中药防风调控AHR/NLRP3通路改善小鼠溃疡性结肠炎

苏帅贤[1], 杨心茹[2,3], 王汛江[2], 王如锋[3,5], 毛恩强[4], 王 旭[2,3*], 林鹏程[1*], 丁丽丽[2,3*]

(1. 青海民族大学药学院, 青海 西宁 810007; 2. 上海中医药大学中药研究所, 中药功效成分发掘与利用全国重点实验室, 中药标准化教育部重点实验室, 中药新资源与品质评价国家中医药管理局重点研究室, 上海 201203; 3. 上海中药标准化研究中心, 上海 201203; 4. 上海交通大学医学院附属瑞金医院急诊科, 上海 200025; 5. 道地药材国家重点实验室, 北京 100700)

摘要: 本研究拟探讨中药防风对溃疡性结肠炎 (UC) 的保护作用及其与芳香烃受体 (AHR)/NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3 (NLRP3) 通路的关系。采用2.5%右旋葡聚糖硫酸钠 (DSS) 连续饮水7天建立C57BL/6J小鼠急性结肠炎模型, 同时灌胃给予防风醇提物 (2、5 g·kg^{-1}·d^{-1}) 或 5-氨基水杨酸 (100 mg·kg^{-1}·d^{-1}) 干预。记录体重及疾病活动指数 (DAI), 结合结肠长度、苏木素−伊红和阿利新蓝−过碘酸希夫染色及免疫荧光评价结肠组织损伤和杯状细胞、紧密连接蛋白变化, 并采用ELISA、RT-qPCR和Western blot分析血清及结肠组织炎症因子、紧密连接蛋白以及AHR/NLRP3相关分子表达。实验动物经上海中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号: PZSHUTCM2510310022)。结果显示: 与DSS模型组相比, 防风可剂量依赖性减轻DSS诱导的体重下降和DAI升高, 延长结肠长度, 减轻黏膜病理损伤; 同时下调血清及结肠组织TNF-α、IL-1β、IL-6等炎症因子表达, 上调紧密连接蛋白-1、膜整合蛋白的mRNA与蛋白水平, 并提高AHR蛋白表达, 抑制NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白、Caspase-1和IL-1β等炎症小体相关蛋白。在AHR敲除小鼠中, 未观察到防风醇提物对DSS诱导的小鼠急性UC的缓解作用。综上, 防风可能通过激活AHR抑制下游NLRP3炎症小体活化, 进而维护肠黏膜屏障功能, 减轻肠道炎症, 为其防治UC的应用提供实验依据。

关键词: 防风; 结肠炎; NLRP3炎症小体; 芳香烃受体; 肠道屏障

中图分类号: R966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)05-1719-12

Traditional Chinese medicine *Saposhnikovia divaricata* ameliorates ulcerative colitis in mice by regulating the AHR/NLRP3 pathway

SU Shuai-xian[1], YANG Xin-ru[2,3], WANG Xun-jiang[2], WANG Ru-feng[3,5], MAO En-qiang[4], WANG Xu[2,3*], LIN Peng-cheng[1*], DING Li-li[2,3*]

(*1. School of Pharmacy, Qinghai Nationalities University, Xining 810007, China; 2. State Key Laboratory of Discovery and Utilization of Functional Components in Traditional Chinese Medicine, The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines, The SATCM Key Laboratory for New Resources and Quality Evaluation of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3. Shanghai R & D Center for Standardization of Traditional Chinese Medicines, Shanghai 201203, China; 4. Emergency Department, Ruijin Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University Medical College, Shanghai 200025, China; 5. State Key Laboratory of Daodi Herbs, Beijing 100700, China*)

Abstract: This study was to investigate the protective effect of *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk.

收稿日期: 2026-01-08; 修回日期: 2026-03-10.

基金项目: 国家自然科学基金区域创新发展联合研究项目 (U24A20792); 青海省创新平台建设专项 (2024-ZJ-T02); 2024财政部国家中医药管理局项目.

*通讯作者 Tel: 86-21-51322497, E-mail: nail8219@126.com;

Tel: 86-971-880464, E-mail: qhlpc@126.com;

Tel: 86-21-51322497, E-mail: wangxucpu@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2026-0032

(SD) on ulcerative colitis (UC) and its relationship with aryl hydrocarbon receptor (AHR)/NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) pathway. The acute colitis model of C57BL/6J mice was established by continuous drinking water with 2.5% dextran sulfate sodium (DSS) for 7 days. At the same time, the ethanol extract of *Saposhnikovia divaricata* (2 and 5 g·kg^{-1}·d^{-1}) or 5-aminosalicylic acid (5-ASA, 100 mg·kg^{-1}·d^{-1}) was given by gavage. Body weight and disease activity index (DAI) were recorded. Colon length, hematoxylin-eosin (HE) and Alcian blue-periodic acid-Schiff staining (AB-PAS) staining and immunofluorescence were used to evaluate colon tissue damage and changes of goblet cells and tight junction proteins. ELISA, RT-qPCR and Western blot were used to analyze the expression of inflammatory factors, tight junction proteins and AHR/NLRP3-related molecules in serum and colon tissues. The use of animals in this study was approved by the Ethics Committee of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (approval number: PZSHUTCM2510310022). The results showed that compared with the DSS model group, *Saposhnikovia divaricata* could dose-dependently reduce DSS-induced weight loss and DAI increase, prolong colon length, and reduce mucosal pathological damage. At the same time, it down-regulated the expression of inflammatory factors such as TNF-α, IL-1β and IL-6 in serum and colon tissues, up-regulated the mRNA and protein levels of zonula occludens-1 (ZO-1) and occludin tight junction proteins, and increased the expression of AHR protein, and inhibited NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), Caspase-1 and IL-1β. In AHR knockout mice, the alleviation effect of the ethanol extract of *Saposhnikovia divaricata* on DSS-induced acute ulcerative colitis in mice was not observed. In summary, *Saposhnikovia divaricata* may inhibit the activation of downstream NLRP3 inflammasome by activating AHR, thereby maintaining intestinal mucosal barrier function and reducing intestinal inflammation, providing experimental basis for its application in the prevention and treatment of UC.

Key words: *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk.; ulcerative colitis; NLRP3 inflammasome; aryl hydrocarbon receptor; intestinal barrier

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种累及结直肠黏膜及黏膜下层的慢性复发性炎症性肠病, 临床多见腹痛、黏液脓血便和体重减轻等症状[1,2]; 其病变以直肠为原发部位, 随后炎症反应呈逆行性、进行性扩展, 可累积至整个结肠[3,4]; 这一过程会导致肠黏膜的水肿、充血、糜烂、出血、脓肿和溃疡等[5]。目前, 溃疡性结肠炎的临床治疗主要依赖5-氨基水杨酸 (5-aminosalicylic acid, 5-ASA)、类固醇、免疫抑制剂及生物制剂; 然而, 对这些药物的长期依赖、耐药性的出现、药物不耐受、疗效丧失以及机会性感染风险增高, 已成为临床实践中的诸多挑战[6]。因此, 急需探索安全、疗效可靠且依从性良好的UC新型治疗策略。

