

五味子甲素调控 FXR 信号通路改善 DSS 诱导的小鼠急性溃疡性结肠炎

蒋嘉瑞^{1,2}, 董 跨^{1,2}, 金玉春³, 杨心茹^{1,2}, 罗亦轩^{1,2}, 徐书扬^{1,2}, 王汛江¹,
谷丽华^{1,2}, 石燕红^{1,2}, 杨 莉^{1,2}, 王 旭^{1,2*}, 丁丽丽^{1,2*}

(1. 上海中医药大学中药研究所, 上海市复方中药重点实验室, 中药标准化教育部重点实验室暨国家中医药管理局中药新资源与质量评价重点实验室, 上海 201203; 2. 上海中药标准化研究中心, 上海 201203; 3. 复旦大学附属妇产科医院乳腺科, 上海 200011)

摘要: 炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 以慢性复发性肠道炎症为特征, 包括溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 和克罗恩病 (Crohn's disease, CD)。IBD 已成为全球性的医疗保健问题。临床上尚缺乏有效治疗药物。本研究聚焦于 UC 模型, 旨在寻找新的治疗策略。前期研究发现, 五味子甲素 (schisandrin A, SchA) 体外具有抗炎作用, 并促进法尼醇 X 受体 (farnesoid X receptor, FXR) 的转录活性。FXR 反向调控 NF- κ B 的转录活性, 在调节炎症反应中具有重要作用。因此, 本研究主要探讨 SchA 对 UC 的保护作用及其通过 FXR 信号通路调控的机制。在 RAW264.7 细胞上评价 SchA 对炎症因子 mRNA 水平的影响。用双荧光素酶报告基因实验验证 SchA 与 FXR 靶向关系。动物实验遵循上海中医药大学动物伦理委员会规定 (批准号: PZSHUTCM2304250005)。野生型或 FXR 敲除的 C57BL/6 小鼠自由饮用 3% 右旋葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 7 天诱导小鼠急性 UC, 并灌胃给药 SchA 连续 7 天。实验期间每日监测小鼠体重及粪便情况。采用 RT-qPCR 方法检测结肠组织炎症因子、FXR 靶基因的 mRNA 水平。结果显示: 体外 SchA 抑制脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的炎症因子 mRNA 水平的增加。同时, SchA 可以增加 FXR 的转录活性。在野生型小鼠中, SchA 能明显改善急性 UC 小鼠的体重下降、结肠缩短、稀便和便血; SchA 显著降低结肠组织中促炎因子基因的表达、增加 FXR 靶基因的表达。在 FXR 敲除小鼠中, SchA 对小鼠急性 UC 的缓解作用消失。综上, SchA 可通过 FXR 信号通路降低肠道炎症, 缓解 DSS 诱导的小鼠急性 UC, 提示五味子木脂素类化合物可能是 IBD 药物开发的先导化合物。

关键词: 五味子甲素; 结肠炎; 葡聚糖硫酸钠; 法尼醇 X 受体; 抗炎

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)05-1261-10

Schisandrin A ameliorates DSS-induced acute ulcerative colitis in mice *via* regulating the FXR signaling pathway

JIANG Jia-ru^{1,2}, DONG Kua^{1,2}, JIN Yu-chun³, YANG Xin-ru^{1,2}, LUO Yi-xuan^{1,2}, XU Shu-yang^{1,2},
WANG Xun-jiang¹, GU Li-hua^{1,2}, SHI Yan-hong^{1,2}, YANG Li^{1,2}, WANG Zheng-tao^{1,2},
WANG Xu^{1,2*}, DING Li-li^{1,2*}

(1. The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines and the SATCM Key Laboratory for New Resources and Quality Evaluation of Chinese Medicines and Shanghai Key Laboratory of Compound Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;
2. Shanghai R & D Center for Standardization of Traditional Chinese Medicines, Shanghai 201203, China;
3. Department of Breast Surgery, the Obstetrics and Gynecology Hospital of Fudan University, Shanghai 200011, China)

Abstract: Inflammatory bowel disease (IBD) is characterized by chronic relapsing intestinal inflammation

收稿日期: 2023-11-21; 修回日期: 2023-12-28.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82122074, 82274165, 82204406, 82130115, 81920108033).

*通讯作者 Tel: 86-21-51322507, Fax: 86-21-51322519, E-mail: wangxucpu@163.com;

Tel: 86-21-51322496, Fax: 86-21-51322519, E-mail: nail8219@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1319

and encompasses ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). IBD has emerged as a global healthcare problem. Clinically efficacious therapeutic agents are deficient. This study concentrates on models of ulcerative colitis with the objective of discovering novel therapeutic strategies. Previous investigations have established that schisandrin A demonstrates anti-inflammatory effects *in vitro*, concurrently enhancing the transcriptional activity of farnesoid X receptor (FXR). FXR inversely modulates the transcriptional activity of NF- κ B, which has an important role in regulating inflammatory responses. Consequently, the current study was to explore the safeguarding influence of schisandrin A on ulcerative colitis and delineate the mechanism by which it regulates this effect through the FXR signaling pathway. The effect of schisandrin A on the mRNA levels of inflammatory factors was evaluated in RAW264.7 cells. The dual luciferase reporter gene assay was used to verify the relationship between schisandrin A and FXR targeting. The animal experiments were performed in accordance with the regulations of the Animal Ethics Committee of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (approval No. PZSHUTCM2304250005). Acute ulcerative colitis was induced in wild-type or FXR knockout C57BL/6 mice by drinking 3% dextran sodium sulfate (DSS) for 7 days, and schisandrin A was administered *via* gavage for a continuous treatment period of 7 days. The body weight and faecal were monitored daily. The mRNA levels of inflammatory factors in colon tissue and FXR target genes were measured by RT-qPCR. The findings revealed that schisandrin A, *in vitro*, impeded the lipopolysaccharide (LPS)-induced elevation in mRNA levels of inflammatory factors and schisandrin A could augment transcriptional activity of FXR. In wild-type mice, schisandrin A significantly improved weight loss, colon shortening, loose stools and blood in stools in mice with acute ulcerative colitis, and schisandrin A significantly reduced the expression of pro-inflammatory factors genes and significantly increased the expression of FXR target genes in colon tissues. In FXR knockout mice, the administration of schisandrin A failed to yield ameliorative effect on acute ulcerative colitis in mice. In conclusion, schisandrin A can reduce intestinal inflammation through the FXR signaling pathway to alleviate acute ulcerative colitis in mice. Implications arise that Schisandra lignans could serve as lead compounds for drug development aimed at inflammatory bowel disease.

