

## 柿叶提取物通过 TLR4/NLRP3 炎症信号通路和肠道菌群治疗 溃疡性结肠炎的机制研究

张雪侠<sup>1,2</sup>, 刘方洲<sup>1</sup>, 梁瑞峰<sup>1</sup>, 周敏<sup>3</sup>, 刘长河<sup>1,2</sup>, 李华妮<sup>1,2</sup>, 郭晓燕<sup>1</sup>

(1 河南省中医药研究院, 郑州 450004; 2 河南省中药制剂工程技术研究中心, 郑州 450004;

3 郑州大学, 郑州 450001)

**[摘要]** **目的:** 鉴定柿叶提取物中黄酮类成分, 从 TLR4/NLRP3 炎症信号通路和肠道菌群角度探究对溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 的作用机制。**方法:** 利用 HPLC 法对柿叶 (persimmon leaf, PL) 提取物中 5 个黄酮类成分进行含量测定。采用 3% 葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 构建小鼠 UC 模型。每天记录小鼠体质量和饮水量。Elisa 法检测血清 IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 水平, HE 染色观察结肠组织的变化, Western blot 法检测结肠组织中 TLR4, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B p65 和 NLRP3 蛋白的表达, 16S rDNA 扩增子测序法检测粪便中肠道菌群的变化。**结果:** 与 Control 组相比, DSS 组小鼠体质量、结肠长度、IL-10 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 疾病活动指数和 IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  水平升高 ( $P < 0.01$ )。与 DSS 组相比, 给药组小鼠体质量下降缓慢, 结肠长度延长, 疾病活动指数降低; IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), IL-10 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); TLR4/NLRP3 相关蛋白表达显著上升 ( $P < 0.01$ ); PL 给药组 TLR4, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B p65, NLRP3 蛋白表达降低 ( $P < 0.01$ ); 16S rDNA 扩增子测序法结果显示鼠乳杆菌、约氏乳杆菌、罗姆布茨菌、艾克曼菌种均有增加的趋势。病理结果显示 DSS 组小鼠可见结肠组织有严重的黏膜溃疡、隐窝丧失、炎性细胞浸润和杯状细胞耗竭, 给药后小鼠结肠组织病变得改善。HPLC 法分离度好、准确度高。**结论:** 柿叶提取物对 DSS 诱导的 UC 小鼠肠道损伤有保护作用, 可能与抑制 TLR4/NLRP3 炎症信号通路降低炎症反应从而改善肠道微环境有关。

**[关键词]** 柿叶; 溃疡性结肠炎; TLR4/NLRP3 信号通路; 肠道菌群

**[中图分类号]** R965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)15-1561-09

## Mechanism on persimmon leaf extract in the treatment of ulcerative colitis through TLR4/NLRP3 inflammatory signal pathway and intestinal flora

ZHANG Xue-xia<sup>1,2</sup>, LIU Fang-zhou<sup>1</sup>, LIANG Rui-feng<sup>1</sup>, ZHOU Min<sup>3</sup>, LIU Chang-he<sup>1,2</sup>,  
LI Hua-ni<sup>1,2</sup>, GUO Xiao-yan<sup>1</sup>

(1 Henan Academy of Chinese Medicine, Zhengzhou 450004, China; 2 Henan Engineering Research

Center of Traditional Chinese Medicine Preparation, Zhengzhou 450004, China;

3 Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To identify the flavonoids in persimmon leaf (PL) extract, and to explore the mechanism of the action on ulcerative colitis (UC) from the perspective of TLR4/NLRP3 inflammatory signal pathway and intestinal flora. **Methods:** HPLC was used to determine the five flavonoids in persimmon leaf extract. The animal model of UC mice was established by 3% dextran sulfate sodium (DSS). The body weight and drinking volume of the mice were measured daily. The detection of IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10 in the serum of the mice

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目 (81873022); 河南省科技攻关计划项目 (202102310501); 河南省医学科技攻关计划项目 (LHGJ20190831); 河南省中医专项 (2018ZY2028, 2019ZY2106, 20-21ZY2265)

**[作者简介]** 张雪侠, 女, 助理研究员, 主要从事中药药效物质基础和机制研究。E-mail: 349433357@qq.com。

were measured by Elisa kit, the changes of colon tissue were observed by HE staining, the expression levels of TLR4, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B p65 and NLRP3 proteins in the colon tissues were determined by western blot, and the changes of intestinal flora in feces were detected by 16S rDNA amplification sequencing. **Results:** The body weight, colon length and IL-10 level in DSS group were significantly lower than that in control group ( $P < 0.01$ ). The disease activity index and the levels of IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in DSS group were significantly increased ( $P < 0.01$ ) compared with the control group. Compared with the DSS group, the body weight decreased slowly, the colon length prolonged and the disease activity index decreased in the treated group, the levels of IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  significantly reduced ( $P < 0.01$ ) and IL-10 significantly increased ( $P < 0.01$ ). The expression levels of TLR4/NLRP3-related proteins significantly increased ( $P < 0.01$ ), the expression levels of TLR4, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B p65 and NLRP3 proteins significantly decreased ( $P < 0.01$ ). The results of 16S rDNA amplification sequencing showed that *Lactobacillus murinus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Romboutsia* and *Akkermansia muciniphila* had an increasing trend in the treated group. The pathological results showed that there were severe mucosal ulcer, crypt loss, inflammatory cell infiltration and goblet cell depletion in colon tissue of mice in DSS group and the pathological changes of colon tissue in mice were improved after administration. The HPLC method has good separation degree and high accuracy. **Conclusions:** Persimmon leaf extract has protective effect on intestinal injury in DSS-induced UC mice. It may improve the intestinal microenvironment by inhibiting TLR4/NLRP3 inflammatory signal pathway and relieving inflammation.

