

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.17.003

冬凌草甲素对小鼠溃疡性结肠炎内质网应激的作用研究*

曾庆钟¹, 刘颖¹, 邹一贺², 刘敏锋¹, 易梦娟¹, 王丽京², 顾取良^{2△}

(广东药科大学:1. 药学院;2. 基础学院血管生物学研究所, 广州 510006)

[摘要] **目的** 探讨冬凌草甲素对溃疡性结肠炎(UC)小鼠的结肠上皮组织内质网应激(ERS)的影响。**方法** 利用葡聚糖硫酸钠(DSS)建立小鼠 UC 模型组,设置冬凌草甲素及柳氮磺胺吡啶干预组;测定疾病活动指数(DAI),对结肠组织进行病理形态学评分(HPS),RT-qPCR 检测结肠上皮组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、环氧合酶-2(COX-2)、葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)、转录因子 EBP 同源蛋白(CHOP)、激活转录因子 6(ATF6)、蛋白激酶 R 样内质网激酶(PERK)及肌醇酶 1 α (IRE1 α)mRNA 表达变化。**结果** 与健康小鼠相比,模型组结肠上皮组织中 TNF- α 、IL-6、COX-2、GRP78、ATF6、CHOP、PERK 及 IRE1 α mRNA 表达均明显上调($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,冬凌草甲素干预组 DAI 与 HPS 均明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),疗效与柳氮磺胺吡啶干预组相当($P > 0.05$, $P < 0.01$),除 IER1 α mRNA 外, TNF- α 、IL-6、COX-2、GRP78、CHOP、ATF6 及 PERK mRNA 表达水平均明显下调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 冬凌草甲素能减轻 DSS 诱导小鼠结肠炎症,其机制可能与其调节结肠上皮组织 ERS 有关。

[关键词] 溃疡性结肠炎;冬凌草甲素;内质网应激**[中图法分类号]** R966**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)17-2261-05

Effects of oridonin on endoplasmic reticulum stress in ulcerative colitis mouse model*

ZENG Qingzhong¹, LIU Ying¹, KUAI Yihe², LIU Minfeng¹, YI Mengjuan¹,WANG Lijing², GU Quliang^{2△}

(1. School of Pharmacy; 2. Vascular Biology Research Institute, School of Basic Sciences, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of oridonin on the endoplasmic reticulum stress (ERS) in colonic epithelium of ulcerative colitis (UC) mice. **Methods** The UC mice model was established by sodium dextran sulfate (DSS), and the intervention group of oridonin and sulfasalazine was set up, the disease activity index (DAI) was measured, the colonic tissue was evaluated by histopathologidscore (HPS), and RT-qPCR was used to detect the expression of inflammatory cytokines tumor factor- α (TNF- α), interleukin 6 (IL-6), cyclooxygenase 2 (COX-2), glucose-regulated protein 78 (GRP78), transcription factor EBP homologous protein (CHOP), activator transcription factor 6 (ATF6), protein kinase R like endoplasmic reticulum kinase (PERK) and inositol requiring enzyme 1 α (IRE1 α). **Results** The expression of TNF- α , IL-6, COX-2, GRP78, ATF6, CHOP, PERK and IRE1 α mRNA in the colonic epithelium of the model group were all up-regulated obviously as compared with the healthy control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). When compared with the model group, DAI and HPS in oridonin-treated group were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), which the curative effect was similar to that of the sulfasalazine group ($P > 0.05$, $P < 0.01$). The expression of TNF- α , IL-6, COX-2, GRP78, CHOP, ATF6 and PERK mRNA levels were significantly reduced in oridonin-treated group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Oridonin can alleviate colonic inflammation induced by DSS and its mechanism may be related to ERS of colonic epithelial tissue.

