

清肠化湿方调控 Nrf2/ARE 通路缓解 溃疡性结肠炎的机制研究

程迎迎¹, 刘志琴², 郑 凯³, 张 洁¹, 徐 希²

(1.南京中医药大学附属医院,江苏省中医院检验科,江苏 南京 210029)

(2.南京理工大学分子代谢中心,江苏 南京 210094)

(3.南京中医药大学附属医院,江苏省中医院消化科,江苏 南京 210029)

[摘要] 溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一类特发性的慢性炎症性肠道疾病,该病易反复,严重影响了患者的身体健康和生活质量。本研究使用构建的小鼠溃疡性结肠炎模型,以氧化应激途径为重点,探讨清肠化湿方缓解 UC 的作用机制。主要以 DSS(Dextran Sodium Sulfate)作为诱导剂,构建小鼠溃疡性结肠炎模型。每日测量小鼠体重,观察并记录小鼠粪便性状及出血情况。实验结束后,留取小鼠结肠组织并记录结肠长度,分别从基因、蛋白和病理水平检测相关指标。采用 qRT-PCR 检测结肠组织中 *HO-1*、*NQO-1*、*Keap1* 和 *Nrf2* 的表达;核磁代谢组学分析各组结肠代谢物的变化并进行多元统计分析;制备结肠病理切片并进行 HE 染色和免疫组化,HE 染色后评估结肠病理炎症情况,免疫组化检测结肠组织中 *Keap1* 和 *Nrf2* 的表达。结果显示,清肠化湿方(Qingchang Huashi Recipe, QHR)可提高溃疡性结肠炎小鼠的生存率;与正常对照组(Ctrl)相比,DSS 模型组小鼠体重降低,结肠长度变短($P<0.05$),结肠组织病理炎症评分较高($P<0.05$),抗氧化反应元件表达降低,差异均具有统计学意义($P<0.05$);QHR 给药后,与 DSS 组相比,小鼠体重升高,结肠长度变长($P<0.05$),结肠组织病理炎症评分较低($P<0.05$),结肠组织中 *HO-1*、*NQO-1*、*Nrf2* 表达升高,*Keap1* 表达降低,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。本研究发现,QHR 通过升高 *Nrf2* 从而上调 ARE 相关分子的表达,进而缓解过度氧化引起的肠道黏膜损伤。

[关键词] 清肠化湿方,溃疡性结肠炎,氧化应激,抗氧化反应元件

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2024)04-0086-12

Mechanistic Study of Qingchang Huashi Recipe Regulating the Nrf2/ARE Pathway to Alleviate Ulcerative Colitis

Cheng Yingying¹, Liu Zhiqin², Zheng Kai³, Zhang Jie¹, Xu Xi²

(1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Laboratory Department,
Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

(2. Center for Molecular Metabolism, Nanjing University of Science & Technology, Nanjing 210094, China)

(3. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Department of Gastroenterology,
Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

Abstract: Ulcerative colitis (UC) is a type of idiopathic chronic inflammatory bowel disease that tends to recur and significantly affecting the health and quality of life of patients. This study utilized a mouse model of UC, focusing on the oxidative stress pathway, to investigate the mechanisms through which Qingchang Huashi Recipe (QHR) alleviates UC. The primary methods involved inducing UC in mice using Dextran Sodium Sulfate (DSS). Daily measurements of mouse body weight, observation and recording of fecal characteristics and bleeding were conducted. After the treatment, the mouse colon length was measured, and colon tissue was collected. Various parameters were evaluated at the genetic, protein, and pathological levels. A portion of the collected colon tissue was subjected to qRT-PCR to assess the expression of *HO-1*, *NQO-1*, *Keap1*, and *Nrf2* in colon tissue. Another portion was subjected to nuclear magnetic resonance metabolomics analysis to examine changes in colon metabolites among different groups and perform multivariate statistical analysis. A third portion was used to prepare colon pathological sections for hematoxylin and eosin (HE) staining and immunohistochemistry. HE staining was used to assess the pathological inflammation in colon tissue, and

收稿日期:2023-10-29.

基金项目:国家中医临床研究基地开放课题(JD2019SZ07).

通讯作者:徐希,副教授,研究方向:感染性疾病的分子代谢. E-mail: xuxi@njnu.edu.cn

immunohistochemistry was employed to determine the expression of Keap1 and Nrf2 in colon tissue. The results demonstrated that QHR could increase the survival rate of mice with UC. Compared to the normal control group (Ctrl), mice in the DSS model group exhibited decreased body weight, shorter colon length ($P < 0.05$), higher colon tissue pathological inflammation scores ($P < 0.05$), and decreased expression of antioxidant response elements, all of which were statistically significant ($P < 0.05$). After QHR administration, mice showed increased body weight, longer colon length ($P < 0.05$), lower colon tissue pathological inflammation scores ($P < 0.05$), and higher expression of HO-1, NHO-1, Nrf2, with a decrease in Keap1 expression, all of which were statistically significant ($P < 0.05$) compared to the DSS group. This study found that QHR alleviated mucosal damage in the intestine caused by excessive oxidation by increasing Nrf2 expression and subsequently upregulating ARE-related molecules.

Key words: Qingchang Huashi Recipe (QHR), ulcerative colitis (UC), oxidative stress, antioxidant response element (ARE)

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一类慢性炎症性的胃肠道疾病,为炎性肠病的主要类型之一,病变主要累及结肠和直肠,临床症状表现为腹痛、腹泻、便血并伴有肠道黏膜损伤^[1-2]。文献报道 UC 每年发病率为 1.2~20.3/10 万人,患病率为 7.6~246/10 万人^[3-4]。据最新流行病学调查,溃疡性结肠炎的发病率在亚洲、非洲、南美洲等地区快速增长^[1,5]。大部分溃疡性结肠炎患者为轻中度的肠道炎症反应,但有 20%~25% 的患者会出现严重的急性反应,需要入院治疗。UC 不仅威胁人们的身体健康,且严重影响患者的生活质量,极大增加了人类的精神压力和经济负担^[6]。现阶段,西医方面用于溃疡性结肠炎治疗的药物包括氨基水杨酸类、糖皮质激素类、免疫抑制剂、生物制剂以及针对不同免疫通路的小分子药物^[7]。中医方面治疗包括口服中药、灌肠、针灸等多种方式联合,清肠化湿方 (Qingchang Huashi Recipe, QHR) 是其中一种口服中药方剂。清肠化湿方为江苏省中医院沈洪教授课题组经多年临床经验和不断的科学试验优化精简而得,该方由黄连、黄芩、炒白芍、木香等中药组成。清肠化湿方具有清热除湿、生肌敛疮功效,可使患者便血、腹泻等不适症状得到有效缓解^[8]。赵崧等研究发现清肠化湿中药联合美沙拉嗪治疗能够降低轻度及中度患者的粪便钙卫蛋白水平,而对中度患者的作用更显著^[9]。动物实验研究发现清肠化湿方通过激活 PPAR- γ 信号通路、抑制 p38 MAPK 的激活、减轻炎症反应、升高结肠组织中 MUC2 与 TFF3 的表达水平、参与肠黏膜的修复,进而发挥保护作用^[10]。此外,根据最新文献研究,QHR 通过调节肠道菌群,维持肠道微生物群代谢稳态和恢复杯状细胞功能来治疗 DSS 诱导的 UC^[11-12]。

核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2) 是一种在许多组织中表达的重要传感器蛋白,是对抗氧化应激的重要转录因子,在细胞对氧化应激的解毒反应中起着至关重要的作用^[13]。在氧化和亲电损伤后,Nrf2 与其细胞质阻遏物 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Keap1) 解离,然后易位到细胞核^[14]。因此,细胞保护酶如 NADPH:醌氧化还原酶 1 (NADPH:quinone oxidoreductase 1, NQO1) 和血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1, HO-1) 的表达增加,以增强细胞对活性氧 (ROS) 的防御,从而对各种有害的氧化应激、炎症和细胞凋亡提供保护^[15]。Nrf2 不仅可以减轻 ROS 对细胞的损伤,还可以通过抗氧化作用维持细胞的稳定性。UC 被认为是由氧化应激引起的,UC 的恢复机制与 Nrf2 的表达有关。越来越多的研究表明,Nrf2 可能通过调节促炎细胞因子和诱导 II 期解毒酶,在防治 UC 方面发挥潜在的重要作用^[16]。因此,Nrf2/ARE 在减轻氧化应激中起着重要作用。本文旨在从氧化应激方面探讨清肠化湿方治疗 UC 的主要机制,以期 UC 的科学研究及临床诊疗提供理论依据。

