

车叶草苷对溃疡性结肠炎大鼠肠上皮细胞焦亡的影响及机制[△]

徐超*, 谭小平, 李杰, 艾明华, 卢月月, 刘超勇[#](荆州市第一人民医院消化内科, 湖北荆州 434000)

中图分类号 R965;R574.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)02-0166-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.02.06



摘要 目的 探讨车叶草苷(Asp)对溃疡性结肠炎(UC)大鼠肠上皮细胞焦亡的影响及机制。方法 将雄性SD大鼠随机分为对照组(Control组),模型组(UC组),ASP低、高剂量组[Asp-L、Asp-H组, Asp 35、70 mg/(kg·d)],ASP高剂量+AMPK抑制剂Compound C组[Asp-H+Compound C组, Asp 70 mg/(kg·d)+Compound C 0.2 mg/(kg·d)],每组12只。除Control组外,其余各组均以腹腔灌入50%乙醇(0.25 mL)+5% 2,4,6-三硝基苯磺酸溶液(2 mL/kg)的方式构建UC模型。造模后,各药物组大鼠灌胃或(和)尾静脉注射相应药液,每天1次,连续14 d。末次给药后,称定各组大鼠体重,测量其结肠长度,并进行疾病活动指数(DAI)评分、结肠黏膜损伤指数(CMDI)评分,检测其血清中炎症因子[白细胞介素18(IL-18)、IL-1 β 、IL-6]水平,观察结肠组织病理改变,检测结肠组织中焦亡相关蛋白[胱天蛋白酶1(caspase-1)、消皮素D(GSDMD)]及通路相关蛋白[腺苷一磷酸活化的蛋白激酶(AMPK)、硫氧还蛋白互作蛋白(TXNIP)、NOD样受体蛋白3(NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)]的表达情况。**结果** 与Control组比较,UC组大鼠结肠组织结构受损,炎症细胞浸润、水肿明显;体重、结肠长度及AMPK蛋白的磷酸化水平均显著降低或缩短($P<0.05$);DAI、CMDI评分,血清中炎症因子水平以及结肠组织中caspase-1、GSDMD、TXNIP、NLRP3、ASC蛋白的表达均显著升高或上调($P<0.05$)。与UC组比较,Asp-L、Asp-H组大鼠结肠组织病理损伤均有所减轻,各定量指标均显著改善($P<0.05$),且Asp-H组的改善效果更明显($P<0.05$);Compound C可显著逆转高剂量Asp对UC大鼠上述指标的改善作用($P<0.05$)。**结论** Asp可改善UC大鼠结肠组织炎症性损伤,抑制其肠上皮细胞焦亡,上述作用可能与激活AMPK进而抑制TXNIP/NLRP3信号通路有关。

关键词 车叶草苷;溃疡性结肠炎;肠上皮细胞;焦亡;AMPK/TXNIP/NLRP3信号通路

Effects and mechanism of asperuloside on the pyroptosis of intestinal epithelial cells in rats with ulcerative colitis

XU Chao, TAN Xiaoping, LI Jie, AI Minghua, LU Yueyue, LIU Chaoyong (Dept. of Gastroenterology, Jingzhou First People's Hospital, Hubei Jingzhou 434000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effects and mechanism of asperuloside (Asp) on the pyroptosis of intestinal epithelial cells in rats with ulcerative colitis (UC). **METHODS** The male SD rats were randomly divided into Control group, model group (UC group), ASP low-dose and high-dose groups [Asp-L, Asp-H groups, Asp 35, 70 mg/(kg·d)], ASP high-dose group+AMPK inhibitor Compound C group [Asp-H+Compound C group, Asp 70 mg/(kg·d)+Compound C 0.2 mg/(kg·d)], with 12 rats in each group. Except for Control group, the other groups were injected with 50% ethanol (0.25 mL)+5% 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid solution (2 mL/kg) into the intestinal cavity to construct UC model. After modeling, the rats in each drug group were given corresponding drug solution by gavage or (and) tail vein injection, once a day, for 14 consecutive days. After the last administration, the weight of rats in each group was measured, and the length of their colons was measured; disease activity index (DAI) score and colonic mucosal damage index (CMDI) score were performed, and the serum levels of inflammatory factors (interleukin-18, -1 β , -6) were detected. The pathological changes of the colon tissue were observed. The expressions of pyroptosis-related proteins [caspase-1, gasdermin D (GSDMD)] in colon tissue, and pathway-related proteins such as adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), thioredoxin-interacting protein (TXNIP), NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) and apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) were all detected. **RESULTS** Compared with Control group, the colon tissue structure of rats in UC group was damaged, with obvious infiltration of inflammatory cells and edema. Their body weight, colon length and phosphorylation level of AMPK protein were significantly reduced or shortened; DAI and CMDI scores, serum levels of inflammatory factors, and the protein expressions of caspase-1, GSDMD, TXNIP, NLRP3 and ASC in colon tissue were increased or upregulated significantly ($P<0.05$). Compared with UC group, the pathological damage of colon tissue in rats was relieved in Asp-L and Asp-H groups, and all quantitative indicators were significantly improved ($P<0.05$); the improvement effect of Asp-H group was more significant ($P<0.05$). Compound C could