[Key words] colitis, ulcerative; oridinin; endoplasmic reticulum stress

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种病因和发病机制未明的炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD),以腹痛、腹泻、里急后重和黏液脓血便等为主要症状,伴随周期性结肠黏膜溃疡、黏膜坏死和再生等病理学改变^[1]。近年来,内质网应激(en-

doplasmic reticulum stress, ERS)在 IBD 发病过程中的重要作用受到很多研究关注^[2-3]。冬凌草甲素是从我国传统药材冬凌草中提取出来的一种贝壳杉烯二萜类物质,具有多种药理学活性,如抗炎、抗菌、抗氧化及抗肿瘤作用等^[4]。研究发现冬凌草甲素片对醋酸

表 1 PCR 引物序列

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	基因大小(bp)
GAPDH	GGT GAA GGT CGG TGT GAA CG	CTC GCT CCT GGA AGA TGG TG	233
TNF- α	CAG GCG GTG CCT ATG TCT C	CGA TCA CCC CGA AGT TCA GTA G	89
IL-6	TAG TCC TTC CTA CCC CAA TTT CC	TTG GTC CTT AGC CAC TCC TTC	76
COX-2	TTC AAC ACA CTC TAT CAC TGG C	AGA AGC GTT TGC GGT ACT CAT	271
GRP78	CAT GGT TCT CAC TAA AAT GAA GG	GCT GGT ACA GTA ACA ACT G	81
ATF6	TGC TCT GGA ACA GGG CTC TAA	CGT CAA AGA AGC CTT GGT AAC T	134
CHOP	CTG GAA GCC TGG TAT GAG GAT	CAG GGT CAA GAG TAG TGA AGG T	121
IRE1	GCA TCA CCA AGT GGA AGT ATC	ACC ATT GAG GGA GAG GCA TAG	115
PERK	AGT CCC TGC TCG AAT CTT CCT	TCC CAA GGC AGA ACA GAT ATA CC	125

诱导的小鼠 UC 具有防治作用,但缺少相应分子机制方面的研究^[5]。本研究从 ERS 的角度探讨冬凌草甲素对小鼠 UC 的防治效果及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 8 周龄 C57BL/6 雄性小鼠 40 只, SPF 级,体质量 18~22 g,广东省医学实验动物中心,许可证号:SCXK(粤)2013-0002。

1.1.2 试剂与仪器 葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium salt,DSS)购自美国 MP Biomedicals 公司,冬凌草甲素购自中国生物药品生物制品检定所,柳氮磺胺吡啶购自美国 Sigma 公司,TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司,反转录试剂盒购自日本 Takara 公司,RT-qPCR 引物由上海生工合成。实时荧光定量 PCR 仪为 Roche 公司 LightCycler[®] 96 型号。

1.2 方法

1.2.1 UC 模型制备及药物干预 将 40 只小鼠分为 4 组,即健康组(NOR)、模型组(DSS+生理盐水)、冬凌草甲素干预组(DSS+冬凌草甲素)、柳氮磺胺吡啶干预组(DSS+柳氮磺胺吡啶),每组 10 只。参照文献^[6]的方法建立急性 UC 模型,即配制 2% DSS 水溶液供除健康组以外的实验小鼠自由饮用,连续饮用 7 d,每 2 天更换 1 次新鲜 DSS 水溶液;健康组小鼠饮用正常无菌水。实验期间每天灌胃给药,冬凌草甲素剂量为 15 mg·kg⁻¹·d⁻¹,柳氮磺胺吡啶剂量为 500 mg·kg⁻¹·d⁻¹,模型组与健康组给予生理盐水 20 mL·kg⁻¹·d⁻¹。

1.2.2 疾病活动指数(disease activity index,DAI)评分 实验期间每天监测小鼠的体质量变化,观察大便性状,有无血便,有无隐血,按文献^[7]进行 DAI 评分。

1.2.3 结肠病理观察及组织病理形态学评分(histopathological score,HPS) 实验第 7 天给药 2 h 后麻醉条件下脱臼法处死小鼠,取小鼠结肠,测量其长度。末端结肠组织经 4%多聚甲醛固定、脱水、石蜡包埋等常规程序后,组织切片进行苏木素-伊红(HE)染色。显微镜下观察结肠组织病理形态并按文献^[6]进行病理评分。