近年来研究认为, 肠黏膜屏障受损和持续性炎症是UC发生发展的核心机制[7]。肠上皮紧密连接蛋白 (如ZO-1、occludin) 及杯状细胞分泌的黏蛋白等共同维系屏障完整性, 其破坏可导致菌群及代谢物易位并放大炎症反应[8]。在右旋葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 诱导的结肠炎模型及UC患者中, 肠道组织NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3, NLRP3) 高表达并驱动半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶1 (cysteinyl aspartate specific proteinase 1, Caspase-1) 激活及白细胞介素 (interleukin, IL)-1β、IL-18成熟释放, 加重肠道炎症[9]; 遗传或药理学抑制NLRP3可显著减轻病变。异常激活的NLRP3炎症小体还导致紧密连接蛋白下调和黏膜屏障受损, 抑制NLRP3有助于恢复紧密连接表达和屏障功能。芳香烃受体 (aryl hydrocarbon receptor, AHR) 广泛表达于肠上皮细胞和免疫细胞, 是整合饮食、肠道菌群及环境信号的重要感受器[10]; 其激活可促进紧密连接蛋白表达和黏膜修复, 并负向调控NLRP3炎症小体及细胞中核因子-κB (nuclear factor kappa B, NF-κB) 通路, 减轻炎症反应[11,12]。已有研究表明, 中药复方及其活性成分 (如止痢宁方、天麻素、白头翁皂苷B4等) 可通过调控AHR通路缓解DSS诱导的结肠炎, 提示该通路是UC干预的重要潜在靶点之一[13]。

防风 [*Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk., SD], 最初记载于《神农本草经》。性微温, 味辛甘; 具有祛风解表、胜湿止痛之功效。临床研究提示, 含防风中药方剂可改善炎症性肠病患者腹痛、腹泻及黏液脓血便等症状[14,15], 其提取物及主要成分通过下调Toll样受体4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/环氧化酶2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 及肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、IL-1β、IL-6等炎症因子发挥抗炎和免疫调节作用[16,17]; 此外, 防风及其根系提取物可降低DSS诱导的肠炎小鼠血清内的TNF-α、IL-1β、

IL-6、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 和COX-2等炎症标志物的水平, 并相对增加了肠道菌丰度[18]; 研究发现, 含有防风的复方药剂玉屏风散可通过NLRP3和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路缓解脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 引起的肺、肠屏障损伤[19]; 然而, 防风是否通过调控AHR/NLRP3通路保护肠黏膜屏障、改善UC仍缺乏系统论证。基于此, 本研究采用DSS诱导小鼠急性结肠炎模型, 评价防风对疾病活动指数、结肠组织学改变、炎症因子及紧密连接蛋白表达的影响, 并重点考察AHR及NLRP3炎症小体相关蛋白的变化, 以阐明防风改善UC的作用及其与AHR/NLRP3通路的可能关联, 为防风及其活性成分在UC防治中的应用提供实验依据。

材料和方法

药品与试剂 DSS (货号160110) 购自美国MP Biomedicals公司; 美沙拉嗪 (即5-ASA, 货号MB7539-1) 购自美仑生物; PVDF膜 (货号IPVH00010) 购自德国Merck公司; ECL发光液 (货号WBKLS0500) 购自Millipore; IL-6酶联免疫试剂盒、IL-1β酶联免疫试剂盒、TNF-α酶联免疫试剂盒 (货号分别为EM30325S、EM30300S、EM30536S) 购自上海威奥生物科技有限公司; 升麻素苷、升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、亥茅酚苷、3′-*O*-当归酰基亥茅酚 (货号分别为BP1139、BP0356、BP0089、BP1279、BP4895) 购自成都普瑞法科技开发有限公司; occludin多克隆抗体 (27260-1-AP)、ZO-1多克隆抗体 (21773-1-AP) 和AHR单克隆抗体 (67785-1-Ig) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

实验动物 雄性C57BL/6J小鼠 (20 ± 2 g, 6～8周, SPF级) 80只购自上海斯莱克实验动物有限责任公司 [合格证号: SCXK (沪) 2022-0004]。饲养于上海中医药大学动物实验中心 [合格证号: SCXK (沪) 2020-0009]。小鼠适应性饲养1周后进行实验, 实验期间不限量摄食和饮水。本实验方案经上海中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号: PZSHUTCM2510310022), 实验期间严格遵循国家和上海中医药大学动物中心动物使用管理条例进行。

药物配制 防风样品均采自吉林省白城市镇赉县, 该地区位于松嫩平原与科尔沁草原交汇带, 属温带大陆性季风气候; 野生防风具体生长地点为东经123°9'36"、北纬45°52'48", 生长年限为7～8年, 于2023年8月采收; 药材样品经上海中医药大学中药学院倪梁红教授 (研究方向为中药资源与品种鉴定) 依据中国药典2020年版相应标准进行显微鉴定, 鉴定结果为伞形科植物防风 *Saposhnikoviadivaricata* (Turcz.) Schischk.的干燥根。称取100 g野生防风饮片, 10倍体积75%乙醇浸泡30 min, 回流提取两次, 每次1 h。合并回收液后蒸发浓缩, 冷冻干燥获得冻干粉。防风醇提物提取率为16.24% [提取率 (%) = $m_{提取物}/m_{生药}$ × 100%]。依据临床成人防风最大日用量10 g, 通过体表面积换算得小鼠等效剂量为2.0 g·kg^{-1}。依据文献[20]采用2.5倍等效剂量 (5.0 g·kg^{-1}) 进行干预。按醇提物得率 (16.24%) 折算实际给药量。

药材鉴定 取对照品升麻素苷约3.61 mg和3′-*O*-当归酰亥茅酚约1.00 mg, 精密称定, 分别置于10 mL量瓶, 甲醇定容; 取对照品升麻素约8.07 mg, 精密称定, 于10 mL量瓶内甲醇定容至10 mL, 取上述溶液1 mL, 甲醇定容至10 mL, 即为对照品溶液。取防风药材醇提物粉末约100 mg, 精密称定, 置离心管中, 精密加入70%甲醇水溶液5 mL, 称定质量, 涡旋混匀后, 超声提取30 min待温度恢复室温后补足失重, 取1 mL提取液高速离心5 min, 取上清液, 即为供试品溶液。线性关系考察: 精密量取混合对照品溶液各0.1、0.5、2.5、5 mL, 置于10 mL量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀, 获得5个梯度浓度的混合对照品溶液, 进样3 μL, 记录峰面积。精密度实验: 取混合对照品溶液, 连续进样6次, 记录峰面积。稳定性实验: 取同一防风供试品溶液, 室温放置, 分别于0、4、8、12、20、24 h进样, 记录峰面积。样品含量测定: 取防风醇提物各100 mg, 精密称定, 平行4份, 制备供试品溶液, 进样并记录峰面积。色谱参数设置参考《中华人民共和国药典(2020年版)》:色谱柱为Waters Acquity HSS T3 column (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm); 流动相为0.1%甲酸水溶液 (A相)-乙腈 (B相), 0～3 min 5% B, 3～13 min 5%～25% B, 13～25 min 25%～62% B, 25～35 min 62%～72% B, 35～40 min 72%～100% B, 40～60 min 100% B; 检测波长为254 nm; 流速为0.3 mL·min^{-1}; 柱温为40 ℃; 进样体积为3 μL。

动物分组及造模 8周龄SPF级雄性C57BL/6J小鼠适应性饲养1周后, 随机分为5组 (n = 6): 空白对照组 (CTRL)、模型组 (DSS)、阳性对照组 (DSS+5-ASA, 100 mg·kg^{-1})、临床剂量防风组 (DSS+SD-L, 2 g·kg^{-1}) 和高剂量防风组 (DSS+SD-H, 5 g·kg^{-1}); 正常对照组小鼠给予无菌水7天, 其余组小鼠给予自由饮用2.5% DSS溶液7天, 建立急性结肠炎小鼠模型。AHR基因敲除 (knockout, KO) 纯合子 (*Ahr*$^{-/-}$) 近交系小鼠由上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院周秉舵课题组捐赠, 于上海中医药大学实验动物中心饲养, 经繁育获得18只雄性敲除小鼠用于实验, 将AHR敲除的C57BL/6J小鼠随机分为3组: 正常对照组 (*Ahr*$^{-/-}$-CTRL)、模型

