·研究论文·

欧当归内酯A通过抑制GRP21受体改善溃疡性结肠炎

刘 娜[1,2#], 刘洁芸[1#], 朱元元[1], 马维娜[4], 陈莉娜[1*], 冼 呈[3*]

(1. 西安交通大学基础医学院, 陕西 西安 710061; 2. 西安市人民医院 (西安市第四医院) 药学部, 陕西 西安 710004; 3. 贺州市人民医院脊柱骨病关节外科, 广西 贺州 542800; 4. 西安交通大学药学院, 陕西 西安 710061)

摘要: 溃疡性结肠炎是一种以结肠黏膜层慢性复发性炎症为特征的肠道疾病, 始于直肠并向近端结肠延伸的连续性、弥漫性的黏膜损伤为其主要的病理特点。G蛋白偶联受体21 (G-protein-coupled receptor 21, GPR21) 是一种孤儿G蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs), 属于A类GPCRs, 已有研究报道GPR21与糖尿病和炎症密切相关。欧当归内酯A (levistilide A, LA) 是一种主要存在于中药材川穹和当归中的天然萜内酯活性成分, 具有抗炎、抗纤维化、抗肿瘤等多重药理活性。本研究通过慢病毒转染构建了GPR21-HEK293重组细胞, 并采用细胞膜色谱法筛选到LA是一种潜在的GPR21抑制剂; 在体外采用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 处理RAW264.7细胞构建炎症的细胞模型, 并证实了LA对炎症的治疗作用与GPR21的相关性; 在体内采用葡萄糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 处理C57BL/6小鼠以诱导溃疡性结肠炎小鼠模型, 证实了LA对溃疡性结肠炎的治疗作用。综上所述, 本研究表明LA作为一种GPR21抑制剂通过减轻肠道炎症改善DSS诱导的溃疡性结肠炎。本研究所涉及的动物实验均获得西安交通大学动物伦理委员会批准 (批准号: XJTUAE2024-1523), 并严格按照要求执行。

关键词: 欧当归内酯A; 溃疡性结肠炎; G蛋白偶联受体21; 炎症; 细胞膜色谱法

中图分类号: R967 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)06-2163-09

Levistilide A ameliorates ulcerative colitis through inhibiting GRP21 receptor

LIU Na[1,2#], LIU Jie-yun[1#], ZHU Yuan-yuan[1], MA Wei-na[4], CHEN Li-na[1*], XIAN Cheng[3*]

(*1. School of Basic Medical Sciences, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 2. Department of Pharmacy, Xi'an People's Hospital (Xi'an Fourth Hospital), Xi'an 710004, China; 3. Department of Orthopedic Surgery and Spinal Bone Disease, Hezhou People's Hospital, Hezhou 542800, China; 4. School of Pharmacy, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China*)

Abstract: Ulcerative colitis (UC) is an intestinal disease characterized by chronic and recurrent inflammation of the colonic mucosal layer, whose main pathological feature is continuous and diffuse mucosal damage which begins in the rectum and extends towards the proximal colon. G-protein-coupled receptor 21 (GPR21) is an orphan G protein-coupled receptor (GPCR), belonging to class A GPCRs. Previous studies have reported that GPR21 is closely related to diabetes and inflammation. Levistilide A (LA), a natural terpene lactone active component mainly exists in the traditional Chinese medicinal herbs *Ligusticum chuanxiong* and *Angelica sinensis*, exhibiting multiple pharmacological activities including anti-inflammation, anti-fibrosis, and anti-tumor. In this study, GPR21-HEK293 recombinant cells were constructed by lentivirus transfection. LA was screened out as a potential GPR21

收稿日期: 2025-09-04; 修回日期: 2026-01-12.

基金项目: 广西中医药管理局自筹课题 (GXZYJ20230711); 陕西省自然科学基金重点项目 (2023-JC-ZD-47); 陕西省中医药管理局科研项目 (SZY-KJ-CYC-2023-008).

#共同第一作者.

*通讯作者 E-mail: chenlin@xjtu.edu.cn; ended_129@yeah.net

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-1057

inhibitor by cell membrane chromatography. RAW264.7 cells were treated with lipopolysaccharide *in vitro* to establish an inflammatory cell model, which confirmed the correlation between the therapeutic effect of LA on inflammation and GPR21. Dextran sodium (DSS) was used to administrate C57BL/6 mice *in vivo* to induce a mouse model of UC, at the meanwhile, the mice in LA group were intragastrical administration with LA to investigate its therapeutic effect on UC. In conclusion, we demonstrated that LA as a GPR21 inhibitor improves DSS-induced UC through reducing intestinal inflammation. This work was approved by the Institutional Animals Care and Use Committee of Xi'an Jiaotong University (approval number: XJTUAE2024-1523) and strictly carried out in accordance with their requirements.

Key words: levistilide A; ulcerative colitis; G-protein-coupled receptor 21; inflammation; cell membrane chromatography

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种慢性和反复性发作的胃肠道炎症性疾病, 临床表现为腹痛、腹泻、肠道出血和体重减轻, 影响着全球500万人的生活质量[1]。UC的病因和发病机制目前仍不清楚, 没有确切的治疗方法, 患者的生存率较低, 且有进展为结肠癌的风险[2]。G蛋白偶联受体21 (G-protein-coupled receptor 21, GPR21) 是一种既有本底活性, 又有调节糖代谢和改善炎症生理功能的孤儿G蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs), 是开发上述治疗药物的极具潜力的靶点[3]。细胞膜色谱法 (cell membrane chromatography, CMC) 是一种在体外模拟配体与受体结合的仿生亲和色谱法, 是受体−配体作用力分析的可靠手段[4]。本研究旨在构建一种细胞膜色谱新方法, 以从中药活性成分中筛选出潜在的GPR21抑制剂并探究其对UC的治疗作用。

材料和方法

实验材料 HEK293细胞购自苏州海星生物科技有限公司, RAW264.7细胞购自武汉尚恩生物公司。SPF级C57BL/6小鼠购自西安交通大学动物实验中心 [实验动物许可证号: SYXK (陕) 2023-0001]。DMEM培养基购自康宁生物科技有限公司, RAW264.7专用培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国赛默飞世尔科技有限公司, 青−链霉素混合溶液、PBS、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 试剂盒、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒和一氧化氮 (nitric oxide, NO) 试剂盒购自北京索莱宝生物科技公司, GPR21慢病毒试剂购自上海吉满生物, GPR21 siRNA购自北京多纳医药科技有限公司, NO试剂盒购自苏州优逸兰迪生物科技有限公司, 欧当归内酯A (levistilide A, LA) 购自成都普菲德生物技术有限公司, 葡萄糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 购自北京泽平生物科技有限责任公司, 嘌呤霉素无菌溶液购买自大连美仑生物。