1.2.4 RT-qPCR 法检测结肠组织肠道上皮组织中相关因子的表达 分离各组小鼠的结肠上皮组织,用

TRIzol 试剂分别提取各组小鼠结肠上皮组织的总 RNA 并用紫外分光光度法测定纯度与浓度。按照 RT-qPCR 试剂盒说明书操作,检测肿瘤坏死因子- α (tumor factor- α ,TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)、环氧合酶-2(cyclooxygenase 2,COX-2)、葡萄糖调节蛋白 78(proteins glucose-regulated protein 78 kD,GRP78)、转录因子 EBP 同源蛋白(C/EBP homology protein,CHOP)、激活转录因子 6(activating transcription factor 6,ATF6)、蛋白激酶 R 样内质网激酶(PKR-like endoplasmic reticulum kinase,PERK)及肌醇酶 1 α (inositol requiring enzyme 1 α ,IRE1 α)mRNA 的表达。各指标 RT-qPCR 引物序列见表 1。以 GAPDH 为内参,实验独立重复 3 次,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法分析数据。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5 软件统计分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DAI 评分及结直肠长度 与健康组比较,建模第 7 天时 DSS 诱导的模型组小鼠的体质量明显下降,出现腹泻、隐血或便血等典型 UC 症状,DAI 评分明显高于健康组($P<0.01$)。与未经干预的模型组相比,冬凌草甲素干预组与柳氮磺胺吡啶干预组的 UC 症状均有所减轻,DAI 评分明显降低($P<0.01$),两个药物干预组之间 DAI 评分差异无统计学意义($P>0.05$)。取结直肠测量其长度,模型组结直肠较健康组明显缩短($P<0.01$),冬凌草甲素干预组与柳氮磺胺吡啶干预组能明显减少结直肠缩短程度($P<0.05$, $P<0.01$),不过柳氮磺胺吡啶的效果更显著,见图 1。

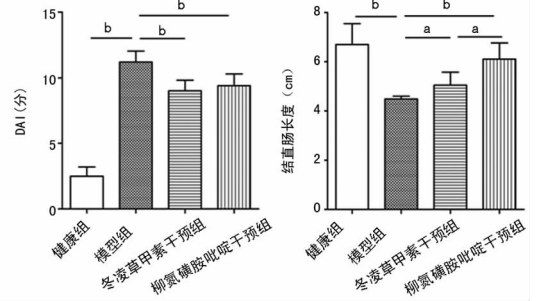
2.2 结肠 HPS 建模第 7 天取结直肠进行病理组织形态学观察,健康组的结肠组织与腺体结构完整(图 2A);模型组结肠黏膜则出现大量腺体溶解及大量的炎症细胞浸润,并伴有明显的溃疡(图 2B);冬凌草甲素干预组与柳氮磺胺吡啶干预组结肠黏膜组织结构较为完整,有少量溃疡,部分腺体溶解(图 2C 和 2D)。与健康组相比,模型组 HPS 明显升高($P<0.01$);与模型组相比,冬凌草甲素干预组与柳氮磺胺吡啶干预组的 HPS 明显降低($P<0.01$),且两个药物干预组之

间 HPS 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 2E。

2.3 结肠上皮组织 TNF- α 、IL-6 与 COX-2 mRNA 的表达变化 与健康组相比, 模型组结肠上皮组织中 TNF- α 、IL-6 及 COX-2 mRNA 表达水平均明显上调 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 冬凌草甲素干预组 TNF- α 、IL-6 及 COX-2 mRNA 表达水平均明显下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 尽管柳氮磺胺吡啶对 COX-2 mRNA 表达水平的影响更明显 ($P < 0.05$), 但两个药物干预组之间 TNF- α 和 IL-6 mRNA 表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 3。