[**Key words**] persimmon leaf; ulcerative colitis; TLR4/NLRP3 signal pathway; intestinal flora

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 在我国发病率逐渐升高, 其发病机制尚不明确。结肠炎症反应是 UC 的重要病理特征, 因此, 抑制炎症成为 UC 主要的治疗策略之一。Nod 样受体蛋白 3 (Nod-like receptor protein 3, NLRP3) 主要由 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 识别胞外病原体, 通过下游信号分子激活核转录因子- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B), 最终诱导 NLRP3 和白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 前体的表达<sup>[1-3]</sup>。研究表明, 肠道菌群失调是导致肠黏膜损伤和上皮细胞免疫障碍的重要因素, 其可能通过改变炎症细胞因子的分泌, 增加了炎症对 UC 的易感性<sup>[4-5]</sup>。

柿叶 (persimmon leaf, PL) 为柿树科植物柿 (*Diospyros kaki* Thunb.) 的新鲜或干燥叶, 柿叶的药理作用记载于《滇南本草》“经霜叶敷疔疮”。有报道, UC 患者体内 TLR4/NLRP3 炎症信号通路被激活<sup>[6]</sup>, 可抑制 NLRP3 被激活<sup>[7]</sup>。目前, 柿叶在 UC 方面的研究未见报道, 前期发现柿叶对 UC 小鼠有治疗作用, 其是否通过 TLR4/NLRP3 通路改善肠道菌群发挥作用未见报道, 本研究对柿叶治疗 UC 的机制进行探究, 为临床应用提供新的思路。

## 材料与方 法

### 1 动物

40 只 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 购于辽宁长生

生物技术股份有限公司, 饲养于河南省实验动物中心。合格证号: 210726211101645858; 实验动物生产许可证号: SCXK(辽)2020-0001; 实验单位使用许可证号: SYXK(豫)2019-0001。该动物实验符合动物伦理学标准, 并得到郑州大学实验动物中心福利伦理委员会的批准, 批准编号: 22u-LAC20211224[07]。

### 2 药品及试剂

对照品槲皮素 (HPLC  $\geq 99.1\%$ , 批号: 100081-201610)、山柰酚 (HPLC  $\geq 98.0\%$ , 批号: 6081)、异槲皮素 (HPLC  $\geq 98.0\%$ , 批号: 25004-202011)、紫云英苷 (HPLC  $\geq 98.0\%$ , 批号: 3975)、金丝桃苷 (HPLC  $\geq 98.0\%$ , 批号: 102628) 均购自中国食品药品鉴定研究院; 供试品柿叶原材料购于安徽亳州药材市场, 经河南省中医药研究院刘长河副研究员鉴定为柿树科植物柿 (*Diospyros kaki* Thunb.) 的干燥叶; 磷酸、乙腈为色谱纯; 水为超纯水; 其余试剂均为分析纯。葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 购于美国 Mpbio 公司; 白介素-6 (IL-6) Elisa 试剂盒 (Solarbio 公司, 批号: 20210418); 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) Elisa 试剂盒 (Solarbio 公司, 批号: 20210324); IL-1 $\beta$  Elisa 试剂盒 (Solarbio 公司, 批号: 202100406); IL-10 Elisa 试剂盒 (Solarbio 公司, 批号: 20210408); TLR4 一抗 (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号: 10005626); NLRP3 一抗 (美国 Abcam 公司, 批号: 10003094); IL-1 $\beta$  一抗 (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号: 10001806);

NF- $\kappa$ B p65 一抗 (Bioss 公司, 批号: AR07256051); GAPDH 一抗 (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号: 11020004); 鼠二抗 (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号: 20201218); 兔二抗 (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号: 20210328), 异氟烷 (上海玉研科学仪器有限公司, 批号: S10010533)。

### 3 仪器

高效液相色谱仪 (Thermo Fisher Scientific 公司); 十万分之一天平 (瑞士 Mettler 公司); 超声波清洗机 (宁波新芝生物科技有限公司); 倒置显微镜 (日本 OLYMPUS 公司); 脱水机 (DIAPATH 公司); 石蜡包埋机、病理切片机 (德国 Leica 仪器有限公司); 组织摊片机 (金华市科迪仪器设备有限公司); 小动物麻醉机 (上海玉研科学仪器有限公司)。

### 4 柿叶提取物制备、方法学考察及样品测定

称取柿叶粗粉, 加 10 倍量 70% 乙醇浸泡 2 h 后, 回流提取 2 次, 每次 1 h, 滤过, 合并 2 次滤液, 减压回收乙醇至无醇味, 滤过, 滤液过 AB-8 大孔吸附树脂柱。上样药液浓度为  $0.6 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 药液: 树脂体积为 1:5, 树脂径高比 1:10, 先用 4 倍柱体水洗脱, 再用 4 倍柱体积 10% 乙醇洗脱, 然后用 50% 乙醇洗脱总黄酮, 收集 50% 乙醇洗脱液, 减压回收乙醇,  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$  干燥即得, 500 g 柿叶提取得到 15 g 柿叶提取物干粉, 出膏率为 3%。采用 HPLC 对提取物进行成分含量测定和方法学考察。

### 5 动物模型建立、分组与药物配制

本实验采用 3% DSS 诱导 UC 模型, 实验分组为对照组 (Control 组)、模型组 (DSS 组, 3% DSS)、柿叶提取物低剂量组 (PL-L,  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、高剂量组 (PL-H,  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 每组 10 只。DSS 组、PL-L 组和 PL-H 组小鼠自由饮 3% DSS 溶液 7 d 造模, 同时 PL-L 组和 PL-H 组分别给予相应剂量的柿叶提取物, 给药体积为  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 连续 7 d, 末次给药 2 h 后, 异氟烷麻醉, 小鼠眼球采血, 留取血清, 截取小鼠结肠组织, 取出其中的粪便进行肠道菌群检测, 结肠组织一部分多聚甲醛固定、一部分  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冻存。

药物配制: 称取 0.2 g 柿叶提取物, 用 0.3% 的 CMC-Na 定容至 10 mL, 所得混悬液即为柿叶提取物高剂量组 ( $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 相当于  $6.67 \text{ g 生药} \cdot \text{kg}^{-1}$ ; 称取 0.1 g 柿叶提取物, 用 0.3% 的 CMC-Na 定容至 10 mL, 所得混悬液即为柿叶提取物低剂量组 ( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 相当于  $3.38 \text{ g 生药} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

### 6 各组小鼠体质量、饮水量、结肠长度以及疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 变化

实验过程中每天记录小鼠的体质量、饮水量; 末次给药后, 留取结肠组织进行长度测量, 粪便性状及血便数据, 计算 DAI:  $\text{DAI} = (\text{体质量下降分数} + \text{大便性状分数} + \text{血便分数}) / 3$ <sup>[8]</sup>。评分标准见表 1。