Key words: schisandrin A; colitis; dextran sodium sulfate; farnesoid X receptor; anti-inflammatory

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是一种非特异性炎症性疾病, 以消化道反复发作的炎症为主要特征, 包括溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 和克罗恩病 (Crohn's disease, CD)。IBD 的发病机制涉及遗传易感性、环境影响、免疫稳态障碍和胃肠道菌群失调等多因素。免疫系统紊乱或与微生物的不平衡相互作用可能导致肠道慢性炎症的发展^[1,2]。IBD 已成为一种全球性疾病^[3], 给社会带来了巨大的财政和医疗负担。因此, 迫切需要考虑常规药物的不良反应、高成本和新的 IBD 治疗药物和治疗策略, 以减轻患者的痛苦并改善他们的生活质量。

近年来, 法尼醇 X 受体 (farnesoid X receptor, FXR) 逐渐受到研究者的重视。FXR 是一种胆汁酸核受体, 广泛分布在肝脏、小肠、结肠、肾脏和肝胆系统等组织中^[4]。它在胆汁酸代谢、脂质代谢、糖代谢、肝脏脂负荷、胆固醇合成以及炎症反应和氧化应激等多个生理过程中发挥关键作用^[5,6]。有研究表明, 激活 FXR 可以抑制炎症反应、调控细胞促炎因子的表达, 对炎症驱动的 IBD 具有保护作用^[7,8]。传统中药白头翁汤可促进 FXR 的水平, 改善肠道微生物的相对丰度, 并抑制 NF- κ B 的活性, 从而治疗 UC 小鼠^[9], 这引发

了关于 FXR 在 IBD 发展和治疗中的重要性的研究。

越来越多的研究表明, 天然产物对改善葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 诱导的小鼠急性结肠炎有着较好的疗效^[10-12]。其中, 五味子甲素 (schisandrin A, SchA) 是从木兰科植物五味子 (*Schisandra chinensis*) 果实中分离出的联苯环辛烯型木脂素, 已被广泛研究并显示出多种药理活性, 如抗炎、抗癌、保肝、抗氧化、神经保护、抗糖尿病等多种药理作用^[13]。五味子在传统中药中被广泛用作止咳剂, 滋补和镇静, 不仅如此, 其主要成分 SchA 也是美国膳食补充剂产品的成分之一^[14,15]。近年来, 有学者发现 SchA 能够抑制炎症细胞的浸润, 降低小鼠足爪水肿炎症模型中炎症因子 (TNF- α 和 IL-1 β) 的水平^[16]。SchA 还可通过降低炎症介质的水平, 并抑制丙二醛活性并增加超氧化物歧化酶活性, 以改善 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢嘧啶诱导的小鼠帕金森病^[17]。然而, 尚未有关于 SchA 在治疗 IBD 方面的研究报道。DSS 诱导小鼠结肠炎模型是一种常用的模拟 IBD 的实验模型^[18]。在这个背景下, 本研究旨在探讨 SchA 是否通过 FXR 信号通路参与对 DSS 诱导的结肠炎的治疗。

材料与amp;方法

实验动物 SPF 级 C57BL/6J 野生型雄性小鼠, 8~9 周龄, 体重 (22 ± 2 g), 购于上海吉辉实验动物饲养有限公司, 生产许可 SCXK (沪) 2022-0009。小鼠饲养于上海中医药大学实验动物中心, 使用许可 SYXK (沪) 2020-0009, 饲养条件为: 温度 20~25 °C, 相对湿度 45%~55%, 12 h 交替照明, 饲料、饮水新鲜无污染, 小鼠自由摄食、饮水。动物实验方案遵循上海中医药大学动物伦理委员会规定且通过批准 (批准号: PZSHUTCM2304250005)。

实验试剂 五味子甲素 (GR-138-260217, 南京广润); 柳氮磺胺吡啶 (sulfasalazine, SASP, S0883)、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS, L2630)、GW4064 (G5172) (美国 Sigma 公司); 右旋 DSS (S8634, 相对分子量: 36 000~50 000, 美国 MP Biomedicals 公司); DMEM 培养基、CCK-8 检测试剂盒、双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (货号分别为 MA0214、MA0812、MA0518, 大连美仑生物技术有限公司); 盐酸萘乙二胺、磺胺、磷酸 (货号分别为 M10623702、30172216、10015408, 国药集团化学试剂公司); 胎牛血清 (Z7181, 美国 Zeta Life 公司); Lipofectamine 3000 转染试剂盒 (CN2507605, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); RNAiso PLUS (9109, 北京宝日医生物技术有限公司); Evo M-MLV 反转录试剂盒 (AG11706, 湖南艾科瑞生物工程有限公司); SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒 (AG11718, 湖南艾科瑞生物工程有限公司); 白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 酶联免疫试剂盒、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 酶联免疫试剂盒、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 酶联免疫试剂盒 (货号分别为 EM30325S、EM30300S、EM30536S, 上海威奥生物科技有限公司)。

动物分组及造模 C57BL/6J 雄性小鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为 4 组 ($n = 6 \sim 8$): 正常对照组 (control)、模型组 (DSS)、阳性药组 (DSS+SASP, $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、五味子甲素组 (DSS+SchA, $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$); 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 3% DSS 溶液 7 天, 建立急性结肠炎小鼠模型。FXR 基因敲除 (knockout, KO) 纯合子 ($Fxr^{-/-}$) 近交系小鼠由美国希望之城国家医学研究中心黄文栋教授课题组捐赠, 并转移至上海中医药大学实验动物中心饲养, 经繁育获得 11 只雄性敲除小鼠用于实验, 将 FXR 敲除的 C57BL/6J 小鼠, 随机分为 3 组 ($n = 3 \sim 4$): 正常对照组 ($Fxr^{-/-}$ -control)、模型组 ($Fxr^{-/-}$ -DSS) 和五味子甲素组 ($Fxr^{-/-}$ -DSS+SchA, $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$); 正常组小鼠给予无菌水 7 天, 其余组小鼠给予自由饮用 3% 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 0.5% 羧甲基纤维素钠水溶液 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 °C 保存, 用于后续生化分析。

结肠病理学染色 切取远端结肠 (近肛门端结肠组织约 2 cm 处), 置于 4% 多聚甲醛固定液固定, 常规石蜡包埋后切片, 将薄片置于载玻片上, 脱蜡后, 按照说明书进行苏木精-伊红染色, 脱水、封片, 于光学显微镜下观察结肠组织形态变化。采取双盲法按照结肠病理损伤评分标准进行结肠黏膜损伤评分。具体评分标准如下^[19]: 炎性细胞浸润程度: 0 分: 无炎性细胞; 1 分: 轻度浸润; 2 分: 中度浸润; 3 分: 严重浸润; 组织损伤程度: 0 分: 无损伤; 1 分: 损伤至黏膜; 2 分: 损伤至黏膜及黏膜下层; 3 分: 损伤严重, 透壁。即每只小鼠病理损伤评分 = 炎性细胞浸润程度 + 组织损伤程度。