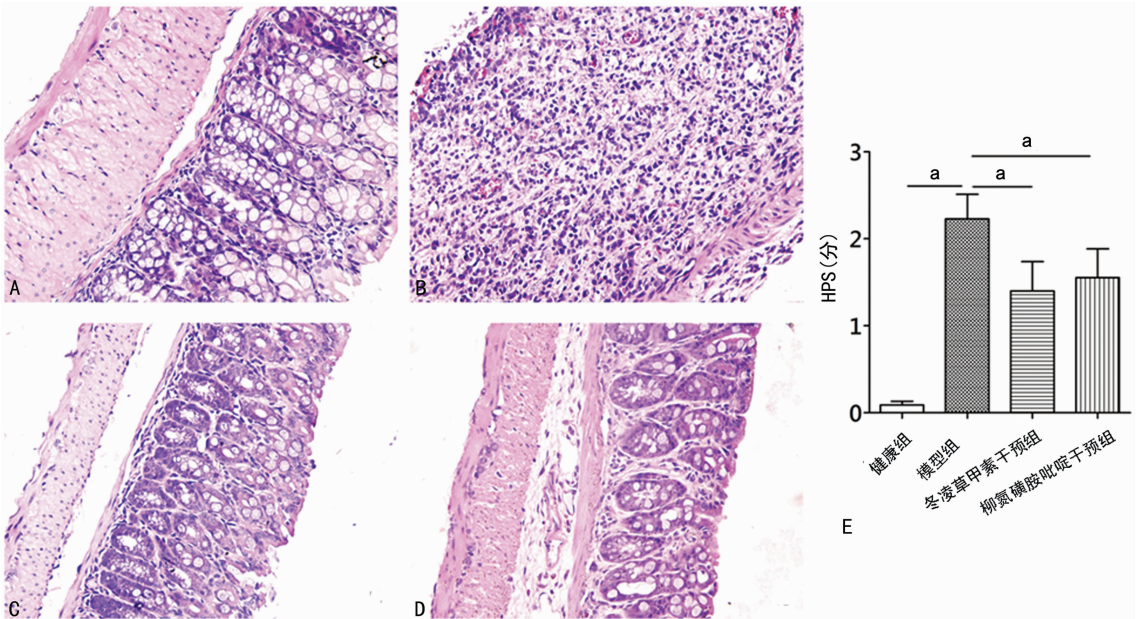
2.4 结肠上皮组织 GRP78、CHOP、IRE1 α 、ATF6 与 PERK mRNA 的表达变化 与健康组相比, 模型组结肠上皮组织中 GRP78、IRE1 α 、PERK、ATF6 及 CHOP mRNA 表达均明显上调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组相比, 冬凌草甲素干预组 GRP78、ATF6、CHOP 及 PERK mRNA 表达水平均明显下调

($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但 IRE1 α mRNA 表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而较柳氮磺胺吡啶干预组 IRE1 α mRNA 表达水平有明显上调 ($P < 0.01$), 见图 4。



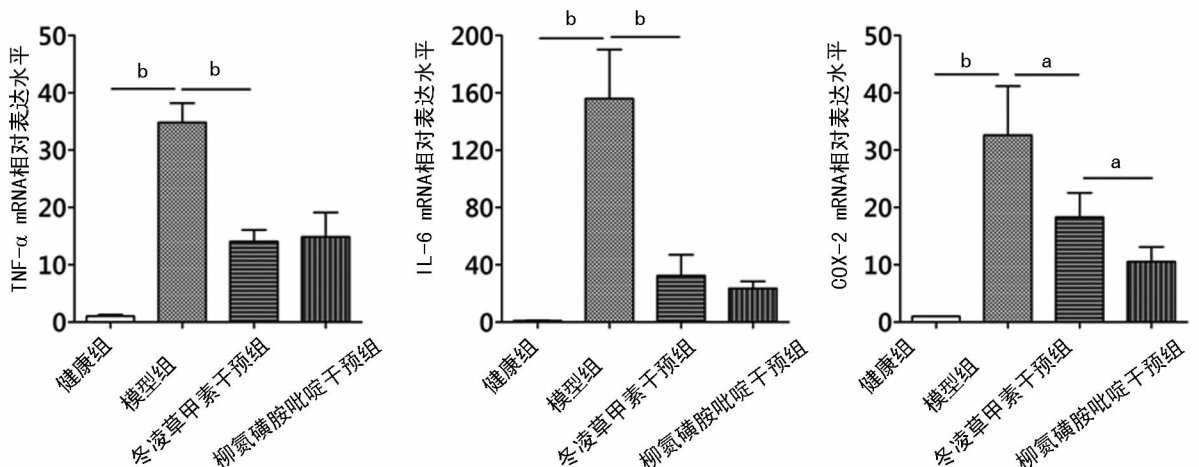
^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$

图 1 各组小鼠的 DAI 评分与结直肠长度



A: 健康组; B: 模型组; C: 冬凌草甲素干预组; D: 柳氮磺胺吡啶干预组; E: HPS; ^a: $P < 0.01$

图 2 结肠组织病理变化与 HPS (HE $\times 40$)