[△]基金项目 湖北省科技计划项目(No.2022BCE009);湖北省卫生健康委科研项目(No.WJ2018H204)

* 第一作者 副主任医师。研究方向:消化病学。E-mail: uocwk4@163.com

[#]通信作者 副主任医师,硕士。研究方向:消化病学。E-mail: x11nry@163.com

significantly reverse the improvement effect of high-dose of Asp on the above indicators in UC rats ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS** Asp can improve inflammatory damage in colon tissue and inhibit pyroptosis of intestinal epithelial cells in UC rats, which is associated with the activation of AMPK and inhibition of TXNIP/NLRP3 signaling pathway.

KEYWORDS asperuloside; ulcerative colitis; intestinal epithelial cell; pyroptosis; AMPK/TXNIP/NLRP3 signaling pathway

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种自身免疫性炎症性肠病,主要病理表现为结直肠黏膜及黏膜下层的弥散性炎症,以及肠上皮细胞的过度焦亡和异常凋亡、坏死等,临床表现包括腹痛、腹泻、脓血便等症状^[1]。其中,细胞焦亡是一种炎症性细胞死亡方式,可促进大量炎症细胞因子的释放,诱发炎症级联反应,从而介导UC的发生发展^[1]。由于环境、生活方式、饮食习惯的改变,UC的患病率持续上升^[2]。目前,UC的临床治疗以免疫抑制剂、类固醇类、氨基水杨酸类、生物制剂等药物治疗为主,虽能一定程度缓解患者的症状,但存在服药时间长、副作用发生率高、病情易反复、感染及癌变风险高等缺点,疗效有限^[3]。UC发病机制较复杂,了解其发病机制、寻找特异性治疗药物是相关研究的重要方向。

车叶草苷(asperuloside, Asp)是一种环烯醚萜类化合物,广泛分布于茜草科、杜仲科等药用植物中,具有抗菌、消炎、抗氧化、抗癌等多种药理活性^[4]。研究指出,Asp可减轻小鼠炎症和氧化应激,降低疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分,减轻结肠组织病理损伤,进而改善葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)诱导的慢性结肠炎^[5]。腺苷一磷酸活化的蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)/硫氧还蛋白互作蛋白(thioredoxin-interacting protein, TXNIP)/NOD样受体蛋白3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)信号通路是经典的细胞焦亡相关通路。研究显示,激活AMPK、抑制TXNIP介导的NLRP3炎症小体激活,可抑制炎症反应,改善DSS诱导的UC小鼠的相关症状和病理损伤^[6]。考虑到AMPK/TXNIP/NLRP3信号通路是Asp的潜在作用靶点^[7],本研究拟基于该通路,初步探索Asp对UC大鼠肠上皮细胞焦亡的影响及潜在机制,以期为UC的临床治疗提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Multiskan MK3型全自动酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)、BH-2型显微镜(日本Olympus公司)、4200SF型凝胶成像分析系统(上海天能科技有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

Asp对照品(批号Y10131-YLS,纯度 $\geq 95\%$)购自北京百奥莱博科技有限公司;AMPK抑制剂Compound C的对照品(批号C649291,纯度98%)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS,批号YBP7020)购自上海钰博生物科技有限公司;白细胞

介素18(interleukin-18, IL-18)、IL-1 β 、IL-6酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为E-EL-R0567、E-EL-R0012、E-EL-R0015)均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;苏木精-伊红(HE)染色液(批号DH0006)购自北京雷根生物技术有限公司;兔源胱天蛋白酶1(caspase-1)多克隆抗体(批号abs148492)购自爱必信(上海)生物科技有限公司;兔源消皮素D(gasdermin D, GSDMD)多克隆抗体(批号FNab03670)购自武汉菲恩生物科技有限公司;兔源磷酸化AMPK(phosphorylated AMPK, p-AMPK)、AMPK单克隆抗体(批号分别为ab133448、ab207442)均购自英国Abcam公司;兔源TXNIP、NLRP3多克隆抗体(批号分别为JK262438、JK220143)均购自上海晶抗生物工程有限公司;兔源凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)多克隆抗体(批号kl-6741R)购自上海康朗生物科技有限公司;兔源 β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体(批号4967)购自美国CST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S0001)购自上海研卉生物科技有限公司。