表 1 DAI 评分表

体质量减轻	大便性状	血便	评分
无	正常	无血	0
1% ~ 5%	粪便较软	—	1
5% ~ 10%	粪便湿软	阳性隐血	2
10% ~ 20%	半稀便	—	3
> 20%	稀便	明显便血	4

### 7 各组小鼠病理形态学观察

取材留取的结肠组织, 用不同浓度的乙醇进行脱水, 石蜡包埋, 切片, 脱蜡, 染色, 脱水, 封片, 在显微镜观察分析。

### 8 结肠组织中炎症因子的测定

留取结肠组织, 按照试剂盒说明书进行相关指标的检测。

### 9 Western blot 法检测结肠组织中炎症因子的表达情况

采用 Western blot 法检测结肠组织中 TLR4, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B/p65, NLRP3 的表达情况。

### 10 小鼠粪便的收集

将采集的粪便收集于带盖 1.5 mL 无菌离心管中, 随后将管迅速置于冰上, 待一段时间转移至  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存, 用于粪便中的微生物测序。

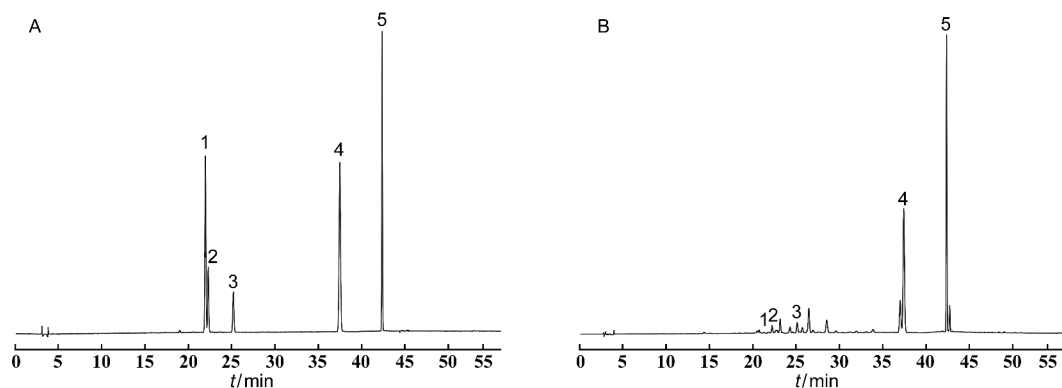
### 11 统计学处理

本实验所有数据以  $\bar{x} \pm s$  的形式表示, 用  $t$  检验计算各组间是否存在显著性差异。

## 结 果

### 1 色谱条件结果

采用 phenomenex C<sub>18</sub> (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱; 流动相 A 为 0.1% 磷酸水溶液, 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱: 0 ~ 40 min, 93%  $\rightarrow$  75% A; 40 ~ 60 min, 75%  $\rightarrow$  50% A; 流速  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 检测波长 360 nm, 柱温  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 进样量 10  $\mu\text{L}$ 。本实验所得到的槲皮素、山柰酚、异槲皮素、紫云英苷、金丝桃苷 HPLC 图见图 1。



1: 金丝桃苷; 2: 异槲皮素; 3: 紫云英苷; 4: 槲皮素; 5: 山柰酚

图 1 对照品(A)和柿叶提取物(B)的 HPLC 图

## 2 方法学考察结果

**2.1 线性关系考察** 采用 Phenomenex  $C_{18}$  (250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m) 色谱柱; 流动相 A 为 0.1% 磷酸水溶液, 流动相 B 为乙腈; 梯度洗脱: 0 ~ 40 min, 93% → 75% A; 40 ~ 60 min, 75% → 50% A; 流速: 1 mL ·

min<sup>-1</sup>; 检测波长: 360 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10  $\mu$ L。以槲皮素、山柰酚、异槲皮素、紫云英苷、金丝桃苷的进样量 ( $X$ ,  $\mu$ g) 为横坐标, 峰面积为纵坐标进行线性回归, 得回归方程和线性范围, 见表 2。

表 2 回归方程与线性范围

成分	回归方程	$r$	线性范围/ $\mu$ g
槲皮素	$Y = 6.10 \times 10^6 X + 2.06 \times 10^4$	0.999 9	0.029 1 ~ 0.291 2
山柰酚	$Y = 2.68 \times 10^7 X + 1.50 \times 10^4$	0.999 9	0.005 6 ~ 0.056 0
异槲皮素	$Y = 3.57 \times 10^6 X + 8.92 \times 10^3$	0.999 9	0.012 8 ~ 0.128 0
紫云英苷	$Y = 3.65 \times 10^6 X + 3.61 \times 10^3$	0.999 9	0.009 1 ~ 0.091 2
金丝桃苷	$Y = 1.55 \times 10^6 X + 1.57 \times 10^3$	0.999 8	0.001 3 ~ 0.013 8

**2.2 精密度实验** 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录各待测成分峰面积并计算 RSD 值。结果显示: 槲皮素、山柰酚、异槲皮素、紫云英苷、金丝桃苷的 RSD 值分别为 1.16%, 1.11%, 1.30%, 0.82%, 5.33%。

