

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)08-0032-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.08.009



去氢骆驼蓬碱对炎症性肠病模型小鼠的防护作用*

谭燕杰^{1,2}, 石郎天^{1,2}, 姚勇刚^{1,2△}

(1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 重庆市中医院, 重庆 400011)

摘要:目的 探讨去氢骆驼蓬碱对炎症性肠病(IBM)模型小鼠肠道屏障的防护作用。方法 将64只C57BL/6J雄性小鼠随机分为空白对照组(等体积水)、药物对照组(0.05 mg/mL去氢骆驼蓬碱)、模型组(等体积水)及药物观察组(0.05 mg/mL去氢骆驼蓬碱),各16只。在小鼠饮水中添加2%硫酸葡聚糖钠连续喂养7d以复制IBM小鼠模型;期间2个对照组小鼠均饮水。建模成功后,各组小鼠连续4d予相应药物或水。观察小鼠生存率、体质量及结肠长度变化情况。采用苏木素-伊红染色,观察小鼠结肠组织病理改变,并评分。采用Western blot法检测小鼠肠道ZO-1和Occludin蛋白表达水平。结果 与模型组比较,药物观察组小鼠生存率明显升高,体质量变化率明显减小,结肠长度明显增加($P < 0.05$);结肠黏膜和黏膜下层上皮损伤明显减轻,炎性细胞浸润明显减少,且病理学评分明显降低($P < 0.05$);肠道ZO-1和Occludin蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$)。结论 去氢骆驼蓬碱对IBM模型小鼠肠道屏障具有防护作用,其机制可能为提高ZO-1和Occludin蛋白的表达水平。

关键词:去氢骆驼蓬碱;炎症性肠病;肠道屏障;小鼠;ZO-1蛋白;Occludin蛋白

Protective Effect of Harmine on Model Mice with Inflammatory Bowel Disease

TAN Yanjie^{1,2}, SHI Langtian^{1,2}, YAO Yonggang^{1,2}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan, China 410208; 2. Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing, China 400011)

Abstract: **Objective** To investigate the protective effect of harmine on the intestinal barrier of model mice with inflammatory bowel disease (IBM). **Methods** A total of 64 C57BL/6J male mice were randomly divided into the blank control group (equal volume of water), the drug control group (0.05 mg/mL harmine), the model group (equal volume of water), and the drug observation group (0.05 mg/mL harmine), with 16 mice in each group. The mice were given the drinking water containing 2% dextran sulphate sodium for 7 d to replicate the IBM model, while the mice in the blank control group and drug control group were given the water. After successful modeling, the mice in each group were given corresponding drugs or water for 4 d. The survival rate, body mass and colon length of mice were observed. The pathological change of colon tissue was observed by the hematoxylin-eosin staining and scored. The expression levels of ZO-1 and Occludin proteins in the intestine of mice were detected by the Western blot. **Results** Compared with those in the model group, the survival rate significantly increased, the change rate of body weight significantly decreased, and the colon length significantly increased in the drug observation group ($P < 0.05$); the epithelial injury and inflammatory cell infiltration of colon mucosa and submucosa significantly relieved, and pathological scores in the drug observation group significantly decreased ($P < 0.05$); the expression levels of ZO-1 and Occludin proteins in the intestine of mice in the drug observation group significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Harmine has a protective effect on the intestinal barrier of IBM model mice, and its mechanism may be related to increasing the expression levels of ZO-1 and Occludin proteins.

Key words: harmine; inflammatory bowel disease; intestinal barrier; mouse; ZO-1 protein; Occludin protein

炎症性肠病(IBM)包括溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩病(CD)^[1]。近年来,IBM在亚洲、欧美及中东地区的发病率不断上升,但目前仍缺少有效的治疗手段,导致IBM患者生活质量降低,社会负担加重^[2-3]。IBM的病因尚未明确^[4],随着研究的不断深入,越来越多的研究表明肠道黏膜屏障的破坏与IBM的发病密切相关^[5-6]。ZO-1和Occludin蛋白为缝隙连接蛋白,在IBM发病的病理生理过程中,通过与其他蛋白相互作用,

形成了上皮细胞之间的紧密连接,从而发挥维持上皮屏障完整性的关键作用^[7-8]。去氢骆驼蓬碱是药用植物骆驼蓬种子的提取物,在国内及中东部分地区已有上千年的药用历史。现代研究表明,该成分具有抗炎性反应、抗病毒、抗感染、抗氧化等作用^[9],但其对IBM的作用尚未明确。本研究中探讨了去氢骆驼蓬碱对IBM模型小鼠肠道组织黏膜屏障的防护作用,从而为开发IBM治疗手段提供新思路。现报道如下。