组 (*Ahr*$^{-/-}$-DSS)、防风醇提物组 (*Ahr*$^{-/-}$-DSS+SD-H, 5 g·kg^{-1}·d^{-1}), 正常组小鼠给予无菌水7天, 其余组小鼠给予自由饮用2.5% DSS溶液7天, 建立急性结肠炎小鼠模型。在造模的同时, 给药组以灌胃的方式连续给药7天, 而正常组与模型组连续灌胃生理盐水7天。给药期间每天监测体重和疾病活动指数 (disease activity index, DAI), 包括体重下降及稀便和便血程度。DAI的计算由两部分加起来: 体重: 减轻1%～5%、5%～10%、10%～20%和> 20%的评分分别为1、2、3和4分; 稀便和便血: 正常为0分; 轻微稀便为1分; 水样稀便为2分; 浅血+稀便3分; 明显便血为4分。实验结束后, 动物颈椎脱臼处死, 收集血清并获得新鲜结肠组织用于长度测量, 随后迅速将结肠组织样品于−80 ℃保存, 用于后续生化分析。

酶联免疫吸附实验 通过酶联免疫吸附测定试剂盒检测血清及小鼠结肠组织TNF-α、IL-6和IL-1β的水平。

组织学分析 每个结肠组织样本保持在4%多聚甲醛溶液中进行固定。随后, 对固定的结肠组织进行石蜡包埋, 切片, 随后进行苏木素−伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 和阿利新蓝−过碘酸希夫染色 (Alcian blue-periodic acid-Schiff staining, AB-PAS) 染色。通过显微镜观察染色切片, 并参考文献[21]评估总体组织病理学评分。

蛋白免疫印痕分析 取10 mg小鼠肠组织样本, 加入含有蛋白酶抑制剂 (SJ-MK0001, 山东思科捷生物技术有限公司) 的RIPA裂解液 (MA0151, 大连美仑生物技术有限公司), 4 ℃充分碾磨, 14 000 r·min^{-1}离心15 min, 取蛋白上清液。用BCA蛋白测定试剂盒 (PC0021, 北京索莱宝科技有限公司) 测定蛋白浓度。蛋白变性后, 取30 μg蛋白进行蛋白免疫印痕分析检测目标蛋白。以内参蛋白β-actin为参照, 计算目的蛋白的相对表达量。

免疫荧光 小鼠的结肠组织置于4%多聚甲醛内室温下固定24 h。将组织嵌入石蜡中并切片。切片进行脱蜡并重新水化, 随后, 切片用纯水摇洗, 后进行抗原修复, 使用0.3% Triton X-100 (T9284, 美国默克公司) 和牛血清白蛋白 [BSA, 36101ES80, 翌圣生物科技(上海)股份有限公司] 封闭1 h, 封闭结束后, 与目标抗体孵育过夜。经过PBS洗涤后, 与二级抗体 [Alexa Fluor 594山羊抗兔IgG (33106ES60, 翌圣生物科技股份有限公司) 和Alexa Fluor 594山羊抗小鼠IgG (33212ES60, 翌圣生物科技股份有限公司)] 孵育1 h。PBS清洗后, 抗淬灭荧光封片剂 (DAPI, P0131-25, 上海碧云天生物技术股份有限公司) 染核; 使用日本东京尼康的荧光显微镜观察图像。

逆转录−聚合酶链式反应分析 取10 mg小鼠肠组织样本, 以FreeZol Reagent总RNA提取试剂盒 (R711-01, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 提取总RNA, 取1 μg总RNA用ABScript Neo RT Master Mix for qPCR with gDNA Remover试剂盒 (RK20433, 武汉爱博泰克生物科技有限公司) 转录为cDNA。使用2× Universal SYBR Green Fast qPCR Mix试剂盒 (RK21203, 武汉爱博泰克生物科技有限公司) 进行实时荧光PCR检测目的基因的mRNA表达水平。以内参基因Gapdh为参照, 通过$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法分析目标基因的相对表达量, 引物序列信息见表1。

Table 1 The primer sequences of real-time quantitative PCR. *Gapdh*: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Il-6*: Interleukin 6; *Il-1β*: Interleukin 1 beta; *Tnf-α*: Tumor necrosis factor *α*; *Zo-1*: Tight junction protein 1; *Ahr*: Aryl-hydrocarbon receptor; *Cyp1a1*: Cytochrome P450

Gene name	Primer	Sequence (5' to 3')
Gapdh	Forward	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG
	Reverse	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG
Tnf-α	Forward	GCTGAGCTCAAACCCTGGTA
	Reverse	CTCCAAAGTAGACCTGCCCG
Il-1β	Forward	TTAGTCCTCGGCCAAGACAG
	Reverse	GGCAAGGAGGAAAACACAGG
Il-6	Forward	GGGACTGATGCTGGTGACAA
	Reverse	ACAGGTCTGTTGGGAGTGGT
Zo-1	Forward	GCCGCTAAGAGCACAGCAA
	Reverse	TCCCCACTCTGAAAATGAGGA
Occludin	Forward	TTGAAAGTCCACCTCCTTACAGA
	Reverse	CCGGATAAAAAGAGTACGCTGG
Ahr	Forward	CCACTGACGGATGAAGAAGGA
	Reverse	ATCTCGTACAACACAGCCTCTC
Cyp1a1	Forward	GACACAGTGATTGGCAGAG
	Reverse	GAAGGTCTCCAGAATGAAGG

统计学分析 实验数据采用GraphPad Prism 10.1软件用于统计分析, 实验结果均以mean ± SEM表示, 多组间比较采用方差分析 (one way ANOVA), $P < 0.05$认为具有统计学意义。

结果

1 防风药材鉴定

标准品与供试品对照药材在254 nm下的特征峰分布一致, 均含升麻素苷、升麻素等5个色原酮标志物, 1～5从左到右依次为: 升麻素苷、升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、亥茅酚苷、3′-*O*-当归酰基亥茅酚 (图1)。将所得峰面积 (*Y*) 为纵坐标, 梯度浓度 (*X*) 为横坐标进行线性回归分析 (表2)。根据精密度实验所得峰面积计算相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD),

以RSD ≤ 3%为符合标准 [参照2020年版《中华人民共和国药典(四部)》9101原则, 稳定性标准相同], 升麻素苷、升麻素和3′-*O*-当归酰亥茅酚峰面积的RSD分别为1.85%、2.09%、1.42%, 仪器精密度良好。根据稳定性实验所得峰面积计算RSD, 升麻素苷、升麻素和3′-*O*-当归酰亥茅酚峰面积的RSD分别为2.16%、1.05%、2.23%, 显示溶液24 h内稳定性良好。按外标法计算升麻素苷、升麻素和5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的含量 (表3)。

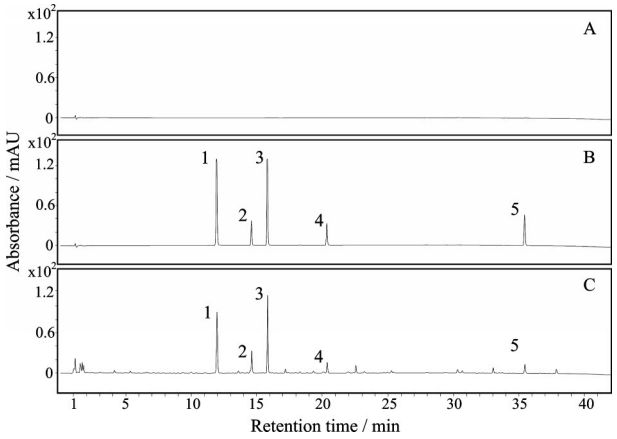


Figure 1 HPLC fingerprint identification of ethanol extract of *Saposhnikovia divaricata*. A: Blank solvent; B: Mixed reference standards; C: *Saposhnikovia divaricata* extract. 1: Prim-*O*-glucosylcimifugin; 2: Cimifugin; 3: 5-*O*-Methylvisammioside; 4: Hamaudol; 5: 3′-*O*-Angeloylhamaudol