主要仪器 CelMate型二氧化碳培养箱 (新加坡艺思高科技有限公司), 内窥镜系统 (上海亭芬生物科技有限公司), 光学显微镜 (德国徕卡公司), M152-CF多功能倒置生物显微镜 (广州明美光电技术有限公司), CFX96荧光定量PCR仪 (美国Bio-Rad公司), 荧光倒置显微镜 (日本Nikon公司), RPL-10ZD型湿法装柱机 (大连日普利科技仪器有限公司), LC-2030C 3D高效液相色谱仪、LC-20AD高效液相色谱仪 (日本岛津公司)。

GPR21过表达HEK293细胞的构建 GPR21慢病毒试剂转入HEK293细胞, 而后在DMEM培养基中添加1 μg·mL^{-1}嘌呤霉素筛选14天, 挑取嘌呤霉素抗性单克隆细胞传代培养, 4周后将DMEM完全培养基中的嘌呤霉素浓度调整为0.5 μg·mL^{-1}继续培养, 得到稳定的GPR21阳性转染的克隆细胞株。同时设置不含GPR21目的基因的空病毒载体转染的HEK293细胞为阴性对照 (negative control, NC) 组。

RNA的提取及qPCR测定目的基因的表达 将细胞以每孔5×10^{5}个的密度种植于6孔板, 按需给予细胞处理, 待细胞贴壁生长且融合度达80%时, 用PBS清洗细胞两次后, 用RNA提取试剂盒 (上海碧云天生物技术股份有限公司) 提取RNA, 并用NanoDrop (美国赛默飞世尔科技有限公司) 进行定量, 用qPCR试剂盒 (艾科瑞生物科技有限公司) 测定mRNA含量。研究中用到的引物的序列如表1所示, 按照$2^{-\Delta\Delta Ct}$公式计算结果。

Western blots 用预冷的RIPA裂解液提取细胞/组织的总蛋白, 用BCA试剂盒 (北京索莱宝生物科技公司) 进行蛋白定量, 而后进行煮样、上样、电泳、转膜、封闭、抗体孵育、显影等操作, 并用Image J软件对免疫印迹的灰度进行定量。

细胞膜色谱柱的制备 将GPR21-HEK293 (约7×10^{6}个) 用生理盐水清洗后离心 (5 min, 1 000 ×*g*, 4 ℃),

Table 1　The sequence of primers. *Gpr21*: G-protein-coupled receptor 21; *Il-6*: Interleukin-6; *Il-1β*: Interleukin-1*β*; *Tnf-α*: Tumor necrosis factor-alpha; *Gapdh:* Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

Gene	Forward	Reverse
Gpr21	TTTTCCACTGGGGCAAACCT	TTGGCAGATGCGGAAGATGT
Il-6	ACAAGTCGGAGGCTTAATTACACAT	TTGCCATTGCACAACTCTTTTC
Il-1β	TCGCTCAGGGTCACAAGAAA	TCGCTCAGGGTCACAAGAAA
Tnf-α	AGGCTGCCCCGACTACGT	GACTTTCTCCTGGTATGAGATAGCAAA
Gapdh	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG
β-actin	CCTCACTGTCCACCTTCC	GGGTGTAAAACGCAGCTC

重复3次, 加入5 mL Tris-HCl (50 mmol·L^{-1}, pH 7.4, 4 ℃), 超声60 min, 匀浆3 min以破裂细胞, 然后离心10 min (2 000 ×*g*, 4 ℃), 收集上清液, 离心20 min (12 000 ×*g*, 4 ℃) 得到沉淀即为细胞膜。用5 mL生理盐水洗涤细胞膜并离心 (20 min, 12 000 ×*g*, 4 ℃) 后, 再次将细胞膜重悬于5 mL生理盐水后于真空条件下加入50 mg活化的精制硅胶中以制备细胞膜色谱的固定相, 将固定相置于4 ℃在磁搅拌器旋涡30 min, 以使细胞膜吸附于硅胶上, 并进一步在4 ℃过夜以完善吸附过程。采用湿法装柱, 将固定相装入一个不锈钢中空小柱 (10 mm × 4.6 mm I.D) 中制得细胞膜色谱柱。

前沿分析法　前沿分析法是计算保留组分与靶标受体平衡解离常数 (K_D值) 的经典色谱学方法[5]。简而言之, 就是将能够与目标受体结合的分析物加入到流动相中, 按照一定的程序, 以由低到高的浓度不断地流过富含特定受体的色谱柱。随着配体与受体的结合, 色谱柱上的受体逐渐饱和, 导致色谱流路中药物配体的流出数量逐渐增加, 形成特征突破曲线。突破曲线最初是一条相对平坦的曲线, 表明配体与固定化受体开始特异性结合; 而后出现拐点, 垂直升高反映了受体在固定相上的特异性结合位点逐渐饱和; 最后, 以平台阶段结束, 表明反应已经达到平衡。突破曲线的拐点与流动相配体的药物浓度、柱上固定化受体的数量以及配体与受体的结合常数有关。K_D值可由公式 (1) 计算:

$$\frac{1}{m_{Lapp}} = \frac{K_D}{m_L} \cdot \frac{1}{[A]} + \frac{1}{m_L} \quad (1)$$

式中: m_{Lapp}代表给定物质的量浓度的配体条件下, 达到突破曲线中点所需配体的摩尔数 (mol); [*A*] 代表流动相中配体的浓度 (mol·L^{-1}); m_L代表细胞膜色谱柱上结合受体的总摩尔数 (mol); K_D值代表平衡解离常数 (mol·L^{-1})。

非线性色谱法　非线性色谱法是探究配体−受体作用力的另一经典方法[6]。具体操作步骤如下, 将系列浓度的药物配体按照由低到高的浓度依次流经该GPR21-HEK293/CMC柱, 得出相应的色谱流出曲线, 并用Peak Fit 4.12软件对色谱流出曲线进行拟合, 得到有关参数, 并据此计算获得药物配体与GPR21的解离速率常数k_d。