1.3 实验动物

SPF级健康成年雄性SD大鼠,7周龄,购自武汉云克隆动物有限公司,动物生产许可证号为SCXK(鄂)2023-0021。所有大鼠均饲养于温度22~26℃、相对湿度55%~60%、每12h光暗交替的环境下,自由摄食、饮水。本研究方案已通过武汉云克隆动物有限公司动物伦理委员会审核批准(批准编号2023-12-236)。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将大鼠随机分为对照组(Control组)、模型组(UC组)、Asp低剂量组(Asp-L组)、Asp高剂量组(Asp-H组)、Asp高剂量+AMPK抑制剂Compound C组(Asp-H+Compound C组),每组12只。除Control组外,其余各组大鼠按下法建立UC模型:大鼠禁食、不禁水24h,经麻醉后固定,将直径1.5mm的聚丙烯管插入肛门内约8cm处,经该管向肠腔内灌入50%乙醇(0.25mL)和5%TNBS溶液(2mL/kg),随后提尾倒挂约30s。若大鼠3d后进食减少、懒动并出现黏液血便等症状,则表示造模成功^[8]。Control组大鼠以生理盐水代替50%乙醇和5%TNBS溶液,其余操作同上。造模成功后,Asp-L、Asp-H组大鼠分别灌胃Asp 35、70mg/(kg·d)(以生理盐水为溶剂,下同)^[7],并同时尾静脉注射生理盐水;Asp-H+Compound C组大鼠灌胃Asp 70mg/(kg·d),并同时

尾静脉注射 Compound C 0.2 mg/(kg·d) (以生理盐水为溶剂)^[9]; Control 组和 UC 组大鼠灌胃并同时尾静脉注射等体积生理盐水; 每天 1 次, 连续 14 d。

2.2 大鼠体重测量及 DAI 评分

末次给药结束后, 称定各组大鼠体重, 并从体重、大便性状及便血情况 3 个方面进行 DAI 评分, 具体标准如下: 三者均正常, 记 0 分; 体重较造模前下降 1%~5%, 大便呈半糊状, 且趋于隐血阳性, 记 1 分; 体重较造模前下降 6%~10%, 大便呈糊状, 且呈隐血阳性, 记 2 分; 体重较造模前下降 11%~15%, 大便介于糊状与稀便之间, 便血介于隐血阳性与肉眼可见之间, 记 3 分; 体重较造模前下降 >15%, 便稀, 且便血肉眼可见, 记 4 分^[10]。

2.3 大鼠血清中炎症因子水平检测

DAI 评分结束后, 取各组大鼠腹主动脉血, 静置后离心, 取上层血清, 严格按照相应试剂盒说明书方法操作, 采用 ELISA 法以酶标仪检测其中 IL-18、IL-1 β 、IL-6 水平。

2.4 大鼠结肠黏膜损伤评估

取血后, 将各组大鼠处死, 取其距肛门 8 cm 处的结肠, 观察其形态并进行结肠黏膜损伤指数 (colonic mucosal damage index, CMDI) 评分。具体标准如下: 结肠黏膜正常, 记 0 分; 结肠黏膜水肿、充血但无溃疡, 记 1 分; 结肠黏膜出现糜烂, 记 2 分; 结肠黏膜出现单个直径 <1 cm 的溃疡, 记 3 分; 结肠黏膜出现 2 个及以上直径 <1 cm 的溃疡, 记 4 分; 结肠黏膜出现直径 >1 cm 的溃疡, 记 5 分^[11]。

2.5 大鼠结肠长度测量及结肠组织病理观察

取“2.4”项下各组大鼠结肠, 从每组中任选 6 只大鼠测量其结肠长度; 随后, 取结肠组织适量, 经固定、脱水、浸蜡、包埋后切片, 进行 HE 染色, 使用显微镜观察结肠组织的病理改变情况。

2.6 大鼠结肠组织中细胞焦亡相关蛋白表达检测

采用免疫组化法检测。取“2.5”项下各组大鼠的结肠组织石蜡切片, 常规处理后进行抗原修复、血清封闭; 加入 caspase-1、GSDMD 一抗 (稀释比例均为 1:200), 于 4 °C 下孵育过夜; 加入相应二抗 (稀释比例为 1:200), 于 37 °C 下孵育 2 h; 洗膜后, 加入 3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐 (DAB) 显色; 用水冲洗后, 以苏木精复染; 脱水后, 以中性树脂封片, 置于显微镜下观察。以棕褐色为阳性染色, 采用 Image 软件分析阳性区域的光密度值, 用以表示 caspase-1、GSDMD 蛋白的表达水平。

2.7 大鼠结肠组织中 AMPK/TXNIP/NLRP3 信号通路相关蛋白表达检测

采用 Western blot 法检测。取各组剩余 6 只大鼠的结肠组织, 研碎后与蛋白裂解液充分反应, 离心后取上清液, 以 BCA 法定量后, 于沸水浴中加热变性。取变性蛋白适量, 经电泳分离后转膜、封闭; 洗膜后, 加入 p-