1 材料与试剂

1.1 材料

1.1.1 药品及主要试剂

清肠化湿方 (QHR) 方剂组成:黄连 6 g、黄芩 10 g、煨木香 10 g、炒白芍 20 g、生地榆 10 g、白芷 10 g、生甘草 6 g,上述药物购自江苏省中医院。上述饮片加入 10 倍量的水,浸泡 1 h 后,加热煎煮 1 h,滤过;药渣再加 8 倍量水,煎煮 1 h,滤过;合并 2 次滤液,减压浓缩,制成生药浓度为 2 g/mL 的制剂^[11]。葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) (MP Biomedicals, 平均分子量:36 000~50 000),用高压灭菌水配制成 2.5% 的溶液用于实验。柳氮磺胺吡啶 (salicylazosulfapyridine, SASP, 罗恩) 购自南京鼓楼区积成实验仪器经营部,实验浓度为 20 mg/mL。

1.1.2 实验动物

C57BL/6 雄性小鼠,购自西普尔必凯生物技术中心。

1.2 方法

1.2.1 DSS 诱导小鼠 UC 生存分析模型的建立

将已适应环境一周的 C57BL/6 雄鼠随机分为 5 组,造模第 1 d 记为第 0 d. Ctrl 组给予正常水直至实验结束;DSS 组、SASP 组(阳性参照药物)、QHR 低剂量(QHR-L)组、QHR 高剂量(QHR-H)组第 0~6 d 给予 3% DSS,第 7~11 d 给予正常水;SASP 组第 0~11 d 按 200 mg/kg 小鼠灌胃;QHR-L 组和 QHR-H 组提前 1 d 灌胃直至实验结束,QHR-L 组给药浓度为 10 g/kg 小鼠,QHR-H 组给药浓度为 20 g/kg 小鼠. 实验中所有小鼠均正常饮食.

1.2.2 QHR 治疗 DSS 诱导小鼠 UC 模型的建立

将已适应环境一周的 C57BL/6 雄鼠随机分为 5 组,造模第 1 d 记为第 0 d. Ctrl 组给予正常水直至实验结束;DSS 组、SASP 组(阳性参照药物)、QHR-L 组、QHR-H 组第 0~5 d 给予 2.5% DSS,第 6~9 d 给予正常水;SASP 第 0~9 d 按 200 mg/kg 小鼠灌胃;QHR-L 组和 QHR-H 组提前 1 d 灌胃直至实验结束,QHR-L 组给药浓度为 10 g/kg 小鼠,QHR-H 组给药浓度为 20 g/kg 小鼠. 实验中所有小鼠均正常饮食,期间每天监测小鼠体重、粪便性状、直肠出血情况及活动度. 模型结束后,处死小鼠,分离结肠,记录各组结肠长度. 将结肠横向分为三部分:一部分用福尔马林固定制作组织切片,进行 HE 染色和免疫组织化学检测;其余部分立即放在液氮中,后续用于相关基因的检测和代谢组学分析.

1.2.3 qRT-PCR 检测小鼠结肠中相关基因的表达

取 1 cm 小鼠结肠液氮研磨成粉末后加入 600 μ L Trizol 裂解液收集到无核酸酶的 EP 管中,旋涡混匀后静置 5 min,按氯仿/Trizol=1:5 体积加入 120 μ L 氯仿,充分混匀 15 s,静置 10 min 后于 4 $^{\circ}$ C 12 000 rpm 离心 15 min;将上清液转移至 1.5 mL EP 管中,按异丙醇/Trizol=1:2 体积加入 300 μ L 异丙醇,上下颠倒 10 次混匀,静置 10 min 后于 4 $^{\circ}$ C 12 000 rpm 离心 10 min;用加样枪吸弃上清,管底可见沉淀,轻轻加入 1 mL 75%乙醇上下颠倒洗涤沉淀,于 4 $^{\circ}$ C 7 500 rpm 离心 5 min;弃上清,开盖室温干燥 10 min;加入 50 μ L 无核酸酶水溶解沉淀,测定 RNA 浓度,取 1 μ g 进行逆转录,逆转录采用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Invitrogen)试剂盒合成 cDNA. 所得 cDNA 采用实时荧光定量 PCR 检测 *HO-1*、*NQO-1*、*Keap1* 和 *Nrf2* 的表达,实时荧光定量 PCR 反应体系包括 2 \times SYBR Green master mix 2 μ L、前向和侧向引物各 0.2 μ L、无核酸酶水 2.6 μ L 和 cDNA 文库 2 μ L;PCR 扩增条件为 50 $^{\circ}$ C 2 min,95 $^{\circ}$ C 变性 1 min,然后按照 95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 45 s 反应 40 个循环,参考基因为 *GAPDH*,相关基因的引物序列见表 1.

1.2.4 小鼠组织 HE 染色

取固定后的小鼠结肠组织 0.5 cm 进行 HE 染色,按脱水、透明、石蜡包埋、切片的顺序依次进行,最后脱蜡行苏木精-伊红染色. 结肠组织包埋、HE 染色及结肠组织炎性病理评分委托江苏省中医院病理科完成.

1.2.5 免疫组化及 Aipathwell 数字病理图像分析

免疫组织化学染色方法为:石蜡包埋的切片在 60 $^{\circ}$ C 烘烤 3 h 后脱蜡;采用微波修复法进行抗原修复;在载玻片上滴加 3% H_2O_2 以去除内源性过氧化物酶,随后用 PBS 清洗;加入正常羊血清进行封闭;取出载玻片进行一抗孵育,于 4 $^{\circ}$ C 过夜;PBS 洗掉未结合的一抗后加入 HRP 标记的二抗,室温孵育 30 min;加入 DAB 显色剂(1:100 稀释)显色;滴加苏木素染液进行复染;随后进行分色和返蓝;依次将载玻片放入不同浓度梯度的乙醇和二甲苯中脱水;最后中性树脂封片. 免疫组织化学染色及数字病理图像分析委托 Servicebi 公司进行. Aipathwell 数字病理图像分析以人工智能学习和海量数据为基础,进行算法训练并通过循迹、选色、运算和分析得到不同表达强度细胞数量和面积,颜色越深,说明表达越强.

1.2.6 结肠组织核磁代谢组学分析

结肠组织核磁代谢组学分析包括样品制备、核磁检测、数据处理和多元统计分析. 样品制备方法为将新鲜结肠组织匀浆后经乙腈提取、氮吹、冻干成粉末,粉末经含 0.05%(w/v)的 3-(三甲基甲硅烷基)丙酸-d4 钠盐(TSP)的磷酸盐复溶后进行核磁检测;核磁共振谱仪为 Bruker A V ANCE III 500 MHz,参数设置

表 1 基因引物序列表

Table 1 The list of gene primer sequence

Gene	Forward/Reverse	Primer(5' to 3')
GAPDH	Forward	AAC TTTGGCATTGTGGAAGG
	Reverse	GGATGCAGGGATGATGTTCT
Nrf2	Forward	TCCGCTGCCATCAGTCAGTC
	Reverse	ATTGTGCTTCACGCTGCTTC
Keap1	Forward	GGAGTGCAAGGCAGAGGTGA
	Reverse	GGCAGCTGGGATGTCCTCAT
HO-1	Forward	TGCAGGTGATGCTGACAGAGG
	Reverse	GGGATGAGCTAGTGCTGATCTGG
NQO1	Forward	AGGATGGGAGGTACTCGAATC
	Reverse	AGGCGTCCTTCCTTATATGCTA

为温度 298 K, D₂O 锁场, 零点化学位移参照 (1H, δ 0.00) 为内标 TSP 峰, 脉冲序列 Call-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG. 序列 (90(τ -180- τ)n-acquisition) 和 10 ms 的自旋回波延迟 (2 n τ); 所有样品的核磁图谱依次使用软件 Bruker Topspin 3.0、MestReC 8.0 和开源软件 R 进行相位和基线校正; 多元统计分析使用有监督的正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 和主成分分析 (principal component analysis, PCA). 上述分析步骤详见参考文献^[17].