细胞实验 HEK-293T 细胞及 RAW264.7 细胞培养: 使用含 10% FBS 及 1% 双抗的 DMEM 培养基, 在含 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱进行常规培养。每两天换液一次, 当细胞在培养皿中覆盖率达到 80%~90% 时传代, 选择对数生长期的细胞进行实验, 实验操作均在生物安全柜中进行。

细胞增殖毒性检测实验 实验分成对照组和 SchA 组 (浓度分别为 1.25、2.5、5、10、20、50 和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 8 组, 每组 6 个复孔。将 RAW264.7 细胞悬液以每毫升 2×10^5 个细胞接种于 96 孔板中, 并在 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养至细胞完全贴壁, 弃去旧培养基, 并加入含有不同浓度的 SchA 的新培养基, 对照组加入等量新培养基, 给药 24 h 后, 加入 10% CCK-8 试剂溶液, 37 °C 孵育 30 min, 按照 CCK-8 试剂盒说明书, 使用酶标仪在 450 nm 波长下检测吸光度并计算细胞存活率。

一氧化氮 (nitric oxide, NO) 释放检测实验 实验开始前, 首先准备 Griess 试剂 A 和 B, 用于配置 Griess 试剂反应液。Griess 试剂 A 的制备: 将 50 mg 盐酸萘乙二胺溶解于 50 mL 双蒸水中; Griess 试剂 B 的制备: 将 500 mg 磺胺溶解于 50 mL 的 5% 磷酸中, 将制备好的 Griess 试剂 A 和 B 等体积混合, 组成 Griess 试剂反应液。实验分成对照组、模型组和 SchA 组 (浓度分别为

5、10、20 和 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 6 组, 每组 6 个复孔。将 RAW264.7 细胞以每毫升 2×10^5 个细胞接种于 96 孔板中, 并在 5% CO_2 的 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 24 h, 待细胞完全贴壁, 弃去旧培养基, 并加入含有不同浓度的 SchA 的新培养基, 对照组和模型组加入等量新培养基。给药 30 min 后, 模型组和 SchA 组每孔加入 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 溶液 1 μL , 对照组加入等量 PBS 缓冲液。LPS 刺激 24 h 后, 取细胞上清液与 Griess 试剂反应液各 50 μL 均匀混合, 使用酶标仪在 540 nm 下检测并计算各组 NO 释放量。

双荧光素酶报告基因检测实验 参照 Lipofectamine 3000 转染试剂盒说明, 将 HEK-293T 细胞按 25: 25: 50: 1 的比例共转染 hFXR、hRXR、EcRE-Luc 和 Renilla 质粒 6 h, 质粒由美国希望之城国家医学研究中心黄文栋教授课题组捐赠。用 GW4064 ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 SchA (浓度分别为 1.25、2.5、5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理转染后的 HEK-293T 细胞 24 h。收集细胞并按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书进行操作, 评估 SchA 对 FXR 的转录激活作用。

酶联免疫检测实验 按照酶联免疫试剂盒说明书进行操作, 反应板中加入 50 μL 标准品溶液和小鼠血清样本溶液, 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 50 min 后, 弃去液体并加入 100 μL 生物素化抗体工作液, 加入酶链亲和素生物素过氧化物酶复合物工作液 100 μL , 于 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 30 min, 最后加入 100 μL 显色液 37 $^\circ\text{C}$ 反应 20 min, 加入终止液 50 μL 混匀后, 使用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度, 检测并计算 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的含量。

实时荧光定量 PCR 实验 取结肠样本约 10 mg, 放于 1.5 mL EP 管中, 放入 2 颗 3 mm 钢珠和 1 mL Trizol 试剂, 于组织研磨仪中匀浆 (60 Hz, 120 s)。匀浆后, 加入 200 μL 氯仿, 上下颠倒混匀后静置 5 min, 于超高速离心机中离心 (4 $^\circ\text{C}$, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 15 min)。离心后吸取上层无色溶液 200 μL 于新的 EP 管中, 加入 200 μL 异丙醇并颠倒震荡混匀, 静置 10 min, 于超高速离心机中离心 (4 $^\circ\text{C}$, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min); 离心后弃上清, 向沉淀中加入 1 mL 75% 乙醇涡旋震荡混匀, 离心 (4 $^\circ\text{C}$, 7 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min), 弃上清重复 2 次, 第 2 次弃上清后, 于生物安全柜中挥干, 残留物加入 40 μL DEPC 处理水溶解, 得结肠组织总 RNA。使用微量分光光度计 NanoDrop2000 测定总 RNA 浓度和纯度。按照 Evo M-MLV 反转录试剂盒说明书, 配制反转录体系。采用 PCR 仪进行逆转录, 条件为: 37 $^\circ\text{C}$ 反应 15 min, 85 $^\circ\text{C}$ 反应 5 s, 所得 cDNA 于 -20 $^\circ\text{C}$ 保存备用。使用 QuantStudio 6 Flex 实时荧光定量 PCR 仪进行扩增反应, 根据仪器所测得的 C_t 值, 以 β -actin 为内参基

因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算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. *Il-6*: Interleukin 6; *Il-1 β* : Interleukin 1 beta; *Tnf- α* : Tumor necrosis factor α ; *Ibabp*: Intestinal bile acid-binding protein; *Fgf15*: Fibroblast growth factor 15; *Shp*: Small heterodimer partner; *Asbt*: Apical sodium-dependent bile acid transporter; *Osta*: Organic solute transporter α ; *Ost β* : Organic solute transporter β

Gene		Primer sequence (5'-3')
β -Actin	Forward	TGTCCACCTTCCAGCAGATGT
	Reverse	AGCTCAGTAACAGTCCGCCTAGA
<i>Il-6</i>	Forward	TTCCATCCAGTTGCCTTCTTG
	Reverse	ATCCTCTGTGAAGTCTCCTCTC
<i>Il-1β</i>	Forward	TTAGTCCCTCGGCAAGACAG
	Reverse	GGCAAGGAGGAAAACACAGG
<i>Tnf-α</i>	Forward	GCTGAGCTCAAACCCTGGTA
	Reverse	CTCAAAGTAGACCTGCCCG
<i>Ibabp</i>	Forward	TGGGGGCAACATTATGAGCA
	Reverse	ACGCGCTCATAGGTCACATC
<i>Fgf15</i>	Forward	GATTGCCATCAAGGACGTCAG
	Reverse	TCAGCCCCTATATCTTGCCG
<i>Asbt</i>	Forward	GTCTGTCCCCAAATGCAACT
	Reverse	CACCCCATAGAAAACATCACCA
<i>Shp</i>	Forward	CGATCCTCTCAACCCAGATG
	Reverse	AGGGCTCCAAGACTTCACACA
<i>Osta</i>	Forward	GAGGCTCCGCTTACTGTTTAG
	Reverse	GAGGTTTCTGTCCCGTATTGA
<i>Ostβ</i>	Forward	AGATGCGGCTCCTTGGAAATTA
	Reverse	TGGTGTCTTCTTCGATTCTG