AMPK、AMPK、TXNIP、NLRP3、ASC、 β -actin 一抗 (稀释比例分别为 1:2 000、1:2 000、1:2 000、1:2 000、1:2 000、1:1 000), 于 4 °C 下孵育过夜; 洗膜后, 加入相应二抗 (稀释比例为 1:10 000), 避光孵育 2 h; 洗膜后, 以 ECL 发光试剂显色, 于凝胶成像分析系统下成像。使用 Image 软件分析各蛋白条带的灰度值, 以 β -actin 为内参, 计算各目的蛋白的表达水平, 并以 p-AMPK 与 AMPK 蛋白的表达水平比值表示 AMPK 蛋白的磷酸化水平。

2.8 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 Asp 对 UC 大鼠体重及 DAI 评分的影响

与 Control 组比较, UC 组大鼠的体重显著降低, DAI 评分显著升高 ($P<0.05$); 与 UC 组比较, Asp-L、Asp-H 组大鼠的体重均显著升高, DAI 评分均显著降低 ($P<0.05$), 且 Asp-H 组上述指标的改善更明显 ($P<0.05$); 与 Asp-H 组比较, Asp-H+Compound C 组大鼠的体重显著降低, DAI 评分显著升高 ($P<0.05$)。结果见表 1。

表 1 各组大鼠体重及 DAI 评分比较 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	体重/g	DAI 评分/分
Control 组	221.53 \pm 12.45	0
UC 组	163.48 \pm 9.78 ^a	3.58 \pm 0.26 ^a
Asp-L 组	189.37 \pm 10.49 ^b	2.42 \pm 0.18 ^b
Asp-H 组	217.64 \pm 11.56 ^c	1.17 \pm 0.12 ^c
Asp-H+Compound C 组	180.25 \pm 10.02 ^d	2.50 \pm 0.19 ^d

a: 与 Control 组比较, $P<0.05$; b: 与 UC 组比较, $P<0.05$; c: 与 Asp-L 组比较, $P<0.05$; d: 与 Asp-H 组比较, $P<0.05$ 。

3.2 Asp 对 UC 大鼠血清中炎症因子水平的影响

与 Control 组比较, UC 组大鼠血清中 IL-18、IL-1 β 、IL-6 水平均显著升高 ($P<0.05$); 与 UC 组比较, Asp-L、Asp-H 组大鼠血清中 IL-18、IL-1 β 、IL-6 水平均显著降低 ($P<0.05$), 且 Asp-H 组上述指标的改善更明显 ($P<0.05$); 与 Asp-H 组比较, Asp-H+Compound C 组大鼠血清中 IL-18、IL-1 β 、IL-6 水平均显著升高 ($P<0.05$)。结果见表 2。

表 2 各组大鼠血清中炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=12$, pg/mL)

组别	IL-18	IL-1 β	IL-6
Control 组	11.58 \pm 1.17	428.46 \pm 25.69	20.83 \pm 1.63
UC 组	48.26 \pm 1.65 ^a	1 362.73 \pm 46.83 ^a	72.64 \pm 3.78 ^a
Asp-L 组	31.73 \pm 1.42 ^b	976.22 \pm 37.51 ^b	51.79 \pm 2.85 ^b
Asp-H 组	13.95 \pm 1.26 ^c	597.68 \pm 28.36 ^c	28.56 \pm 2.17 ^c
Asp-H+Compound C 组	36.42 \pm 1.51 ^d	1 125.47 \pm 39.84 ^d	57.33 \pm 3.09 ^d

a: 与 Control 组比较, $P<0.05$; b: 与 UC 组比较, $P<0.05$; c: 与 Asp-L 组比较, $P<0.05$; d: 与 Asp-H 组比较, $P<0.05$ 。

3.3 Asp 对 UC 大鼠 CMDI 评分及结肠长度的影响

与 Control 组比较, UC 组大鼠的 CMDI 评分显著升高, 结肠长度显著缩短 ($P<0.05$); 与 UC 组比较, Asp-L、

Asp-H组大鼠的CMDI评分均显著降低,结肠长度均显著延长($P<0.05$),且Asp-H组上述指标的改善更明显($P<0.05$);与Asp-H组比较,Asp-H+Compound C组大鼠的CMDI评分显著升高,结肠长度显著缩短($P<0.05$)。结果见表3。