1.3 统计学处理

数据采用 SPSS 24.0 进行统计分析, 满足正态分布的两组数据采用 *t* 检验, 多组数据采用单因素方差分析. *P* < 0.05 为差异具有统计学意义.

2 结果与讨论

2.1 QHR 可提高肠炎小鼠的生存率

为研究 QHR 对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠的生存情况, 给予 3% DSS 进行生存研究造模, 统计每组小鼠的生存情况. 生存曲线显示 QHR 和阳性对照药物 SASP 给药组小鼠生存率均高于模型组 (DSS 组), QHR-H 组的生存率优于 QHR-L 组和 SASP 组 (图 1). 上述结果表明 QHR 可提高 DSS 诱导肠炎小鼠的生存率.

2.2 QHR 可促进溃疡性结肠炎的炎症缓解

为研究 QHR 对溃疡性结肠炎的治疗作用, 实验以 2.5% DSS 进行造模, 观察 QHR 对溃疡性结肠炎小鼠一般表型包括体重变化、结肠长度和粪便性状的影响. 体重变化曲线显示 DSS 处理后单纯模型组小鼠体重下降快, 下降趋势持续至模型结束, 而 QHR-H 和 SASP 给药后小鼠体重在模型的前 7 d 有所下降, 后逐渐恢复, 且 QHR-H 组体重恢复优于 QHR-L 组和 SASP 组 (图 2A). 模型结束后, 留取小鼠结肠, 记录了结肠长度和粪便性状, 结肠长度测量结果显示, 与 DSS 组相比, QHR 和 SASP 给药组小鼠结肠较长, 尤以 QHR-H 明显 (图 2B); 与正常小鼠相比, DSS 组小鼠结肠内粪便不成形, QHR-L 给药组小鼠粪便半成形, QHR-H 和 SASP 给药组

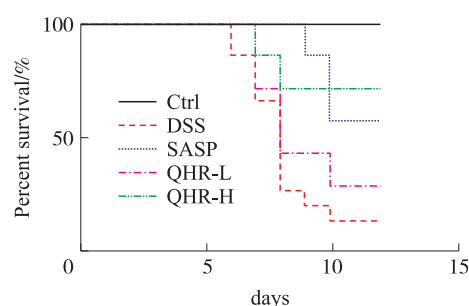
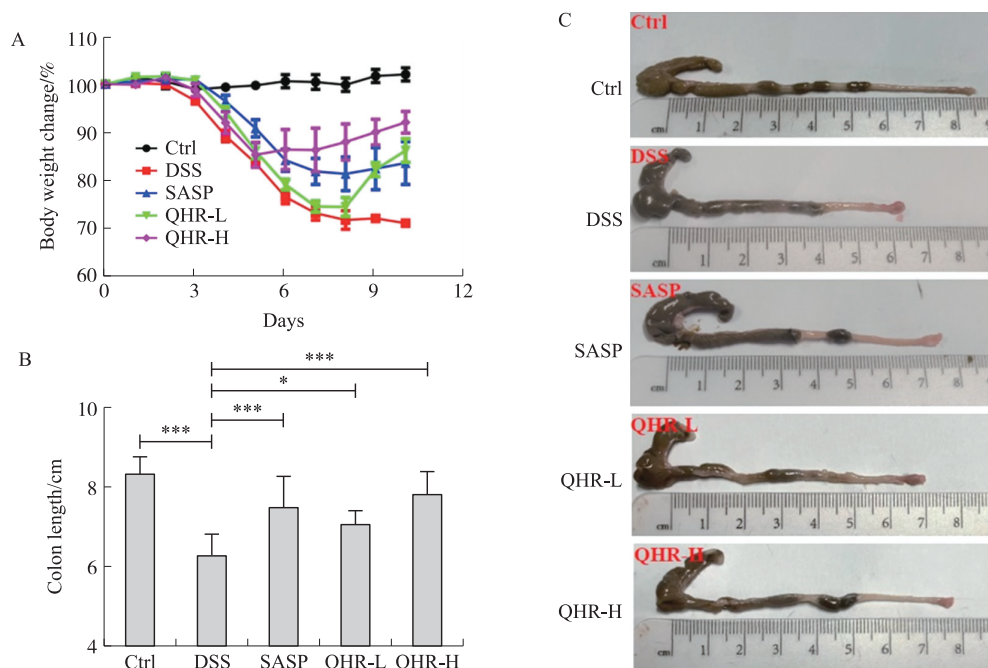


图 1 QHR 对 DSS 诱导溃疡性结肠炎小鼠的生存情况

Fig. 1 The effect of QHR on the survival of DSS-induced colitis mice



A: 小鼠体重变化; B: 结肠长度; C: 结肠长度外观图. 每组 7 只小鼠.

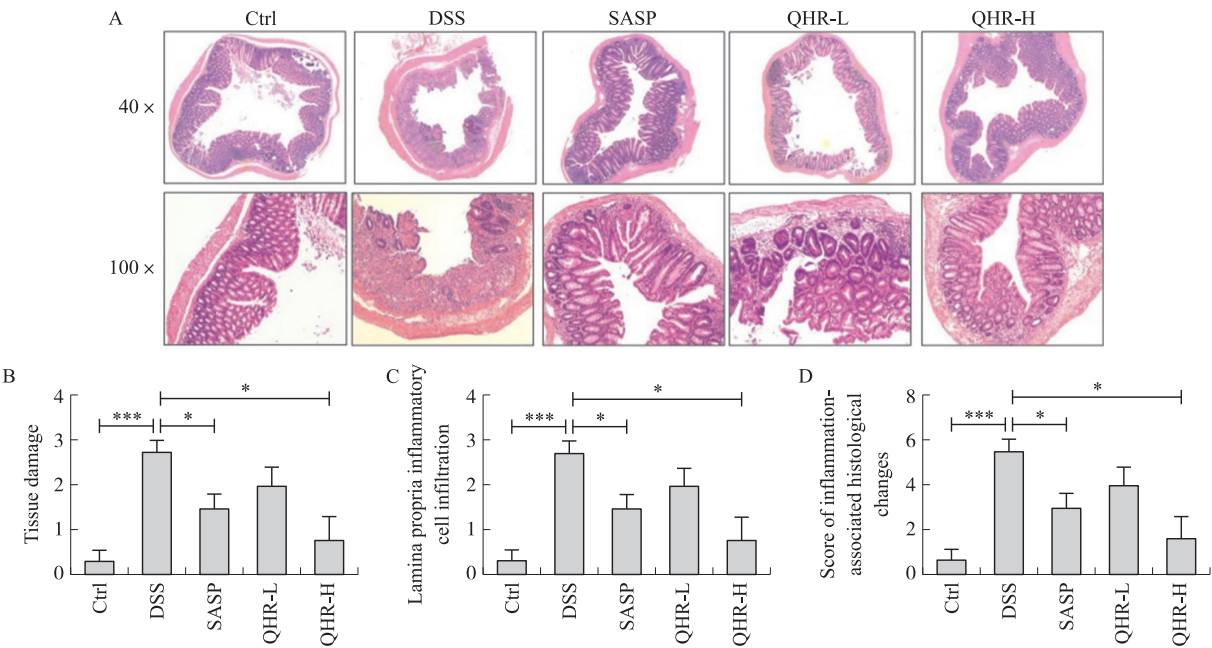
图 2 QHR 可促进肠炎小鼠疾病恢复

Fig. 2 QHR can promote disease recovery in colitis mice

小鼠粪便成形(图 2C). 结合小鼠一般表型变化,QHR 可促进溃疡性结肠炎的炎症缓解.