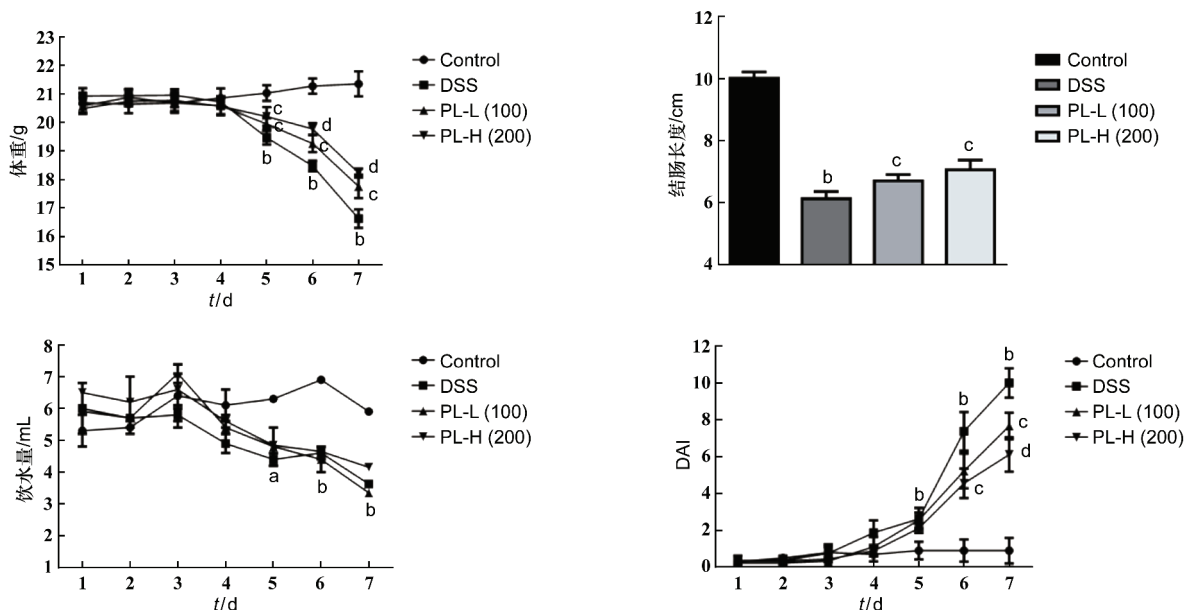
**2.3 稳定性实验** 按“2.1”项色谱条件分别于 0, 2, 4, 8, 10, 12 h 下进样, 记录各待测成分峰面积并计算 RSD 值。结果显示: 槲皮素、山柰酚、异槲皮素、紫云英苷、金丝桃苷的峰面积 RSD 值分别为: 1.10%, 0.95%, 2.64%, 2.42%, 5.00%。

**2.4 重复性实验** 平行制备 6 份柿叶提取物供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录各待测成分的峰面积, 计算出各成分含量及其 RSD 值。结果显示: 槲皮素、山柰酚、异槲皮素、紫云英苷、金丝桃苷的含量平均值分别为: 0.739 3%, 0.198 0%, 0.059 4%, 0.092 0%, 0.020 6%, RSD 依次为: 0.81%, 1.94%, 2.64%, 2.03%, 6.02%。

**2.5 加样回收率** 称取柿叶提取物粉末约 0.05 g, 精密称定, 平行 6 份。分别精密加入一定量的槲皮素、山柰酚、异槲皮素、紫云英苷、金丝桃苷对照品, 制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件注入液相色谱仪进行测定, 计算加样回收率。结果显示: 槲皮素、山柰酚、异槲皮素、紫云英苷、金丝桃苷的平均回收率为: 100.84%, 99.96%, 98.55%, 100.31%, 95.58%, RSD 值分别为 1.00%, 1.99%, 2.18%, 1.77%, 3.51%。

## 3 各组小鼠体质量、饮水量、结肠长度、DAI 变化情况

与 Control 组相比, DSS 组小鼠的体质量、饮水量和结肠长度显著降低, DAI 逐渐升高。与 DSS 组相比, 给药组小鼠的体质量下降、饮水量减少开始趋于平缓、结肠长度明显变长、DAI 明显降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 见图 2。



与 Control 组相比, a:  $P < 0.05$ ; b:  $P < 0.01$ ; 与 DSS 组相比, c:  $P < 0.05$ , d:  $P < 0.01$

图 2 各组对 DSS 诱导的 UC 小鼠体质量、饮水量、结肠长度和 DAI 的影响

#### 4 各组小鼠结肠组织病理变化情况

与 Control 组相比, DSS 组小鼠中黏膜溃烂、隐窝丧失、大量炎性细胞浸润和杯状细胞耗竭。与

DSS 组相比, 给药组结肠的病理变化得到改善, 且 PL-H 组改善更加明显, 见图 3。

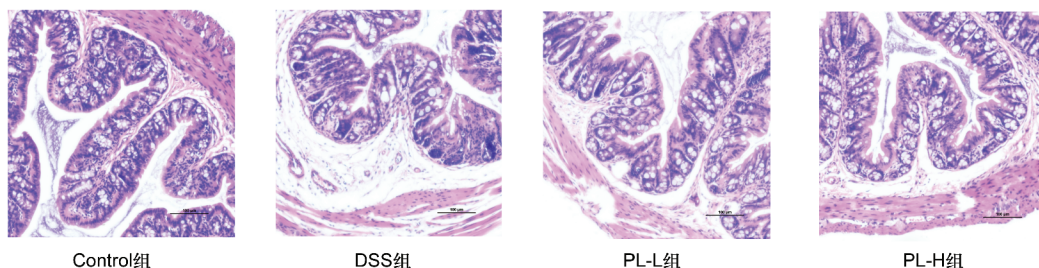
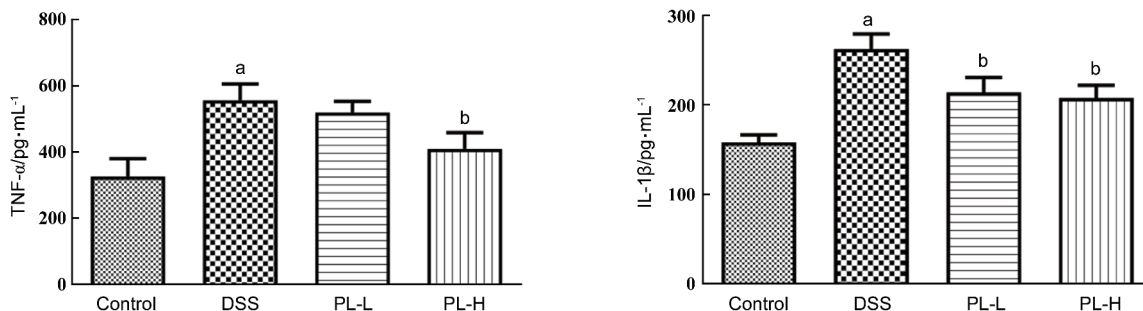