分子对接实验　从PDB数据库获得GPR21蛋白晶体结构 (PDB ID: 8MHV), 使用ChemDraw软件绘制化合物的分子二维结构并以mol 2格式导出, 利用计算机辅助药物设计技术平台在SYBYL-X 2.0分子模拟环境中, 经过加氢、去水等处理后将配体分子保存为最优结构, 并用Pymol软件进行可视化处理。

NO释放实验　将RAW264.7细胞以每孔5×10^{3}个的密度接种于96孔板, 置于37 ℃、5% CO_2的饱和湿度培养箱中贴壁培养24 h, 而后用药物干预相应时间并参照试剂盒说明书操作在550 nm处测定其吸光度。

siRNA敲低　将RAW264.7细胞以每孔1×10^{5}个的密度接种于6孔板, 待细胞贴壁完全后换用不含青−链霉素混合液的培养基, 而后加入50 μmol·L^{-1} *Gpr21* siRNAs或空载体引物 (*NC* siRNA) 转染12 h后换用正常培养基, 培养48 h后进行后续实验。*Gpr21* siRNA的序列如下所示: 上游引物: GCUGAUUAUUGUCUUUCUAdTdT, 下游引物: UAGAAAGACAAUAAUCAGCdTdT。

cAMP释放水平的测定　将GPR21-HEK293细胞以每孔5×10^{4}个的密度接种于24孔板中, 培养48 h后, 用EBSS缓冲液溶液洗涤3次, 给药孵育40 min, 收集孵育液, 用cAMP ELISA试剂盒 (泉州睿信生物科技有限公司) 测定其中的cAMP浓度。

UC模型小鼠的构建　将雄性C57BL/6小鼠适应性喂养一周 (n = 60), 随机选取10只作为对照组 (control), 另50只进行UC造模[7]。对照组自由饮用纯水, 模型组 (model) 自由饮用2.5% DSS溶液, 所有小鼠自由摄食, 持续7天, 每天记录小鼠体重、粪便等情况。第7天, 若小鼠出现体重下降15%以上并出现便血则视为造模成功。将40只成功造模的个体, 随机分为4组, 分别为模型组、LA 12.5 mg·kg^{-1}组、LA 25 mg·kg^{-1}组和LA 50 mg·kg^{-1}组。LA组小鼠每天灌胃相应剂量的药物, 对照组和模型组灌胃等体积的羧甲基纤维素钠 (CMC-Na), 持续7天。在给药干预阶段, 除对照组, 其余小鼠仍持续自由饮用1% DSS溶液。每天定时监

测小鼠体重、粪便情况。第8天, 通过内窥镜观察小鼠结肠组织的病变情况。随后脱颈椎处死小鼠, 收集结肠组织用于后续检测分析。本研究获得西安交通大学动物伦理委员会批准 (批准号: XJTUAE2024-1523), 并严格参照西安交通大学动物伦理委员的指导方针和建议执行。

UC疾病活动指数评分 疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 是反映动物结肠炎症程度的重要指标[8]。详细指标如表2所示, 其中DAI得分 = (体重变化百分率+粪便性状+便血程度)/3。

Table 2 The scoring criteria for disease activity index (DAI). m: Rate of body weight change

Score	Rate of body weight (m, %)	Fecal property	Degree of hematochezia
0	m ⩾ 0	Normal	Normal
1	0 > m ⩾ −3	Existing adhesion	Normal
2	−3 > m ⩾ −5	Soft and unshaped	Occult hematochezia
3	−3 > m ⩾ −7	Diarrhea	Occult hematochezia
4	−7 > m ⩾ −10	Diarrhea	Manifest hematochezia

小鼠肠道内窥镜检查 使用气麻机麻醉小鼠, 将其仰卧位固定, 润滑内窥镜并缓慢插入肛门, 沿直肠推进至结肠, 注入少量空气扩张肠腔, 通过摄像头观察黏膜病变并记录图像, 最后轻柔退出内窥镜, 将小鼠置于温暖环境中恢复。

小鼠肠道MPO和MDA含量测定 将小鼠结肠组织取出后, 用预冷的PBS冲洗干净, 取约1 cm肠段放入匀浆管中, 加入适量裂解液, 置于预冷的匀浆仪中, 按照仪器选项进行匀浆处理, 完成后12 000 ×*g*离心10 min取上清液, 并测定其中MPO和MDA含量。

统计学方法 数据均以mean ± SEM形式表示, 数据采用SPSS 19.0版本进行统计学分析, 用单因素方差分析法进行显著性检验, $P < 0.05$认为差异具有统计学意义。

结果

1 GPR21-HEK293过表达细胞系的成功构建

用不同感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 的含GPR21全长基因的慢病毒系统转染HEK293细胞以构建GPR21过表达的HEK293细胞系, 并同时设置添加转染增强液polybrene (P) 组。如图1A所示, 最终选择MOI = 10添加P液作为正式转染的条件。正式转染后, 用qPCR和Western blots测定目的基因的表达, 相比于NC-HEK293细胞, GPR21-HEK293细胞的*Gpr21* mRNA水平显著上调 (图1B); GPR21蛋白的表达量也显著上调 (图1C、D)。上述结果表明, GPR21-HEK293细胞成功构建。

2 GPR21-HEK293/CMC系统的构建及用其筛选GPR21抑制剂

提取GPR21-HEK293的细胞膜并制备成细胞膜色谱固定相, 而后装入细胞膜色谱柱中制备成GPR21-HEK293/CMC柱, 并将其与高效液相色谱系统联用于筛选GPR21靶向性成分, 其中别隐品碱、盐酸山梗碱、