2.3 QHR 可改善结肠组织的炎症病理状态

为观察 QHR 给药后小鼠结肠组织炎症情况,将结肠组织固定、包埋并进行 HE 染色,根据严格的评分标准^[18],对各组结肠组织炎症情况进行病理评分. HE 染色结果显示,正常小鼠结肠组织完整,固有层无炎性细胞浸润,DSS 处理后小鼠结肠组织细胞结构被破坏,出现大范围溃疡,固有层见大量炎性细胞浸润,而 QHR-H 和 SASP 给药组小鼠结肠组织较完整,见小范围细胞结构破损. 与单纯 DSS 处理组相比,QHR-H 和 SASP 可明显改善因 DSS 处理造成的组织损伤和炎性细胞浸润.(图 3)



A: HE 染色;B:结肠组织损伤评分;C:结肠组织炎性细胞浸润评分;D:结合组织损伤和炎性细胞浸润的总评分. 40×,100×代表放大倍数.

图 3 QHR 可明显改善结肠组织的炎症病理状态

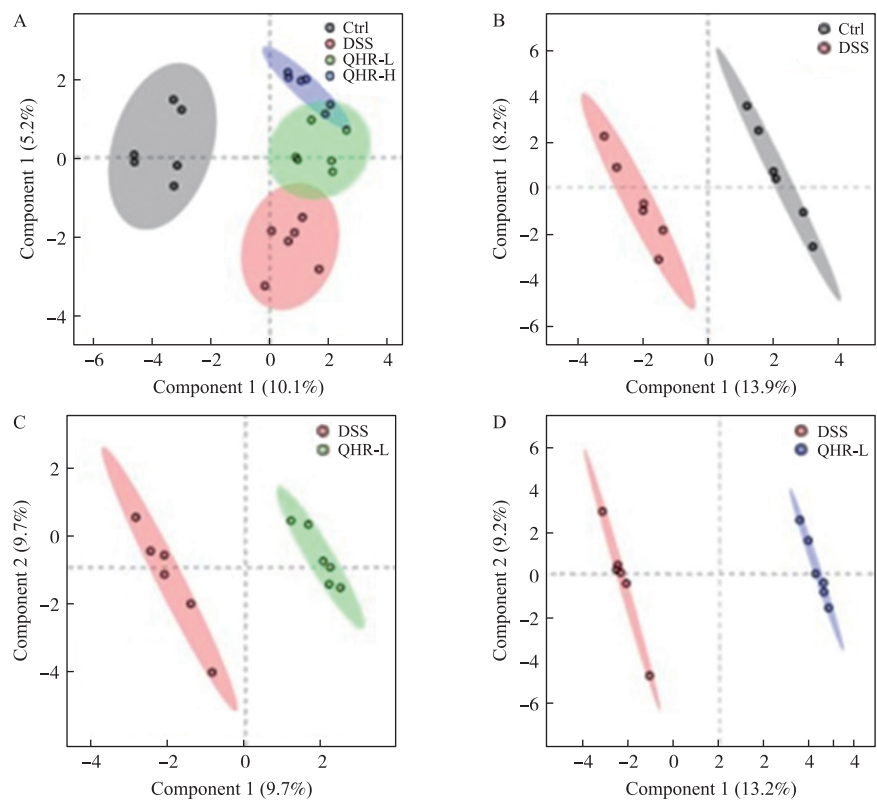
Fig. 3 QHR can significantly improve the inflammatory pathological state of colon tissue

2.4 QHR 影响溃疡性结肠炎小鼠肠组织的代谢物

为了深入探索 QHR 在溃疡性结肠炎中的新机制,借助代谢组学分析挖掘 QHR 发挥作用的新机制. 利用核磁数据指认软件(Chenomx profiler),并参考已经被报道的数据和查询公开可访问的代谢组学数据库,如人类代谢组数据库(Human metabolome database, HMDB)和麦迪逊-青岛代谢组学联盟数据库(Medison-Qingdao metabolomics consortium database, MMCD),对 4 个组 Ctrl 组、DSS 组、QHR-L 组和 QHR-H 组结肠组织的代谢物进行了指认,最终共指认了 37 种代谢物并对其进行代谢轮廓分析(图 4A),37 种代谢物包含异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、3-羟基丁酸酯、乳酸、丙氨酸、精氨酸、赖氨酸、醋酸盐、谷氨酸、谷氨酰胺、丙酸盐、琥珀酸盐、谷胱甘肽、蛋氨酸、肌酸、胆碱、Sn-甘油-3-磷酸胆碱、甜菜碱、牛磺酸、葡萄糖、甘氨酸、麦芽糖、肌酐、抗坏血酸、乳糖、尿苷、腺苷、延胡索酸盐、酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、组胺、黄嘌呤、腺嘌呤、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)、磷酸腺苷(AMP). 结果显示, Ctrl 组和 DSS 组代谢轮廓完全分开(图 4B),说明两组代谢差异具有显著性,而 QHR-L 和 QHR-H 两组在组分 2 指标上与 Ctrl 组接近,提示 QHR 处理可能在一定程度上逆转 DSS 诱导的代谢物变化趋势(图 4C 和 4D).

2.5 QHR 能部分逆转由 DSS 诱导的代谢物含量改变

计算指认出的 37 种代谢物倍率变化及其相应的 P 值,结果汇总于表 2;聚类分析图结果显示为图 5. 结果显示,相比 Ctrl 组,DSS 组结肠中异亮氨酸、亮氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、胆碱、NADPH 等代谢物的含量显著升高,肌酸、麦芽糖、组氨酸等代谢物的含量显著降低;相比 DSS 组,QHR-L 组结肠中谷氨酸、甘氨酸和黄嘌呤等代谢物的含量显著降低;相比 DSS 组,QHR-H 组结肠中丙酸盐、谷胱甘肽、肌苷和 NADPH 等代谢物的含量显著升高,异亮氨酸、谷氨酸、Sn-甘油-3-磷酸胆碱和苯丙氨酸等代谢物的含量显著降低. 综合以上结果,清肠化湿方能部分逆转由 DSS 诱导的代谢物含量改变.



A: 四组(黑色:Ctrl,红色:DSS,绿色:QHR-L,蓝色:QHR-H)代谢轮廓分析比较图;B:Ctrl与DSS组代谢轮廓分析比较图;C:DSS与QHR-L组代谢轮廓分析比较图;D:DSS与QHR-H组代谢轮廓分析比较图.分析方法为正交偏最小二乘判别分析,圆圈反映图例中描述的每个组的样本,阴影区域代表每组95%置信区间.

图4 各组小鼠结肠组织代谢物得分图

Fig. 4 Score plot of colon tissue metabolites in each group of mice

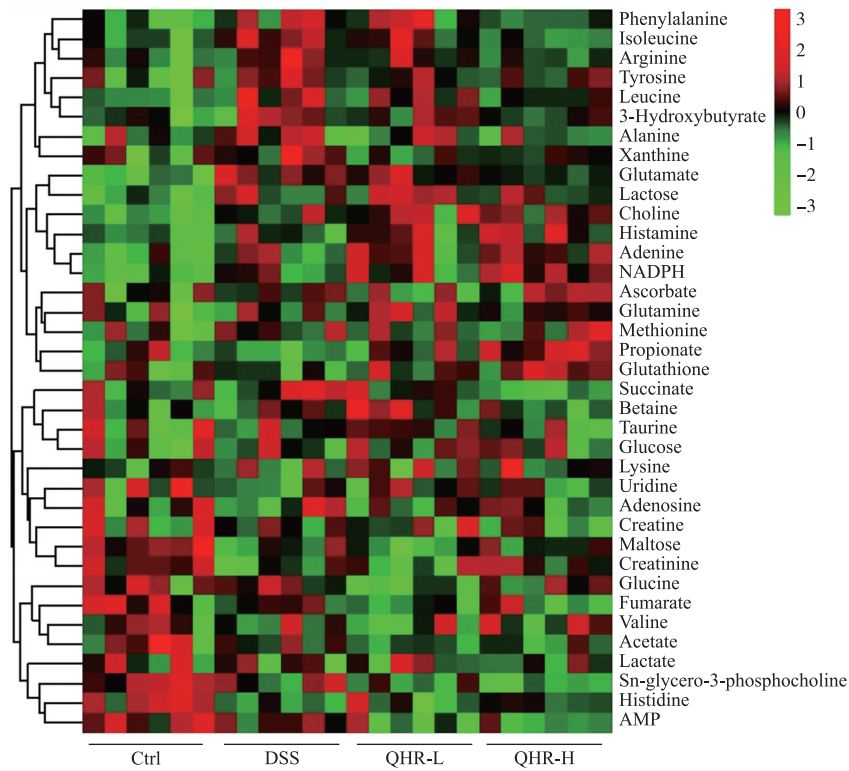


图5 四组结肠组织代谢物变化的聚类分析结果

Fig. 5 Cluster analysis results of metabolite changes in colon tissue across the four groups