*基金项目:国家自然科学基金[31800983];重庆市自然科学基金面上项目[cstc2019jcyj-msxmX0101]。

第一作者:谭燕杰,男,在读硕士研究生,研究方向为急危重症的治疗,(电子信箱)2233865065@qq.com。

△通信作者:姚勇刚,男,博士研究生,副主任医师,研究方向为急危重症诊治,(电子信箱)7757011@qq.com。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器:KH-BL型包埋机(湖北孝感阔海医疗科技有限公司);YD-315型石蜡切片机(金华市益迪医疗设备有限公司);LTP-400型脱水机(金华市华速科技有限公司);Bio-rad蛋白电泳转印套装 1658029、Biorad Powerpac HC 164-5052型电泳仪(美国Bio-rad公司)。

试剂:去氢骆驼蓬碱(批号为HY-N0737A)、蛋白酶抑制剂(批号为HY-13259),均购自美国MCE公司;2%硫酸葡聚糖钠(DSS,美国MP Biomedicals公司,批号为0216011080);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(批号为C0105M)、细胞裂解缓冲液(批号为P0013B),均购自上海碧云天生物技术股份有限公司;戊二醛(梯希爱<上海>化成工业发展有限公司,批号为G0067);硝酸纤维素滤膜(美国PALL公司,批号为P-N66485);ZO-1抗体(批号为21773-1-AP)、Occludin抗体(批号为27260-1-AP)、GAPDH抗体(批号为60004-1-Ig),均购自武汉三鹰生物技术有限公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白G(赛默飞世尔科技<中国>有限公司,批号为A-11034);转印模块(美国Bio-rad公司,批号为1658029)。

动物:C57BL/6J小鼠,64只,雄性,2月龄,体质量(22 ± 2)g,于温度25℃,相对湿度40%,12h/12h明暗交替环境下适应性喂养1周。均购自北京维通利华实验动物技术有限公司。实验动物生产许可证号SCXK(沪)2022-0007。动物饲养于重庆市中医院动物实验室,实验期间小鼠自由进食饮水。本研究经重庆市中医院实验动物伦理审查批准(批件号2023-DWSY-TYJ)。

1.2 方法

1.2.1 分组、建模与给药

将64只小鼠随机分为空白对照组(等体积水)、药物对照组(0.05 mg/mL去氢骆驼蓬碱)、模型组(等体积水)和药物观察组(0.05 mg/mL去氢骆驼蓬碱),各16只。在小鼠饮水中添加2%的DSS,连续喂养7d,以复制IBD小鼠模型;空白对照组和药物对照组以水喂养。建模成功后,各组小鼠予相应药物或水,连续4d。

1.2.2 体质量及生存率

每组取10只小鼠,分别于建模第0~7天称定体质量,观察各组小鼠建模第0~11天的生存率,并进行组间比较。

1.2.3 结肠长度及病理学评分

每组取6只小鼠,收集结肠组织,测量其长度,并固定,将标本置4%多聚甲醛24h,随后脱水、石蜡包埋和

切片(厚4 μ m),HE染色,显微镜下观察。基于组织损伤参数(腺体增生、上皮损伤和水肿程度)和炎性参数(单核细胞、多形核细胞、淋巴细胞和浸润位置)进行评分。评分范围为0~3分和0~4分,对于组织损伤参数分别对应不存在、轻微、中度、严重,对于炎性参数分别对应不存在、黏膜、黏膜下层、全层(肌层和浆膜受累)、弥漫性。

1.2.4 蛋白表达

采用Western blot法。取小鼠结肠组织,加入液氮研磨,加入细胞裂解缓冲液和蛋白酶抑制剂,研成匀浆,冰上静置5 min,4℃、12 000 r/min离心10 min,随后提取蛋白。采用BCA法进行蛋白定量,随后进行SDS-PAGE、转膜、封闭,用5%脱脂奶粉稀释的ZO-1抗体(1:500)、Occludin抗体(1:800, V/V)4℃下孵育过夜,TBST缓冲液洗膜3次,每次10 min,用5%脱脂奶粉稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白G(1:5 000, V/V),室温下孵育60 min,TBST再次洗膜3次,每次10 min,采用化学发光法显影。使用Image J软件计算蛋白的相对表达量。