2 防风对结肠炎小鼠疾病症状的缓解作用

采用2.5% DSS诱导溃疡性结肠炎模型期间 (图2A), 正常组小鼠体重持续增长 (图2B), 模型组小鼠在模型期间体重逐渐降低, 并伴随腹泻和血便等症状; 同时DAI伴随DSS造模时间而逐渐升高 (图2C), 说明DSS成功诱导了溃疡性结肠炎小鼠模型。给予阳性药和不同剂量的防风干预后, 防风干预组小鼠的体重增长趋势明显高于模型组 (图2B), 且DAI与模型组有显著差异, 表明防风对结肠炎具备良好的治疗效果 (图2C)。肉眼观察小鼠结肠组织结果: 正常组结肠外观正常, 未见粘连及充血; 模型组结肠充血严重, 肠黏膜和肌层变薄, 且颜色加深, 而阳性药及防风干预组小鼠的结肠组织形态及颜色趋于正常 (图2D)。结肠缩短长度可反映结肠炎的严重程度, 模型组小鼠结肠长度明显缩短, 阳性药及防风干预后结肠长度有所恢复 (图2D)。

3 防风改善结肠炎小鼠结肠组织病理学及炎症因子变化

对各组小鼠结肠HE染色结果 (图3A) 显示, 正常组结肠组织结构完整, 层次清晰, 黏膜上皮完整, 隐窝排列整齐、结构正常; 无水肿及炎性细胞浸润。模型组小鼠的结肠可见多处黏膜上皮缺损, 形成溃疡, 隐窝扭曲、分支, 甚至完全消失, 且出现明显炎性浸润。阳性药及防风干预后小鼠结肠黏膜结构、黏膜损伤及炎性细胞浸润均获得显著改善 (图3B)。使用ELISA检测试剂盒检测血清中TNF-α、IL-1β和IL-6发现, 与对照组相比, 模型组小鼠炎症因子均显著升高, 而阳性药及防风干预后, 炎症因子水平有所下降 (图3C); 检测结肠组织炎症因子表达情况, RT-qPCR结果与血清ELISA检测炎症因子表达趋势一致 (图3D), 同时ELISA检测小鼠结肠炎症蛋白水平变化发现阳性药及防风干预后, 炎症蛋白水平有所下降 (图3E)。这些结果表明, 防风改善了DSS诱导结肠炎小鼠结肠组织的组织病理变化。

4 防风维持结肠炎小鼠肠道屏障功能

AB-PAS染色显示 (图4A), DSS诱导的结肠炎小鼠结肠内杯状细胞数量显著减少。阳性药和防风能够有效维持结肠上皮杯状细胞的丰度 (图4B)。取小鼠结肠组织检测紧密连接相关基因表达情况, RT-qPCR结果表明, 与对照组相比, 模型组小鼠紧密连接基因表达下调, 阳性药和防风干预后改善其基因表达 (图4C、D), 进一步通过免疫印迹 (WB) 分析后, 结果表明模型组小鼠ZO-1和occludin蛋白含量均显著下降, 而阳性药和防风干预后, 紧密连接蛋白含量有所上调 (图4E)。这些结果表明, 防风通过维持杯状细胞数量、增加黏液蛋白分泌和上调紧连接蛋白表达, 从而减少结

Table 2 Linear regression results for prim-*O*-glucosylcimifugin, cimifugin and 3'-*O*-angeloylhamaudol

Compound	Regression equation	*r*	Linear range / μg·mL^{-1}
Prim-*O*-glucosylcimifugin	Y = 6.283 2X−28.048	0.999 6	3.61−180.54
Cimifugin	Y = 8.966 5X−9.217 5	0.999 6	0.81−40.38
3'-*O*-Angeloylhamaudol	Y = 13.826X−13.616	0.999 5	1.00−50.13

Table 3 The content of prim-*O*-glucosylcimifugin, cimifugin and 3'-*O*-angeloylhamaudol (n = 4)

Compound	Peak area / mAU	Concentration / mg·mL^{-1}	Content / mg·g^{-1}
Prim-*O*-glucosylcimifugin	283.95	0.049 66	2.474 6
Cimifugin	164.82	0.019 41	0.967 3
3'-*O*-Angeloylhamaudol	92.25	0.007 66	0.381 6

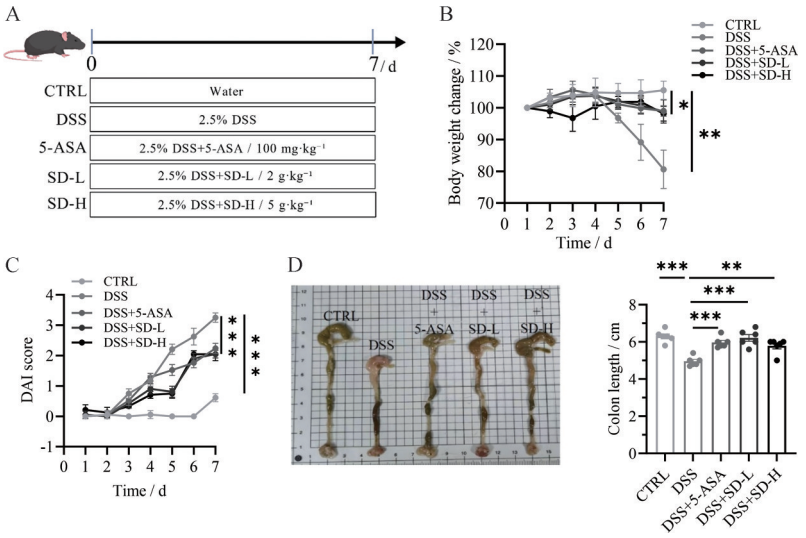


Figure 2 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. (SD) improves the symptoms of dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. A: DSS-induced colitis model program; B: Daily body weight changes in different groups; C: Daily changes of disease activity index (DAI) in different groups; D: Comparison of colon length in different groups. n = 6, mean ± SEM. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$. CTRL: Normal group; SD-L: Clinical dose of *Saposhnikovia divaricata*; SD-H: *Saposhnikovia divaricata* 2.5 times clinical dose; 5-ASA: 5-Aminosalicylic acid group

肠上皮屏障损伤, 从而保护黏膜完整性。

5 防风上调结肠炎小鼠紧密连接蛋白

进一步通过组织免疫荧光验证结肠屏障完整性, 结果表明, 模型组小鼠结肠组织ZO-1和occludin紧密连接蛋白荧光下调, 而防风干预后改善了紧密连接的下调趋势, 表现为ZO-1和occludin蛋白荧光强度升高(图5A～D)。