^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$

图 3 结肠上皮组织炎症相关因子 mRNA 表达变化

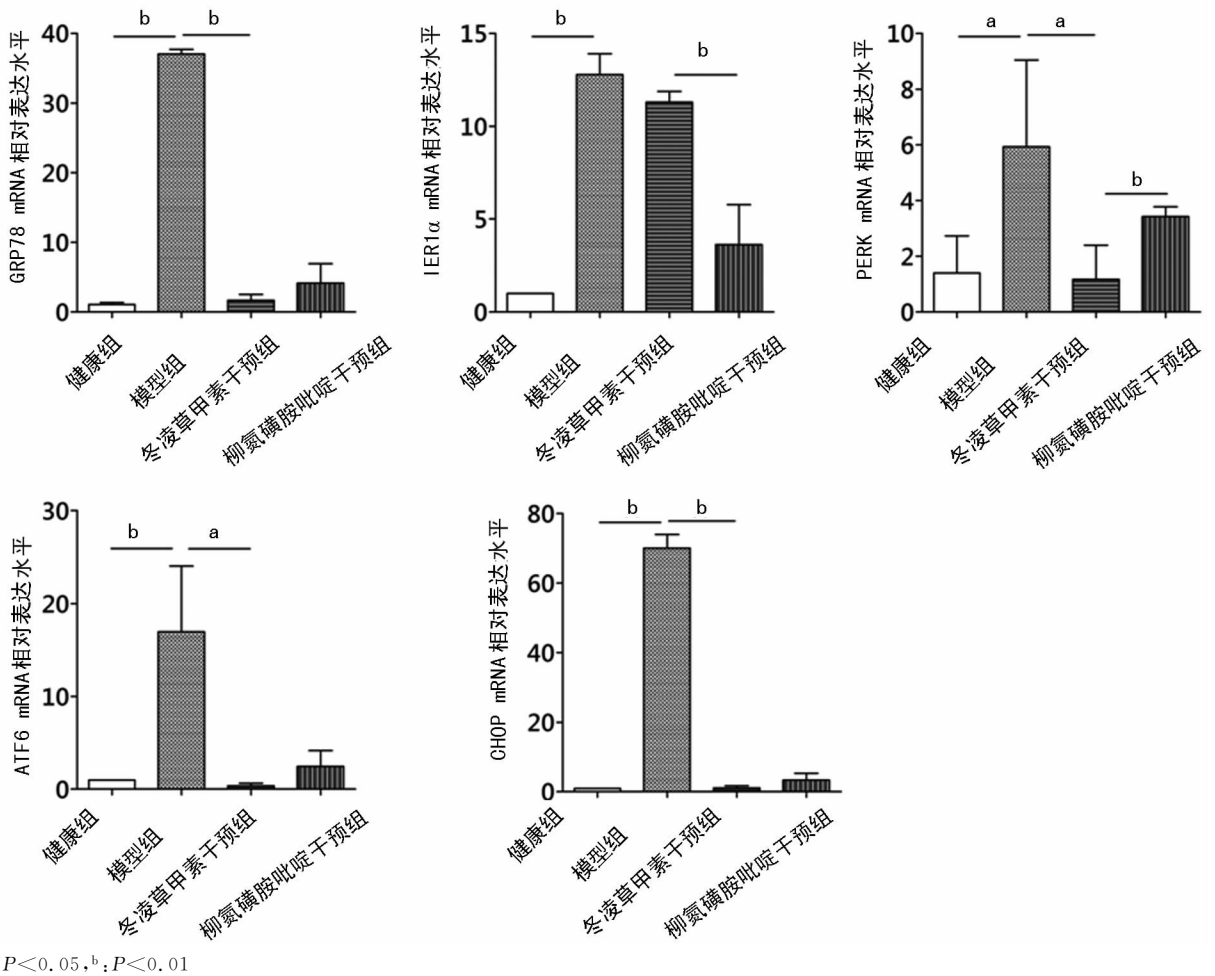


图 4 结肠上皮组织 ERS 相关因子 mRNA 表达变化

3 讨论

内质网是真核细胞中新生多肽折叠与组装、蛋白质修饰与加工的重要场所,具有很强的适应性。研究表明,患有 IBD 的人类与动物的肠道上皮细胞中存在 ERS,ERS 激活的未折叠蛋白反应(UPR)对于维持肠道上皮细胞的正常形态与功能均很重要,但过度 ERS 会导致细胞启动凋亡程序^[2-3,8]。冬凌草甲素具有抗炎、抗菌、抗肿瘤、抗氧化及免疫调节等作用^[4],近年亦有研究发现冬凌草甲素对肝癌 HepG2 细胞中 ERS 具有调节作用^[9]。