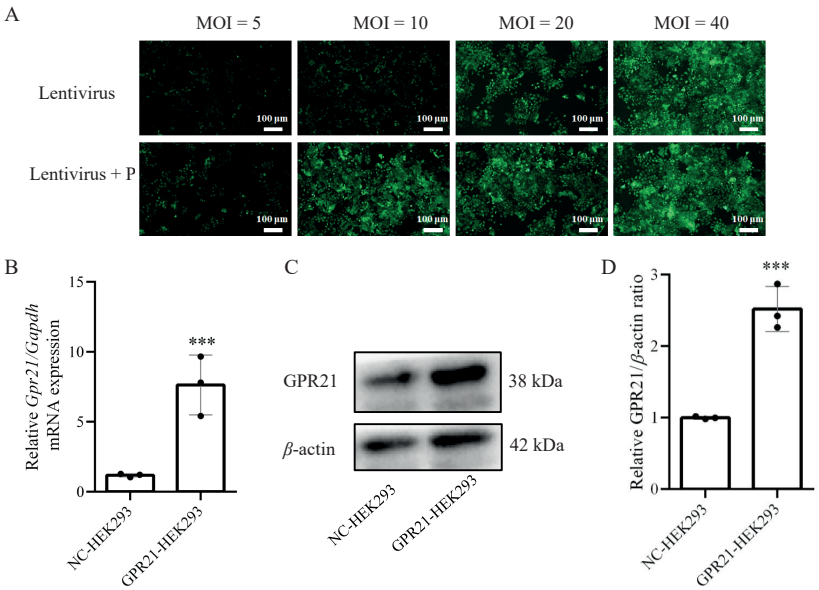


Figure 1 The construction and verification of GPR21-HEK293 cells. A: The fluorescence intensity of HEK293 cells after transfection with lentivirus for 48 h. Scale bar: 100 μm; B: The mRNA level of *Gpr21* gene on NC-HEK293 and GPR21-HEK293 cells; C: The representative Western blots results of GPR21 protein in NC-HEK293 and GPR21-HEK293 cells; D: The quantitative results of GPR21 proteins. MOI: Multiplicity of infection. $n = 3$, mean ± SEM. $^{***}P < 0.001$ *vs* NC-HEK293

LA和桤木酮 (alnustone, Aln) 是4种具有较强保留行为的组分, 其分子结构、在GPR21-HEK293/CMC系统上的保留行为和分子对接的结果如图2A～D所示, 分子对接的详细参数如表3所示。

cAMP是GPR21信号通路中重要的下游信号因子[9], 当抑制GPR21活性时, cAMP释放也随之下调 (图2E)。当用含100 μmol·L^{-1}四种成分的培养基孵育GPR21-HEK293细胞24 h后, 测定培养基中的cAMP水平, 仅LA和Aln能够明显抑制cAMP的水平 (图2F)。当不同浓度的LA (图2G) 和Aln (图2H) 孵育GPR21-HEK293, 两者能够浓度依赖性地抑制cAMP释放。

采用前沿分析法和非线性色谱法探究LA和Aln与GPR21蛋白的亲和力。前沿分析法获得LA与GPR21的结合情况 (图3A), 可见随着药物浓度的增大, 突破曲线的拐点到达时间逐渐提前, $1/m_{Lapp}$与$1/[A]$的线性关系为$y = 0.731\ 2x + 0.043\ 36$ (K_D = 1.68×10^{-8} mol·L^{-1}), 非线性色谱法的结果如图3B所示, 可见LA与GPR21的k_d值为1.68×10^{-5} mol·L^{-1}; Aln与GPR21的前沿分析结果如图3C所示, 其线性方程为$y = 0.873\ 2x + 0.004\ 431$ (K_D = 1.97×10^{-7} mol·L^{-1}), 非线性色谱法的结果如图3D所示, 求得Aln与GPR21的k_d值为1.97×10^{-4} mol·L^{-1}。上述结果表明, LA与GPR21的结合力强于Aln。

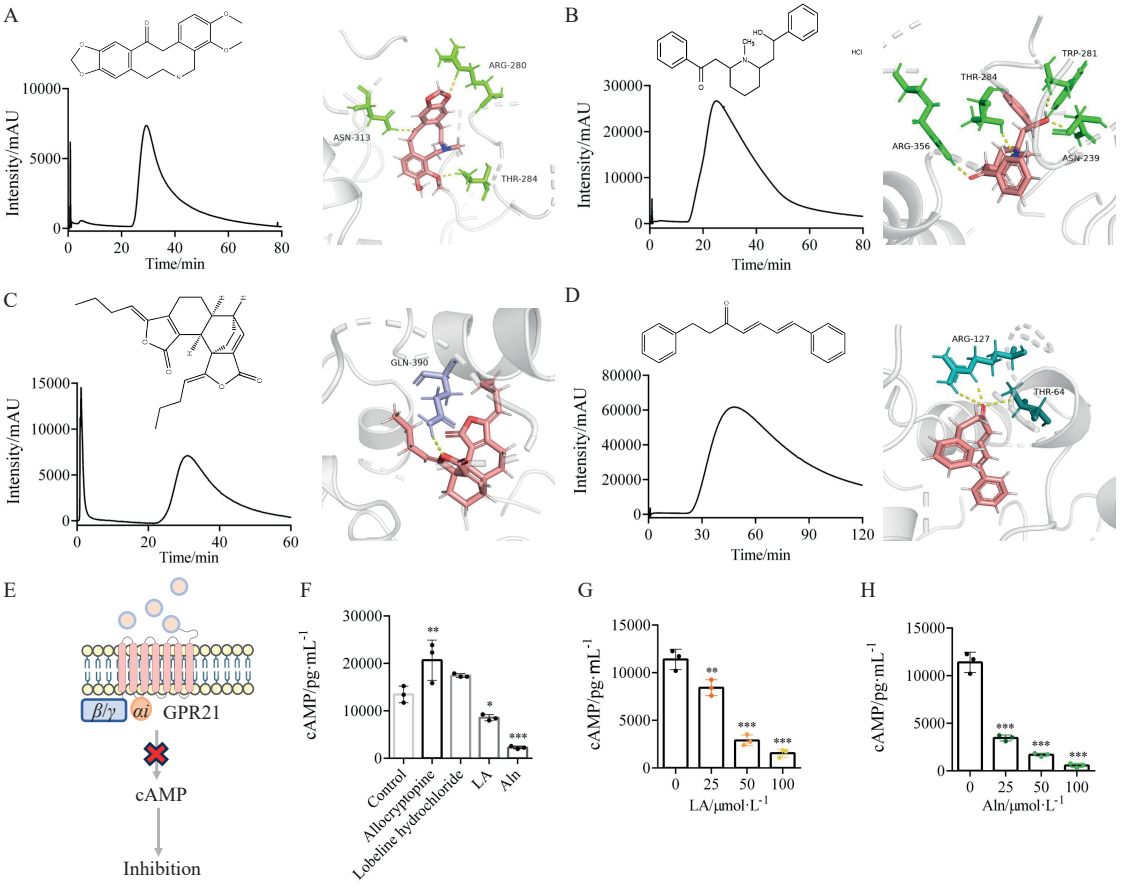


Figure 2　The binding analysis of four compounds with GPR21 and their influence on cAMP accumulation in GPR21-HEK293 cells. A−D: The chemical structural formula, chromatographic retention diagram, and molecular docking results of allocryptopine (A), lobeline hydrochloride (B), LA (C), and Aln (D) on GPR21-HEK293/CMC column; E: Schematic diagram of GPR21 signal pathway; F: The influence of these compounds on cAMP accumulation on GPR21-HEK293 cells; G: The influence of different concentrations of LA on cAMP accumulation; H: The influence of different concentrations of Aln on cAMP accumulation. LA: Levistilde A; Aln: Alnustone. n = 3, mean ± SEM. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* control

