

车叶草苷减轻溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜损伤及炎症反应的机制^Δ

张霞^{1,2*}, 李秀芬², 赵汉清³, 贾慧宇⁴, 董利平^{5#} (1. 河北北方学院研究生学院, 河北张家口 075051; 2. 河北北方学院附属第二医院老年医学科, 河北张家口 075100; 3. 河北北方学院附属第二医院中医科, 河北张家口 075100; 4. 河北北方学院附属第二医院检验科, 河北张家口 075100; 5. 河北北方学院附属第一医院老年医学科, 河北张家口 075061)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)22-2756-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.22.09



摘要 目的 基于干扰素基因刺激因子(STING)/TANK结合激酶1(TBK1)/干扰素调节因子3(IRF3)信号通路,探究车叶草苷(ASP)对溃疡性结肠炎(UC)大鼠结肠组织病理损伤及炎症反应的影响机制。方法 以结肠内注射三硝基苯磺酸和乙醇构建UC大鼠模型,并将造模成功的大鼠分为模型组、ASP低剂量组(17.5 mg/kg)、ASP高剂量组(35 mg/kg)、ASP高剂量+STING激活剂组(35 mg/kg ASP+20 mg/kg ADU-S100),每组16只;另取16只健康大鼠,结肠内注射生理盐水,作为对照组。各组大鼠灌胃或/和腹腔注射相应药液或生理盐水,每天1次,连续14 d。末次给药后24 h,使用疾病活动指数(DAI)和结肠黏膜损伤指数(CMDI)分别评估各组大鼠的UC严重程度和结肠黏膜损伤程度,观察其结肠组织病理改变并进行组织病理学评分,检测其结肠组织细胞凋亡情况、炎症因子[肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、 β 干扰素(IFN- β)、白细胞介素4(IL-4)、IL-10]水平和通路相关蛋白表达情况[STING、TBK1、IRF3、核因子 κ B p65(NF- κ B p65)]。结果 与对照组比较,模型组大鼠结肠组织黏膜及腺体结构严重受损,黏膜上皮磨损,隐窝缺失,可见明显的炎症细胞浸润;DAI、CMDI、结肠组织病理学评分,细胞凋亡率,TNF- α 、IFN- β 水平,以及STING蛋白的表达水平和TBK1、IRF3、NF- κ B p65蛋白的磷酸化水平均显著升高;IL-4、IL-10水平均显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较,ASP低、高剂量组大鼠结肠组织黏膜结构相对完整,腺体排列有序,充血和水肿减轻,炎症细胞浸润及溃疡明显减少;上述各定量指标均显著改善,且高剂量组的改善较剂量组明显($P < 0.05$)。与ASP高剂量组比较,ASP高剂量+STING激活剂组大鼠的上述指标均被显著逆转($P < 0.05$)。结论 ASP可能通过抑制STING/TBK1/IRF3信号通路来减轻UC大鼠的结肠组织病理损伤及炎症反应。
关键词 车叶草苷;溃疡性结肠炎;结肠组织病理损伤;炎症反应;STING/TBK1/IRF3信号通路

Mechanism of the alleviation of colonic mucosal injury and inflammatory response in rats with ulcerative colitis by asperuloside

ZHANG Xia^{1,2}, LI Xiufen², ZHAO Hanqing³, JIA Huiyu⁴, DONG Liping⁵ (1. Graduate School of Hebei North University, Hebei Zhangjiakou 075051, China; 2. Dept. of Geriatric Medicine, the Second Hospital Affiliated to Hebei North University, Hebei Zhangjiakou 075100, China; 3. Dept. of Traditional Chinese Medicine, the Second Hospital Affiliated of Hebei North University, Hebei Zhangjiakou 075100, China; 4. Dept. of Laboratory, the Second Hospital Affiliated of Hebei North University, Hebei Zhangjiakou 075100, China; 5. Dept. of Geriatric Medicine, the First Hospital Affiliated of Hebei North University, Hebei Zhangjiakou 075061, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the effects and potential mechanism of asperuloside (ASP) on colonic pathological injury and inflammatory response in rats with ulcerative colitis (UC) based on the stimulator of interferon genes (STING)/TANK binding kinase 1 (TBK1)/interferon regulatory factor 3 (IRF3) signaling pathway. **METHODS** A UC rat model was established by intrarectal injection of trinitrobenzenesulfonic acid and ethanol. The successfully modeled rats were allocated to model group, low-dose ASP group (17.5 mg/kg), high-dose ASP group (35 mg/kg), and high-dose ASP+STING activator ADU-S100 group (35 mg/kg ASP+20 mg/kg ADU-S100), with 16 rats in each group. Another 16 healthy rats were selected as control group, by intrarectally injecting with normal saline. The rats in

^Δ基金项目 河北省医学科学研究课题计划项目(No.20210853)

*第一作者 副主任医师,硕士。研究方向:溃疡性结肠炎的诊治。

E-mail: zhangxiaxia5287@163.com

#通信作者 主任医师。研究方向:老年疾病的诊治。E-mail:

13582431375@163.com

each group were given the corresponding drug solutions or normal saline by gavage or/and intraperitoneal injection once a day for 14 consecutive days. Twenty-four hours after the last administration, the disease activity index (DAI) and colonic mucosal damage index (CMDI) were employed to assess the severity of UC and colonic mucosal damage in each group. Colonic tissue pathological changes were observed, and histopathological scores were recorded. Apoptosis in colonic tissue, levels of inflammatory cytokines [tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- β (IFN- β), interleukin-4 (IL-4), IL-10], and expressions of pathway-related proteins [STING, TBK1, IRF3, nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65)] were detected. **RESULTS** Compared with the control group, the model group showed severe destruction of colonic mucosa and glandular structure, mucosal epithelial erosion, crypt loss, marked inflammatory cell infiltration; it also demonstrated significant increase in DAI score, CMDI score, colonic histopathological score, apoptosis rate, the levels of TNF- α and IFN- β , and protein expression of STING and phosphorylation levels of TBK1, IRF3 and NF- κ B p65, while the levels of IL-4 and IL-10 were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the low- and high-dose ASP groups showed relatively intact colonic mucosal structure, orderly glandular arrangement, reduced congestion and edema, and markedly reduced inflammatory cell infiltration and ulcers; all quantitative indicators were significantly improved, with the high-dose group showing more pronounced improvements than the low-dose group ($P < 0.05$). Compared with the high-dose ASP group, the above indicators of rats in the high-dose ASP+STING activator group were significantly reversed ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS** ASP may alleviate colonic pathological injury and inflammatory response in UC rats by inhibiting the STING/TBK1/IRF3 signaling pathway.

KEYWORDS asperuloside; ulcerative colitis; colonic pathological injury; inflammatory response; STING/TBK1/IRF3 signaling pathway

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种慢性复发性炎症性胃肠道疾病,可造成结肠黏膜层炎症损伤,破坏胃肠道黏膜屏障,增加结直肠癌的发生风险^[1]。目前,UC的治疗方式主要包括药物治疗及手术治疗,但效果有限,且存在一定的安全风险,因此寻找更有效的低风险治疗手段是当前学界的研究重点之一^[2]。

近年来,天然化合物及其衍生物因疗效好、毒副作用小而备受学界关注。车叶草苷(asperuloside, ASP)是一种环烯醚萜苷类成分,分离自茜草科植物,具有较强的抗炎、抗氧化作用,可用于治疗急性肺损伤、尿酸性肾病和类风湿性关节炎等炎症性疾病^[3]。研究证实,ASP可改善非酒精性脂肪性肝病小鼠的肝脏脂质沉积和炎症反应^[4]。干扰素基因刺激因子(stimulator of interferon genes, STING)是一种衔接蛋白,主要存在于内质网中,可通过作用于异常的细胞质DNA来调控先天免疫反应过程^[5]。当STING被激活后,可通过募集和激活TANK结合激酶1(TANK binding kinase 1, TBK1)和干扰素调节因子3(interferon regulatory factor 3, IRF3)来启动下游核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号的转导,最终导致 β 干扰素(interferon- β , IFN- β)的产生^[6]。研究发现,茯苓酸可通过抑制环磷酸鸟苷-腺苷酸合成酶/STING信号通路来抑制TBK1和IRF3的表达,从而减轻UC大鼠肠上皮细胞损伤^[7]。据报道,ASP可通过抑制NF- κ B信号通路来改善慢性结肠炎小鼠的结肠氧化应激和炎症反应^[8]。由于STING/TBK1/IRF3信号通路位

于NF- κ B的上游,故本课题组推测该通路可能是ASP的潜在作用靶点。基于此,本研究从STING/TBK1/IRF3信号通路出发,初步探讨ASP对UC的影响及潜在机制,旨在为UC治疗新药的开发提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究采用的主要仪器包括SM-101型光学显微镜(澳大利亚KEWLAB公司)、DMi8-S型荧光显微镜(德国Leica公司)、3000FA型酶标仪(上海闪谱生物科技有限公司)、OmegaLum G型蛋白凝胶成像系统(美国Aplegen公司)等。

1.2 主要药品与试剂

ASP原料药(批号BH-R3019,纯度 $\geq 99\%$)购自上海博湖生物科技有限公司;STING激活剂ADU-S100的原料药(批号HY-12885A,纯度 $\geq 99.83\%$)购自美国MedChemExpress公司;三硝基苯磺酸、苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(批号分别为YR0417、YR0059)均购自上海远慕生物科技有限公司;TUNEL凋亡检测试剂盒(批号A111-01)购自苏州新赛美生物科技有限公司;肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素4(interleukin-4, IL-4)、IL-10酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为70-EK3823/2、70-EK3041/2、70-EK3101/2)均购自杭州联科生物技术有限公司;IFN- β ELISA试剂盒(批号E-EL-R0545)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;兔源TBK1、磷酸化TBK1

(phosphorylated TBK1, p-TBK1)、IRF3、磷酸化 IRF3 (phosphorylated IRF3, p-IRF3) 单克隆抗体(批号分别为 abs148670、abs148596、abs124576、abs140593)均购自爱必信(上海)生物科技有限公司;免源 STING、NF- κ B p65、磷酸化 NF- κ B p65 (phosphorylated NF- κ B p65, p-NF- κ B p65)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(批号分别为 ab288157、ab19870、ab76302、ab9485)均购自英国 Abcam 公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G 二抗(批号 DKY0991A)购自西宝生物科技(上海)有限公司。