1.3 统计学处理

采用GraphPad Prism 8.0统计学软件分析。生存分析使用对数秩(Mantel-Cox)检验。采用Shapiro-Wilk检验判断数据是否符合正态分布,符合且方差齐时行双侧、未配对 t 检验。对于假定具有相等方差和正态分布的3组及以上数据,使用单因素方差分析(ANOVA),再使用Bonferroni事后检验进行多重比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生存率、体质量及结肠长度

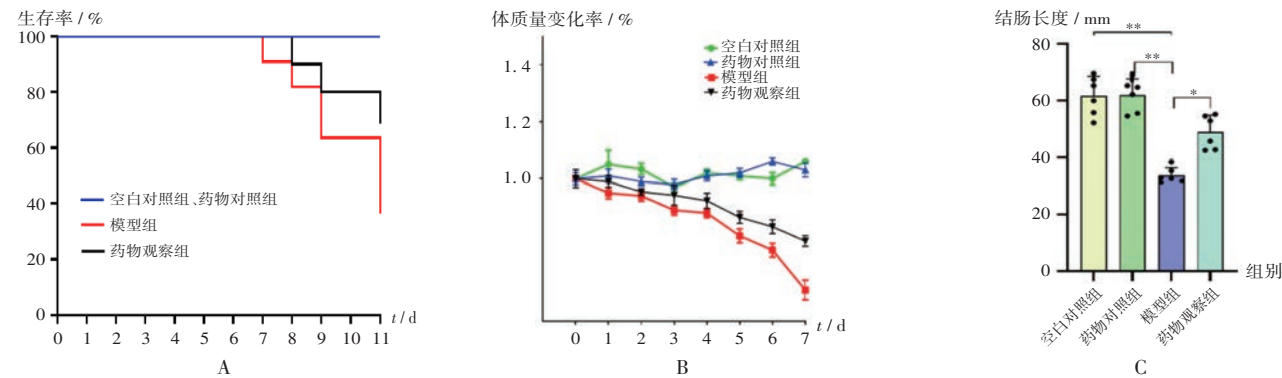
与模型组比较,药物观察组小鼠的生存率明显升高,体质量变化率明显减小,结肠长度明显增加($P < 0.05$)。详见图1。

2.2 肠道组织病理学评分及形态

与空白对照组比较,模型组小鼠病理损伤明显加重,结肠黏膜和黏膜下层出现上皮损伤,炎性细胞增多,部分细胞核出现溶解,且病理学评分明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,药物观察组小鼠病理损伤程度明显减轻,结肠黏膜和黏膜下层上皮损伤明显减轻,炎性细胞浸润明显减少,且病理学评分明显降低($P < 0.05$)。详见图2。

2.3 ZO-1和Occludin蛋白

与空白对照组比较,模型组小鼠ZO-1和Occludin蛋白表达水平均明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,药物观察组小鼠ZO-1和Occludin蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$)。详见图3。



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。图 2、图 3 同。

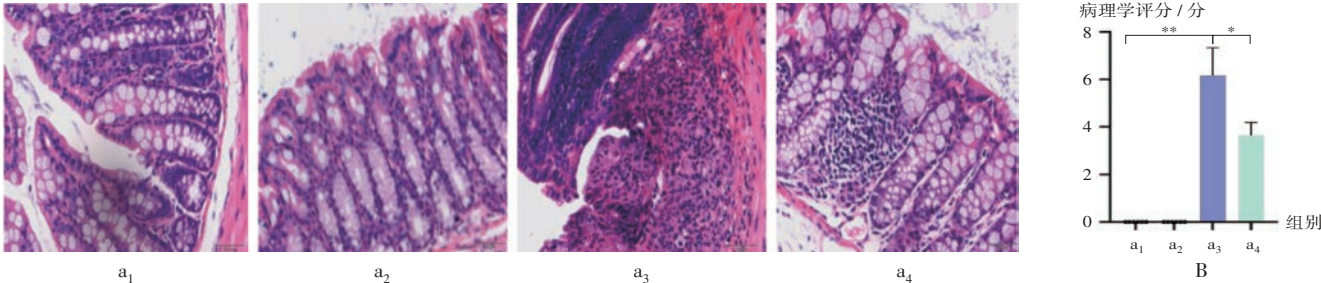
A. 生存曲线 B. 体质量 C. 结肠长度

图 1 小鼠生存曲线、体质量及结肠长度

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (for Fig. 1 - 3).