统计学处理 使用 GraphPad Prism 9.0.1 软件进行统计学处理, 实验结果均以均数 \pm 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 SchA 增加 FXR 的转录活性, 抑制 LPS 诱导的巨噬细胞 NO 的释放

由于巨噬细胞在 IBD 的发病机制中扮演着关键角色, 因此本研究聚焦于 SchA 对巨噬细胞功能的影响, 包括对 NO 的释放和炎症因子 mRNA 水平的调控。首先, 细胞存活实验结果显示, SchA 在 1.25、2.5、5、10、20 和 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下对 RAW264.7 的细胞活力无明显影响 (图 1A)。进一步的实验表明, LPS 诱导激活的巨噬细胞会释放大量的 NO, 而 SchA 处理显著抑制了 NO 的释放 (图 1B)。考虑到 FXR 是 NF- κ B 的转录抑制因子, 本研究进一步探讨了 SchA 的抗炎活性是否与 FXR 有关。为了评估 SchA 对 FXR 功能的调控, 采用 HEK-293T 细胞转染人 FXR (hFXR) 质粒的实验。与 GW4064 (FXR 激动剂) 类似, SchA 显著增加了 HEK-293T 细胞中的 FXR 的转录活性 (图 1C)。这些结果表明, SchA

可以增加 FXR 的转录激活作用, 与抗炎机制相关。此外, SchA 处理显著抑制了 LPS 诱导的巨噬细胞中 *Il-6*、*Il-1 β* 和 *Tnf- α* mRNA 水平的增加 (图 1D~F)。这些结果表明, SchA 增加了 FXR 的转录活性并抑制了 LPS 诱导的巨噬细胞促炎功能的增加。

2 SchA 显著改善 DSS 诱导的小鼠急性溃疡性结肠炎

IBD 的一个常用实验模型是使用 DSS 诱导结肠炎, 其特征包括急性炎症和结肠溃疡, 类似于人类 UC 的典型临床症状^[20]。本研究探讨了 SchA 对 DSS 诱导的小鼠结肠炎的影响。与对照组相比, DSS 诱导的结肠炎小鼠表现出体重明显减轻、腹泻和直肠出血。而 SchA 处理显著改善了体重减轻 (图 2A), 并显著降低了疾病活动指数 DAI 评分 (图 2B)。进一步的结肠组织肉眼检查结果显示, 对照组结肠外观良好, 基本没有粘连和充血; DSS 组可观察到明显的结肠炎特征, 包括结肠充血较多, 肠黏膜和肌层严重变薄, 颜色变黑; 而 SchA 处理后, 小鼠结肠外观和形状都有明显改善。如图 2C、D 所示, 与对照组比较, DSS 组小鼠结肠长度明显缩短。经 SchA 治疗后, 结肠炎小鼠结肠长度增加。鉴于 IBD 是主要影响结肠或直肠的肠道炎症病变, 本研究拟以结肠病理学变化判断 SchA 对结肠炎症的改善作用。H&E 染色情况表明, 在对照组小鼠中, 结肠组织显示出正常的黏膜形态以及隐窝结构, 几乎没有出现炎症浸润; 在 DSS 诱导的小鼠中, 结肠组织表现出明显的黏膜溃疡, 隐窝丧失, 杯状细胞减少, 上皮损

伤和炎症浸润; 值得注意的是, SchA 和 SASP 处理后, 结肠肠道损伤情况显著改善, 特别是对于结肠部位的隐窝和杯状细胞的改善效果几乎相同 (图 2E、F)。上述结果表明, SchA 显著减轻 DSS 诱导的 UC 小鼠的疾病症状。

3 SchA 显著抑制结肠炎小鼠炎症反应

为了评估 DSS 诱导的小鼠的炎症严重程度, 本研究通过 RT-PCR 测定结肠组织中 *Il-6*、*Il-1 β* 和 *Tnf- α* 的表达。与正常小鼠相比, 仅暴露于 DSS 的小鼠结肠组织中 *Il-6*、*Il-1 β* 和 *Tnf- α* 的 mRNA 表达增加 (图 3A~C)。然而, 用 SchA 和 SASP 处理导致 DSS 诱导的小鼠中这些炎症细胞因子 mRNA 表达明显下降 (图 3A~C)。如图 3D、E 所示, 与 DSS 组相比, SchA 和 SASP 处理后, 小鼠血清中 IL-6 和 IL-1 β 显著降低; 相较于对照组, DSS 诱导后的小鼠血清中 TNF- α 的含量显著升高, 而给药 SchA 后, 血清中 TNF- α 的水平显著降低 (图 3F)。以上结果明确显示, SchA 可抑制 UC 小鼠炎症反应。

4 SchA 对结肠组织中 FXR 下游靶基因 mRNA 水平的调节作用

为了深入揭示 SchA 在结肠炎治疗中的分子机制, 本研究主要关注 SchA 对结肠组织中 FXR 下游靶基因的 mRNA 表达水平的调节作用, 包括顶端钠离子依赖性胆汁酸转运体 (apical sodium-dependent bile acid transporter, *Asbt*)、有机溶质转运体 α (organic solute transporter α , *Osta*)、有机溶质转运体 β (organic solute