Table 3　The detailed docking parameters between 4 compounds with GPR21

Compound	Score	Number of hydrogen bond	Amino acid residue
Allocryptopine	4.265 8	3	ARG280, ASN313, THR284
Lobeline hydrochloride	7.711 2	4	ARG356, ASN239, THR284, TRP281
LA	6.378 2	1	GLN390
Aln	5.784 3	3	ARG127×2, THR64

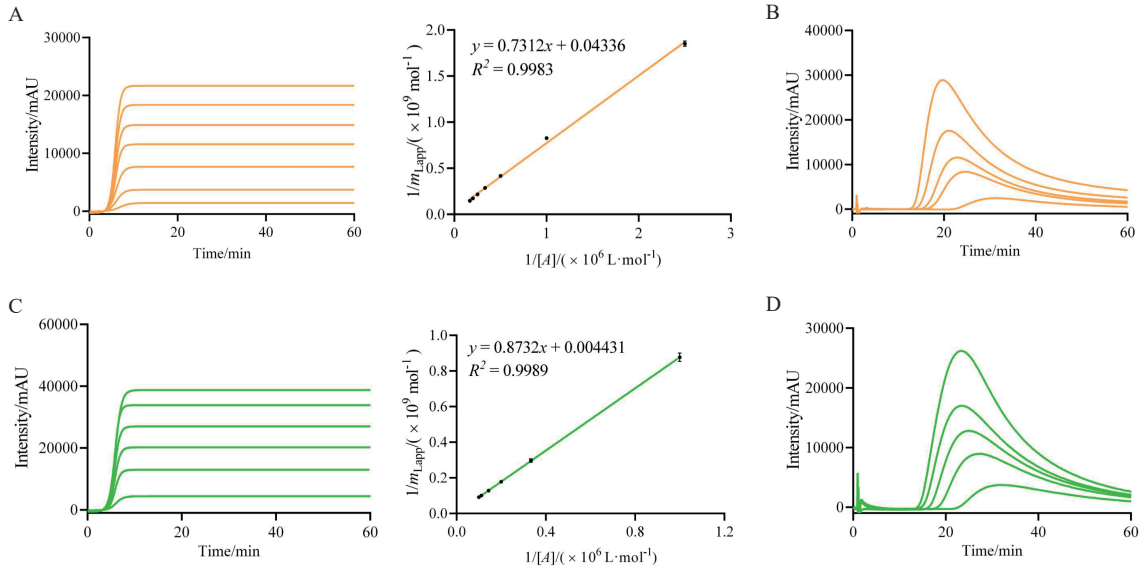


Figure 3 The binding force analysis of LA and Aln with GPR21 protein. A: The breaking curve (left) and linear relationship of $1/m_{Lapp}$ and $1/[A]$(right) of LA on GPR21-HEK293/CMC column by frontier analysis. From low to high, LA contains 4%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% and 60% respectively in mobile phases; B: The diagram of different concentration of LA on GPR21-HEK293/CMC column by nonlinear chromatography method. From low to high, the concentrations of LA were 0.1, 0.3, 0.4, 0.6 and 0.8 mmol·L^{-1}, respectively; C: The breaking curve (left) and linear relationship of $1/m_{Lapp}$ and $1/[A]$(right) of Aln on GPR21-HEK293/CMC column by frontier analysis. From low to high, Aln contains 10%, 30%, 50%, 60% 70% and 90% respectively in mobile phases; D: The diagram of different concentration of Aln on GPR21-HEK293/CMC column by nonlinear chromatography method. From low to high, the concentrations of Aln were 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 mmol·L^{-1}, respectively. n = 3, mean ± SEM

3 RAW264.7炎症细胞模型的构建及LA和Aln的抗炎作用分析

采用LPS处理RAW264.7以构建炎症状态下的细胞模型, 并用NO释放量来衡量炎症的水平[10]。当LPS的浓度大于0.5 μg·mL^{-1}时可明显增加NO的释放, 研究中选择1 μg·mL^{-1} LPS处理24 h来构建炎症模型 (图4A), 联用不同浓度的LA (图4B) 和Aln (图4C) 处理均能改善LPS诱导的NO释放。

为了进一步探究LA和Aln的抗炎作用与GPR21的相关性, 用siRNA敲低*Gpr21*, 并给予LPS和药物处理。如图4D～F所示, 在*NC*-siRNA转染的情况下, LA可以改善LPS介导的*Il-6*、*Il-1β*和*Tnf-α* mRNA表达上调, 而在*Gpr21*-siRNA转染的条件下, LA对LPS介导的上述炎症因子的改善作用消失。而敲低GPR21基因不会削弱Aln对LPS诱导的*Il-6*水平升高的作用 (图4G), 但会抵消其对*Il-1β*和*Tnf-α* mRNA表达水平的改善作用 (图4H、I)。

上述结果表明, 相较于Aln, LA与GPR21的结合力更强 (更小的K_D和k_d值), 且其对LPS诱导的RAW264.7细胞的炎症相关指标 (*Il-6*、*Il-1β*和*Tnf-α*) 的影响均会随GPR21基因的敲低而抵消, 因而后续体内实验仅探究LA对UC小鼠的治疗作用。