本研究发现,冬凌草甲素干预 DSS 诱导的 UC 小鼠可使其结肠炎 DAI 评分和病理指标等明显缓解,其疗效与临床上应用于 UC 的柳氮磺胺吡啶相当,且结肠上皮组织中炎症相关因子 TNF- α 、IL-6 和 COX-2 mRNA 表达亦明显降低,提示冬凌草甲素可能通过其抗炎与免疫调节作用对 UC 结肠具有保护作用。

GRP78 能通过内质网中错误折叠或未折叠蛋白结合的方式来恢复异常蛋白质的正确构象,作为内质网主要分子伴侣对细胞起保护作用^[10]。在应激发生时 GRP78 表达显著增高,其表达水平在一定程度上反映细胞 ERS 的水平,可作为 ERS 的标志蛋白^[11]。本研究发现,模型组小鼠结肠上皮组织中 GRP78 mRNA 表达水平较健康组有明显上调,表明

DSS 诱导 UC 小鼠的结肠上皮组织中伴随 ERS 发生,与文献报道一致。在使用冬凌草甲素或柳氮磺胺吡啶干预时 GRP78 mRNA 表达水平明显下降,并与健康组相当,一定程度上说明结肠上皮组织中 ERS 恢复到正常水平,提示冬凌草甲素能抑制 UC 小鼠 ERS 的作用。

IER1 α 、PERK 和 ATF6 是哺乳动物的 3 种内质网跨膜蛋白,正常生理条件下与 GRP78 稳定结合,ERS 发生时则与 GRP78 解离,引发 UPR,发挥 ERS 状态下的保护细胞功能,但这 3 种蛋白质也会介导细胞凋亡^[2-3]。本研究中,模型组小鼠结肠上皮组织细胞中 IER1 α 、PERK 及 ATF6 mRNA 的表达水平较健康组明显上升,表明 DSS 诱导 UC 小鼠结肠上皮组织发生 UPR;冬凌草甲素可以抑制其中 PERK 和 ATF6 mRNA 的表达升高,但对 IER1 α mRNA 却没有明显影响,而柳氮磺胺吡啶对这 3 种 ERS 相关蛋白 mRNA 表达均有明显下调作用。这一结果提示,尽管本研究中冬凌草甲素与柳氮磺胺吡啶防治 UC 疗效相当,但从 ERS 角度来说二者的作用机制存在一定差异,而且目前关于柳氮磺胺吡啶在 ERS 方面的作用少有报道。冬凌草甲素干预未能降低 IER1 α mRNA 高表达,提示可能存在其他机制抑制了高水平 IER1 α 介导的细胞凋亡通路。有研究报道,IER1 α 缺失会出

现 CHOP 表达增加,因此 IRE1 α 高表达亦可能抑制 CHOP 表达,二者之间的平衡保护细胞适度 ERS^[12]。

ERS 虽然可以维持内质网稳态,但过强或过久 ERS 则会启动细胞凋亡程序,CHOP 则是其中的一条凋亡通道^[13],CHOP 基因敲除小鼠在由三硝基苯磺酸诱导发生结肠炎过程中细胞凋亡减弱^[14]。本研究中,DSS 诱导的 UC 模型组小鼠结肠上皮组织中 CHOP mRNA 的表达水平较健康组明显上调,与文献^[15]报道一致;使用冬凌草甲素干预则显著降低增高的 CHOP mRNA,表明冬凌草甲素将 UC 小鼠结肠上皮组织中 ERS 限制在适当程度内从而利于其发挥保护细胞作用。

综上所述,冬凌草甲素可以抑制小鼠结肠上皮组织中炎症相关因子表达,调控 ERS,维持内质网稳定,这可能是冬凌草甲素防治 UC 的作用机制之一。目前国内对冬凌草甲素在 ERS 方面作用的报道较少,因此仍需在动物水平和细胞水平上对其详细作用机制进行进一步的研究。

