

# 黄连碱衍生物 Q3 通过调节 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路和肠道微生物改善葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠溃疡性结肠炎研究

迟笑倩, 柴常伟, 张海婧, 吴练秋\* (中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所 消化健康全国重点实验室, 北京 100050)

**摘要:**目的 从炎症信号通路 Toll 样受体 4 (TLR4)/核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 以及肠道微生物群组成改变的角度探究黄连碱衍生物 Q3 抗葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 诱导小鼠溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 的作用机制。方法 将 50 只小鼠随机分为正常对照组、模型组、阳性药柳氮磺吡啶 (SASP) 组、Q3-低剂量组和 Q3-高剂量组, 每组 10 只, 除正常对照组外其余组小鼠以 2.5% DSS 溶液喂饮建立 UC 模型。SASP 组灌胃给予 700 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup> SASP, Q3 低与高两个剂量组分别灌胃给予 50 和 100 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup> Q3, 其余组给予等量蒸馏水。给药 6 d 后取小鼠结肠组织进行疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分和长度测量, 苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, HE) 检测各组病理损伤程度, 16S rRNA 高通量测序检测小鼠肠内容物中肠道菌群的变化, 免疫组织化学 (IHC) 检测结肠组织 TLR4 和 p-p65 的表达, Western blot 法检测结肠组织中 TLR4、p-p65 和 p-I $\kappa$ B $\alpha$  的蛋白表达, 体外实验, 利用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导炎症反应, 免疫荧光法检测 IEC6 细胞和 RAW264.7 细胞中 NF- $\kappa$ B p65 的核转位。结果 体内: 在 DSS 诱导的小鼠 UC 模型中, 与模型组相比, Q3 能够显著改善 UC 小鼠体重降低、结肠挛缩和 DAI 评分升高等情况, HE 染色结果显示 Q3 明显改善 UC 小鼠肠道上皮破坏、隐窝结构紊乱和杯状细胞减少等病理损伤; 16S rRNA 结果表明 Q3 可以增加 DSS 作用后肠道菌群的生物多样性, 调节肠道菌群组成。免疫组化和 Western blot 结果显示 Q3 可以显著降低模型组小鼠结肠组织中 TLR4 和 p-p65 的表达; 体外: 免疫荧光和 Western blot 结果显示 Q3 能够抑制 IEC6 和 RAW264.7 两种细胞中 NF- $\kappa$ B p65 的核转位。结论 Q3 能够通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路以及调节肠道菌群组成改善肠道炎症, 发挥抗 UC 作用, 有望成为治疗 UC 的候选化合物。

**关键词:** 溃疡性结肠炎; 黄连碱衍生物; 肠道菌群; Toll 样受体 4; NF- $\kappa$ B

doi:10.11669/cpj.2024.17.005 中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2024)17-1581-09

## Coptisine Derivative Q3 Ameliorates DSS-induced Ulcerative Colitis in Mice by Modulating TLR4/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway and Intestinal Microbiota

CHI Xiaoqian, CHAI Changwei, ZHANG Haijing, WU Lianqiu\* (State Key Laboratory of Digestive Health, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore the mechanism of action of coptisine derivative Q3 against dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis (UC) in mice from the perspective of changes in the inflammatory signaling pathway TLR4/NF- $\kappa$ B and compositions of the intestinal microbiota. **METHODS** Fifty mice were randomly divided into normal control group, model group, sulfasalazine (SASP) group, Q3-low dose group, Q3-high dose group, with 10 in each group. Mice in the groups except the control group were orally administered with 2.5% DSS solution to induce UC model. The SASP was given 700 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup> of sulfasalazine by intragastric administration, and the Q3 low and high dose groups were given 50 and 100 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup> of Q3, respectively. The other groups were given an equal amount of distilled water. After 6 days of administration, the mouse colon tissues were taken for DAI score and length measurement. HE staining was used to detect the degree of pathological damage in each group. 16S rRNA high-throughput sequencing was used to detect changes in intestinal flora in the intestinal contents of mice. Immunohistochemistry and Western blot were used to detect the expression of TLR4 and p-p65 in colon tissue. The protein expressions of TLR4, p-p65 and p-I $\kappa$ B $\alpha$  and the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B p65 in IEC6 cells and RAW264.7 cells were detected by Western blot and immunofluorescence. **RESULTS** In the DSS-induced mouse ulcerative colitis model, compared with the model group, *in vivo* Q3 could significantly improve the weight loss, colon length, and increase in DAI scores of UC mice. HE staining results showed that Q3 significantly improved the intestinal pathological damages such as tract epithelial damage, crypt structure disorder and goblet cell reduction; immunohistochemistry and Western blot results showed that Q3 could significantly reduce the expression of TLR4 and p-p65 in the colon tissue of mice in the model group. The results of 16S rRNA showed that Q3 could increase the biodiversity of intestinal microbiota and