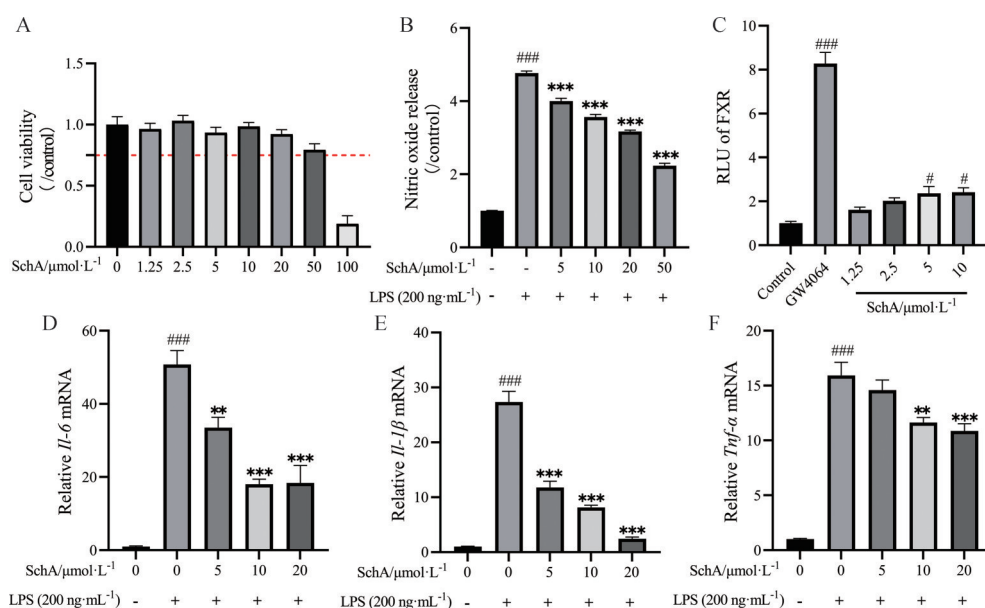


Figure 1 Schisandrin A (SchA) increases farnesoid X receptor (FXR) transcriptional activity and inhibits lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide release in macrophages. A: Evolution of cell viability in RAW264.7 cells; B: The nitric oxide release was assessed in RAW264.7 cells; C: The FXR transcriptional activity was measured using dual-Glo luciferase reporter assay in HEK-293T cells; D-F: The mRNA expressions of *Il-6*, *Il-1 β* and *Tnf- α* in RAW264.7 cells were determined by RT-PCR. $n = 3-6$, mean \pm SEM. # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ vs model group

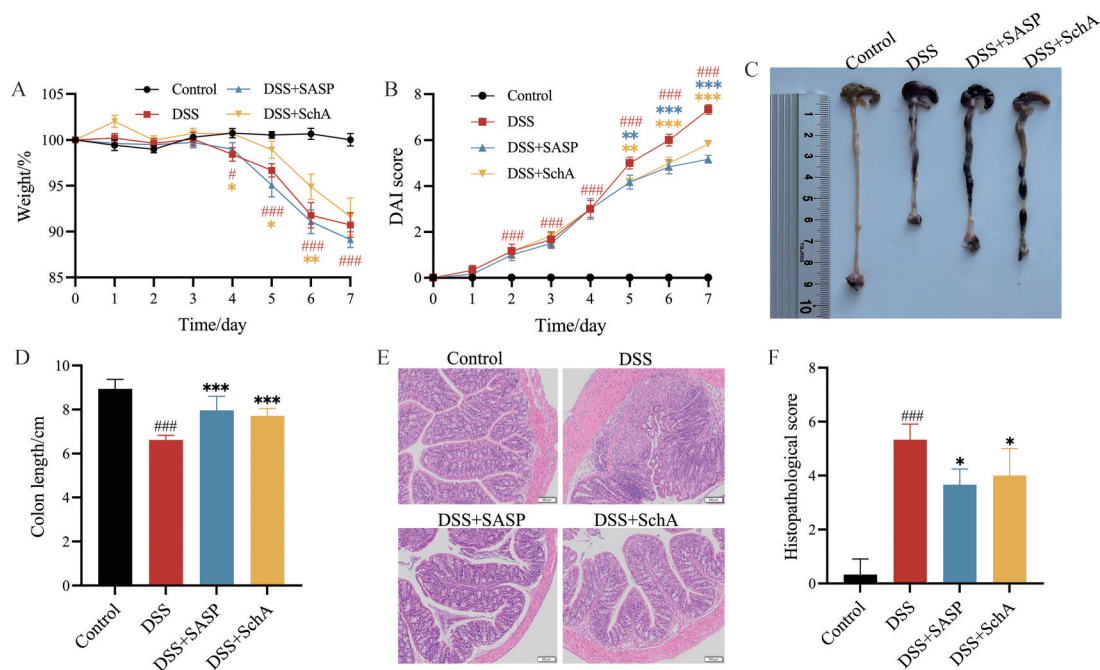


Figure 2 SchA significantly ameliorates dextran sodium sulfate (DSS)-induced acute ulcerative colitis in mice. A: Evolution of body weight gain during the experiment (day 0–7); B: Daily disease activity index (DAI) in DSS-induced experimental groups; C: Colon images; D: Colon length quantization; E: The histopathological changes in the colon tissue samples were examined by H&E staining, scale bar =100 μ m; F: Histopathological score. $n = 6-8$, mean \pm SEM. $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#\#}P < 0.001$ vs control group; $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs model group

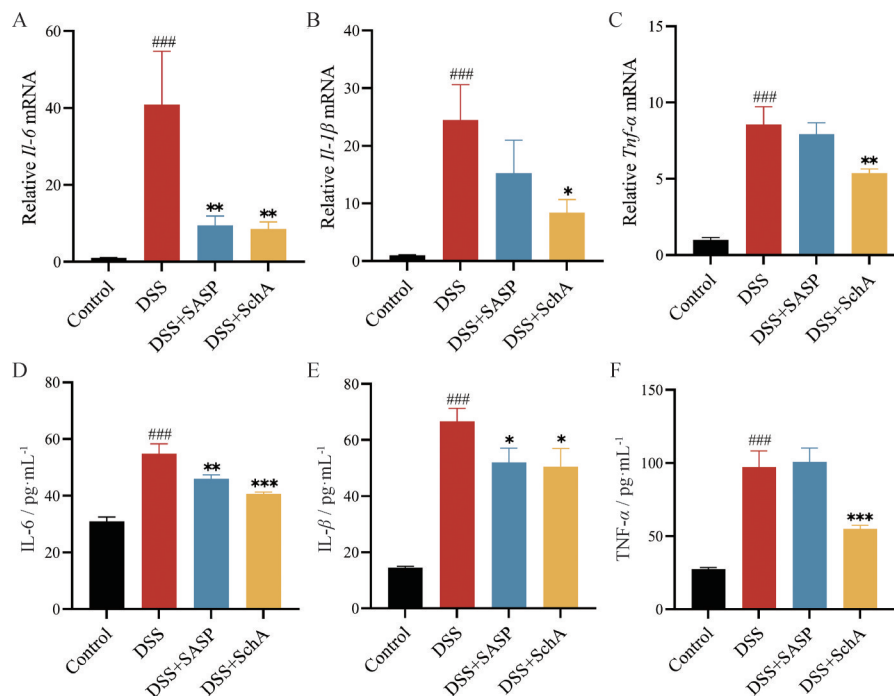


Figure 3 SchA significantly inhibits inflammatory response in colitis mice. A–C: Relative expressions of *Il-6*, *Il-1 β* and *Tnf- α* were assessed by RT-PCR; D–F: The level of IL-6, IL-1 β and TNF- α in serum. $n = 6-8$, mean \pm SEM. $^{\#\#\#}P < 0.001$ vs control group; $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs model group

transporter β , *Ost* β)、回肠胆汁酸结合蛋白 (intestinal bile acid-binding protein, *Ibabp*)、成纤维生长因子 15 (fibroblast growth factor 15, *Fgf15*) 和小异源二聚体伴