4 LA通过缓解炎症状态来改善DSS诱导的溃疡性结肠炎

进一步开展体内实验来探究LA对UC的治疗作用, 实验流程如图5A所示。为探究UC与GPR21的相关性, 测定对照组和UC组小鼠肠道组织中的GPR21的表达水平。UC组小鼠肠道组织中GPR21蛋白表达上调 (图5B)。研究期间各组小鼠的体重变化 (图5C), 与对照组小鼠相比, DSS组小鼠的体重明显下调, LA 50 mg·kg^{-1}处理能够改善DSS导致的小鼠体重下降。消化系统是UC最常累及的部位, 常出现腹泻、脱水、结肠穿孔等症状, 甚至致死[11]。与对照组小鼠相比, DSS组小鼠的存活率下降, 而LA处理可显著增加小鼠的存活率 (图5D)。DAI指数评分结果如图5E所示, 造模期内DSS会增加小鼠的DAI指数, 且全周期内模型组小鼠的DAI指数显著上升, 而LA处理会降低模型组小鼠的DAI指数。各组小鼠的脾脏大体图片如图5F所示, 可见DSS处理组小鼠的脾脏明显增大, 而LA处理可以显著改善上述病理变化; 统计脾脏指数, DSS处理会增加小鼠的脾脏指数, 而LA处理具有改善作用 (图5G)。此外, 与对照组小鼠相比, DSS处理会缩短小鼠的结肠长度, 而LA处理能够恢复小鼠的结肠长度 (图5H)。小鼠肠道组织MDA和MPO的测定结

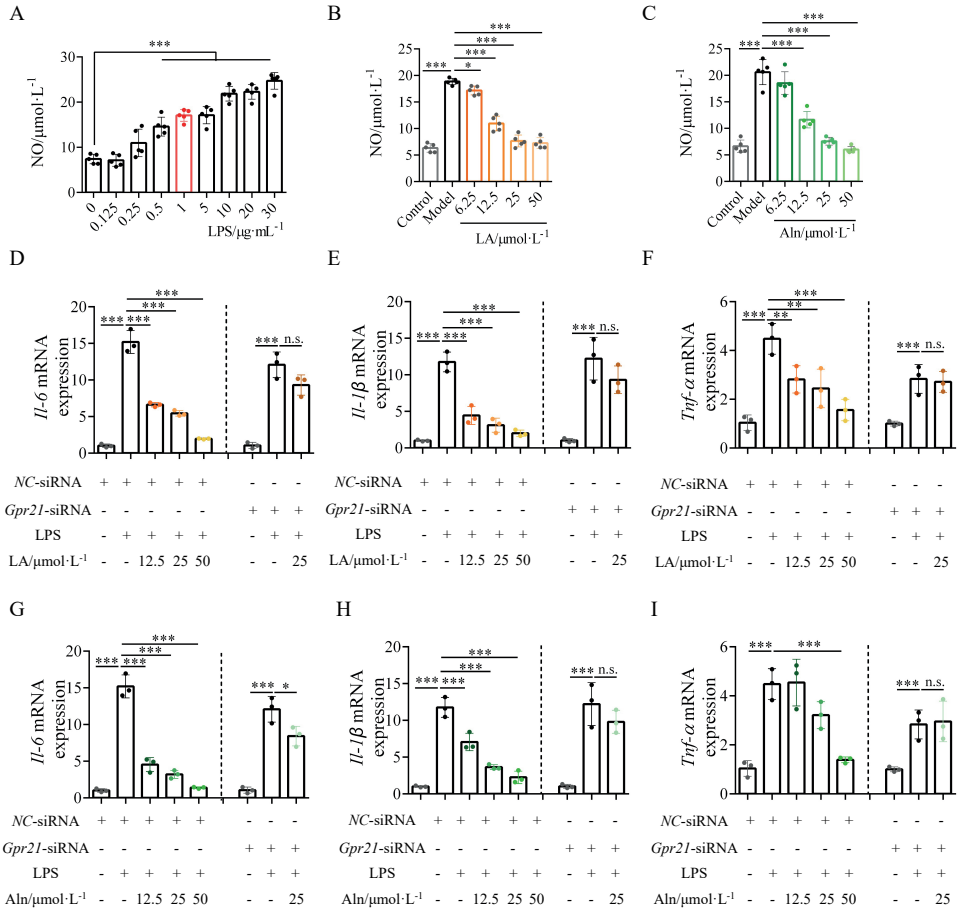


Figure 4　The anti-inflammation effect analysis of LA and Aln on LPS-induced RAW264.7 cells. A: Influence of different concentration of lipopolysaccharide (LPS) administration on NO release; B, C: Influence of LPS (1 μg·mL^{-1}) administration combined with different concentration of LA (B) and Aln (C) on NO release; D−I: The effects of LA and Aln treatment on mRNA level of *Il-6* (D, G), *Il-1β* (E, H) and *Tnf-α* (F, I) on RAW264.7 cell. n = 3, mean ± SEM. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* control. n.s.: No significance

果显示, 与对照组小鼠相比, DSS处理会增加MDA和MPO的水平, 而LA处理能够恢复小鼠的上述水平 (图5I、J)。肠道内窥镜结果显示, 健康小鼠结肠内壁光滑, 血管网丰盈, 无溃疡及出血点; DSS处理组结肠黏膜颜色发红, 内壁粗糙, 有可见溃疡点, 并形成出血网络; LA治疗组结肠黏膜颜色少见泛红, 内壁较为光滑, 溃疡点减少 (图5K)。各组小鼠的结肠组织HE染色的结果显示, 对照组小鼠的结肠组织呈现完整的形态学特征, 固有层可见分布均匀的结缔组织, 散布大量杯状细胞, 隐窝结构正常; DSS组小鼠肠黏膜结构破坏, 肠壁变薄、腺体结构消失、间质严重水肿; LA治疗后, 间质水肿得到改善, 杯状细胞数量明显增加, 隐窝结构得到恢复 (图5L)。上述结果提示, LA可改善UC导致的结肠病理性变化。

讨论

UC作为一种不同程度的累及结肠和回肠的终身性炎症性疾病, 影响全球约500万人的生命健康[12], 发病机制不清楚且缺乏特异性的治疗药物是其治疗过程中面对的重要挑战[13]。抗炎治疗是目前临床上主要的治疗手段, 其中美沙拉嗪和糖皮质激素是常用的治疗药物。此外, 粪便移植也具有一定的治疗作用[14]。已有多项研究表明, GPRs参与UC的疾病进展, 其中GPR43和GPR109A水平下调通过作用于炎性小体介导UC的发生发展[15]。“促进黏膜愈合、维持临床缓解、降低癌变风险”是UC治疗的主要宗旨。GPR21作为一种孤儿受体, 尽管其内源性配体缺乏, 已有多项研究报道其受体抑制具有改善糖代谢失衡[3,16]、抑制炎症状态[17]、改善胰岛素抵抗[18]等效应。然而, GPR21与UC的相关性及其抗炎效应目前仍不清楚。此外, GPR21靶向性的分子能否改善UC的病理目前也不清楚。