表 2 小鼠结肠组织中代谢物的核磁归属信息及倍率分析结果

Table 2 Nuclear magnetic resonance assignment information and fold change analysis results of metabolites in mouse colon tissue							
	Ppm	DSS/Ctrl ^a		QHR-L/DSS ^b		QHR-H/DSS ^c	
		Log(FC)	P	Log(FC)	P	Log(FC)	P
Isoleucine	0.94(t) , 1.02(d) , 3.68(d)	0.54	**	-0.13		-0.66	**
Leucine	0.96(d) , 0.97(d) , 3.74(t)	0.62	*	-0.13		-0.34	
Valine	0.99(d) , 1.05(d) , 3.62(d)	-0.52		-0.09		0.72	
3-Hydroxybutyrate	1.20(d)	0.60		-0.15		-0.42	
Lactate	1.33(d) , 4.12(q)	-0.07		0.05		0.01	
Alanine	1.48(d) , 3.78(q)	0.16		-0.12		-0.19	
Arginine	1.68(m) , 1.91(m) , 3.23(t) , 3.78(t)	0.74		-0.18		-0.67	
Lysine	1.73(m) , 1.90(m) , 3.02(t)	0.05		0.15		0.20	
Acetate	1.92(s)	-0.38		-0.62	*	-0.45	
Glutamate	2.06(m) , 2.36(m) , 3.77(t)	0.55	**	-0.03		-0.21	*
Glutamine	2.14(m) , 2.46(m) , 3.77(t)	0.10		0.11		0.03	
Propionate	1.05(t) , 2.19(m)	-0.50		0.64		1.20	***
Succinate	2.41(s)	0.38		-0.82		0.00	
Glutathione	2.56(m) , 2.96(m)	-0.02		0.33		0.51	*
Methionine	2.14(s) , 2.66(t) , 3.86(t)	0.35		-0.07		0.02	
Creatine	3.04(s) , 3.94(s)	-0.03		0.01		-0.05	
Creatinine	3.05(s) , 4.07(s)	-0.33	*	0.04		0.26	*
Choline	3.21(s)	0.30	**	0.12		0.08	
Sn-glycero-3-phosphocholine	3.23(s)	-0.12		-0.13		-0.27	*
Betaine	3.26(s)	0.05		0.12		-0.05	
Taurine	3.28(t) , 3.44(t)	0.00		0.03		-0.03	
Glucose	3.4-3.95(m) , 5.24(d)	0.01		0.04		0.02	
Glycine	3.57(s)	0.00		-0.17	**	-0.03	
Maltose	3.56-3.92(m) , 5.23(d) , 5.40(m)	-0.47	*	-0.28		0.11	
Ascorbate	4.06(m) , 4.52(d)	0.22		-0.16		0.12	
Lactose	5.24(d)	0.97		0.26		-0.12	
Uridine	5.90(m) , 7.88(d)	-0.22		0.11		0.05	
Fumarate	6.53(s)	-0.20		-0.23		-0.14	
Tyrosine	6.90(d) , 7.20(d)	0.49		-0.20		-0.21	
Phenylalanine	7.33(m)	0.49	*	0.03		-0.30	*
Histidine	7.09(s) , 7.89(s)	-1.62	**	0.27		0.66	
Histamine	7.10(s) , 7.91(s)	0.45		0.31		0.57	
Xanthine	7.93(s)	0.40		-1.03	*	-0.67	
Adenine	8.21(d)	0.71		0.31		0.38	
Adenosine	6.11(d) , 8.25(s)	-0.05		-0.10		-0.05	
AMP	8.27(s)	-0.53		-0.16		-1.25	
NADPH	8.22(s)	0.67	*	0.31		0.55	*

a:所列数据表示与 Ctrl 组相比,DSS 组结肠代谢物变化水平,正值表示升高,负值表示降低;b:所列数据表示与 DSS 组相比,QHR-L 组结肠代谢物变化水平,正值表示升高,负值表示降低;c:所列数据表示与 DSS 组相比,QHR-H 组结肠代谢物变化水平,正值表示升高,负值表示降低。

2.6 QHR 影响结肠组织中谷胱甘肽代谢通路

前期结果发现,QHR-H 给药对 DSS 诱导溃疡性小鼠的治疗作用最明显,进一步通过比较 QHR-H 组与 DSS 组变化代谢物的 MetaboAnalyst 通路分析图,根据变化的代谢物,提供 25 条可能参与的信号通路,圆点的颜色越深,代表显著性越高. 通过比较 QHR-H 组与 DSS 组代谢物的变化,发现代谢物变化中最可能影响的是谷胱甘肽代谢通路,其次是氨酰 tRNA 的生物合成以及苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸的生物合成等通路(图 6). 谷胱甘肽是重要的抗氧化物质,在体内可以发挥抗氧化、调节氧化压力的作用。

2.7 QHR 调控 ARE 缓解溃疡性结肠炎

代谢组学分析提示谷胱甘肽作为一种重要的抗氧化分子在 QHR 缓解结肠炎中具有重要作用,表明 QHR 通过调控体内氧化应激水平缓解结肠炎的疾病状态. 为了验证该问题,检测了抗氧化反应元件(antioxidant response element,ARE)相关分子在各组结肠组织和血清中的表达情况. 结果显示,作为 ARE

的主要分子,HO-1 和 NQO1 在 DSS 模型组的结肠组织中表达下调,而 QHR 和 SASP 给药后两者均表达升高,其中 QHR-H 组变化更明显(图 7A 和 7B). 结合前期代谢组学结果,QHR 给药后谷胱甘肽水平升高,进一步检测了小鼠血清中谷胱甘肽还原酶(glutathionereductase,GR)的水平,结果显示,与 DSS 组相比,GR 在 QHR 给药后血清表达升高(图 7C),而另一种抗氧化分子 NO 无明显变化(图 7D). 该结果提示 QHR 可能主要通过调控还原性谷胱甘肽这一抗氧化反应元件的合成来缓解溃疡性结肠炎.