A. Survival curve B. Body mass C. Colon length

Fig. 1 Survival curve, body mass and colon length of mice



a₁. 空白对照组 a₂. 药物对照组 a₃. 模型组 a₄. 药物观察组

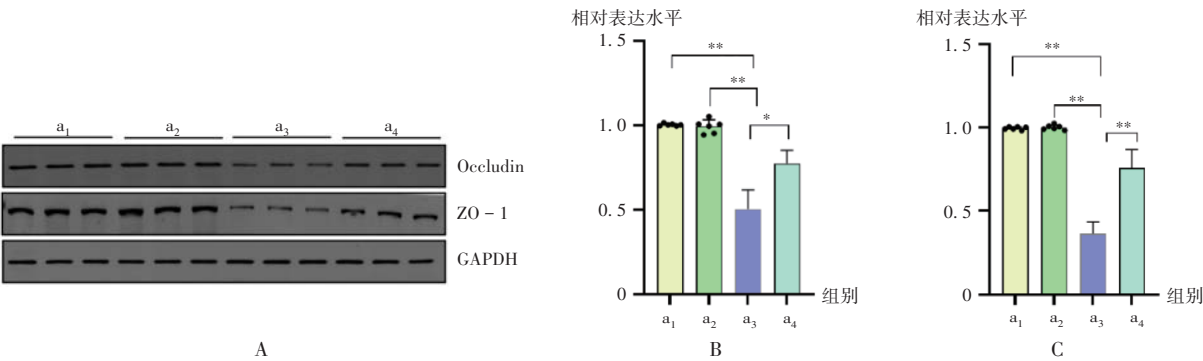
A. 显微镜图(HE, $\times 100$) B. 数据统计

图 2 病理组织学及病理组织评分

a₁. Blank control group a₂. Drug control group a₃. Model group a₄. Drug observation group

A. Microscopic images (HE, $\times 100$) B. Data statistics

Fig. 2 Pathological histology and pathological score



a₁. 空白对照组 a₂. 药物对照组 a₃. 模型组 a₄. 药物观察组

A. 蛋白条带 B. Occludin 表达水平数据统计 C. ZO - 1 表达水平数据统计

图 3 蛋白表达水平

a₁. Blank control group a₂. Drug control group a₃. Model group a₄. Drug observation group

A. Protein electropherograms B. Data statistics of Occludin expression C. Data statistics of ZO - 1 expression

Fig. 3 Expression levels of proteins

3 讨论

近年来已有大量研究广泛探讨了 IBD 的发病机制和治疗策略。既往研究表明,免疫系统异常激活、遗传易感性、肠道菌群失调、饮食相关因素及环境因素等多

种因素与 IBD 的发病相关^[8,10]。传统疗法中使用的免疫抑制剂、益生菌、生物制剂等,在部分患者中可能表现出限制性或不良反应^[11-13],故寻找新的治疗策略以改善 IBD 患者的预后尤为重要。

近年来,越来越多的研究关注了天然产物和草药中的活性成分,探索其对IBD的潜在疗效^[14-15]。去氢骆驼蓬碱具有潜在的药用价值,在一些实验模型中显示出对炎症性疾病具有抗炎和免疫调节作用^[16-17]。本研究结果显示,与模型组比较,药物观察组小鼠的存活率显著升高,结肠长度明显增加,IBD相关的病理组织学明显改善,进一步强调了其有益效果。表明去氢骆驼蓬碱可能作为治疗IBD的潜在药物。

IBD的病理生理特点为肠道黏膜屏障的破坏^[8,18],导致肠道内微生物易穿越,继而引发炎症反应。肠道黏膜屏障的破坏可能涉及黏膜上皮细胞的改变及缝隙连接蛋白的异常表达^[19]。既往研究证实,缝隙连接蛋白(如ZO-1, Occludin等)在维持肠道屏障完整性方面十分重要,其水平失调与IBD的发病有关^[20]。本研究结果表明,去氢骆驼蓬碱有效地调节了肠道组织中缝隙连接蛋白ZO-1和Occludin的表达,提示其可能通过增强肠道屏障功能和减少黏膜通透性来发挥作用。去氢骆驼蓬碱改善肠道屏障功能的能力在IBD的背景下尤为重要,因为黏膜屏障的破坏会促进IBD的发展并加剧炎症反应。通过恢复肠道屏障的完整性,去氢骆驼蓬碱有可能减轻肠腔抗原和病原体对黏膜的渗透,病理组织上表现为结肠黏膜和黏膜下层上皮损伤减轻,炎症细胞浸润减少,从而减轻IBD特有的炎症反应。