参考文献

- [1] 安阿玥. 肛肠病学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2005:341.
- [2] CHONG W C, SHASTRI M D, ERI R. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress;a vicious nexus implicated in bowel disease pathophysiology[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(4):771-789.
- [3] HOSOMI S, KASER A, BLUMBERG R S. Role of endoplasmic reticulum stress and autophagy as interlinking pathways in the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2015, 31(1):81-88.
- [4] 郭萍, 李玉山, 郭远强. 冬凌草化学成分和药理活性研究进展[J]. *药物评价研究*, 2010, 33(2):144-147.
- [5] 臧凯宏, 杜丽东, 刘晓梅, 等. 冬凌草甲素片对醋酸诱导的小鼠溃疡性结肠炎的治疗作用(英文)[J]. *中国现代应用药学*, 2012, 29(9):781-785.
- [6] 邹一贺, 王丽京, 邓慧君, 等. 靶向抑制巨噬细胞 Act1 表达对溃疡性结肠炎的作用[J]. *中国实验动物学报*, 2016,

24(6):585-590.

- [7] MURANO M, MAEMURA K, HIRATA I, et al. Therapeutic effect of intracolonicly administered nuclear factor kappa B(p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate Sodium(DSS)-induced colitis[J]. *Clin Exp Immunol*, 2000, 120(1):51-58.
- [8] TRÉTON X, PÉDRUZZI E, CAZALS-HATEM D, et al. Altered endoplasmic reticulum stress affects translation in inactive colon tissue from patients with ulcerative colitis[J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(3):1024-1035.
- [9] 王辉, 叶燕, 禹志领. 冬凌草甲素对 HepG2 细胞内质网应激蛋白 IRE-1、PERK 和 CHOP 的作用研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2012, 23(3):263-266.
- [10] QIAN Y, TIFFANY-CASTIGLIONI E. Lead-induced endoplasmic reticulum(ER) stress responses in the nervous system[J]. *Neurochem Res*, 2003, 28(1):153-162.
- [11] RUTKOWSKI D T, KAUFMAN R J. That which does not kill me makes me stronger:adapting to ER stress[J]. *Trends Biochem Sci*, 2007, 32(10):469-476.
- [12] ZHANG H S, CHEN Y, FAN L, et al. The endoplasmic reticulum stress sensor IRE1(in intestinal epithelial cells) is essential for protecting against colitis[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(24):15327-15336.
- [13] KASER A, ADOLPH T E, BLUMBERG R S. The unfold protein response and gastrointestinal disease[J]. *Semin Immunopathol*, 2013, 35(3):307-319.
- [14] NAMBA T, TANAKA K I, ITO Y, et al. Positive role of CCAAT/Enhancer-Binding protein homologous protein, a transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response in the development of colitis[J]. *American Journal of Pathology*, 2009, 174(5):1786-1798.
- [15] CHOI Y, KOH S J, LEE H S, et al. Roxithromycin inhibits nuclear factor kappaB signaling and endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells and ameliorates experimental colitis in mice[J]. *Exp Biol Med*, 2015, 240(12):1664-1671.

(收稿日期:2017-12-20 修回日期:2018-02-23)

(上接第 2260 页)

- [10] CAI Z G, ZHANG S M, ZHANG Y, et al. MicroRNAs are dynamically regulated and play an important role in LPS-induced lung injury[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2012, 90(1):37-43.
- [11] AMBROS V. microRNAs; tiny regulators with great potential[J]. *Cell*, 2001, 107(7):823-826.
- [12] ALTMAN N. Replication, variation and normalisation in microarray experiments[J]. *Appl Bioinformatics*, 2005, 4(1):33-44.
- [13] XIE T, LIANG J, GUO R, et al. Comprehensive microRNA analysis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis id-

entifies multiple sites of molecularregulation[J]. *Physiol Genomics*, 2011, 43(9):479-487.

- [14] LIU G, FRIGGERI A, YANG Y, et al. miR-21 mediates fibrogenic activation ofpulmonary fibroblasts and lung fibrosis[J]. *J Exp Med*, 2010, 207(8):1589-1597.
- [15] POTTIER N, MAURIN T, CHEVALIER B, et al. Identification of keratinocyte growth factor as a target of microRNA-155 in lung fibroblasts; implication in epithelial-mesenchymal interactions [J]. *PLoS One*, 2009, 4(8):e6718.

(收稿日期:2017-12-18 修回日期:2018-02-21)