表3 各组大鼠CMDI评分及结肠长度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	CMDI评分($n=12$)/分	结肠长度($n=6$)/cm
Control组	0	12.03 ± 1.15
UC组	4.25 ± 0.25 ^a	6.55 ± 0.74 ^a
Asp-L组	2.92 ± 0.19 ^b	8.86 ± 0.92 ^b
Asp-H组	1.75 ± 0.13 ^{bc}	11.42 ± 1.09 ^{bc}
Asp-H+Compound C组	3.08 ± 0.20 ^d	7.51 ± 0.83 ^d

a:与Control组比较, $P<0.05$;b:与UC组比较, $P<0.05$;c:与Asp-L组比较, $P<0.05$;d:与Asp-H组比较, $P<0.05$ 。

3.4 Asp对UC大鼠结肠组织病理改变的影响

Control组大鼠结肠组织结构完整,黏膜光滑,无水肿、炎症细胞浸润现象;与Control组比较,UC组大鼠结肠组织结构受损,黏膜层大面积变性坏死,黏膜上皮细胞排列紊乱,炎症细胞大量浸润,水肿明显;与UC组比较,Asp-L、Asp-H组大鼠结肠组织结构均相对完整,黏膜上皮损伤均有所改善,炎症细胞浸润、水肿均明显减轻;与Asp-H组比较,Asp-H+Compound C组大鼠结肠组织结构受损严重,黏膜上皮损伤、炎症细胞浸润、水肿均明显加重。结果见图1。

3.5 Asp对UC大鼠结肠组织中细胞焦亡相关蛋白表达的影响

与Control组比较,UC组大鼠结肠组织中caspase-1、GSDMD蛋白的表达均显著上调($P<0.05$);与UC组比较,Asp-L、Asp-H组大鼠结肠组织中caspase-1、GSDMD蛋白的表达均显著下调($P<0.05$),且Asp-H组

上述指标的改善更明显($P<0.05$);与Asp-H组比较,Asp-H+Compound C组大鼠结肠组织中caspase-1、GSDMD蛋白的表达均显著上调($P<0.05$)。结果见图2、表4。

3.6 Asp对UC大鼠结肠组织中AMPK/TXNIP/NLRP3信号通路相关蛋白表达的影响

与Control组比较,UC组大鼠结肠组织中AMPK蛋白的磷酸化水平显著降低,TXNIP、NLRP3、ASC蛋白的表达水平均显著升高($P<0.05$);与UC组比较,Asp-L、Asp-H组大鼠结肠组织中AMPK蛋白的磷酸化水平均显著升高,TXNIP、NLRP3、ASC蛋白的表达水平均显著降低($P<0.05$),且Asp-H组上述指标的改善更明显($P<0.05$);与Asp-H组比较,Asp-H+Compound C组大鼠结肠组织中AMPK蛋白的磷酸化水平显著降低,TXNIP、NLRP3、ASC蛋白的表达水平均显著升高($P<0.05$)。结果见图3、表5。

4 讨论

UC属于慢性炎症性肠病,其发病机制主要为肠道受到刺激,肠黏膜免疫失衡导致肠屏障功能障碍、通透性增加,使得免疫细胞、炎症因子等大量释放,从而加剧炎症反应、加重病理损伤^[12]。由于UC易复发且治疗周期长,使得患者肠道长期受到炎症刺激,导致相关癌症发病率及病死率升高,故临床治疗难度大^[3]。目前,UC的临床治疗以药物治疗为主,虽可使患者病情得到一定缓解,但效果有限,因此寻找新的特效药非常重要。Asp提取自茜草科、杜仲科等药用植物,具有明显的消炎、抗氧化、抗癌等活性^[4]。研究显示,Asp可通过抑制结肠炎相关肿瘤细胞的上皮-间质转化,减少肿瘤细胞数量,改善结肠炎症状,从而预防结肠炎相关恶性肿瘤的发生发

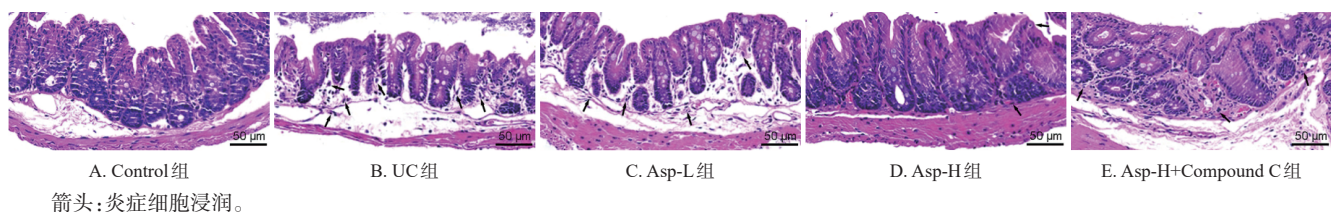


图1 各组大鼠结肠组织病理改变的显微图(HE染色法)