侣 (small heterodimer partner, *Shp*)。实验观察到 DSS 模型组和 SchA 给药组在 *Asbt* 和 *Osta* 这些基因的表达水平上没有明显改变 (图 4A、B)。尽管 DSS 模型组没

有显著降低 *Ostβ* 和 *Ibabp* 的 mRNA 水平, 但 SchA 给药后显著增加二者的 mRNA 水平 (图 4C、D)。然而, 值得注意的是, DSS 模型组中 *Fgf15* 和 *Shp* 的 mRNA 水平出现显著下调, 而 SchA 给药后成功逆转了 *Fgf15* 和 *Shp* 的 mRNA 水平, 如图 4E、F 所示。有研究表明, *Fgf15* 和 *Shp* 可以抑制炎症反应^[21,22], 而这一系列结果表明, SchA 在结肠组织中通过激活 FXR 从而增加下游靶基因的表达, 特别是 *Fgf15* 和 *Shp* 的表达, 从而参与了结肠炎的治疗机制。这些发现为进一步解析 SchA 的分子机制以及其在结肠炎治疗中的潜在应用提供了重要线索。

5 FXR 的缺失削弱了 SchA 改善结肠炎的效果

为了深入研究 SchA 在治疗急性结肠炎中是否依赖于核受体 FXR 的作用, 本研究进行了 FXR 缺失小鼠实验, 分为 *Fxr*^{-/-}-control 组、*Fxr*^{-/-}-DSS 组和 *Fxr*^{-/-}-DSS+SchA 组。首先, 对这些小鼠的体重变化、疾病活动指数 (DAI) 评分以及结肠长度进行了详细的测量和分析。如图 5A 所示, *Fxr*^{-/-}-DSS 组的小鼠体重下降百分比明显高于 *Fxr*^{-/-}-control 组, 表明结肠炎引发了明显的体重减轻。令人关注的是, 在给予 SchA 治疗后, 并没有观察到体重改善的趋势, 这暗示 FXR 的缺失可能阻断了 SchA 的治疗效果。进一步的分析结果显示, DAI 评分也未呈现出明显的变化趋势 (图 5B), 强调了 FXR 缺失对 SchA 的治疗效果的抑制作用。此外, *Fxr*^{-/-}-

DSS 组和 *Fxr*^{-/-}-DSS+SchA 组之间的结肠长度也未显示出改善趋势 (图 5C、D)。而且实验观察到 FXR 的缺失明显抑制了 SchA 对结肠炎小鼠肠道损伤的改善和抗炎作用。H&E 染色结果表明, 在 *Fxr*^{-/-}-control 小鼠中, 结肠组织呈现出正常的黏膜形态和隐窝结构。然而, 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。令人注意的是, SchA 处理未能改善结肠组织的病理结构损伤情况 (图 5E、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 *Fxr*^{-/-}-control 组相比, 仅暴露于 DSS 的小鼠结肠组织中 *Il-6*、*Il-1β* 和 *Tnf-α* 的 mRNA 表达明显增加。然而, SchA 处理后并不能显著降低这些炎症细胞因子的 mRNA 表达 (图 5G)。这些结果明确突显了 FXR 在 SchA 治疗结肠炎过程中的关键作用。

总之, 这些数据明确验证了 SchA 治疗 UC 的潜力, 而 FXR 的缺失显著削弱了 SchA 对结肠炎的治疗效果, 这证实了 SchA 通过激活 FXR 信号通路来改善结肠炎的机制, 为进一步研究 SchA 作为治疗 UC 的潜在药物提供了坚实的实验依据。

讨论

目前, IBD 的发病率在全球范围内呈上升趋势^[1]。

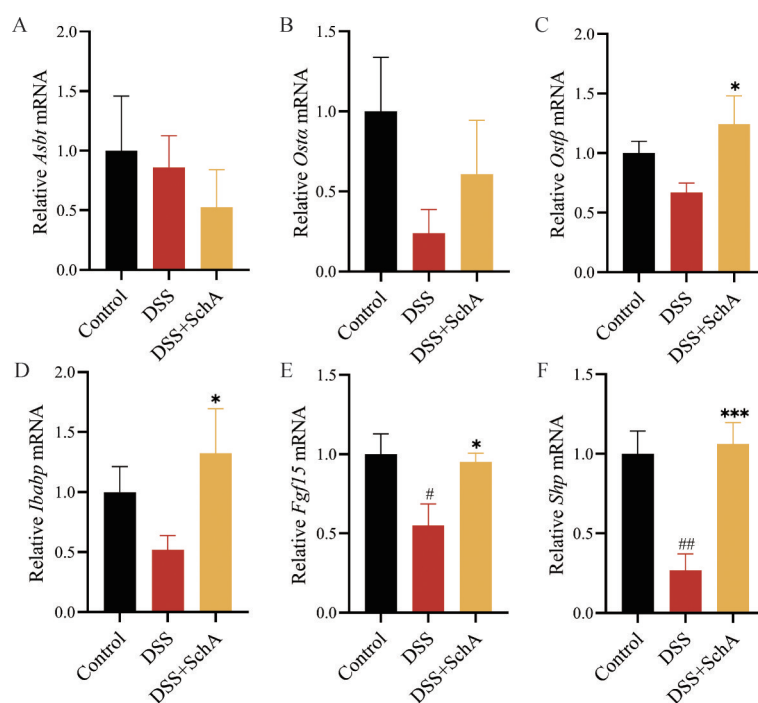


Figure 4 The modulation of mRNA expression levels of FXR downstream target genes within the colon tissues by SchA. A–F: The mRNA expressions of *Asbt* (A), *Osta* (B), *Ostβ* (C), *Ibabp* (D), *Fgf15* (E) and *Shp* (F) in colon tissues were determined by RT-PCR. $n = 6-8$, mean \pm SEM. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs model group