6 防风通过AHR信号抑制NLRP3炎症小体激活

越来越多的证据表明NLRP3炎症小体是结肠炎发病机制的关键介质[22,23], AHR已被证明能负向调控NLRP3炎症小体的激活及其下游炎症级联反应[24], 为探讨防风对AHR的影响, 取结肠组织测量了AHR表达情况。结果显示, DSS诱导后, 模型组小鼠*Ahr*和下游基因*Cyp1a1*的表达水平均有所下降, 阳性药及防风干预后, 表达水平有所升高 (图6A)。进一步通过免疫荧光检测AHR在结肠内的表达情况, 结果显示与对照组相比, DSS作用后致结肠组织AHR荧光减弱, 表达下降; 而防风及阳性药干预后, AHR免疫荧光增强, 表达上调 (图6B、C)。为阐明防风治疗结肠炎的分子机制, 本研究进行了WB分析, 以评估防风对AHR信号传导和NLRP3炎症小体相关蛋白的影响。结果显示, DSS诱导结肠炎显著降低了AHR蛋白表达, 同时显著提升了NLRP3炎症小体成分的表达, 包括NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)、Caspase-1和IL-1β, 而防风则抑制了DSS诱导后相关蛋白表达情况, 表现为NLRP3、ASC、Caspase-1和IL-1β蛋白水平的下降(图6D)。以上结果表明, 防风有效调节AHR/NLRP3通路, 发挥其抑制炎症的作用。

7 AHR的缺失减弱了防风改善结肠炎的效果

为了深入研究防风在治疗急性结肠炎中是否依赖AHR受体作用, 本研究进行了AHR缺失小鼠实验, 分为*Ahr*$^{-/-}$-CTRL组、*Ahr*$^{-/-}$-DSS组以及*Ahr*$^{-/-}$-DSS+SD-H组。首先, 本研究对这些小鼠的体重变化、DAI评分以及结肠长度进行了详细测量和分析。如图7A所示, *Ahr*$^{-/-}$-DSS组的小鼠体重下降百分比明显高于*Ahr*$^{-/-}$-CTRL组, 表明结肠炎引发了明显的体重减轻。在给予SD治疗后, 并没有观察到体重改善的趋势, 这暗示AHR的缺失可能阻断了SD的治疗效果。进一步结果显示, DAI评分也未呈现出明显的变化趋势 (图7B), 强调了AHR缺失对SD治疗效果的抑制。此外, *Ahr*$^{-/-}$-DSS组和*Ahr*$^{-/-}$-DSS+SD-H组之间的结肠长度也未显示出改善趋势 (图7C、D)。而且AHR缺失明显抑制了SD对结肠炎小鼠肠道损伤的改善和抗炎作用。HE染色结果表明, 在*Ahr*$^{-/-}$-CTRL小鼠中, 结肠组织呈现出正常的黏膜形态和隐窝结构。而在DSS诱导的小鼠中, 结肠组织显示出明显的黏膜溃疡, 隐窝丧失, 杯状细胞减少, 上皮受损和炎症浸润。且SD处理未能改善结肠组织的病理结构损伤情况 (图7E、F)。此外, 为了评估DSS诱导的小鼠结肠炎的炎症严重程度, 本研究通过RT-PCR测定了结肠组织中*Il-6*、*Il-1β*和*Tnf-α*的表达水平。与*Ahr*$^{-/-}$-CTRL组相比, 仅暴露于DSS的小

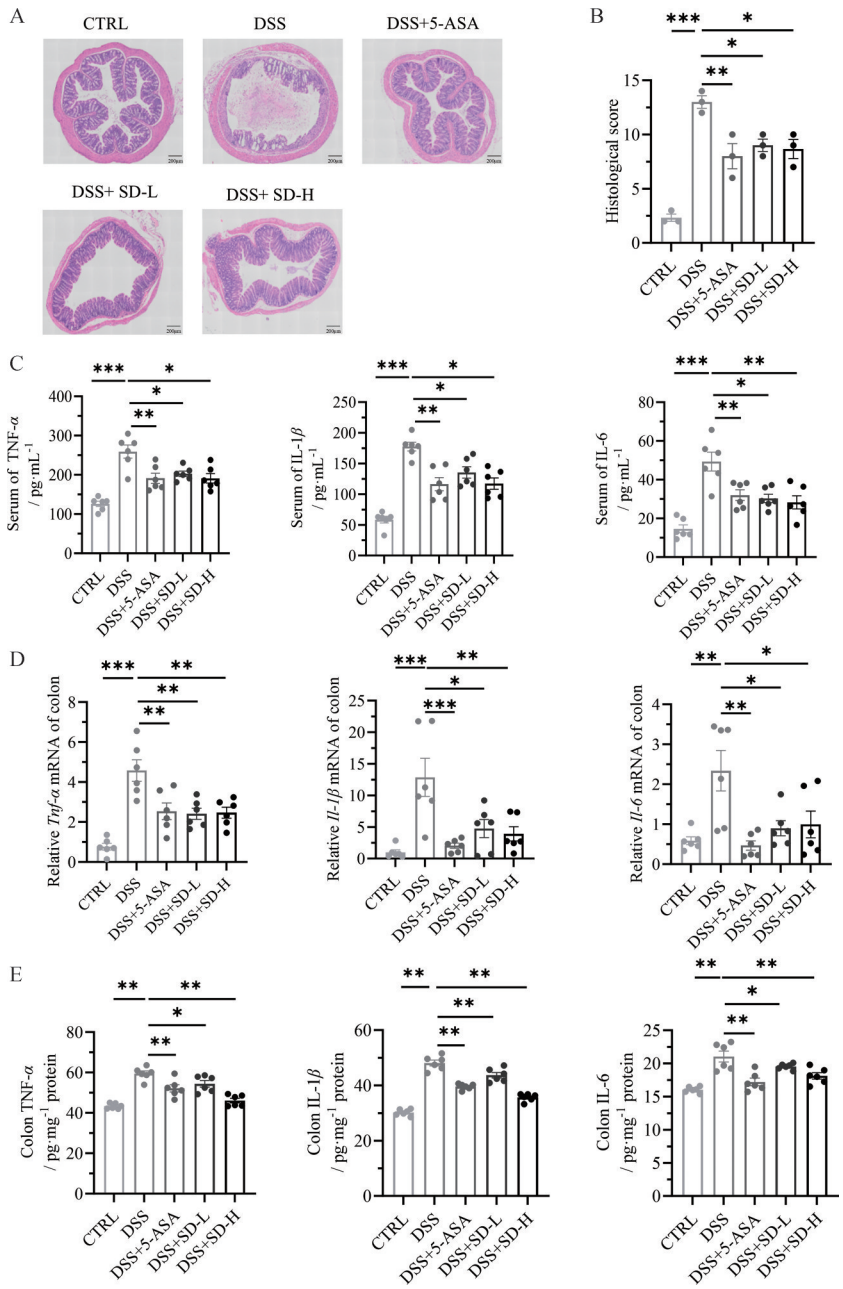


Figure 3 SD improved the histopathological changes of colon tissue in DSS-induced colitis mice. A: Representative images of HE staining of colon tissues (magnification, × 40) (n = 3); B: The histopathological changes in the colon tissue samples were examined by HE staining (n = 3); C: The content of TNF-α, IL-1β and IL-6 protein in serum (n = 6); D: The content of *Tnf-α*, *Il-1β* and *Il-6* mRNA in colon tissue (n = 6); E: The content of TNF-α, IL-1β and IL-6 protein in colon tissue (n = 6). Mean ± SEM. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$

鼠结肠组织中*Il-6*、*Il-1β*和*Tnf-α*的mRNA表达明显增加。然而, SD处理后并不能显著降低这些炎症细胞因子的mRNA表达 (图7G), 通过ELISA检测结肠组织炎症蛋白水平发现, *Ahr*$^{-/-}$-DSS组和*Ahr*$^{-/-}$-DSS+SD-H炎症蛋白水平均出现上升 (图7H)。总之, 这些数据明确验证了SD治疗急性溃疡性结肠炎的潜力, 此外还发现AHR的缺失显著削弱了SD对结肠炎的治疗效果, 这证实了SD通过激活AHR信号通路来改善结肠炎的机制, 为进一步研究SD作为治疗UC的潜在药物提供了实验依据。