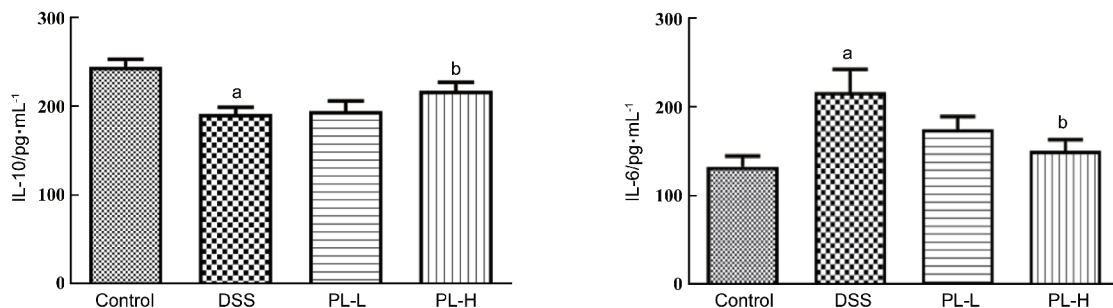
图 3 各组小鼠结肠组织病理变化情况 (HE, 200 ×)

#### 5 各组小鼠结肠组织中炎症因子的表达情况

与 Control 组相比, DSS 组 IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), IL-10 水平显著降低 ( $P <$

0.01); 与 DSS 组相比, PL-L 组和 PL-H 组中 IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  表达水平均显著降低 ( $P < 0.01$ ), IL-10 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), 见图 4。





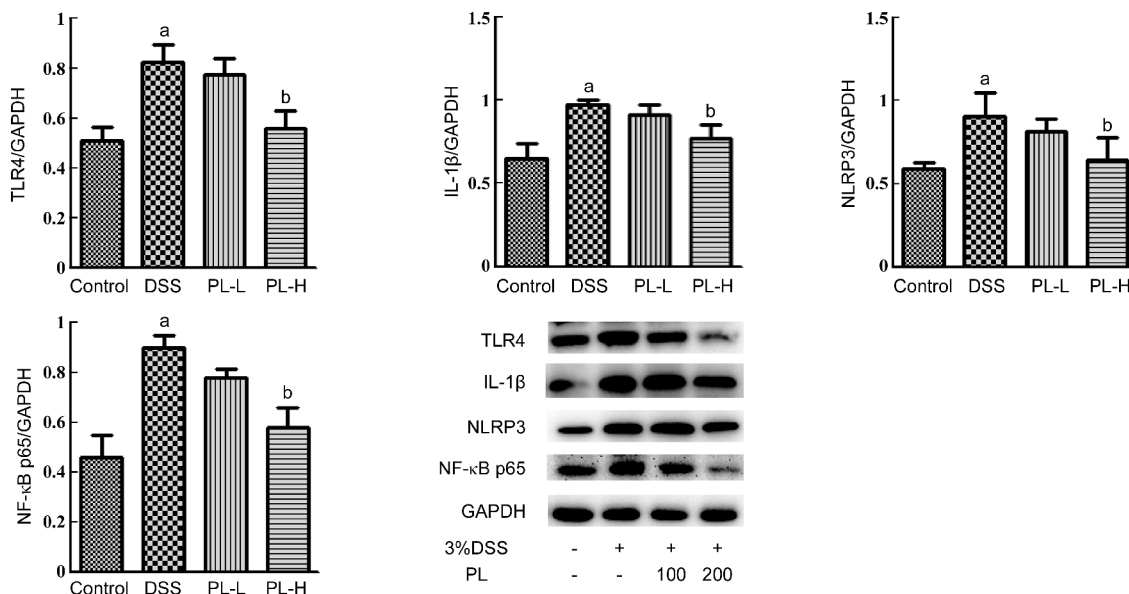
与 Control 组相比, a:  $P < 0.01$ ; 与 DSS 组相比, b:  $P < 0.01$

图 4 各组小鼠结肠组织中炎症因子的表达情况

### 6 Western blot 法检测结肠组织中相关蛋白的表达情况

与 Control 组相比, DSS 组 TLR4, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B

p65, NLRP3 蛋白表达升高 ( $P < 0.01$ ); 与 DSS 组相比, PL-L 组和 PL-H 组 TLR4, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B p65, NLRP3 蛋白表达降低 ( $P < 0.01$ ), 见图 5。



与 Control 组相比, a:  $P < 0.01$ ; 与 DSS 组相比, b:  $P < 0.01$

图 5 Western blot 法检测结肠组织中相关蛋白的表达情况

### 7 肠道菌群的聚类分析和多样性分析

将有效数据以 97% 的一致性进行操作分类单元 (operational taxonomic units, OTUs) 聚类分析。将所得到的 OTUs 结果绘制韦恩图分析各组之间共有的、特有的 OTUs。各组小鼠肠道微生物菌群的种类见图 6。 $\alpha$  多样性包括 ACE 指数、Shannon 指数、Simpson 指数和 Chao1 指数, 其数值的大小代表着样本中菌群的丰富度和多样性的高低。给予柿叶提取物后, 小鼠微生物群落  $\alpha$  多样性发生改变, 见图 7; 在目、科、属、种不同水平上相对丰度 (relative abundance) 的结果均表明, 小鼠肠道内微生物群发生部分改变, 见图 8。