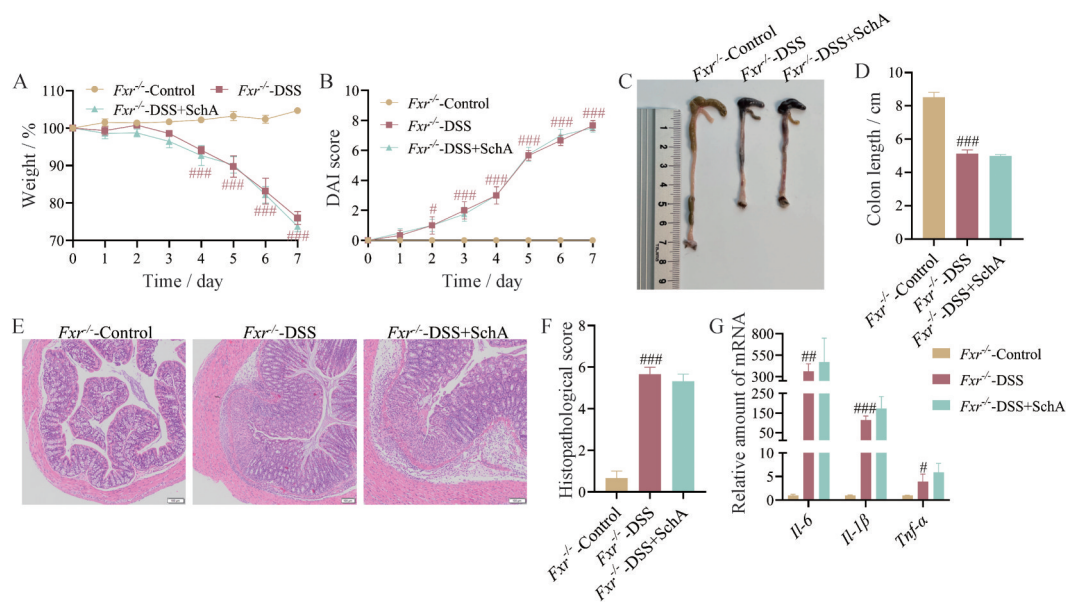


Figure 5 The absence of FXR diminishes the efficacy of SchA in ameliorating colitis. A: Evolution of body weight gain during the experiment (day 0–7); B: DAI in DSS-induced experimental groups; C: Colon images; D: Colon length quantization; E: The histopathological changes in the colon tissue samples were examined by H&E staining, scale bar =100 μm; F: Histopathological score; G: Relative expressions of *Il-6*, *Il-1β* and *Tnf-α* were assessed by RT-PCR. *n* = 3–4, mean ± SEM. **P* < 0.05, ###*P* < 0.01, ###*P* < 0.001 vs control group

因此,迫切需要开发有效的IBD治疗药物。先前的研究表明,传统中药如五味子可以通过抑制TLR4/NF-κB/NLRP3炎症小体途径减轻DSS诱导的小鼠结肠炎症^[23]。此外,五味子多糖可以通过调节肠道微生物群和抑制NF-κB活化对DSS诱导的小鼠急性结肠炎发挥保护作用^[24]。SchA被认为在许多疾病中起抗炎作用,如哮喘、慢性阻塞性肺病和脓毒症^[25-27]。基于SchA在其他疾病中呈现一定的抗炎作用,本课题组拟开展研究SchA对IBD的改善作用及其机制。

在许多IBD研究中,促炎细胞因子(IL-1β、IL-6和TNF-α)已被用于测量炎症水平^[28]。正如预期的那样,SchA在体外降低了LPS诱导的RAW264.7细胞中*Il-1β*、*Il-6*和*Tnf-α*的mRNA水平,表明SchA具有减轻肠道炎症的潜在能力。因此,本课题组随后探讨了其在体内IBD模型上的治疗效果。DSS诱导的小鼠的特征是体重减轻,稀便,腹泻,甚至直肠出血。因此,DSS诱导的小鼠经常被用作IBD的动物模型,包括UC和CD^[18]。本研究一致地显示出DSS诱导的小鼠体重减轻、结肠缩短和DAI增加等症状。在这项研究中,与DSS诱导的小鼠相比,SchA处理的小鼠表现出结肠长度显著增加。此外,DSS诱导的小鼠表现出结肠组织的病理损伤,包括结肠充血、肠黏膜溃疡、隐窝丧失和肌层严重变薄等,而SchA能够逆转DSS诱导的这种损伤。本研究揭示了SchA可以逆转DSS诱导的UC症状。

FXR还在许多免疫细胞中表达,如自然杀伤细胞和巨噬细胞等,因此,FXR功能对研究炎症具有重要价值^[29,30]。有研究表明,在结肠炎小鼠模型中,发现炎症结肠黏膜中*Fxr*的mRNA表达下调^[31]。与野生型小鼠相比,FXR缺失的小鼠容易发生肠道炎症,FXR敲除小鼠模型的上皮屏障完整性降低,并且观察到巨噬细胞浸润升高、炎症细胞因子表达增加。相反,巨噬细胞中FXR的激活抑制了NF-κB依赖的促炎因子的产生,如IL-6、IL-1β和TNF-α。在2,4,6-三硝基苯磺酸和DSS诱导的小鼠结肠炎模型中,通过应用奥贝胆酸激活FXR可缓解结肠炎,但不能缓解FXR敲除小鼠的结肠炎^[7,31]。这些结果表明,FXR是肠道先天免疫的调节剂,并可能通过免疫活性影响IBD,FXR激活可抑制炎症反应并减轻IBD中的肠道损伤^[32],而FXR敲除后会加重IBD。

FXR的激活或抑制可以对代谢稳态有显著影响,已有研究提出使用FXR配体治疗胆汁淤积、炎症性肝病等。同时,激活肠道FXR已被认知参与肠道免疫调节和屏障功能,抑制肠道炎症以维持肠道屏障的完整性和功能^[33];FXR在不同水平和多个器官中调节炎症的作用及其与免疫系统相互作用的能力已成为人们关注的焦点。因此,FXR激动剂有望成为更有前景的IBD治疗药物。通过靶向FXR信号通路来改善炎症代表了IBD的一个有吸引力的概念。激活FXR可能是治疗IBD及其并发症的治疗策略。因此,本研究

进一步评估了 SchA 在改善 IBD 中肠道炎症反应的影响。结果提示, SchA 抑制了炎症反应, 导致结肠组织 *Il-1 β* 、*Il-6* 和 *Tnf- α* 的 mRNA 水平降低。同时, 在体外 SchA 处理后 FXR 转录活性增加。为了进一步研究 SchA 在治疗急性结肠炎中是否依赖于 FXR 的作用, 本研究在 FXR 敲除小鼠中研究了 SchA 对 DSS 诱导的小鼠急性结肠炎的作用, 发现 FXR 的缺失显著削弱了 SchA 对小鼠急性结肠炎疾病症状、炎症反应和肠道损伤的改善。

本研究发现 SchA 可以通过激活 FXR 来改善小鼠结肠炎, 证实了 SchA 对 IBD 的保护作用, 并证明了 FXR 是 SchA 治疗 IBD 的有效治疗靶点, 也为 SchA 的临床应用提供了新的实验依据。

作者贡献: 蒋嘉瑞、丁丽丽和王旭设计实验; 蒋嘉瑞、董跨、金玉春、杨心茹、罗亦轩、徐书扬、王汛江进行实验数据采集与分析; 蒋嘉瑞、王旭、谷丽华、石燕红、杨莉、丁丽丽和王峥涛撰写、修改论文。