本研究通过慢病毒转染构建了GPR21受体过表达的GPR21-HEK293细胞, 提取细胞膜, 并与硅胶一起包被制成细胞膜色谱固定相, 制备CMC柱并组成色谱系统用于发现GPR21靶向性成分, 据此筛选到别隐

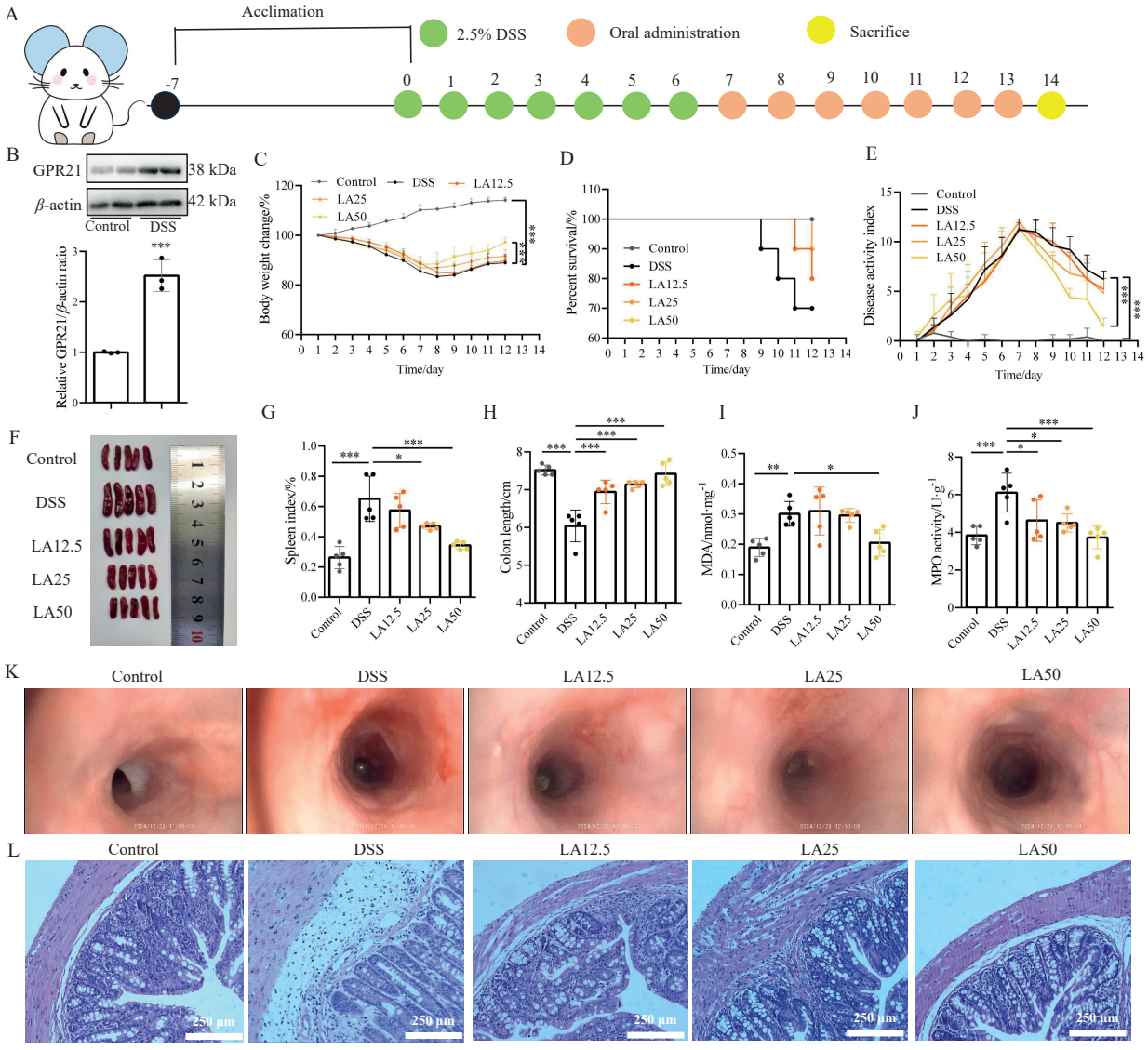


Figure 5 Influence of LA administration on intestinal inflammation of dextran sodium sulfate (DSS)-induced mouse model. A: Illustration of animal experiment; B: Representative immunoblots (upper) and quantification results (below) of GPR21 in colon of mice in control group and DSS-administrated group; C−L: The results of body weight (C), survival rate (D), disease activity index (E), image of spleen (F), spleen index (G), colon length (H), MDA level (I), MPO activity (J), intestinal endoscopy (K) and intestinal HE staining results (L) of mice given with different administration. $n = 5$, mean ± SEM. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* control

品碱、盐酸山梗碱、LA和Aln 4种成分，并通过分子对接模拟其与GPR21的结合情况，开展体外实验探究了4种成分对cAMP释放水平的影响，发现LA和Aln是两种具备抑制GPR21活性的成分，进一步开展前沿分析法和非线性色谱法分析了LA和Aln与GPR21的结合力，发现LA与GPR21的结合力强于Aln。采用LPS处理RAW264.7细胞以构建炎症状态下的细胞模型，发现LA和Aln具有抑制炎症状态下的NO释放和炎症相关因子水平的能力，且敲低*Gpr21*会削弱LA的抗炎效应。上述结果提示LA是极具潜力的GPR21抑制剂，其可能通过抑制GPR21受体发挥抗炎和改善UC的作用。

本研究在分子水平上证实UC模型小鼠肠道GPR21受体蛋白表达上调，提示GPR21表达上调可能介导UC疾病进展。这一发现既从分子层面上佐证“炎症是GPR21受体和UC共有的信号通路[17,19]”这一理论，又说明GPR21受体可能通过介导炎症反应诱导UC的发展。此外，本研究还表明，LA对UC的治疗作用与其改善炎症状态下巨噬细胞的GPR21受体活性相关。