**基金项目:** 中国医学科学院医学与健康科技创新工程资助 (2022-I2M-1-014)

**作者简介:** 迟笑倩, 女, 硕士研究生 研究方向: 抗炎免疫; 柴常伟, 男, 硕士研究生 研究方向: 抗炎免疫。迟笑倩和柴常伟为共同第一作者

\* **通讯作者:** 吴练秋, 女, 博士, 研究员, 硕士生导师 研究方向: 抗炎免疫相关疾病新靶点的发现和新药开发研究 Tel: (010)63031589

regulate the composition of intestinal microbiota after DSS administration. It was also shown that *in vitro* Q3 could inhibit the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B p65 in both IEC6 and RAW264.7 cells by immunofluorescence. **CONCLUSION** Q3 can improve intestinal inflammation by inhibiting the TLR4/NF- $\kappa$ B pathway and regulating the composition of intestinal flora, exerting anti-UC effects, which is expected to become a candidate compound for the treatment of UC.

**KEY WORDS:** ulcerative colitis; coptisine derivatives; intestinal flora; TLR4; NF- $\kappa$ B

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种病因不明的慢性炎症性肠病<sup>[1]</sup>。UC的病理机制涉及肠道上皮屏障缺陷、肠道微生物群紊乱和免疫反应失调等<sup>[2]</sup>,其症状取决于结肠炎症的部位和严重程度,多表现为便血、里急后重和腹痛<sup>[3]</sup>。2023年流行病学调查数据显示,北美地区UC的患病率约占人口的0.4%,共计有150万左右患者深受UC的困扰<sup>[4]</sup>。虽然UC多发于北美地区,但随着亚洲以及拉丁美洲等大陆板块现代化与工业化水平逐渐提升,UC已然演变为严峻的全球卫生问题<sup>[5]</sup>。

临床常用的治疗药物包括5-氨基水杨酸类药物、皮质类固醇和免疫抑制剂,这些药物大多疗效不理想或不良反应严重,不能用于长期治疗;针对具体靶点的生物制剂(如抗TNF- $\alpha$ 单克隆抗体和抗IL-23单克隆抗体等)疗效有所改善,但由于患者个体差异大并且生物制剂价格高昂导致应用受限<sup>[6-7]</sup>。因此,寻找更安全更有效且经济负担小的潜在治疗药物具有重要的临床意义。

Toll样受体(toll-like receptors, TLR)是一类跨膜蛋白家族受体,在非特异性或先天免疫防御中发挥关键作用。TLR4/NF- $\kappa$ B作为一条经典炎症信号通路,常活跃于多种炎症性疾病的发病机制中并发挥关键作用<sup>[8-9]</sup>。UC患者结肠黏膜中常见TLR4/核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路的异常激活,这种异常的激活导致肠道炎症持续加重,因此,靶向TLR4成为治疗药物研发的方向之一<sup>[10]</sup>。与此同时,与疾病相关的肠道菌群的研究表明,紊乱的肠道菌群在肠道疾病包括炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)、肥胖、肝病和结直肠癌等的发生发展过程中发挥着关键作用<sup>[11]</sup>。肠道菌群的动态失衡增加了能够分泌内毒素的革兰阴性细菌的丰度,高水平的内毒素与TLR4结合激活NF- $\kappa$ B通路,使得异常激活的炎症反应持续发生<sup>[12]</sup>。最新研究也证明,过度激活的免疫反应,尤其是通过肠道微生物组扰动介导的TLR依赖性免疫功能障碍,在IBD的发病机制中起关键作用<sup>[13]</sup>。