1.3 实验动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠(体重 324~356 g)购自常州卡文斯实验动物有限公司,生产许可证号为 SCXK(苏)2021-0013。所有大鼠均置于无特定病原体的环境(温度 21~25 °C、相对湿度 50%~70%、黑暗/光照周期 12 h),自由摄食、饮水,并适应性饲养 1 周。本实验在河北北方学院动物实验室进行,实验方案经该院伦理委员会批准,批准编号为伦理基础-2023-031。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

依据相关文献^[9]方法建立 UC 大鼠模型:取 69 只大鼠,禁食、不禁水 24 h 后以乙醚麻醉,将导尿管沿肛门插入约 8 cm,然后在肠腔内缓慢注入 5% 三硝基苯磺酸溶液 2 mL/kg 和 50% 乙醇 0.3 mL,接着注入空气 0.5 mL,轻揉大鼠腹部 5 min。若大鼠出现血便、稀便和肛周污秽,且其结肠组织(随机选取 5 只)出现明显病变及炎症细胞浸润,则表明 UC 模型复制成功^[9]。将造模成功的 64 只 UC 大鼠随机分成模型组,ASP 低、高剂量组(17.5、35 mg/kg 的 ASP^[10]),ASP 高剂量+STING 激活剂组(35 mg/kg 的 ASP+20 mg/kg 的 ADU-S100^[11]),每组 16 只。另取 16 只正常大鼠,于肠腔内注入等体积生理盐水,并注入空气 0.5 mL,轻揉腹部 5 min,作为对照组。ASP 低、高剂量组大鼠分别灌胃 17.5、35 mg/kg 的 ASP(以生理盐水为溶剂,按 10 mL/kg 灌胃),同时腹腔注射生理盐水(10 mL/kg);ASP 高剂量+STING 激活剂组大鼠灌胃 35 mg/kg 的 ASP(以生理盐水为溶解,按 10 mL/kg 灌胃),同时腹腔注射 20 mg/kg 的 ADU-S100(以生理盐水为溶剂,按 10 mL/kg 注射);对照组和模型组大鼠分别灌胃和腹腔注射生理盐水 10 mL/kg。各组大鼠均每天予相应药液/生理盐水 1 次,连续 14 d。

2.2 大鼠 UC 严重程度评估及结肠黏膜损伤指数评分

末次给药结束后 24 h,使用疾病活动指数(disease activity index, DAI)评估各组大鼠 UC 的严重程度:通过测量各组大鼠的体重减轻情况[体重于造模结束后和末

次给药结束后 24 h 各测量 1 次,体重减轻百分比=(造模结束后体重-末次给药结束后 24 h 体重)/造模结束后体重 \times 100%],粪便性状及出血状况来确定 DAI,DAI=(体重减轻评分+粪便性状评分+大便隐血或出血评分)/3,具体评分标准^[12]见表 1。评分结束后,各组大鼠以颈椎脱臼法处死,取其病变处结肠组织(对照组大鼠取相同部位结肠组织,下同),使用结肠黏膜损伤指数(colonic mucosal damage index, CMDI)评估其结肠黏膜损伤程度,具体评分标准如下:结肠组织正常,记 0 分;结肠组织没有溃疡但可见水肿,记 1 分;结肠组织糜烂并伴有水肿,记 2 分;结肠组织存在直径 \leq 10 mm 的单个溃疡,记 3 分;结肠组织存在直径 \leq 10 mm 的多个溃疡或直径 $>$ 10 mm 的单个溃疡,记 4 分;结肠组织存在直径 $>$ 10 mm 的多个溃疡,记 5 分^[13]。

表 1 DAI 评分标准

评分分	体重减轻/%	粪便性状	大便隐血或出血
0	<1	正常	正常
1	1~5	-	-
2	6~10	松散	隐血阳性
3	11~15	-	-
4	>15	腹泻	显性出血

一:粪便性状、大便隐血或出血项评分只有 0、2、4 分 3 个等级。

2.3 大鼠结肠组织病理学变化观察

随机选取每组 8 只大鼠的结肠组织适量,在室温下固定于 4% 多聚甲醛溶液中 24 h,经梯度乙醇脱水、二甲苯清洗、石蜡包埋后切片(厚约 5 μ m);切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水后,依次用苏木精染色液染色 5 min、伊红染色液染色 2~3 min,经中性树脂封片后,置于光学显微镜下观察结肠组织病理学形态。随机选取每只大鼠的 5 个切片,根据结肠黏膜下层炎症细胞浸润、隐窝缺失等特征进行组织病理学评分,总分为 4 分,得分越高表示结肠组织病理损伤越严重。具体标准为:结肠黏膜正常,记 0 分;结肠隐窝部分缺失,记 1 分;结肠隐窝完全缺失,黏膜下层有轻度炎症细胞浸润,但固有层上皮表面仍保持完整,记 2 分;结肠隐窝完全缺失,黏膜下层有严重的炎症细胞浸润,但固有层上皮表面仍保持完整,记 3 分;结肠糜烂并伴有明显的炎症细胞浸润,记 4 分^[14]。