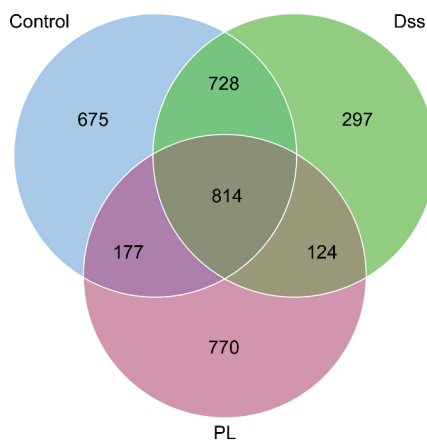


图 6 基于 OTUs 结果的韦恩图

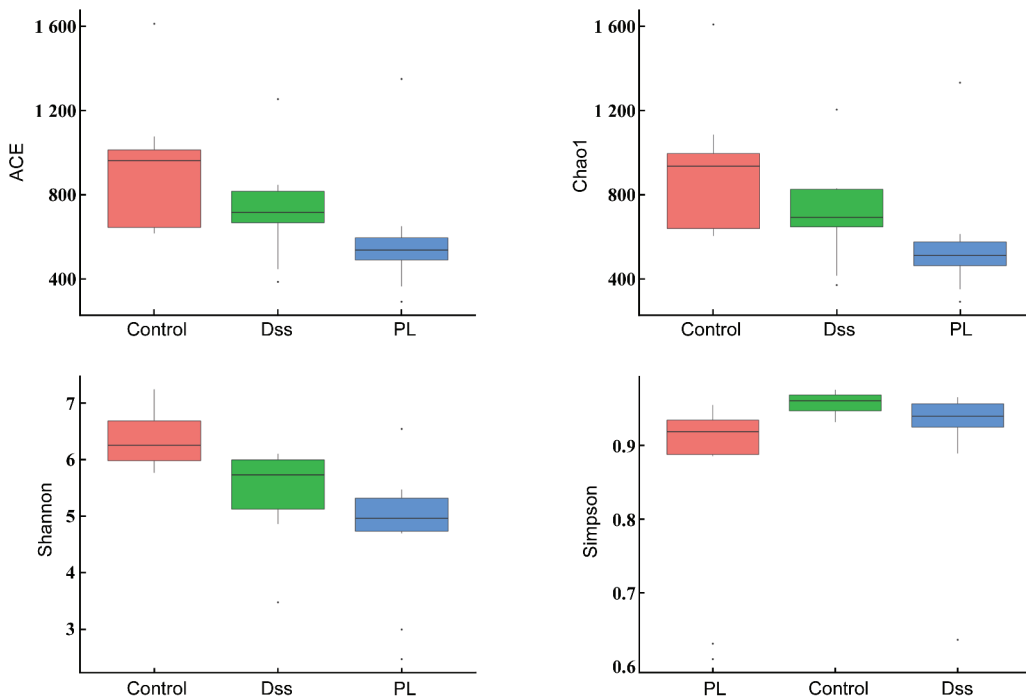


图 7 α 多样性中的 ACE, Shannon, Simpson 和 Chao1 指数分析结果

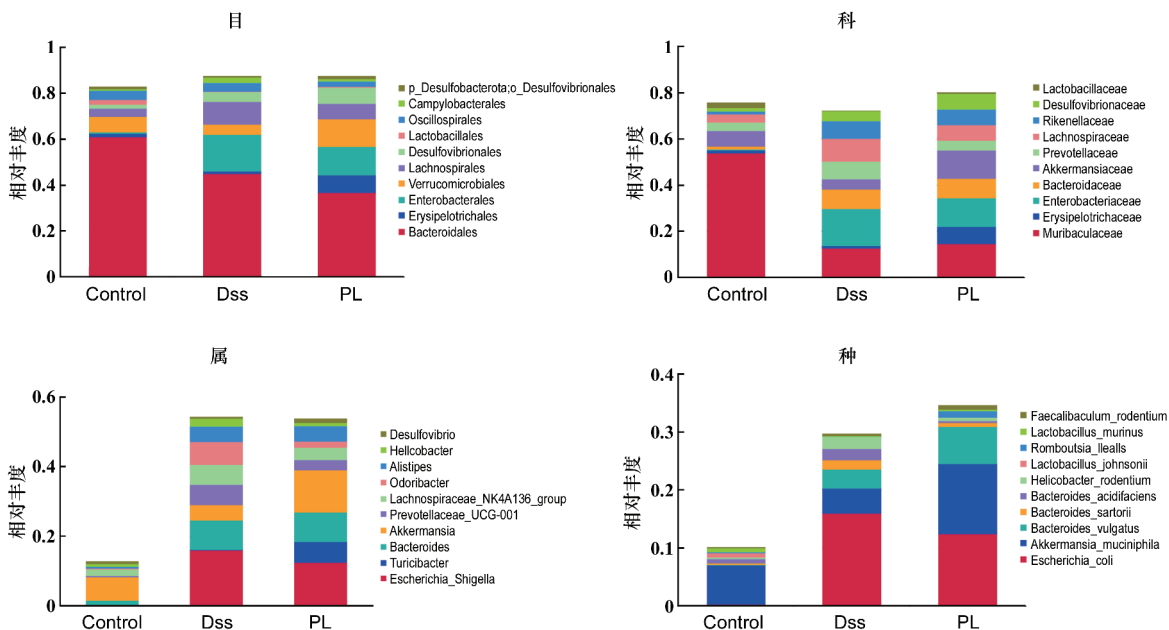


图 8 各个分组在不同层级水平上最大丰度排名前 10 的物种

### 8 MetaStat 分析

利用 MetaStat 分析对组间的物种丰度数据进行假设检验,与 DSS 组相比,PL 组鼠乳杆菌 (*Lactobacillus\_murinus*)、约氏乳杆菌 (*Lactobacillus\_johnsonii*)、

罗姆布茨菌 (*Romboutsia\_ilealis*)、艾克曼菌种 (*Akkermansia\_muciniphila*) 明显增加 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ),结果见图 9 和图 10。