去氢骆驼蓬碱对缝隙连接蛋白的影响还表明了其在治疗IBD外对胃肠道健康的更广泛意义。考虑到肠道屏障完整性在维持肠道稳态和预防各种胃肠道疾病方面的核心作用,去氢骆驼蓬碱可能在治疗与黏膜屏障功能失调有关的多种疾病方面具有潜力。

综上所述,去氢骆驼蓬碱对IBD模型小鼠的肠道屏障具有一定防护作用,其机制可能为提高ZO-1和Occludin蛋白表达水平。未来仍需进一步明确该成分如何调控缝隙连接蛋白,同时需进一步研究其完整的治疗潜力。

参考文献

- [1] NEURATH M. Current and emerging therapeutic targets for IBD[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(5): 269 – 278.
- [2] KAPLAN GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 12(12): 720 – 727.
- [3] ARGOLLO M, GILARDI D, PEYRIN – BIROULET C, et al. Comorbidities in inflammatory bowel disease: a call for action[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2019, 4(8): 643 – 654.
- [4] PIOVANI D, DANESE S, PEYRIN – BIROULET L, et al. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta – analyses[J]. *Gastroenterology*, 2019, 157(3): 647 – 659.
- [5] KO JK, AUYEUNG KK. Inflammatory bowel disease: etiology, pathogenesis and current therapy[J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(7): 1082 – 1096.
- [6] HAN X. Intestinal permeability as a clinical surrogate endpoint in the development of future Crohn's disease therapies[J]. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 2010, 4(2): 159 – 176.
- [7] FASANO A. Intestinal permeability and its regulation by zonulin: diagnostic and therapeutic implications[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2012, 10(10): 1096 – 1100.
- [8] XAVIER RJ, PODOLSKY DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. *Nature*, 2007, 448(7152): 427 – 434.
- [9] ZHANG L, LI D, YU S. Pharmacological effects of harmine and its derivatives: a review[J]. *Arch Pharm Res*, 2020, 43(12): 1259 – 1275.
- [10] KHOR B, GARDET A, XAVIER RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. *Nature*, 2011, 474(7351): 307 – 317.
- [11] JEONG DY, KIM S, SON MJ, et al. Induction and maintenance treatment of inflammatory bowel disease: A comprehensive review[J]. *Autoimmun Rev*, 2019, 18(5): 439 – 454.
- [12] NIELSEN OH, SEIDELIN JB, MUNCK LK, et al. Use of biological molecules in the treatment of inflammatory bowel disease[J]. *J Intern Med*, 2011, 270(1): 15 – 28.
- [13] TORRES J, BONOVAS S, DOHERTY G, et al. ECCO Guidelines on Therapeutics in Crohn's Disease: Medical Treatment[J]. *J Crohns Colitis*, 2020, 14(1): 4 – 22.
- [14] 杜亚平, 魏 婷, 黄 粟, 等. 乌梅丸通过 Notch 信号通路治疗寒热错杂证溃疡性结肠炎临床研究[J]. *中国药业*, 2023, 32(15): 85 – 88.
- [15] 余海平, 张建兴, 李春耕. 附子理中汤加味治疗慢性溃疡性结肠炎的临床评价[J]. *中国药业*, 2017, 26(13): 67 – 69.
- [16] HUANG J, LIU Y, CHEN JX, et al. Harmine is an effective therapeutic small molecule for the treatment of cardiac hypertrophy[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(1): 50 – 63.
- [17] WANG L, WANG Q, WANG W, et al. Harmine Alleviates Titanium Particle – Induced Inflammatory Bone Destruction by Immunomodulatory Effect on the Macrophage Polarization and Subsequent Osteogenic Differentiation[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 657687.
- [18] ABRAHAM C, CHO JH. Inflammatory bowel disease[J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(21): 2066 – 2078.
- [19] VAN ITALLIE CM, ANDERSON JM. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 36: 157 – 165.
- [20] BREUGELMANS T, OOSTERLINCK B, ARRAS W, et al. The role of mucins in gastrointestinal barrier function during health and disease[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2022, 7(5): 455 – 471.

(收稿日期: 2023 – 11 – 08; 修回日期: 2024 – 02 – 25)