2.4 大鼠结肠组织细胞凋亡情况检测

采用 TUNEL 法检测。取“2.3”项下各组大鼠的结肠组织石蜡切片,于室温下以二甲苯脱蜡,经梯度乙醇脱水(每次 3 min)后,放入蛋白酶 K 溶液中于室温下孵育 20 min;然后根据 TUNEL 检测试剂盒说明书方法对切片进行标记,以 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)避光染核 5 min,随后用抗荧光淬灭剂终止反应;经中性树脂封

片后,置于荧光显微镜下观察各切片的染色情况(凋亡细胞呈绿色荧光,正常细胞呈蓝色荧光),计算细胞凋亡率[细胞凋亡率=绿色荧光细胞数/(绿色荧光细胞数+蓝色荧光细胞数)×100%]。

2.5 大鼠结肠组织中 TNF- α 、IFN- β 、IL-4、IL-10 水平检测

取各组剩余 8 只大鼠的结肠组织适量,以磷酸盐缓冲液匀浆后分成 2 份,其中一份置于 -70 °C 下保存;另一份于 4 °C 下以 5 000 r/min 离心 5 min,收集上清液,按 ELISA 试剂盒说明书方法操作,使用酶标仪检测上清液中 TNF- α 、IFN- β 、IL-4、IL-10 水平。

2.6 大鼠结肠组织中 STING/TBK1/IRF3 信号通路相关蛋白表达检测

取“2.5”项下冻存的各组大鼠结肠组织,以 RIPA 裂解液提取总蛋白,定量后进行变性处理。取变性蛋白适量,经电泳分离、转膜后,以牛血清白蛋白封闭 2 h;加入 STING/TBK1/IRF3 信号通路相关蛋白一抗(TBK1、p-TBK1、IRF3、p-IRF3 的稀释比例均为 1:500,STING、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 的稀释比例均为 1:1 000,GAPDH 的稀释比例为 1:2 000),4 °C 下孵育过夜;加入相应二抗(稀释比例为 1:3 000),室温下孵育 1 h;以 ECL 试剂显影,在蛋白凝胶成像系统下成像。以 GAPDH 为内参,通过 Image J 软件分析各目的蛋白的表达水平,并分别以 p-TBK1 与 TBK1、p-IRF3 与 IRF3、p-NF- κ B p65 与 NF- κ B p65 的灰度比值表示 TBK1、IRF3、NF- κ B p65 蛋白的磷酸化水平。

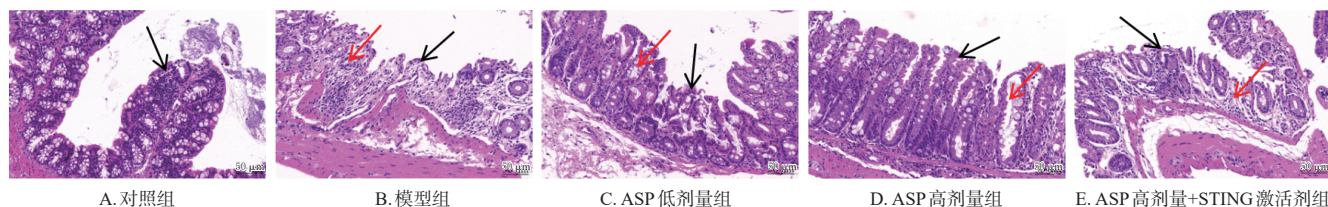
2.7 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用单因素方差分析进行多组间比较,随后使用 SNK- q 检验进行两组间多重比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 ASP 对 UC 大鼠 DAI 和 CMDI 评分的影响

与对照组比较,模型组大鼠的 DAI、CMDI 评分均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,ASP 低、高剂量组大鼠的 DAI、CMDI 评分均显著降低,且 ASP 高剂量组显著低于 ASP 低剂量组($P<0.05$);与 ASP 高剂量组比较,ASP 高剂量+STING 激活剂组大鼠的 DAI、CMDI 评分均显著升高($P<0.05$)。结果见表 2。



黑色箭头:腺体;红色箭头:炎症细胞浸润。

图 1 各组大鼠结肠组织病理学变化的显微图(HE 染色)

表 2 各组大鼠 DAI、CMDI 评分比较($\bar{x} \pm s, n=16$,分)

组别	DAI 评分	CMDI 评分
对照组	0	0
模型组	3.35±0.41 ^a	4.03±0.51 ^a
ASP 低剂量组	2.19±0.36 ^b	2.70±0.39 ^b
ASP 高剂量组	1.04±0.19 ^c	1.65±0.27 ^c
ASP 高剂量+STING 激活剂组	3.20±0.37 ^d	3.64±0.42 ^d

a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$; c: 与 ASP 低剂量组比较, $P<0.05$; d: 与 ASP 高剂量组比较, $P<0.05$ 。