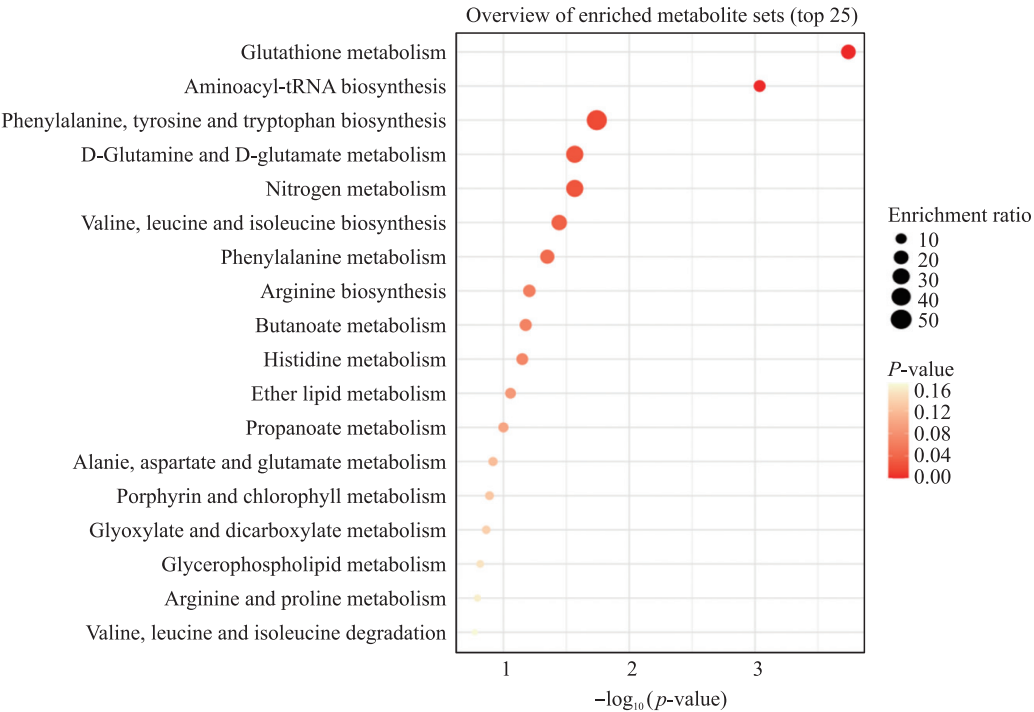
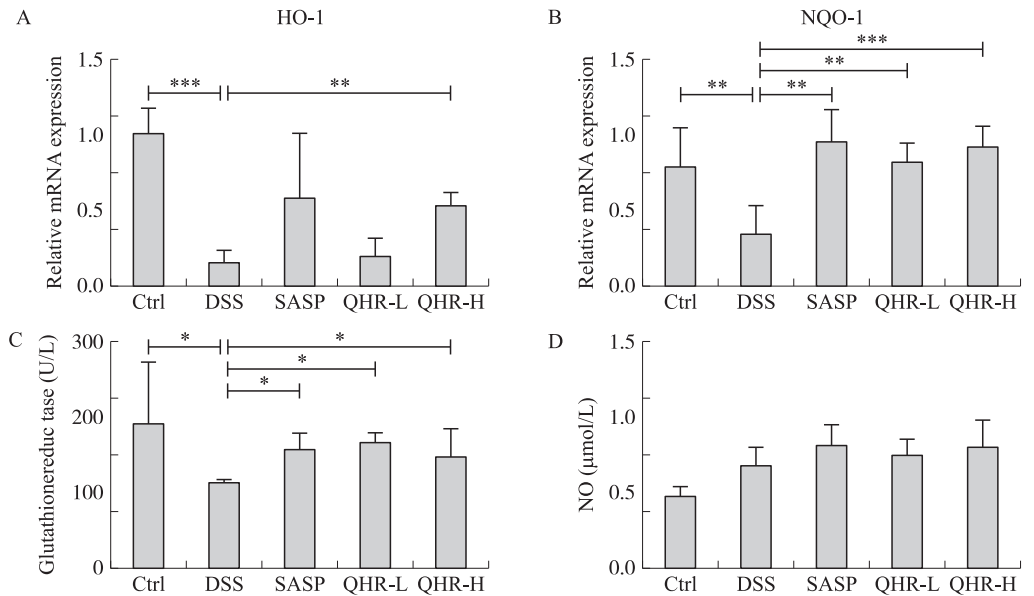


图 6 四组小鼠结肠组织代谢物富集通路图

Fig. 6 Enrichment pathway map of colon tissue metabolites in the four groups of mice



A,B:ARE 相关分子在结肠组织中的表达;C,D:ARE 相关分子在小鼠血清中的表达. GR:谷胱甘肽还原酶,NO:一氧化氮

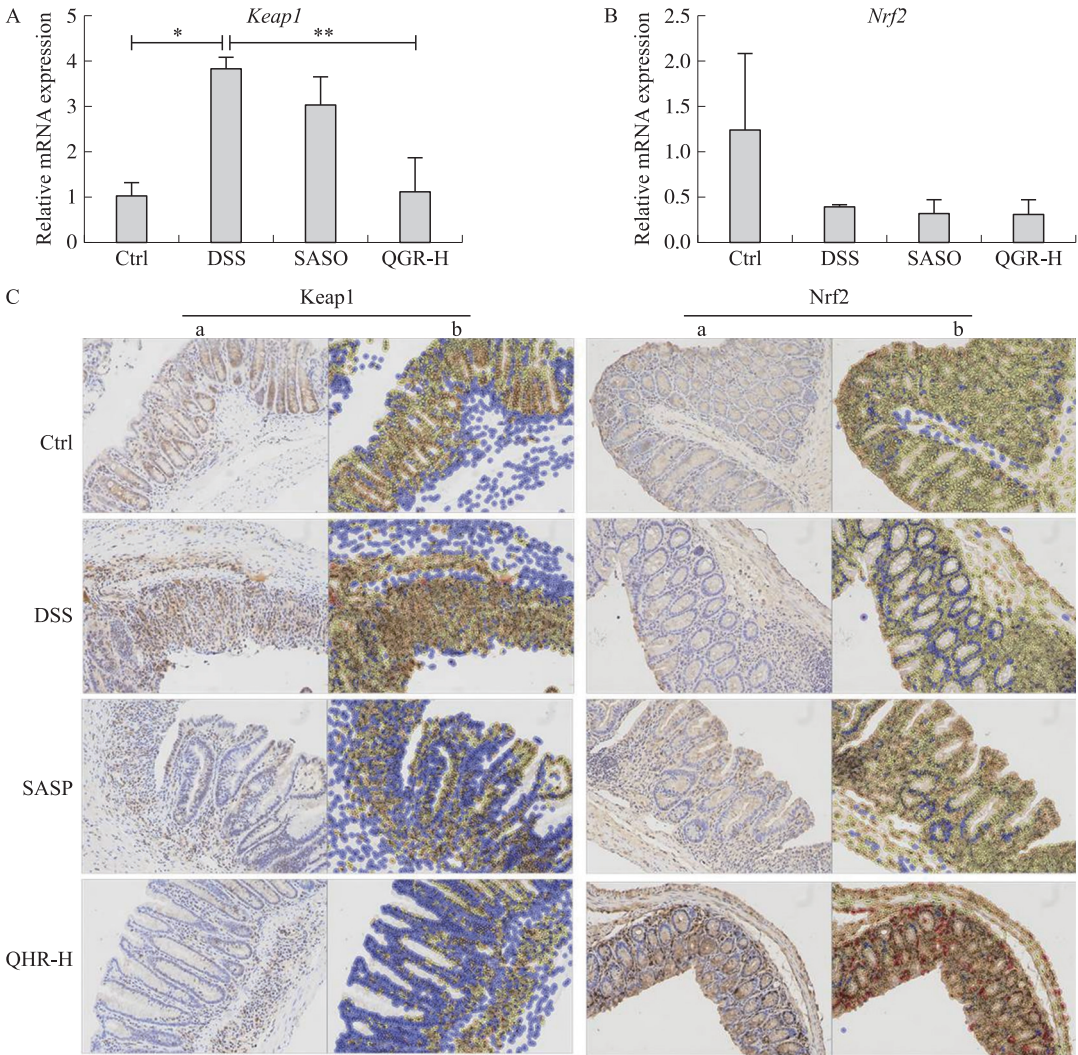
图 7 ARE 相关分子在结肠组织及血清中的表达情况

Fig. 7 Expression of ARE-related molecules in colon tissue and serum

2.8 QHR 上调结肠组织中 Nrf2 的表达

Nrf2 是调控 ARE 相关分子表达的上游分子. 一般情况下,NRF2 以与 Keap1 结合的形式存在于胞质中,在氧化状态下,Nrf2 从结合体上解离并入核,调控 ARE 相关分子的表达. 进一步检测了 Keap1 和 Nrf2

在结肠组织中的表达. 结果显示,Keap1 在 DSS 模型组小鼠结肠组织中表达升高,QHR-H 给药后表达降低,基因水平与蛋白水平变化一致(图 8A 和 8C);基因水平 *Nrf2* 在 DSS 处理后呈现降低趋势(无统计学差异),QHR-H 给药后无明显变化(图 8B),免疫组化结果显示 *Nrf2* 在 DSS 组表达降低,QHR 给药后表达升高(图 8C). 该结果表明,QHR-H 并不影响 *Nrf2* 基因水平的表达,而是通过减少 *Nrf2* 的蛋白降解进而升高细胞内 *Nrf2* 的生物活性.



