Zhang ZN, Zuo LG, Song X, et al. Arjunolic acid protects the intestinal epithelial barrier, ameliorating Crohn's disease-like colitis by restoring gut microbiota composition and inactivating TLR4 signalling[J]. *Phytomedicine*, 2024, 123: 155223.
- [16] 马博凯, 钱冲, 王茂媛, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定药材牛大力中刺桐碱、芒柄花素和高丽槐素[J]. *分析科学学报*, 2022, 38(2): 203-8.
- [17] 曹斯琼, 吴文平, 罗宇琴, 等. 王不留行炮制前后的UPLC指纹图谱比较及刺桐碱和王不留行黄酮苷的含量测定[J]. *中国药房*, 2020, 31(19): 2365-70.
- [18] Sun H, Zhu X, Cai W, et al. Hypaphorine attenuates lipopolysaccharide-induced endothelial inflammation via regulation of TLR4 and PPAR- γ dependent on PI3K/Akt/mTOR signal pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(4): E844.
- [19] Ding YH, Miao RX, Zhang Q. Hypaphorine exerts anti-inflammatory effects in sepsis induced acute lung injury via modulating DUSP1/p38/JNK pathway[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2021, 37(10): 883-93.
- [20] Li QQ, Li J, Yin LX, et al. Sophoricoside improved Crohn's disease-like colitis by inhibiting intestinal epithelial cell apoptosis through PI3K/AKT signaling[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 131: 111886.
- [21] Zhang Y, Huang J, Gan L, et al. Hepatoprotective effects of Niudali (*Callerya speciosa*) root aqueous extracts against tetrachloromethane-induced acute liver injury and inflammation[J]. *Food Sci Nutr*, 2023, 11(11): 7026-38.
- [22] 蔡维维, 侯豹, 陈旭红, 等. 王不留行中刺桐碱的分离鉴定及抗炎活性研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2018, 30(4): 616-20.
- [23] Wang L, Song X, Zhou YQ, et al. Sclareol protected against intestinal barrier dysfunction ameliorating Crohn's disease-like colitis via Nrf2/NF-B/MLCK signalling[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 133: 112140.
- [24] Yang T, Liu DD, Li YL, et al. Chemoproteomics reveals Sofalcone inhibits the inflammatory response of Caco-2 cells by covalently targeting HMGB1[J]. *Chem Commun*, 2023, 59(58): 8981-4.
- [25] Geng Z, Zuo L, 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.
- [26] Neurath M, Fuss I, Strober W. TNBS-colitis[J]. *Int Rev Immunol*, 2000, 19(1): 51-62.
- [27] Antoniou E, Margonis GA, Angelou A, et al. The TNBS-induced colitis animal model: an overview[J]. *Ann Med Surg*, 2016, 11: 9-15.
- [28] 蔡维维, 张仕杰, 文媛媛, 等. 刺桐碱促伤口愈合的网络药理学分析及实验验证[J]. *天然产物研究与开发*, 2024, 36(11): 1959-71, 1958.
- [29] Matar A, Damianos JA, Jencks KJ, et al. Intestinal barrier impairment, preservation, and repair: an update[J]. *Nutrients*, 2024, 16(20): 3494.
- [30] Neurath MF, Artis D, Becker C. The intestinal barrier: a pivotal role in health, inflammation, and cancer[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2025, 10(6): 573-92.
- [31] Qiao YR, He CE, Xia YX, et al. Intestinal mucus barrier: a potential therapeutic target for IBD[J]. *Autoimmun Rev*, 2025, 24(2): 103717.
- [32] Wang Z, Shen J. The role of goblet cells in Crohn's disease[J]. *Cell Biosci*, 2024, 14(1): 43.
- [33] Macura B, Kiecka A, Szczepanik M. Intestinal permeability disturbances: causes, diseases and therapy[J]. *Clin Exp Med*, 2024, 24(1): 232.
- [34] Luo X, Yu Z, Deng C, et al. Baicalein ameliorates TNBS-induced

- colitis by suppressing TLR4/MyD88 signaling cascade and NLRP3 inflammasome activation in mice[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16374.
- [35] Li CZ, Xi YB, Li S, et al. Berberine ameliorates TNBS induced colitis by inhibiting inflammatory responses and Th1/Th17 differentiation[J]. *Mol Immunol*, 2015, 67(2): 444-54.
- [36] Shen JC, Qi Q, Han D, et al. Moxibustion improves experimental colitis in rats with Crohn's disease by regulating bile acid enterohepatic circulation and intestinal farnesoid X receptor[J]. *J Integr Med*, 2023, 21(2): 194-204.
- [37] Stephens M, von der Weid PY. Lipopolysaccharides modulate intestinal epithelial permeability and inflammation in a species-specific manner[J]. *Gut Microbes*, 2020, 11(3): 421-32.
- [38] Pereira M, Durso DF, Bryant CE, et al. The IRAK4 scaffold integrates TLR4-driven TRIF and MYD88 signaling pathways[J]. *Cell Rep*, 2022, 40(7): 111225.
- [39] Endale M, Park SC, Kim S, et al. Quercetin disrupts tyrosine-phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase and myeloid differentiation factor-88 association, and inhibits MAPK/AP-1 and IKK/NF- κ B-induced inflammatory mediators production in RAW 264.7 cells[J]. *Immunobiology*, 2013, 218(12): 1452-67.
- (编辑:余诗诗)