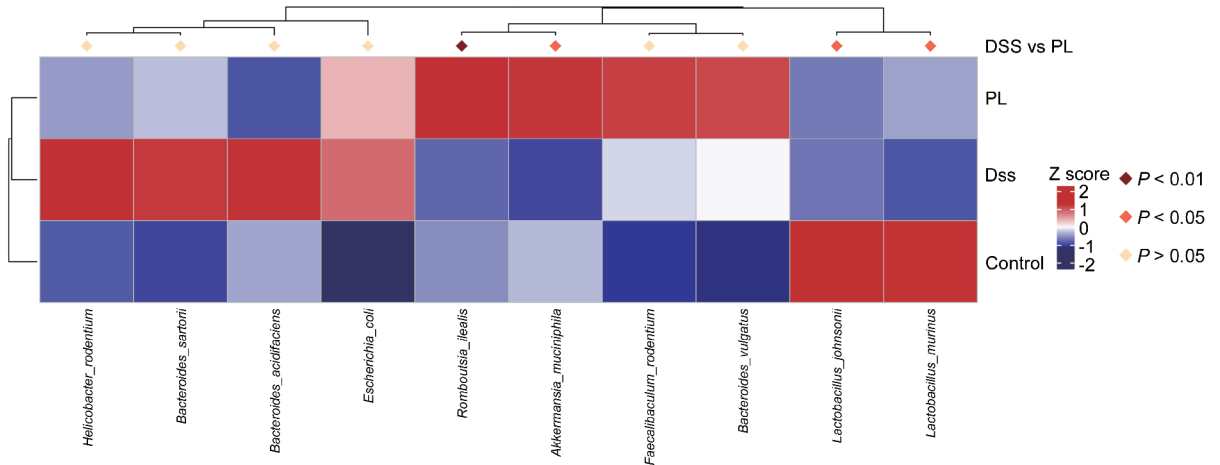
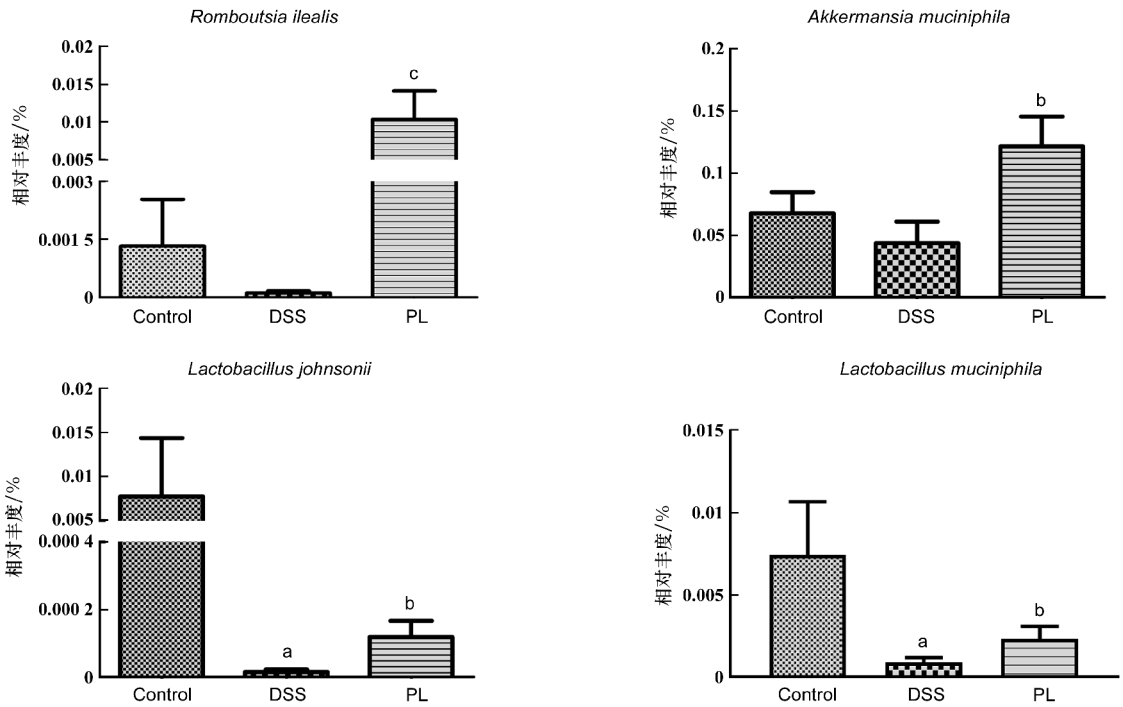


图9 各分组的物种在种水平上的分类差异图



与 Control 组相比, a:  $P < 0.01$ ; 与 DSS 组相比, b:  $P < 0.05$ , c:  $P < 0.01$

图10 4种有差异菌在种水平上的相对丰度变化结果

## 讨论

Fre 等<sup>[9]</sup>和 Lee 等<sup>[10]</sup>报道,柿叶在治疗疾病方面发挥着抗炎和抗氧化的作用,可通过降低 MDA 和脂质 ROS 水平来抑制铁死亡<sup>[11-12]</sup>;小鼠补充槲皮素改善结肠炎症状,抑制包括 IL-6, TNF- $\alpha$  在内的促炎细胞因子的产生,增强抗炎因子 IL-10 的产生,从而改善肠屏障功能<sup>[13]</sup>。本研究结果表明,含量测定方法可靠,符合药典相关规定,为柿叶的临床合理应用提供科学依据。

DSS 可导致肠道菌群失调、破坏肠黏膜屏障,使动物模型产生与人类相似的症状和病理改变<sup>[14]</sup>。研究发现,炎症小体在 UC 小鼠中高表达<sup>[15]</sup>, NLRP3 在肠道相关性炎症的发病中发挥重要作用<sup>[16-17]</sup>,对肠道相关性炎症反应发挥促进作用, NLRP3 的高表达可以促进多种肠道有害菌的出现<sup>[18]</sup>。此外, IL-1 $\beta$  的增多也促进了炎症的发生和发展<sup>[19]</sup>。结果显示, PL 组小鼠体质量下降缓慢,结肠长度延长, DAI 降低; IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), IL-10 水平显著升高 ( $P < 0.01$ );病理结果显示: DSS

组小鼠可见结肠组织有严重的黏膜溃疡、隐窝丧失、炎性细胞浸润和杯状细胞耗竭,给予药物后小鼠结肠组织病理学变化得到改善;Western blot 结果显示,PL-L 组和 PL-H 组 TLR4, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B p65, NLRP3 蛋白表达降低( $P < 0.01$ )。

UC 的发生发展与肠道微生物生态的失衡密切相关,故恢复 UC 患者肠道微生物稳态成为治疗 UC 的热点。若菌群失衡则会导致众多疾病如心血管疾病<sup>[20]</sup>、炎症性肠病<sup>[21]</sup>、代谢紊乱<sup>[22]</sup> 的发生,且疾病亦会加剧菌群失衡,进一步加重病情。本研究通过 16S rDNA 分析各组小鼠肠道菌群的变化,证实了 DSS 诱导的结肠炎小鼠肠道微生物多样性显著降低,而柿叶提取物有利于恢复肠道微生物群的多样性。大肠杆菌是一种致病菌,在 UC 患者中高表达,其可能促进炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的产生,进一步加重疾病的发展<sup>[23]</sup>。罗姆布茨菌在肠道中起着重要的作用,可维持肠屏障功能,减少炎症反应<sup>[24]</sup>。乳杆菌主要通过阻止致病菌的入侵和增殖、分泌短链脂肪酸,恢复肠道菌群平衡,减少肠道炎症的产生<sup>[25-26]</sup>。艾克曼菌在维持机体健康中扮演着重要的角色<sup>[27]</sup>。本研究发现,DSS 组的大肠杆菌高表达,在给予药物后,大肠杆菌丰度明显降低;鼠乳杆菌、约氏乳杆菌、罗姆布茨菌和艾克曼菌种的丰度明显增加,表明柿叶提取物可能促进某些特定微生物菌的正向功能调节,抑制条件致病菌的生长,帮助恢复肠道屏障功能。