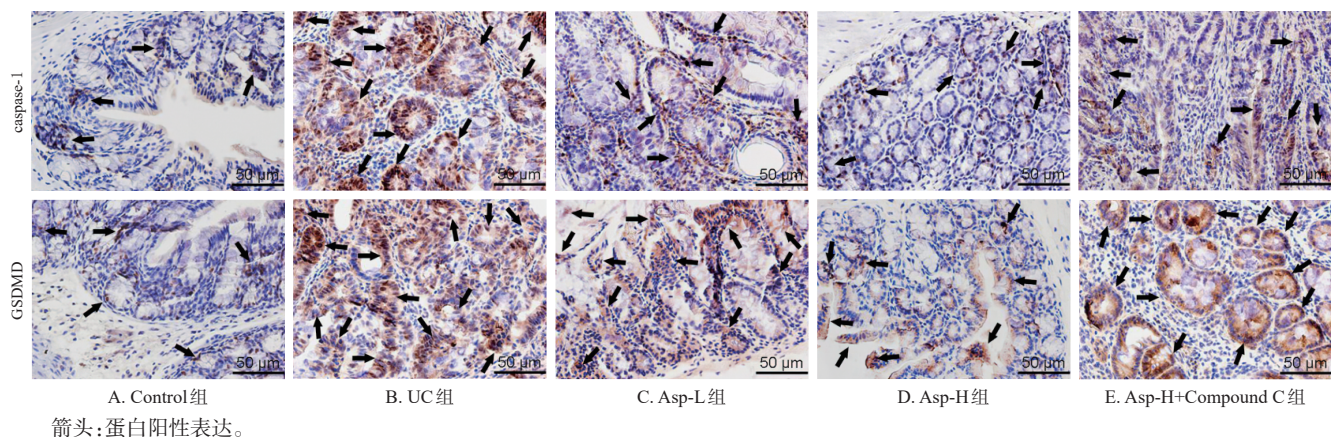
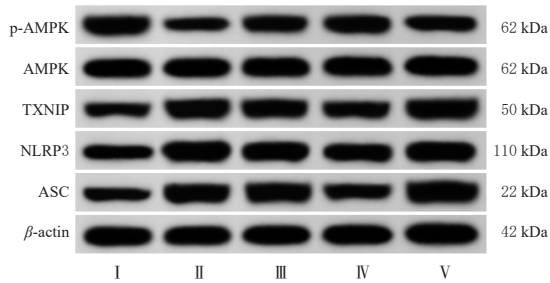


图2 各组大鼠结肠组织中caspase-1、GSDMD蛋白表达的显微图(免疫组化法)

表4 各组大鼠结肠组织中 caspase-1、GSDMD 蛋白表达情况比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	caspase-1	GSDMD
Control组	0.25 ± 0.03	0.32 ± 0.03
UC组	0.81 ± 0.08 ^a	0.88 ± 0.09 ^a
Asp-L组	0.60 ± 0.06 ^b	0.67 ± 0.07 ^b
Asp-H组	0.38 ± 0.04 ^{bc}	0.45 ± 0.05 ^{bc}
Asp-H+Compound C组	0.66 ± 0.07 ^d	0.73 ± 0.07 ^d

a: 与Control组比较, $P < 0.05$; b: 与UC组比较, $P < 0.05$; c: 与Asp-L组比较, $P < 0.05$; d: 与Asp-H组比较, $P < 0.05$ 。



I: Control组; II: UC组; III: Asp-L组; IV: Asp-H组; V: Asp-H+Compound C组。

图3 各组大鼠结肠组织中 AMPK/TXNIP/NLRP3 信号通路相关蛋白表达的电泳图

表5 各组大鼠结肠组织中 AMPK/TXNIP/NLRP3 信号通路相关蛋白表达情况比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	p-AMPK/AMPK	TXNIP/ β -actin	NLRP3/ β -actin	ASC/ β -actin
Control组	0.94 ± 0.05	0.36 ± 0.04	0.44 ± 0.04	0.31 ± 0.03
UC组	0.36 ± 0.04 ^a	1.19 ± 0.12 ^a	1.26 ± 0.13 ^a	1.02 ± 0.10 ^a
Asp-L组	0.57 ± 0.06 ^b	0.85 ± 0.09 ^{bc}	0.94 ± 0.09 ^{bc}	0.73 ± 0.07 ^{bc}
Asp-H组	0.82 ± 0.08 ^{bc}	0.52 ± 0.05 ^{bc}	0.60 ± 0.06 ^{bc}	0.42 ± 0.04 ^{bc}
Asp-H+Compound C组	0.49 ± 0.05 ^d	0.93 ± 0.09 ^d	1.07 ± 0.11 ^d	0.84 ± 0.08 ^d

a: 与Control组比较, $P < 0.05$; b: 与UC组比较, $P < 0.05$; c: 与Asp-L组比较, $P < 0.05$; d: 与Asp-H组比较, $P < 0.05$ 。