A,B:实时定量 PCR 结果;C:免疫组化结果;a,普通显微镜下代表视野,200x;b,Aipathwell 数字病理图像分析结果.

图 8 Keap1 和 Nrf2 在结肠组织中的表达情况

Fig. 8 Expression of Keap1 and Nrf2 in the colon tissue

2.9 讨论

UC 是一种复杂的肠道疾病,其病理机制涉及多个因素,包括炎症、氧化应激和免疫异常等. 其中氧化应激常见于炎症反应中,因为炎症细胞、中性粒细胞和巨噬细胞产生大量的 ROS. 积累的 ROS 可以对细胞结构(蛋白质、DNA、脂质和膜)造成氧化损害,并可作为化学信使来激活 NF- κ B 和 p38 MAPK 等信号通路,影响细胞的增殖、分化和凋亡^[19–20]. 研究表明,UC 小鼠除炎症外,还存在显著的氧化应激^[21]. 因此,抗氧化策略在 UC 治疗中也有很大的应用前景. *Nrf2* 作为细胞内的关键转录因子,是维持细胞氧化还原稳态的中心调节因子,在抵抗氧化应激方面具有重要作用. *Nrf2* 不仅可以减轻 ROS 对细胞的损伤,还可以通过抗氧化作用维持细胞的稳定性. 研究发现,*Nrf2* 敲除小鼠在 DSS 诱导的直肠出血和结肠缩短方面比 *Nrf2* 野生型小鼠表现出更严重的症状,同时伴有更明显的组织学变化,如黏膜凹陷和炎症细胞浸润^[22]. 与此同时,促炎细胞因子水平上升,抗氧化酶的表达下降. 在 DSS 诱导的 *Nrf2* 缺陷小鼠中,结肠脂质过氧化程度和严重的氧化损伤显著高于野生型小鼠^[23]. 此外,*Nrf2*/*NQO1* 通路的激活可以降低三硝基苯磺酸(TNBS)

诱导的克罗恩病小鼠中的炎症分数、细胞因子和趋化因子水平,同时增加肠道通透性^[24]。因此,Nrf2/ARE 信号通路在炎性肠病(inflammatory bowel disease,IBD)的进展中扮演着极为重要的角色。

目前,治疗 IBD 的主要药物包括抗炎药、生物制剂、糖皮质激素和免疫抑制剂^[25-27]。然而,使用上述药物和生物制品治疗 IBD 大多伴有耐药性和副作用^[28-29]。UC 作为 IBD 的主要类型之一,其临床治疗面临同样的难题,而中医在治疗 UC 上具有独特的优势和效能。中医以中医理论和医学实践为基础,具有整体观念和循证治疗的特点,通过整体判断患者的身体状况来治疗疾病。研究表明中医可以改善 UC 患者的症状,如腹泻、腹部疼痛和直肠出血^[30]。中药具有多组分、多靶点协同作用,从氧化应激方面研究发现中药方剂主要通过激活 Nrf2/ARE 信号通路治疗 IBD。如黄连解毒汤可通过调节 NF- κ B 和 Nrf2 信号通路,增强肠道屏障功能,改善小鼠急性溃疡性结肠炎^[31]。半夏泻心汤通过抑制 NF- κ B p65 的激活和增加 Nrf2 的表达来预防 UC^[32]。

清肠化湿方是中医治疗 UC 的方法之一,通过多种中药成分的联合使用,能够有效缓解 UC 患者的腹痛、腹泻等症状,其作用机制主要为抗炎和增强粘膜屏障^[33-34]。本研究首先通过结肠代谢组学发现 QHR 可在一定程度上逆转 DSS 诱导的代谢物变化趋势,代谢物信号通路分析表明 QHR 最可能影响的是谷胱甘肽代谢通路。进一步实验表明 QHR 给药后结肠组织中抗氧化反应元件 HO-1 和 NQO1 表达升高,血清中调节谷胱甘肽合成的谷胱甘肽还原酶 GR 水平增加,并且细胞内抗氧化反应的关键转录因子 Nrf2 表达升高,其阻遏物 Keap1 表达降低。已有研究发现 Nrf2 激活多个基因的表达,包括参与药物和外源性解毒的解毒酶(GST 和 NQO1)、参与活性氧清除的活性蛋白氧清除酶(GPx 和 SOD)以及参与氧化应激反应的应激反应蛋白(HO-1)^[35-36]。这些蛋白质表达的增加可以增强细胞对 ROS 的防御,从而保护细胞免受各种有害的氧化应激、炎症和凋亡的影响。NQO1 通过维持辅酶 Q 和维生素 E 的还原状态,在抗氧化应激中发挥着至关重要的作用^[37]。HO-1 对身体组织具有保护作用,并维持体内氧化还原稳态^[38]。GSH 对于维持肠道的结构和功能完整性、抑制自由基的形成或消除形成的自由基非常重要^[39]。

3 结论

在本项研究中,通过体内实验发现 QHR 通过上调 Nrf2 信号传导来缓解 UC,即在 UC 小鼠模型中,QHR 处理降低了细胞内 Keap1 蛋白水平,进而使得胞质内 Nrf2 蛋白降解减少,有生物活性的 Nrf2 蛋白水平增加,活化的 Nrf2 进入细胞核并与 ARE 结合,启动下游 NQO1、HO-1 和 GST 信号的表达,发挥抗氧化作用,缓解过度氧化引起的肠道黏膜损伤。在后续的研究中,一方面可以深入探讨 QHR 对 Nrf2 的具体调节机制,以及如何通过增强 Nrf2 信号通路来提高 UC 患者的治疗效果。目前 Nrf2/ARE 通路活化主要有两个机制,即 Keap1 依赖型和非 Keap1 依赖型。对于 Keap1 依赖型,细胞内 Nrf2 的蛋白水平主要取决于 Keap1 的水平,Keap1 含有 4 个结构域,其中双赖氨酸重复结构域(DGR)和 C 端区域(CTR)负责维持细胞内 Keap1 和 Nrf2 的结合形式,在基础状态下,大部分 Nrf2 以 Nrf2-Keap1 结合形式存在,这种形式的 Nrf2 易被泛素化并被 26S 蛋白酶降解,故 Nrf2 水平较低。在氧化或电刺激后,Keap1 从 Nrf2 上解离下来,Nrf2 降解减少,新合成的游离 Nrf2 增加,上述信号改变可以活化 Nrf2 并促进其核转位,进而升高 ARE 发挥抗氧化作用^[34]。因此,Keap1 依赖型主要影响 Nrf2 蛋白水平。这种机制部分解释了在 QHR 处理后 Nrf2 基因水平无明显变化而蛋白水平升高。非 Keap1 依赖型的 Nrf2/ARE 通路活化主要需要其他调节因子如蛋白激酶 C(PKC)、AMP 活化蛋白激酶(AMPK)、细胞外信号调节激酶(ERK)和 p38 等^[20],前期研究尚未对这部分进行探索,在后续研究中也应对该点进行深入研究。另一方面可以进一步研究 Nrf2 与其他抗氧化通路之间的交互作用,以更全面地理解 UC 的氧化应激机制,也为开发新的治疗方法提供理论基础。

[参考文献]

- [1] UNGARO R,MEHANDRU S,ALLEN P B,et al. Ulcerative colitis[J]. Lancet,2017,389(10080):1756-1770.
- [2] ADAMS S M,CLOSE E D,SHREENATH A P. Ulcerative colitis:rapid evidence review[J]. American family physician, 2022,105(4):406-411.
- [3] PUGLIESE N,RODA G,PEYRIN-BIROULET L,et al. Emerging therapies for the treatment of ulcerative colitis[J]. Expert