3.2 ASP 对 UC 大鼠结肠组织病理学形态及组织病理学评分的影响

对照组大鼠结肠组织黏膜完整,隐窝和腺体排列正常,无溃疡形成。与对照组比较,模型组大鼠结肠组织黏膜及腺体结构严重受损,黏膜上皮磨损,隐窝缺失,可见明显的炎症细胞浸润,组织病理学评分显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,ASP 低、高剂量组大鼠结肠组织黏膜结构相对完整,腺体排列有序,充血和水肿减轻,炎症细胞浸润及溃疡明显减少,组织病理学评分均显著降低($P<0.05$);且 ASP 高剂量组的改善较 ASP 低剂量组明显,组织病理学评分更低($P<0.05$)。与 ASP 高剂量组比较,ASP 高剂量+STING 激活剂组大鼠结肠组织损伤和炎症细胞浸润加重,组织病理学评分显著升高($P<0.05$)。结果见图 1、表 3。

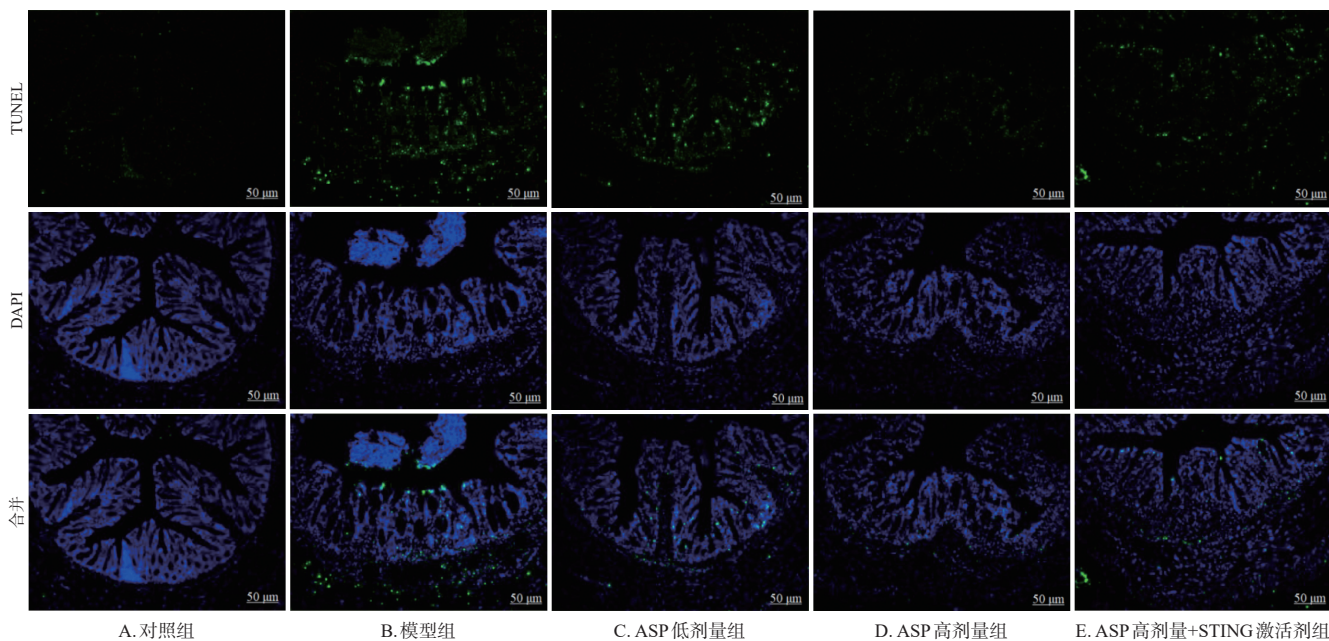
表 3 各组大鼠结肠组织病理学评分和细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	组织病理学评分/分	细胞凋亡率/%
对照组	0	3.74±0.49
模型组	3.51±0.34 ^a	35.67±4.61 ^a
ASP 低剂量组	2.44±0.28 ^b	21.85±3.27 ^b
ASP 高剂量组	1.27±0.22 ^c	9.14±1.48 ^c
ASP 高剂量+STING 激活剂组	3.26±0.31 ^d	31.43±4.20 ^d

a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$; c: 与 ASP 低剂量组比较, $P<0.05$; d: 与 ASP 高剂量组比较, $P<0.05$ 。

3.3 ASP 对 UC 大鼠结肠组织细胞凋亡率的影响

与对照组比较,模型组大鼠结肠组织的细胞凋亡率显著升高($P<0.05$);与模型组比较,ASP 低、高剂量组大鼠结肠组织的细胞凋亡率均显著降低,且 ASP 高剂量组显著低于 ASP 低剂量组($P<0.05$);与 ASP 高剂量组比较,ASP 高剂量+STING 激活剂组大鼠结肠组织的细胞凋亡率显著升高($P<0.05$)。结果见图 2、表 3。



绿色荧光:凋亡细胞;蓝色荧光:正常细胞。

图2 各组大鼠结肠组织细胞凋亡情况的显微图(TUNEL染色)

3.4 ASP对UC大鼠结肠组织中TNF- α 、IFN- β 、IL-4、IL-10水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠结肠组织中TNF- α 、IFN- β 水平均显著升高,IL-4、IL-10水平均显著降低($P<0.05$);与模型组比较,ASP低、高剂量组大鼠结肠组织中TNF- α 、IFN- β 水平均显著降低,IL-4、IL-10水平均显著升高,且ASP高剂量组的改变较ASP低剂量组明显($P<0.05$);与ASP高剂量组比较,ASP高剂量+STING激活剂组大鼠结肠组织中TNF- α 、IFN- β 水平均显著升高,IL-4、IL-10水平均显著降低($P<0.05$)。结果见表4。