综上所述,柿叶提取物可改善 UC 小鼠的生存质量,减轻结肠中的炎症,这些症状的改变可能与抑制 TLR4/NLRP3 炎症信号通路、降低粪便中有害菌、提高有益菌的丰度有关,特别是艾克曼菌种的变化,为后期的研究指明了方向。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] KELLEY N, JELTEMA D, DUAN Y, *et al.* The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13): E3328.
- [2] 付书彬, 徐广, 高原, 等. 甘草查尔酮 A 对 NLRP3 炎症小体的调控作用及机制初探 [J]. *药学学报*, 2018, 53(12): 2050-2056.
- [3] 聂源, 朱莹. NLRP3 炎症小体与肠道微生态 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2020, 36(10): 1174-1179.
- [4] NISHIDA A, INOUE R, INATOMI O, *et al.* Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. *Clin J Gastroenterol*, 2018, 11(1): 1-10.
- [5] SHIKATA F, SHIMADA K, SATO H, *et al.* Potential influences of gut microbiota on the formation of intracranial aneurysm [J]. *Hypertension*, 2019, 73(2): 491-496.
- [6] 葛飞, 刘丽娜, 严晶, 等. 金荞麦联合 SASP 治疗大肠湿热型 UC 的疗效及其对 TLR4/NLRP3 信号通路的影响 [J]. *南京*

中医药大学学报, 2021, 37(1): 16-20.

- [7] 闵冬雨, 李红岩, 关乐, 等. 脑心清对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的保护机制 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(2): 215-222.
- [8] FRE S, HUYGHE M, MOURIKIS P, *et al.* Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine [J]. *Nature*, 2005, 435(7044): 964-968.
- [9] LEE HS, KIM EN, KIM GR, *et al.* Persimmon leaf extract protects mice from atopic dermatitis by inhibiting T cell activation via regulation of the JNK pathway [J]. *Phytother Res*, 2021, 35(5): 2545-2556.
- [10] 吴小凡, 马斌, 侯训尧, 等. 柿叶提取物对 HEK293-APPsw 转基因细胞模型的抗氧化作用及对 Nrf2/HO-1 途径的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2017, 33(6): 854-858.
- [11] WANG Y, QUAN F, CAO QH, *et al.* Quercetin alleviates acute kidney injury by inhibiting ferroptosis [J]. *J Adv Res*, 2020, 28: 231-243.
- [12] 郭海彪, 董福越, 李雯珊, 等. 一测多评法测定柿叶提取物中 6 种黄酮类成分 [J]. *中国现代应用药学*, 2021, 38(7): 831-835.
- [13] CHASSAING B, AITKEN JD, MALLESHPA M, *et al.* Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2014, 104: 15.25.1-15.25.14.
- [14] KIM H, IM JP, KIM JS, *et al.* Alloferon alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis [J]. *Immune Netw*, 2015, 15(3): 135-141.
- [15] ITANI S, WATANABE T, NADATANI Y, *et al.* NLRP3 inflammasome has a protective effect against oxazolone-induced colitis: a possible role in ulcerative colitis [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 39075.
- [16] 吴丽洁, 张霁, 张丹, 等. NLRP3 炎症小体与炎症性肠病的关系及针灸调节作用研究进展 [J]. *上海针灸杂志*, 2018, 37(8): 961-968.
- [17] LIU L, DONG Y, YE M, *et al.* The pathogenic role of NLRP3 inflammasome activation in inflammatory bowel diseases of both mice and humans [J]. *J Crohns Colitis*, 2017, 11(6): 737-750.
- [18] XUE YS, DU M, ZHU MJ. Quercetin suppresses NLRP3 inflammasome activation in epithelial cells triggered by *Escherichia coli* O157: H7 [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 108: 760-769.
- [19] TSCHOPP J, SCHRODER K. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(3): 210-215.
- [20] WITKOWSKI M, WEEKS TL, HAZEN SL. Gut microbiota and cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 2020, 127(4): 553-570.
- [21] SASSO GL, KHACHATRYAN L, KONDYLLIS A, *et al.* Inflammatory bowel disease-associated changes in the gut: focus on Kazan patients [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2021, 27(3): 418-433.
- [22] CHOI BSY, DAOUST L, PILON G, *et al.* Potential therapeutic applications of the gut microbiome in obesity: from brain function to body detoxification [J]. *Int J Obes (Lond)*, 2020, 44(9): 1818-1831.
- [23] MIRSEPAZI-LAURIDSEN HC, VALLANCE BA, KROGFELT KA, *et al.* *Escherichia coli* pathobionts associated with inflammatory bowel disease [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2019, 32(2): e00060-e00018.
- [24] WU ZY, PAN D, JIANG M, *et al.* Selenium-enriched *Lactobacillus acidophilus* ameliorates dextran sulfate sodium-induced chronic colitis in mice by regulating inflammatory cytokines and intestinal microbiota [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8: 716816.
- [25] LIU JL, GAO YY, ZHOU J, *et al.* Changes in serum inflammatory cytokine levels and intestinal flora in a self-healing dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis murine model [J]. *Life Sci*, 2020, 263: 118587.
- [26] WANG GQ, LIU YN, LU Z, *et al.* The ameliorative effect of a *Lactobacillus* strain with good adhesion ability against dextran sulfate sodium-induced murine colitis [J]. *Food Funct*, 2019, 10(1): 397-409.
- [27] 赵凡, 李春保. 肠道菌 *Akkermansia muciniphila* 的特性及其与机体健康的关系 [J]. *微生物学通报*, 2017, 44(6): 1458-1463.

编辑: 毕晓帆/接受日期: 2022-10-24