展^[13];同时,Asp可改善脂质沉积和炎症反应,减轻高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病小鼠的肝损伤和炎症损伤^[14]。本研究结果显示,Asp可显著降低UC大鼠的DAI、CMDI评分,减少结肠组织炎症细胞浸润,减轻水肿,说明其对UC大鼠的结肠黏膜损伤具有一定的改善作用。

炎症反应是UC发生发展的主要病理基础。炎症因子IL-18、IL-1 β 、IL-6等在UC的发生发展过程中呈高表达,可促进肠道炎症,加剧DSS致UC小鼠结肠组织的病理改变^[15]。研究显示,通过抑制NLRP3/caspase-1信号通路可抑制IL-18、IL-1 β 、IL-6的分泌,抑制UC大鼠肠道黏膜细胞的焦亡,从而改善UC大鼠的肠道黏膜损伤^[16]。本研究结果显示,Asp可显著降低UC大鼠血清中IL-18、IL-1 β 、IL-6水平,提示其可减轻UC大鼠的炎症反应。

细胞焦亡是一种由炎症小体介导的细胞程序性死亡方式,适度的细胞焦亡对于维持机体稳态及保护机体免受微生物侵袭至关重要,而过度焦亡则可造成组织损伤,引发炎症、氧化应激反应,在UC的发生发展中具有重要作用^[1,17]。焦亡发生时,caspase-1被激活,使炎症因

子大量释放;同时,激活的caspase-1可特异性切割GSDMD,并使切割后的GSDMD在细胞膜上寡聚以形成孔隙,从而破坏细胞膜的完整性,最终诱导细胞焦亡^[18]。研究显示,抑制caspase-1、GSDMD蛋白的表达,降低IL-1 β 的水平,可以抑制细胞焦亡,缓解UC大鼠的炎症反应^[19];抑制NLRP3、caspase-1、GSDMD蛋白的表达,可以减少IL-1 β 、IL-18的分泌,从而抑制细胞焦亡并改善UC大鼠的肠黏膜炎症性损伤^[20]。本研究结果显示,Asp可显著减少UC大鼠IL-1 β 等炎症因子的分泌,下调caspase-1、GSDMD蛋白的表达,提示其对UC大鼠细胞焦亡具有一定的抑制作用。

AMPK/TXNIP/NLRP3信号通路在炎症、细胞焦亡等进程中具有重要作用。真核细胞的能量感受器AMPK可参与调控包括焦亡、自噬、凋亡、蛋白合成等多种细胞过程,当机体受到刺激时,AMPK表达受到抑制,活性氧大量释放,促进氧化应激相关因子TXNIP蛋白的表达,激活NLRP3炎症小体,NLRP3与接头蛋白ASC、caspase-1前体结合,活化caspase-1,促进炎症因子IL-1 β 、IL-18等的成熟及释放,加剧炎症反应,最终诱发细胞焦亡^[21]。研究显示,抑制结肠组织中NLRP3炎症小体的活化可有效减轻炎症反应及细胞焦亡,改善UC大鼠结肠组织的病理损伤^[22]。本研究结果显示,Asp可上调UC大鼠结肠组织中AMPK蛋白的磷酸化水平,下调TXNIP、NLRP3、ASC蛋白的表达,抑制肠上皮细胞焦亡,推测该成分可能通过激活AMPK进而抑制TXNIP/NLRP3信号通路来阻止UC大鼠的肠上皮细胞焦亡。为验证上述假设,本研究以高剂量Asp和AMPK抑制剂Compound C联合干预UC大鼠,结果显示,Compound C可显著逆转Asp对UC大鼠肠上皮细胞焦亡的改善作用,说明Asp可通过调控AMPK/TXNIP/NLRP3信号通路来抑制UC大鼠的肠上皮细胞焦亡。

综上所述,Asp可改善UC大鼠结肠组织炎症性损伤,抑制其肠上皮细胞焦亡,上述作用可能与激活AMPK进而抑制TXNIP/NLRP3信号通路有关。

参考文献

- [1] SEGAL J P, LEBLANC J F, HART A L. Ulcerative colitis: an update[J]. Clin Med, 2021, 21(2): 135-139.
- [2] BUIE M J, QUAN J, WINDSOR J W, et al. Global hospitalization trends for Crohn's disease and ulcerative colitis in the 21st century: a systematic review with temporal analyses[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2023, 21(9): 2211-2221.
- [3] BEAUGERIE L, KIRCHGESNER J. Balancing benefit vs. risk of immunosuppressive therapy for individual patients with inflammatory bowel diseases[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2019, 17(3): 370-379.
- [4] CHAN Y H, NG S W, XIN TAN J Z, et al. Emerging therapeutic potential of the iridoid molecule, asperuloside:

- a snapshot of its underlying molecular mechanisms[J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 315:108911.
- [5] 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.
- [6] ZHANG Q, WANG S F, JI S Y. Trifolirhizin regulates the balance of Th17/Treg cells and inflammation in the ulcerative colitis mice through inhibiting the TXNIP-mediated activation of NLRP3 inflammasome[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2022, 49(8):787-796.
- [7] 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.
- [8] ZHU L, XU L Z, ZHAO S, et al. Protective effect of baicalin on the regulation of Treg/Th17 balance, gut microbiota and short-chain fatty acids in rats with ulcerative colitis[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(12):5449-5460.
- [9] 李浩田, 李梦丽, 张臣, 等. 基于 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬途径研究黄芪多糖对急性放射性肠炎大鼠肠黏膜的保护作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(2):311-317.
LI H T, LI M L, ZHANG C, et al. *Astragalus* polysaccharide protects against intestinal mucosal injury in rats with acute radiation enteritis through AMPK/mTOR-mediated autophagy pathway[J]. *Chin J Pathophysiol*, 2022, 38(2):311-317.
- [10] HUANG Y C, ZHENG Y H, YANG F M, et al. *Lycium barbarum* glycopeptide prevents the development and progression of acute colitis by regulating the composition and diversity of the gut microbiota in mice[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12:921075.
- [11] 陈泰宇, 唐学贵, 蒋小东, 等. 基于 Nrf2/ARE 信号通路探讨硫氢化钠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.
- [12] DU L, HA C. Epidemiology and pathogenesis of ulcerative colitis[J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2020, 49(4):643-654.
- [13] LU Y Y, GUAN T, XU S X, et al. Asperuloside inhibited epithelial-mesenchymal transition in colitis-associated cancer via activation of vitamin D receptor[J]. *Phytomedicine*, 2022, 101:154070.
- [14] 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.
- [15] ZHANG Y F, ZHANG Y Q, ZHAO Y, et al. Protection against ulcerative colitis and colorectal cancer by evo-diamine via anti-inflammatory effects[J]. *Mol Med Rep*, 2022, 25(5):188.
- [16] 田琳, 王鑫, 黄晓峰, 等. 清化肠饮对溃疡性结肠炎大鼠 NLRP3/caspase-1 细胞焦亡通路的影响[J]. *实用中医内科杂志*, 2023, 37(11):86-89.
TIAN L, WANG X, HUANG X F, et al. Effect of Qinghuachang yin on NLRP3/caspase-1 cell scorching pathway in ulcerative colitis rats[J]. *J Pract Tradit Chin Intern Med*, 2023, 37(11):86-89.
- [17] 唐立, 陆岩, 欧阳满照. 细胞焦亡与溃疡性结肠炎研究的最新进展[J]. *广东医学*, 2021, 42(11):1393-1399.
TANG L, LU Y, OUYANG M Z. The latest progress in the study of cell death and ulcerative colitis[J]. *Guangdong Med J*, 2021, 42(11):1393-1399.
- [18] 周伯乐, 徐卫东. NLRP3 炎症小体在自身免疫疾病中的作用及机制[J]. *国际免疫学杂志*, 2024, 47(3):300-305.
ZHOU B L, XU W D. The role and mechanism of NLRP3 inflammasome in autoimmune diseases[J]. *Int J Immunol*, 2024, 47(3):300-305.
- [19] YUAN B, ZHOU X M, YOU Z Q, et al. Inhibition of AIM2 inflammasome activation alleviates GSDMD-induced pyroptosis in early brain injury after subarachnoid haemorrhage[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(1):76.
- [20] 李克亚, 王真权, 王军文. 乌梅丸通过调控 NLRP3 炎症小体改善溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜炎症反应及细胞焦亡[J]. *中国免疫学杂志*, 2024, 40(1):97-102, 109.
LI K Y, WANG Z Q, WANG J W. Wu-mei-wan improves colonic mucosal inflammation and pyroptosis in rats with ulcerative colitis via regulating NLRP3 inflammasome[J]. *Chin J Immunol*, 2024, 40(1):97-102, 109.
- [21] CHEN Q L, YIN H R, HE Q Y, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome as new therapeutic avenue for inflammatory bowel disease[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2021, 138:111442.
- [22] YOUSSEF M E, ABD EL-FATTAH E E, ABDELHAMID A M, et al. Interference with the AMPK α /mTOR/NLRP3 signaling and the IL-23/IL-17 axis effectively protects against the dextran sulfate sodium intoxication in rats: a new paradigm in empagliflozin and metformin reprofiling for the management of ulcerative colitis[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:719984.

(收稿日期:2024-05-29 修回日期:2024-10-11)

(编辑:张元媛)