GPCRs对多种复杂疾病的治疗具有重要意义。GPR37孤儿受体参与帕金森病、神经性疼痛、脑肿瘤等多种神经系统疾病的发生发展[20]; GPR139孤儿受体参与调控多种神经、精神行为[21]; GPR74受体在多种神经系统疾病、代谢性疾病和肿瘤的治疗方面呈现出巨大潜力[22]; GPR146对胆固醇替代路径的代谢具有重要

意义。孤儿受体研究有助于发现新的信号通路和靶点, 一旦完成脱孤, 孤儿受体就可能为相关疾病的治疗带来希望。目前发现配体的孤儿受体在生物学功能和药物开发方面的研究进展, 为代谢、免疫、神经和癌症等疾病的治疗带来了新希望。GPR21作为一种与GPR52受体具有72%的同源性的孤儿受体, 表达于机体几乎所有组织中, 在脑和脾脏中尤其高表达, 主要通过与Gs蛋白偶联来激活腺苷酸环化酶以及与Gq和G15/16蛋白偶联来激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)发挥作用[23]。GPR21配体的研究对于阐述炎症及代谢性疾病的治疗机制以及据此开发新药具有重要意义。本研究聚焦于GPR21抑制剂的开发, 将分子生物学技术和色谱学方法结合起来, 用于筛选中药化合物中的作用成分, 并将体内外实验结合起来, 以探究LA对炎症和UC的治疗作用, 既为GPR21受体的研究提供了方向和思路, 且所筛选出的LA又是一种对UC的治疗极具潜力的先导化合物, 为其治疗药物的开发提供了方向。

作者贡献: 刘娜、刘洁芸共同承担实验操作、数据整理、论文撰写的工作; 朱元元负责可行性分析和实验操作; 马维娜对实验提供了关键性的技术支持, 并对论文给予了重要修订; 陈莉娜和冼呈负责研究指导、论文修改和经费支持。

利益冲突: 本研究所有作者承诺不存在利益冲突。

References

[1] Wangchuk P, Yeshi K, Loukas A. Ulcerative colitis: Clinical biomarkers, therapeutic targets, and emerging treatments [J]. Trends Pharmacol Sci, 2024, 45: 892-903.

[2] Roselli M, Finamore A. Use of synbiotics for ulcerative colitis treatment [J]. Curr Clin Pharmacol, 2020, 15: 174-182.

[3] Riddy DM, Kammoun HL, Murphy AJ, et al. Deletion of GPR21 improves glucose homeostasis and inhibits the CCL2-CCR2 axis by divergent mechanisms [J]. BMJ Open Diabetes Res Care, 2021, 9: e002285.

[4] Fu J, Jia Q, Liang P, et al. Enhanced stability designs of cell membrane chromatography for screening drug leads [J]. J Sep Sci, 2022, 45: 2498-2507.

[5] Wei F, Wang S, Lv N, et al. Characterization the affinity of α_{1A} adrenoreceptor by cell membrane chromatography with frontal analysis and stoichiometric displacement model [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2017, 1040: 273-281.

[6] Liu N, Cui X, Yan W, et al. Baicalein: A potential GLP-1R agonist improves cognitive disorder of diabetes through mitophagy enhancement [J]. J Pharm Anal, 2024, 14: 100968.

[7] Zhu Y, Huang X, Deng Z, et al. Orally biomimetic metal-phenolic nanozyme with quadruple safeguards for intestinal homeostasis to ameliorate ulcerative colitis [J]. J Nanobiotechnology, 2024, 22: 545.

[8] Kim B, Chae J, Kim EH, et al. Physical activity and quality of life of patients with inflammatory bowel disease [J]. Medicine (Baltimore), 2021, 100: e26290.

[9] Martin AL, Steurer MA, Aronstam RS. Constitutive activity among orphan class-A G protein coupled receptors [J]. PLoS One, 2015, 10: e0138463.

[10] Wang L, Cheng CK, Yi M, et al. Targeting endothelial dysfunction and inflammation [J]. J Mol Cell Cardiol, 2022, 168: 58-67.

[11] Wu Y, Ran L, Yang Y, et al. Deferasirox alleviates DSS-induced ulcerative colitis in mice by inhibiting ferroptosis and improving intestinal microbiota [J]. Life Sci, 2023, 314: 121312.

[12] Le Berre C, Honap S, Peyrin-Biroulet L. Ulcerative colitis [J]. Lancet, 2023, 402: 571-584.

[13] Du L, Ha C. Epidemiology and pathogenesis of ulcerative colitis [J]. Gastroenterol Clin North Am, 2020, 49: 643-654.

[14] Marsool MDM, Vora N, Marsool ADM, et al. Ulcerative colitis: Addressing the manifestations, the role of fecal microbiota transplantation as a novel treatment option and other therapeutic updates [J]. Dis Mon, 2023, 69: 101606.

[15] Zhou J, Yang Q, Wei W, et al. *Codonopsis pilosula* polysaccharide alleviates ulcerative colitis by modulating gut microbiota and SCFA/GPR/NLRP3 pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2025, 337: 118928.

[16] Wang J, Pan Z, Baribault H, et al. GPR21 KO mice demonstrate no resistance to high fat diet induced obesity or improved glucose tolerance [J]. F1000Res, 2016, 5: 136.

[17] Bordano V, Kinsella GK, Cannito S, et al. G protein-coupled receptor 21 in macrophages: An *in vitro* study [J]. Eur J Pharmacol, 2022, 926: 175018.

[18] Osborn O, Oh DY, McNelis J, et al. G protein-coupled receptor 21 deletion improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice [J]. J Clin Invest, 2012, 122: 2444-2453.

[19] Feuerstein JD, Moss AC, Farraye FA. Ulcerative colitis [J]. Mayo Clin Proc, 2019, 94: 1357-1373.

[20] Bolinger AA, Frazier A, La JH, et al. Orphan G protein-coupled receptor GPR37 as an emerging therapeutic target [J]. ACS Chem Neurosci, 2023, 14: 3318-3334.

[21] Zhang R, Chen J. Research progress on the role of orphan receptor GPR139 in neuropsychiatric behaviours [J]. Eur J Pharmacol, 2023, 960: 176150.

[22] Stratulat T, Babes A, Tunaru S. Orphan G-protein coupled receptor 75 (GPR75), a unique and controversial potential therapeutic target [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2025, 45: 251-258.

[23] Lin X, Chen B, Wu Y, et al. Cryo-EM structures of orphan GPR21 signaling complexes [J]. Nat Commun, 2023, 14: 216.