- opinion on emerging drugs,2020,25(1):71-79.
- [4] GAJENDRAN M,LOGANATHAN P,JIMENEZ G,et al. A comprehensive review and update on ulcerative colitis[J]. Disease-a-month,2019,65(12):100851.
- [5] NG S C,SHI H Y,HAMIDI N,et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century:a systematic review of population-based studies[J]. Lancet,2018,390(10114):2769-2778.
- [6] LICHTENSTEIN G R,SHAHABI A,SEABURY S A,et al. Lifetime economic burden of crohn's disease and ulcerative colitis by age at diagnosis[J]. Clinical gastroenterology and hepatology,2020,18(4):889-897.
- [7] KOBAYASHI T,SIEGMUND B,LE BERRE C,et al. Ulcerative colitis[J]. Nature reviews disease primers,2020,6(1):1-74.
- [8] 朱磊,沈洪,顾培青,等. 沈洪教授治疗溃疡性结肠炎的经验探析[J]. 中华中医药杂志,2015,30(7):2381-2383.
- [9] 赵崧,王晓晓,张露,等. 清肠化湿方联合美沙拉嗪对溃疡性结肠炎患者粪便钙卫蛋白的影响[J]. 河北医学,2018,24(3):445-448.
- [10] 顾培青,沈洪,朱磊,等. 清肠化湿方对 TNBS 大鼠结肠组织 PPAR- γ /p38 MAPK 的影响[J]. 山东中医药大学学报,2017,41(1):81-85.
- [11] 刘丽,康安,刘春样,等. 清肠化湿方改善溃疡性结肠炎小鼠炎症及肠道菌群的影响[J]. 南京中医药大学学报(自然科学版),2021,37(1):47-53.
- [12] HU J,HUANG H,CHE Y,et al. Qingchang Huashi Formula Attenuates DSS-Induced colitis in mice by restoring gut microbiota-metabolism homeostasis and goblet cell function[J]. Journal of ethnopharmacology,2021,266(113394):1-13.
- [13] QIN S,HOU D X. Multiple regulations of Keap1/Nrf2 system by dietary phytochemicals[J]. Molecular nutrition & food research,2016,60(8):1731-1755.
- [14] JARAMILLO M C,ZHANG D D. The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer[J]. Genes & development,2013,27(20):2179-2191.
- [15] ZHANG Y L,GUAN L,WANG X F,et al. Protection of chlorophyllin against oxidative damage by inducing HO-1 and NQO1 expression mediated by PI3K/Akt and Nrf2[J]. Free radical research,2008,42(4):362-371.
- [16] KHODIR A E,ATEF H,SAID E,et al. Implication of Nrf2/HO-1 pathway in the coloprotective effect of coenzyme Q10 against experimentally induced ulcerative colitis[J]. Inflammopharmacology,2017,25(1):119-135.
- [17] 钟坤霞. β -葡聚糖 Salecan 缓解脂多糖诱导的急性肺损伤及其相关机制研究[D]. 南京:南京理工大学,2021.
- [18] WIRTZ S,POPP V,KINDERMANN M,et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation[J]. Nature protocols,2017,12(7):1295-1309.
- [19] WANG Z Q,LI S,CAO Y,et al. Oxidative stress and carbonyl lesions in ulcerative colitis and associated colorectal cancer[J]. Oxidative medicine and cellular longevity,2016(9875298):1-15.
- [20] HE L,HE T,FARRAR S,et al. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species[J]. Cellular physiology and biochemistry,2017,44(2):532-553.
- [21] LI B T,WANG Y X,JIANG X L,et al. Natural products targeting Nrf2/ARE signaling pathway in the treatment of inflammatory bowel disease[J]. Biomedicine & pharmacotherapy,2023,164(114950):1-18.
- [22] KHOR T O,HUANG M T,KWON K H,et al. Nrf2-deficient mice have an increased susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis[J]. Cancer research,2006,66(24):11580-11584.
- [23] OSBURN W O,KARIM B,DOLAN P M,et al. Increased colonic inflammatory injury and formation of aberrant crypt foci in Nrf2-deficient mice upon dextran sulfate treatment[J]. International journal of cancer,2007,121(9):1883-1891.
- [24] WEN H X,ZHANG H F,LI Q Q,et al. Ruscogenins improve CD-Like enteritis by inhibiting apoptosis of intestinal epithelial cells and activating Nrf2/NQO1 pathway[J]. Oxidative medicine and cellular longevity,2022(4877275):1-12.
- [25] PARK J,CHEON J H. Updates on conventional therapies for inflammatory bowel diseases:5-aminosalicylates,corticosteroids,immunomodulators,and anti-TNF α [J]. Korean journal of internal medicine,2022,37(5):895-905.
- [26] BRUSCOLI S,FEBO M,RICCARDI C,et al. Glucocorticoid therapy in inflammatory bowel disease:mechanisms and clinical practice[J]. Frontiers in immunology,2021,12(691480):1-9.
- [27] SATTLER L,HANAUER S B,MALTER L. Immunomodulatory agents for treatment of patients with inflammatory bowel disease (review safety of anti-TNF,anti-Integrin,anti IL-12/23,JAK inhibition,sphingosine 1-phosphate receptor modulator,azathioprine/6-MP and methotrexate)[J]. Current gastroenterology reports,2021,23(12):30.
- [28] KIENZL M,STORR M,SCHICHO R. Cannabinoids and opioids in the treatment of inflammatory bowel diseases[J]. Clinical and translational gastroenterology,2020,11(1):e00120.

- [29] STALLMACH A, HAGEL S, BRUNS T. Adverse effects of biologics used for treating IBD[J]. Best practice & research clinical gastroenterology, 2010, 24(2):167-182.
- [30] SEYEDIAN S S, NOKHOSTIN F, MALAMIR M D. A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease[J]. Journal of medicine and life, 2019, 12(2):113-122.
- [31] YUAN Z W, YANG L H, ZHANG X S, et al. Huang-Lian-Jie-Du decoction ameliorates acute ulcerative colitis in mice via regulating NF-kappaB and Nrf2 signaling pathways and enhancing intestinal barrier function[J]. Frontiers in pharmacology, 2019, 10(1354):1-18.
- [32] CHEN G, YANG Y, LIU M L, et al. Banxia xiexin decoction protects against dextran sulfate sodium-induced chronic ulcerative colitis in mice[J]. Journal of ethnopharmacology, 2015, 166:149-156.
- [33] 屈芸, 朱磊, 王琼, 等. 清肠化湿方通过激活 AhR/IL-22 缓解小鼠溃疡性结肠炎的作用机制研究[J]. 南京中医药大学学报(自然科学版), 2021, 37(6):823-829.
- [34] 傅书山, 朱磊, 王琼, 等. 清肠化湿方对溃疡性结肠炎湿热证小鼠 NLRP6 蛋白及相关炎症因子表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(5):582-588.
- [35] LIU H, JOHNSTON L J, WANG F L, et al. Triggers for the Nrf2/ARE signaling pathway and its nutritional regulation: potential therapeutic applications of ulcerative colitis[J]. International journal of molecular sciences, 2021, 22(21):11411.
- [36] LU M C, JI J A, JIANG Z Y, et al. The Keap1-Nrf2-ARE pathway as a potential preventive and therapeutic target: an update[J]. Medicinal research reviews, 2016, 36(5):924-963.
- [37] SIEGEL D, BOLTON E M, BURR J A, et al. The reduction of alpha-tocopherolquinone by human NAD(P)H: quinone oxidoreductase: the role of alpha-tocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant[J]. Molecular pharmacology, 1997, 52(2):300-305.
- [38] CHIANG S K, CHEN S E, CHANG L C. The Role of HO-1 and Its crosstalk with oxidative stress in cancer cell survival[J]. Cells, 2021, 10(9):2401.
- [39] STURGEON B E, SIPE H J, BARR D P, et al. The fate of the oxidizing tyrosyl radical in the presence of glutathione and ascorbate. Implications for the radical sink hypothesis[J]. Journal of biological chemistry, 1998, 273(46):30116-30121.

[责任编辑:黄 敏]