表4 各组大鼠结肠组织中TNF- α 、IFN- β 、IL-4、IL-10水平比较($\bar{x} \pm s, n=8, \text{ng/g}$)

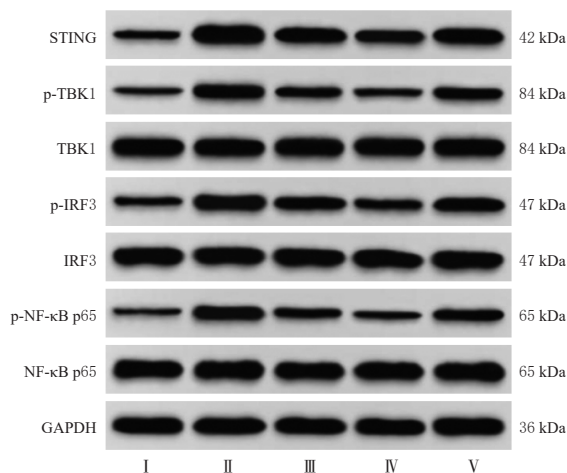
组别	TNF- α	IFN- β	IL-4	IL-10
对照组	38.96 \pm 5.21	97.34 \pm 10.52	137.48 \pm 12.67	189.37 \pm 16.85
模型组	173.54 \pm 19.62 ^a	243.17 \pm 27.39 ^a	24.18 \pm 4.76 ^a	41.25 \pm 7.39 ^a
ASP低剂量组	119.35 \pm 14.28 ^b	183.44 \pm 20.65 ^b	62.07 \pm 7.81 ^b	88.71 \pm 10.56 ^b
ASP高剂量组	62.73 \pm 8.49 ^{bc}	125.89 \pm 15.06 ^{bc}	113.50 \pm 10.24 ^{bc}	153.64 \pm 14.27 ^{bc}
ASP高剂量+STING激活剂组	156.21 \pm 18.10 ^d	228.43 \pm 24.15 ^d	31.49 \pm 4.23 ^d	49.83 \pm 7.15 ^d

a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与ASP低剂量组比较, $P<0.05$;d:与ASP高剂量组比较, $P<0.05$ 。

3.5 ASP对UC大鼠结肠组织中STING/TBK1/IRF3信号通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组大鼠结肠组织中STING蛋白的表达水平和TBK1、IRF3、NF- κ B p65蛋白的磷酸化水平均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,ASP低、高剂量组大鼠结肠组织中STING蛋白的表达水平和TBK1、IRF3、NF- κ B p65蛋白的磷酸化水平均显著降低,且ASP高剂量组显著低于ASP低剂量组($P<0.05$);与ASP高

剂量组比较,ASP高剂量+STING激活剂组大鼠结肠组织中STING蛋白的表达水平和TBK1、IRF3、NF- κ B p65蛋白的磷酸化水平均显著升高($P<0.05$)。结果见图3和表5。



I:对照组;II:模型组;III:ASP低剂量组;IV:ASP高剂量组;V:ASP高剂量+STING激活剂组。

图3 各组大鼠结肠组织中STING/TBK1/IRF3信号通路相关蛋白表达的电泳图

表5 各组大鼠结肠组织STING蛋白表达水平和TBK1、IRF3、NF- κ B p65蛋白磷酸化水平比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	STING/GAPDH	p-TBK1/TBK1	p-IRF3/IRF3	p-NF- κ B p65/NF- κ B p65
对照组	0.31 \pm 0.05	0.27 \pm 0.04	0.29 \pm 0.03	0.17 \pm 0.02
模型组	1.34 \pm 0.15 ^a	0.89 \pm 0.10 ^a	0.92 \pm 0.11 ^a	0.78 \pm 0.08 ^a
ASP低剂量组	1.02 \pm 0.09 ^b	0.56 \pm 0.07 ^b	0.67 \pm 0.08 ^b	0.49 \pm 0.06 ^b
ASP高剂量组	0.73 \pm 0.06 ^{bc}	0.35 \pm 0.05 ^{bc}	0.36 \pm 0.05 ^{bc}	0.25 \pm 0.03 ^{bc}
ASP高剂量+STING激活剂组	1.09 \pm 0.12 ^d	0.68 \pm 0.09 ^d	0.73 \pm 0.09 ^d	0.59 \pm 0.07 ^d

a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与ASP低剂量组比较, $P<0.05$;d:与ASP高剂量组比较, $P<0.05$ 。