讨论

UC是一类以结肠黏膜慢性复发性炎症为特征的疾病, 其发生发展与肠道菌群紊乱、免疫失衡及黏膜屏障受损密切相关[1,2]。目前临床主要采用5-氨基水杨酸、糖皮质激素及免疫抑制剂等药物控制病情, 但缓解

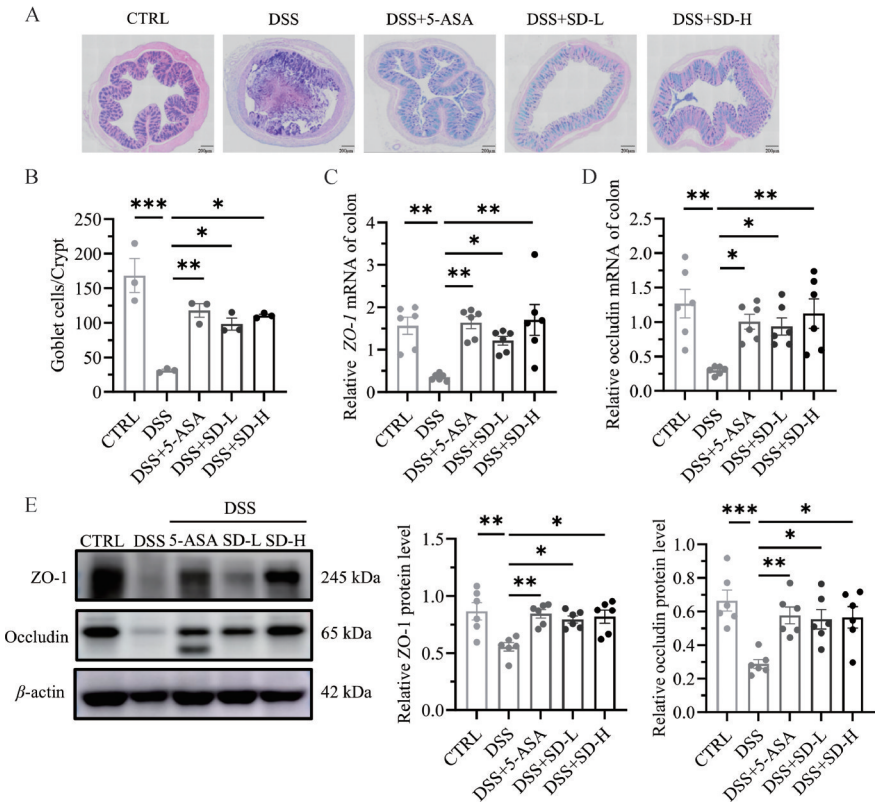


Figure 4 SD maintains intestinal barrier function in colitis mice. A: Representative micrographs of AB-PAS staining in colon tissues (magnification, × 40) (n = 3); B: AB-PAS staining was used to count the abundance of goblet cells (n = 3); C, D: The relative mRNA expression of *ZO-1* (C) and occludin (D) in colon tissue (n = 6); E: The protein expressions of ZO-1 and occludin in intestinal tissues (n = 6). Mean ± SEM. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$

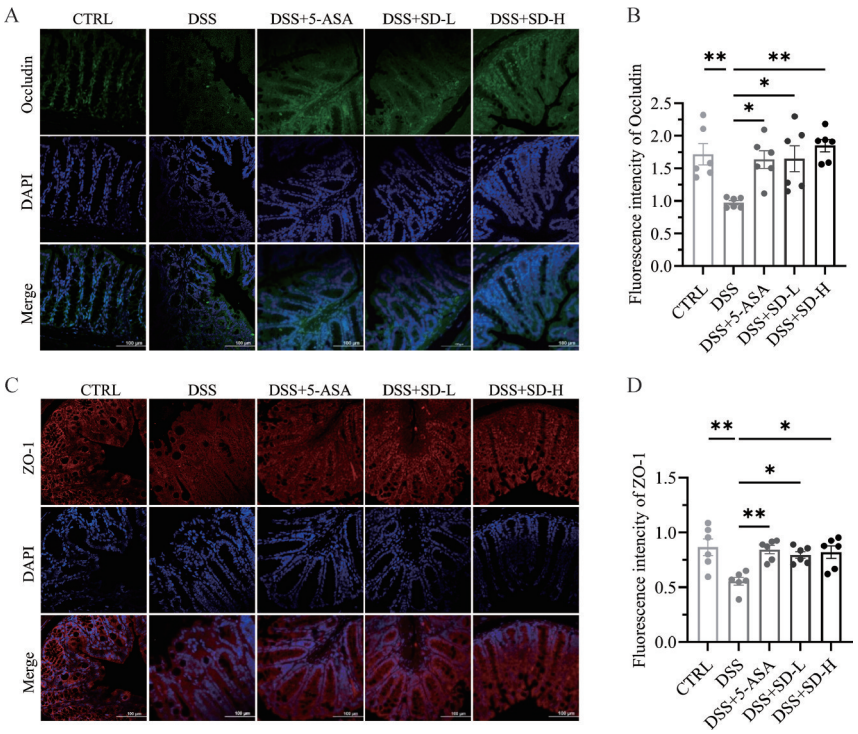


Figure 5 SD up-regulates the expression of tight junction protein in colitis mice. A: Occludin immunofluorescence representative photos; B: Fluorescence statistics of occludin; C: ZO-1 immunofluorescence representative photos; D: Fluorescence statistics of ZO-1. n = 6, mean ± SEM. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