利益冲突: 本文的发表不存在任何利益冲突。

References

- [1] Kaplan GG, Windsor JW. The four epidemiological stages in the global evolution of inflammatory bowel disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18: 56-66.
- [2] Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14: 329-342.
- [3] Ng SC, Shi HY, Hamidi N, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies [J]. *Lancet*, 2017, 390: 2769-2778.
- [4] Huber RM, Murphy K, Miao B, et al. Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters [J]. *Gene*, 2002, 290: 35-43.
- [5] Koutsounas I, Theocharis S, Delladetsima I, et al. Farnesoid X receptor in human metabolism and disease: the interplay between gene polymorphisms, clinical phenotypes and disease susceptibility [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2015, 11: 523-532.
- [6] Zhou M, Wang D, Li X, et al. Farnesoid-X receptor as a therapeutic target for inflammatory bowel disease and colorectal cancer [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1016836.
- [7] Gadaleta RM, van Erpecum KJ, Oldenburg B, et al. Farnesoid X receptor activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in inflammatory bowel disease [J]. *Gut*, 2011, 60: 463-472.
- [8] Fu T, Li Y, Oh TG, et al. FXR mediates ILC-intrinsic responses to intestinal inflammation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119: e2213041119.
- [9] Hua YL, Jia YQ, Zhang XS, et al. Baitouweng Tang ameliorates DSS-induced ulcerative colitis through the regulation of the gut microbiota and bile acids *via* pathways involving FXR and TGR5 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 137: 111320.
- [10] Kang Z, Zhao H, Wang M, et al. Effects of curcumin on memory follicular T cells in obese mice with colitis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 2068-2076.
- [11] Yuan L, Lian Z, Luo L, et al. Xinhui citrus fermentation liquor ameliorates acute ulcerative colitis in mice *via* regulating intestinal bacteria homeostasis and Nrf2/NLRP3 pathway to repair intestinal mucosa [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 3513-3523.
- [12] Wang X, Zhu M, Dong S, et al. Paeoniflorin regulates gut microbiota and bile acids metabolism in colitis mice [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 1811-1819.
- [13] Fu K, Zhou H, Wang C, et al. A review: pharmacology and pharmacokinetics of schisandrin A [J]. *Phytother Res*, 2022, 36: 2375-2393.
- [14] Xu M, Wang G, Xie H, et al. Pharmacokinetic comparisons of schizandrin after oral administration of schizandrin monomer, Fructus Schisandrae aqueous extract and Sheng-Mai-San to rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 115: 483-488.
- [15] Böhmer V, Meshcheryakov D, Thondorf I, et al. 3-Oxa-6,8-diaza-1,2:4,5-dibenzocycloocta-1,4-dien-7-one: a three-dimensional network assembled by hydrogen-bonding, pi-pi and edge-to-face interactions [J]. *Acta Crystallogr C*, 2004, 60: o136-o139.
- [16] Cui L, Zhu W, Yang Z, et al. Evidence of anti-inflammatory activity of schizandrin A in animal models of acute inflammation [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2020, 393: 2221-2229.
- [17] Zhi Y, Jin Y, Pan L, et al. Schisandrin A ameliorates MPTP-induced Parkinson's disease in a mouse model *via* regulation of brain autophagy [J]. *Arch Pharm Res*, 2019, 42: 1012-1020.
- [18] Kim JJ, Shajib MS, Manocha MM, et al. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD [J]. *J Vis Exp*, 2012, (60): 3678.
- [19] Schmidt N, Gonzalez E, Visekruna A, et al. Targeting the proteasome: partial inhibition of the proteasome by bortezomib or deletion of the immunosubunit LMP7 attenuates experimental colitis [J]. *Gut*, 2010, 59: 896-906.
- [20] Dong S, Zhu M, Wang K, et al. Dihydromyricetin improves DSS-induced colitis in mice *via* modulation of fecal-bacteria-related bile acid metabolism [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 171: 105767.
- [21] Takagane K, Umakoshi M, Itoh G, et al. SKAP2 suppresses inflammation-mediated tumorigenesis by regulating SHP-1 and SHP-2 [J]. *Oncogene*, 2022, 41: 1087-1099.
- [22] Li X, Zhu Z, Xia Z, et al. FGF15 protects septic mice by inhibiting inflammation and modulating treg responses [J]. *J Inflamm Res*, 2022, 15: 6187-6197.
- [23] Guo X, Liu L, Zhao W, et al. The protective effect of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. polysaccharide on DSS-induced ulcerative

- colitis in mice *via* the modulation of gut microbiota and inhibition of NF- κ B activation [J]. *J Sci Food Agric*, 2024, 104: 196-206.
- [24] Bian Z, Qin Y, Li L, et al. *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. protects against DSS-induced colitis in mice: involvement of TLR4/NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway and gut microbiota [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 298: 115570.
- [25] Zeng J, Liao S, Liang Z, et al. Schisandrin A regulates the Nrf2 signaling pathway and inhibits NLRP3 inflammasome activation to interfere with pyroptosis in a mouse model of COPD [J]. *Eur J Med Res*, 2023, 28: 217.
- [26] Qiu Q, Zhang W, Liu K, et al. Schisandrin A ameliorates airway inflammation in model of asthma by attenuating Th2 response [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 953: 175850.
- [27] You LJ, Li PW, Zhang WW, et al. Schisandrin A ameliorates increased pulmonary capillary endothelial permeability accompanied with sepsis through inhibition of RhoA/ROCK1/MLC pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 118: 110124.
- [28] Breugelmans T, van Spaendonk H, de Man JG, et al. In-depth study of transmembrane mucins in association with intestinal barrier dysfunction during the course of T cell transfer and DSS-induced colitis [J]. *J Crohns Colitis*, 2020, 14: 974-994.
- [29] Li WT, Luo QQ, Wang B, et al. Bile acids induce visceral hypersensitivity *via* mucosal mast cell-to-nociceptor signaling that involves the farnesoid X receptor/nerve growth factor/transient receptor potential vanilloid 1 axis [J]. *FASEB J*, 2019, 33: 2435-2450.
- [30] Fiorucci S, Zampella A, Ricci P, et al. Immunomodulatory functions of FXR [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2022, 551: 111650.
- [31] Vavassori P, Mencarelli A, Renga B, et al. The bile acid receptor FXR is a modulator of intestinal innate immunity [J]. *J Immunol*, 2009, 183: 6251-6261.
- [32] Ding L, Yang L, Wang Z, et al. Bile acid nuclear receptor FXR and digestive system diseases [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5: 135-144.
- [33] Paik D, Yao L, Zhang Y, et al. Human gut bacteria produce T_H17-modulating bile acid metabolites [J]. *Nature*, 2022, 603: 907-912.