4 讨论

UC是一种发生在结肠的炎症性疾病,是一种起因不明的连续性黏膜溃疡,可累及结肠黏膜及黏膜下层,然后扩散至整个结肠,以慢性复发性腹痛、腹泻、粪便出血、体重减轻和肠黏膜损伤为主要临床表现。目前,UC治疗药物以氨基水杨酸盐、皮质类固醇、免疫抑制剂和生物制剂为主,上述药物虽可抑制炎症反应,但存在一定副作用(如消化不良、胰腺炎、过敏反应等),且长期使用会增加复发率,有引发严重感染和肿瘤的风险^[15]。因此,寻找有效的替代药物至关重要。据报道,肠腔内注射三硝基苯磺酸和乙醇是目前构建UC模型的常用方法之一,该法所致实验动物结肠组织损伤的病理特征与UC患者相似,同时可引发与人类UC相同的腹泻、体重减轻和炎症反应等症状,并伴有促炎细胞因子水平的升高^[16]。因此,本研究利用此方法构建UC大鼠模型。结果显示,UC大鼠结肠组织黏膜及腺体结构受损严重,炎症细胞浸润明显,且DAI、CMDI、结肠组织病理学评分,细胞凋亡率和结肠组织中促炎细胞因子TNF- α 、IFN- β 水平均较健康大鼠显著升高,而抗炎细胞因子IL-4、IL-10水平均较健康大鼠显著降低,提示大鼠存在明显的结肠组织病理损伤及炎症反应,UC模型构建成功。

ASP是一种存在于茜草科植物中的环烯醚萜苷类成分,具有较强的抗炎、抗氧化、抗癌等活性^[10]。Chen等^[8]研究发现,ASP可通过减轻氧化应激和炎症反应来改善炎症性肠病小鼠的相关症状;Uczay等^[17]报道显示,ASP能够缓解癫痫大鼠海马组织的炎症反应,从而减少其癫痫发作次数。本研究发现,经不同剂量ASP干预后,UC大鼠结肠组织黏膜及腺体损伤、炎症细胞浸润均得到改善,DAI、CMDI、结肠组织病理学评分,细胞凋亡率和TNF- α 、IFN- β 水平均较模型组显著降低,IL-4、IL-10水平均较模型组显著升高,且高剂量组的改善更明显,提示ASP可减轻UC大鼠结肠组织的病理损伤及炎症反应,具有一定的抗炎活性。

STING是一种在内质网膜上广泛表达的蛋白,经环磷酸鸟苷-腺苷酸合成酶通过识别外源核酸后活化,并催化腺苷三磷酸和鸟苷三磷酸形成环鸟苷酸腺苷酸,后者作为第二信使与STING结合,激活TBK1/IRF3信号轴,从而进一步激活NF- κ B^[18];随后,NF- κ B与p-IRF3一起易位至细胞核,进而激活I型IFN(如IFN- β)和各种细胞因子(如TNF- α 、IL-6)编码基因的转录和表达^[19]。研究指出,抑制STING的表达能够抑制下游TBK1/IRF3信号轴的活性,从而改善结肠炎小鼠的炎症反应并恢复其肠道屏障功能^[20]。本研究发现,UC大鼠结肠组织中

STING蛋白的表达水平和TBK1、IRF3、NF- κ B p65蛋白的磷酸化水平均显著高于健康大鼠,表明其体内的STING/TBK1/IRF3信号通路被激活;经不同剂量ASP干预后,UC大鼠结肠组织中STING蛋白的表达水平和TBK1、IRF3、NF- κ B p65蛋白的磷酸化水平均较模型组显著降低,且ASP高剂量组显著低于ASP低剂量组,提示ASP可抑制UC大鼠结肠组织中STING/TBK1/IRF3信号通路的激活。为进一步验证上述结果,本研究在高剂量ASP的基础上联合STING激活剂ADU-S100对UC大鼠进行干预,结果显示,高剂量ASP对UC大鼠的改善作用被该激活剂显著逆转,推测ASP对UC大鼠的干预作用可能与STING/TBK1/IRF3信号通路被抑制有关。

综上所述,ASP可通过抑制STING/TBK1/IRF3信号通路来减轻UC大鼠结肠组织的病理损伤及炎症反应,改善结肠组织细胞凋亡。本研究为ASP治疗UC提供了新的参考依据,但有关STING信号途径的机制较为复杂,其上下游完整的作用途径尚有待后续深入探讨。

参考文献

- [1] SHAHRIARIRAD R, ERFANI A, NEKOU EI F, et al. Protective effect of *Melissa officinalis* against acetic acid-induced ulcerative colitis in rat models: an experimental study[J]. *Ann Gastroenterol*, 2023, 36(6): 654-660.
- [2] D' HAENS G, DUBINSKY M, KOBAYASHI T, et al. Mirikizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis[J]. *N Engl J Med*, 2023, 388(26): 2444-2455.
- [3] WANG X G, CHEN X T, ZHANG Z X, et al. Asperuloside prevents peri-implantitis via suppression of NF- κ B and ERK1/2 on rats[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2022, 15(8): 1027.
- [4] SHEN Q, CHEN Y E, SHI J X, et al. Asperuloside alleviates lipid accumulation and inflammation in HFD-induced NAFLD via AMPK signaling pathway and NLRP3 inflammasome[J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 942: 175504.
- [5] OCCHIGROSSI L, ROSSIN F, D' ELETTO M, et al. Transglutaminase 2 regulates innate immunity by modulating the STING/TBK1/IRF3 axis[J]. *J Immunol*, 2021, 206(10): 2420-2429.
- [6] HAO J F, HUANG X, GUAN J B, et al. Shengkang injection protects against renal fibrosis by reducing perforin expression through the STING/TBK1/IRF3 signaling pathways in natural killer cells[J]. *Phytomedicine*, 2022, 104: 154206.
- [7] 张士伟,程慎令,邢启峰. 茯苓酸通过抑制cGAS-STING