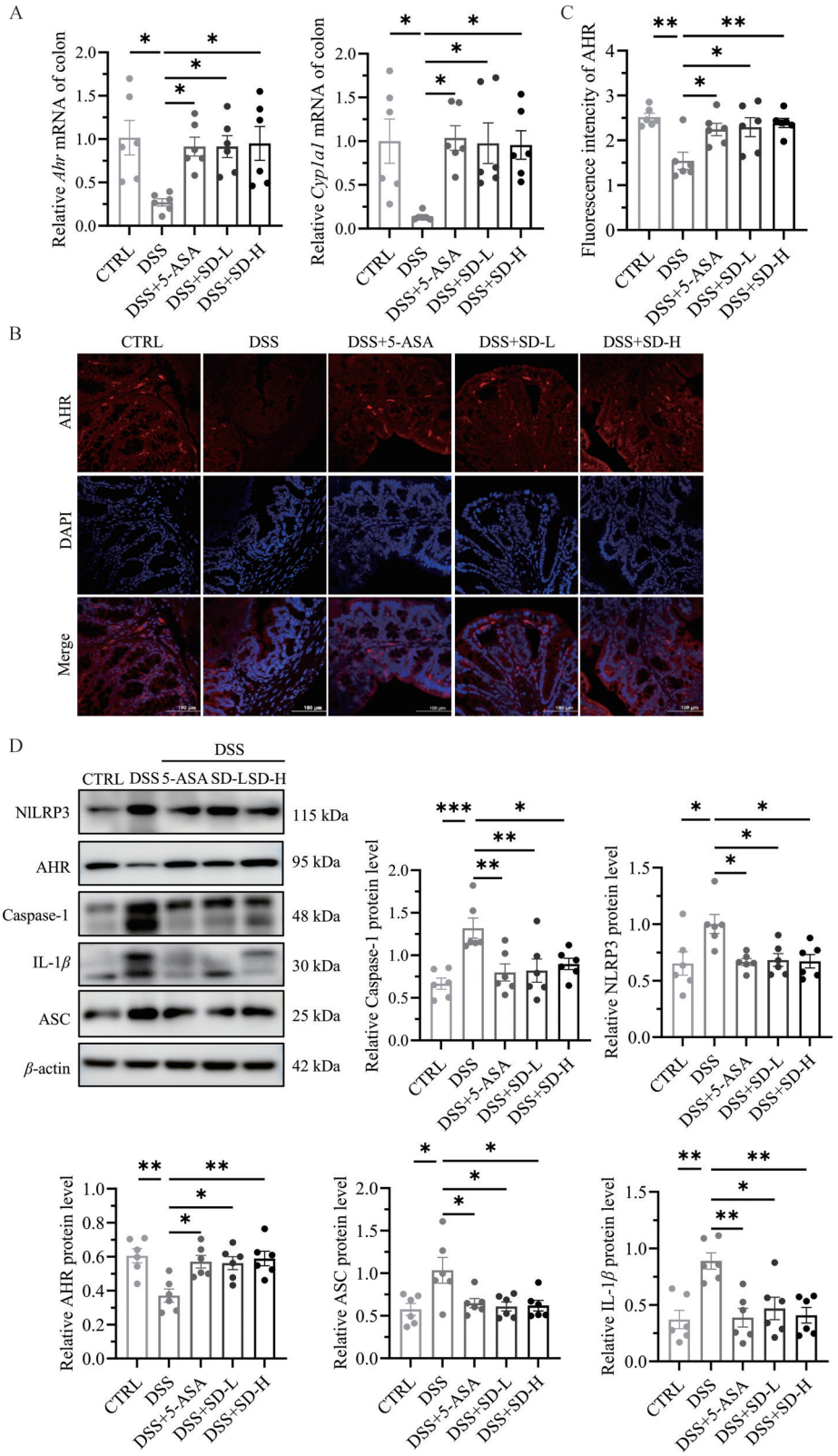


Figure 6 SD inhibits NLRP3 inflammasome activation through AHR signaling. A: The relative expression of *Ahr* and *Cyp1a1* in colon tissue; B: AHR immunofluorescence representative photos; C: Fluorescence statistics of AHR; D: The expression of NLRP3, AHR, Caspase-1, ASC and IL-1β protein in colon tissue. $n = 6$, mean ± SEM. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$

率有限、复发率较高, 且长期应用易引发继发感染、肝肾毒性及激素依赖等不良反应[25]。因此, 急需兼具安全性和长期用药潜力并能同时调节炎症和修复屏障的新型干预策略。

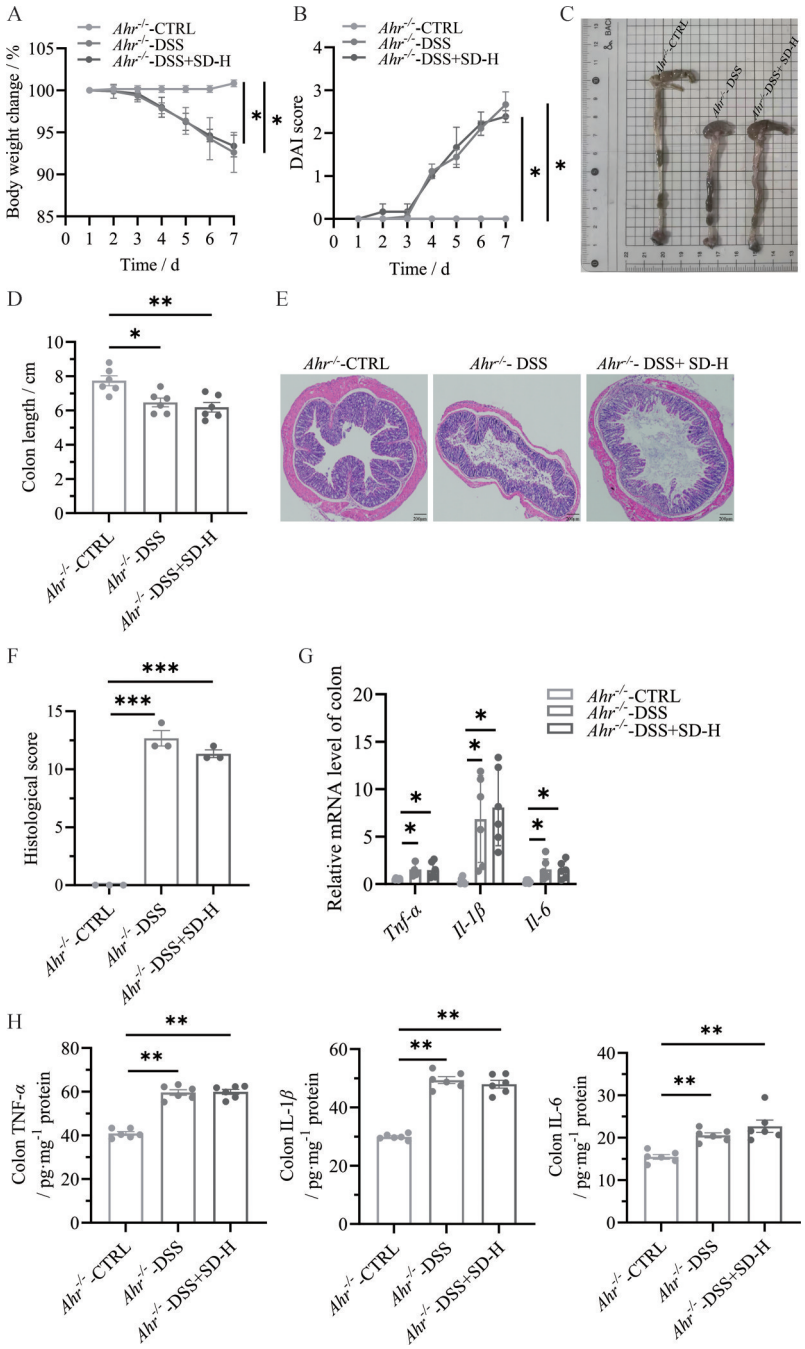


Figure 7 The lack of AHR weakened the effect of SD in improving colitis. A: Daily body weight changes in different groups (n = 6); B: Daily changes of DAI in different groups (n = 6); C: Colon images of each group; D: Colon length quantization of each group (n = 6); E: The histopathological changes in the colon tissue samples were examined by HE staining (n = 3); F: Histopathological score (n = 3); G: Relative expressions of *Il-6*, *Il-1β* and *Tnf-α* were assessed by RT-PCR (n = 6); H: The content of TNF-α, IL-1β and IL-6 protein in colon tissue (n = 6). Mean ± SEM. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$

本研究在DSS诱导的急性结肠炎小鼠模型中, 发现防风干预后改善模型小鼠体重下降、DAI评分升高及结肠缩短等表型, HE染色显示炎性细胞浸润和隐窝结构破坏减轻, 说明其具有组织学保护作用。炎症因子检测显示, 防风下调血清及结肠组织中 *Tnf-α*、*Il-1β*、*Il-6* 水平, 提示其可抑制黏膜炎症。既往多种中药活性成分被证实可通过抑制NLRP3炎症小体等通路, 降低IL-1β等炎症介质释放, 从而减轻UC病理损伤[26], 本研究结果与之相符。

黏膜屏障破坏是UC的另一关键病理基础, 主要表现为杯状细胞减少、黏液层变薄及紧密连接蛋白下调, 导致肠道通透性增加和细菌、毒素移位[27,28]。本研

究发现, DSS处理减少结肠杯状细胞并降低ZO-1、occludin的基因及蛋白表达, 而防风干预后上述指标回升, 提示防风能够维持杯状细胞丰度、促进黏液和紧密连接蛋白表达, 从而改善肠屏障功能。

“AHR-炎症小体–黏膜屏障”被认为是解释UC复杂病理的重要信号轴之一。研究显示, UC患者结肠黏膜中AHR表达及其内源性配体水平下降, AHR缺失小鼠对DSS更为敏感, 而增强AHR活性有助于减轻黏膜炎症并改善紧密连接蛋白表达[29]; NLRP3炎症小体在UC中过度激活, 多种色氨酸代谢产物及中药成分可通过激活AHR抑制NLRP3和NF-κB信号, 从而缓解UC[30]。本研究观察到, DSS处理导致结肠组织AHR及下游CYP1A1表达降低, 同时NLRP3、ASC、Caspase-1及IL-1β蛋白水平升高; 防风干预后可上调AHR/CYP1A1表达, 并同步抑制NLRP3炎症小体相关蛋白的异常激活。为了进一步研究防风在治疗急性结肠炎中是否依赖于AHR的作用, 本课题组在AHR敲除小鼠中研究了防风对DSS诱导的小鼠急性结肠炎的作用, 发现AHR的缺失显著削弱了防风对小鼠急性结肠炎疾病症状、炎症反应和肠道损伤的改善。推测防风通过增强AHR信号负向调控NLRP3炎症小体活性, 在“信号轴调控–炎症抑制–屏障保护”的连续过程中发挥关键作用。

本研究发现防风可以通过激活AHR来改善小鼠结肠炎, 证实了防风对UC的保护作用, 并提供证据证明了AHR是防风治疗UC中的有效治疗靶点, 也为防风的临床应用提供了新的实验依据。

作者贡献: 苏帅贤、王旭和丁丽丽设计实验; 苏帅贤、杨心茹和王汛江进行实验数据采集与分析; 苏帅贤、王如锋、毛恩强、王旭、丁丽丽和林鹏程撰写修改论文。

利益冲突: 本文的发表不存在任何利益冲突。

References

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

[2] Adams SM, Close ED, Shreenath AP. Ulcerative colitis: Rapid evidence review [J]. Am Fam Physician, 2022, 105: 406-411.

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

[4] Eisenstein M. Ulcerative colitis: Towards remission [J]. Nature, 2018, 563: S33.

[5] Sun Y, Zhang Z, Zheng CQ, et al. Mucosal lesions of the upper gastrointestinal tract in patients with ulcerative colitis: A review [J]. World J Gastroenterol, 2021, 27: 2963-2978.

[6] Gu S, Xue Y, Gao Y, et al. Mechanisms of indigo naturalis on treating ulcerative colitis explored by GEO gene chips combined with network pharmacology and molecular docking [J]. Sci Rep, 2020, 10: 15204.

[7] Tatiya-Aphiradee N, Chatuphonprasert W, Jarukamjorn K. Immune response and inflammatory pathway of ulcerative colitis [J]. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2018, 30: 1-10.

[8] Xu X, Wang M, Wang Z, et al. The bridge of the gut-joint axis: Gut microbial metabolites in rheumatoid arthritis [J]. Front Immunol, 2022, 13: 1007610.

[9] Zhu F, Wang L, Gong Z, et al. Blockage of NLRP3 inflammasome activation ameliorates acute inflammatory injury and long-term cognitive impairment induced by necrotizing enterocolitis in mice [J]. J Neuroinflammation, 2021, 18: 66.

[10] de Vos WM, Tilg H, Van Hul M, et al. Gut microbiome and health: Mechanistic insights [J]. Gut, 2022, 71: 1020-1032.

[11] Zhou R, Huang K, Chen S, et al. Zhilining Formula alleviates DSS-induced colitis through suppressing inflammation and gut barrier dysfunction *via* the AHR/NF-κBp65 axis [J]. Phytomedicine, 2024, 129: 155571.

[12] Wu H, Li YL, Wang Y, et al. Anemoside B4 alleviates ulcerative colitis by attenuating intestinal oxidative stress and NLRP3 inflammasome *via* activating aryl hydrocarbon receptor through remodeling the gut microbiome and metabolites [J]. Redox Biol, 2025, 85: 103746.

[13] Zhang D, Wu J, Feng H, et al. Gastrodin ameliorates ulcerative colitis *via* modulating gut microbial tryptophan metabolism and AhR/NLRP3 pathway [J]. Phytomedicine, 2025, 147: 157217.

[14] Zhang YB, Wang XF, Wang R, et al. Effect of Jingjie and Fangfeng in the treatment of ulcerative colitis [J]. Shandong J Tradit Chin Med (山东中医杂志), 2018, 37: 557-559.

[15] Zhang SX. Application of wind herbs in treatment of surgical diseases in traditional Chinese medicine [J]. Liaoning J Tradit Chin Med (辽宁中医杂志), 2008, 10: 1501-1502.

[16] Guo JX, Ma L, Wang B, et al. Impact of Fangfeng in Tongxie Yaofang on TLR-4, TNF-α, and IL-1β in UC rats triggered by TNBS [J]. Acta Chin Med Pharmacol (中医药学报), 2018, 46: 58-61.

[17] Guo JX, Yan LG. Effect of Tongxie Yaofang and Fangfeng on COX-2 in colonic mucosa and IL-6 in peripheral blood of rats with liver depression and spleen deficiency syndrome of ulcerative colitis [J]. Tradit Chin Med Res (中医研究), 2017, 30: 73-77.

[18] Erdenebileg S, Son YJ, Kim M, et al. *Saposhnikovia divaricata* root and its major components ameliorate inflammation and altered gut microbial diversity and compositions in DSS-induced colitis [J]. Integr Med Res, 2023, 12: 100998.

[19] Wang Y, Wang Y, Ma J, et al. YuPingFengSan ameliorates LPS-induced acute lung injury and gut barrier dysfunction in mice [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 312: 116452.

[20] Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human [J]. J Basic Clin Pharm, 2016, 7:

27-31.

[21] Kihara N, de la Fuente SG, Fujino K, et al. Vanilloid receptor-1 containing primary sensory neurones mediate dextran sulphate sodium induced colitis in rats [J]. Gut, 2003, 52: 713-719.

[22] Gao J, Xu K, Liu H, et al. Impact of the gut microbiota on intestinal immunity mediated by tryptophan metabolism [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018, 8: 13.

[23] Stockinger B, Shah K, Wincent E. AHR in the intestinal microenvironment: Safeguarding barrier function [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18: 559-570.

[24] Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2003, 43: 309-334.

[25] Liu JR, Wang JH, Xu ZB, et al. Research progress on the pathogenesis and drug treatment of ulcerative colitis [J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig (中国中西医结合消化杂志), 2025, 33: 888-894.

[26] Zhang YQ, Dong FY, Gao ZY, et al. Research progress on mechanism of traditional Chinese medicine intervention in NLRP3 inflammasome for treatment of ulcerative colitis [J]. J Anhui Univ Chin Med (安徽中医药大学学报), 2025, 44: 107-112.

[27] Ikeda M, Shimizu K, Ogura H, et al. Hydrogen-rich saline regulates intestinal barrier dysfunction, dysbiosis, and bacterial translocation in a murine model of sepsis [J]. Shock, 2018, 50: 640-647.

[28] Krezalek MA, DeFazio J, Zaborina O, et al. The shift of an intestinal "microbiome" to a "pathobiome" governs the course and outcome of sepsis following surgical injury [J]. Shock, 2016, 45: 475-482.

[29] Li YY, Wang XJ, Su YL, et al. Baicalein ameliorates ulcerative colitis by improving intestinal epithelial barrier *via* AhR/IL-22 pathway in ILC3s [J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43: 1495-1507.

[30] Cao J, Bao Q, Hao H. Indole-3-carboxaldehyde alleviates LPS-induced intestinal inflammation by inhibiting ROS production and NLRP3 inflammasome activation [J]. Antioxidants (Basel), 2024, 13: 1107.