- 信号通路减轻溃疡性结肠炎大鼠结肠上皮细胞损伤[J]. 免疫学杂志, 2023, 39(8):672-680.
- ZHANG S W, CHENG S L, XING Q F. Pachymic acid alleviates colonic epithelial cell damage in ulcerative colitis rats by inhibiting cGAS-STING signaling pathway[J]. Immunol J, 2023, 39(8):672-680.
- [8] CHEN Y E, XU S J, LU Y Y, et al. Asperuloside suppressing oxidative stress and inflammation in DSS-induced chronic colitis and RAW 264.7 macrophages via Nrf2/HO-1 and NF- κ B pathways[J]. Chem Biol Interact, 2021, 344: 109512.
- [9] 王钰嘉, 于千惠, 卢雨微, 等. 穴位埋线联合艾灸对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 IL-6/JAK/STAT3 信号通路的影响[J]. 针刺研究, 2022, 47(6):525-530.
- WANG Y J, YU Q H, LU Y W, et al. Effect of moxibustion combined with acupoint catgut embedding on IL-6/JAK/STAT3 signaling pathway in colonic mucosa of ulcerative colitis rats[J]. Acupunct Res, 2022, 47(6): 525-530.
- [10] 孙立燕, 刘泽茹, 苏永胜, 等. 车叶草苷调节 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路对脓毒症大鼠肺组织细胞焦亡的影响[J]. 天津医药, 2023, 51(6):607-613.
- SUN L Y, LIU Z R, SU Y S, et al. Effect of asperuloside on pyroptosis of lung tissue in septic rats by regulating NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway[J]. Tianjin Med J, 2023, 51(6):607-613.
- [11] 李妍, 齐曼曼, 缴宝杰, 等. IL-18 结合蛋白在创伤性颅脑损伤大鼠认知功能障碍中的作用及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(7):776-783.
- LI Y, QI M M, JIAO B J, et al. Effect and mechanism of IL-18BP in relieving cognitive dysfunction of rats with traumatic brain injury[J]. Med J Chin People's Liberation Army, 2023, 48(7):776-783.
- [12] 王婧婧, 古诗琴, 蔡莹, 等. 参苓白术散与肾气丸干预脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠的代谢组学研究[J]. 中成药, 2022, 44(11):3690-3696.
- WANG J J, GU S Q, CAI Y, et al. The metabolomics study of Shenling baizhu powder and Shenqi pill on the intervention of ulcerative colitis rats with spleen-kidney yang deficiency[J]. Chin Tradit Pat Med, 2022, 44(11): 3690-3696.
- [13] 陈泰宇, 唐学贵, 蒋小东, 等. 基于 Nrf2/ARE 信号通路探讨硫化氢对溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜损伤的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2022, 32(19):38-43.
- CHEN T Y, TANG X G, JIANG X D, et al. Effects of NaHS on intestinal mucosal injury in ulcerative colitis rats based on Nrf2/ARE signaling pathway[J]. China J Mod Med, 2022, 32(19):38-43.
- [14] TUNC N, SAHIN A, DEMIREL U, et al. Favourable effects of whey protein on acetic acid-induced ulcerative colitis in a rat model[J]. Arch Med Sci, 2021, 18(6):1617-1625.
- [15] CALMÉJANE L, LAHARIE D, KIRCHGESNER J, et al. Review article: updated management of acute severe ulcerative colitis: from steroids to novel medical strategies [J]. United European Gastroenterol J, 2023, 11(8): 722-732.
- [16] 张霞, 贾慧宇, 康金旺, 等. 柠檬苦素对溃疡性结肠炎大鼠肠道损伤和肠道菌群紊乱的改善作用及机制[J]. 中国药房, 2024, 35(1):51-56.
- ZHANG X, JIA H Y, KANG J W, et al. Improvement effects of limonin on intestinal injury and intestinal flora disturbance in rats with ulcerative colitis and its mechanism [J]. China Pharm, 2024, 35(1):51-56.
- [17] UCZAY M, PFLÜGER P, PICADA J N, et al. Geniposide and asperuloside alter the COX-2 and GluN2B receptor expression after pilocarpine-induced seizures in mice[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2023, 396(5): 951-962.
- [18] OCCHIGROSSI L, ROSSIN F, VILLELLA V R, et al. The STING/TBK1/IRF3/IFN type I pathway is defective in cystic fibrosis[J]. Front Immunol, 2023, 14:1093212.
- [19] YUM S, LI M H, FANG Y, et al. TBK1 recruitment to STING activates both IRF3 and NF- κ B that mediate immune defense against tumors and viral infections[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(14):e2100225118.
- [20] LAN J, DENG Z T, WANG Q Z, et al. Neuropeptide substance P attenuates colitis by suppressing inflammation and ferroptosis via the cGAS-STING signaling pathway [J]. Int J Biol Sci, 2024, 20(7):2507-2531.

(收稿日期:2024-04-23 修回日期:2024-09-20)

(编辑:张元媛)