黄连是一种传统中草药,在我国广泛用于治疗包括腹泻、急性肠胃炎在内的多种疾病<sup>[14]</sup>。黄连碱是黄连的特征活性成分之一,具有典型的天然生物

碱骨架,具有广泛的抗炎、抗菌、抗肿瘤等显著的生物活性,是一种很有前景的治疗UC的活性成分<sup>[15-16]</sup>。本项目通过对天然活性产物黄连碱进行结构修饰改造获得了黄连碱衍生物Q3,经前期工作<sup>[17]</sup>确认Q3具有良好的体外抗炎活性。基于以上研究基础,本课题组着眼于TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路并结合肠道菌群,综合探讨并考察了黄连碱衍生物Q3抗UC的药效与机制,证明了黄连碱衍生物Q3具有开发成治疗UC药物的潜在可能性,为黄连碱衍生物的进一步开发提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

超净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司,型号:DJ-CJ-2ND),低温离心机(日本久保田公司,型号:K21128-F000),一体式化学发光成像仪(上海勤翔科学仪器有限公司,型号:ChemiScope S6),酶标分析仪(美国Bio-Tek公司),共聚焦显微镜(美国Leica公司),光学显微镜(日本Olympus公司),细胞恒温培养箱(北京五洲东方科技发展有限公司),蛋白电泳仪(美国Bio-Rad公司)。

### 1.2 试剂与药物

化合物Q3(中国医学科学院药物研究所自行合成),葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS,美国MP Biomedicals公司,批号:YD08001),柳氮磺吡啶(SASP)肠溶片(上海信谊天平药业有限公司,批号:09230106),10%福尔马林中性组织固定液、DMEM培养基、PBS缓冲液、RIPA裂解液、蛋白酶混合抑制剂(北京索莱宝科技有限公司),胎牛血清(FBS)、青霉素和链霉素(美国Gibco Life Technologies公司),脂多糖(LPS)、Triton X-100(美国Sigma-Aldrich公司),Western blot快速制胶试剂盒(北京聚德安泰科技有限公司),聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国Merck Millipore公司),牛血清白蛋白(BSA,北京普利莱基因技术有限公司),TLR4抗体(美国Abcam公司,货号:ab217274),p-p65、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B p65抗体(美国Cell Signaling Technology公司,货号:3033S、2859S、8242S),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(博奥瑞京北京科技发

展有限公司,货号:ab1019t),山羊抗兔 IgG、山羊抗鼠 IgG 抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号:ZB-2301、ZB-5305)山羊血清(碧云天),山羊抗兔 488 nm 荧光抗体(proteintech 公司,货号:SA00013-2)。

### 1.3 实验动物

C57BL/6J 雄性小鼠,SPF 级,50 只,6~8 周龄,体重( $20 \pm 2$ )g。饲养于中国医学科学院药物研究所动物房,温度 25 °C,湿度 40%,每 12 h 明暗交替循环饲养,动物自由饮食、饮水。所有动物实验按照相关规定执行,并经中国医学科学院药物研究所实验动物福利和伦理委员会审核批准,批号:00009659。

## 2 方法

### 2.1 动物分组、造模及给药

小鼠于 SPF 级动物房适应性饲养 7 d 后随机分为 5 组:即 CON 组、MOD 组、SASP 组、Q3-低剂量组、Q3-高剂量组,每组 10 只。除 CON 组外,MOD 组及各给药组小鼠给予 2.5% DSS 水溶液替代正常饮水,每日自由饮水诱导小鼠结肠炎模型。从造模第二天开始灌胃给药,SASP 组给予  $700 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,Q3 低、高两个剂量组分别给予 50 和  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,其余组给予等量蒸馏水。约 6 d 后 MOD 组动物出现明显精神萎靡、活动减少、稀便等 UC 典型症状。在第 8 天终止实验,处死各组动物,并检测结肠炎各项相关评价指标,综合评价黄连碱衍生物 Q3 的抗 UC 药效学活性。

### 2.2 观察指标与检测方法

**2.2.1 苏木精-伊红(HE)染色观察结肠组织病理损伤情况** 取各实验组病变部位结肠保存于 10% 福尔马林组织固定液中,使用梯度浓度的乙醇脱水后,将组织包埋于石蜡中,并切  $5 \mu\text{m}$  厚组织切片,载于玻片上,清洗并重新水化。按照标准方法使用苏木精和伊红对组织切片进行染色。光镜下观察组织形态学改变。

**2.2.2 Western blot 法检测体内外相关指标** 取结肠组织按照  $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的比例加入含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液,在冰上匀浆,裂解 45 min 后离心取上清,BCA 蛋白法定量上清中蛋白总含量;SDS-PAGE 电泳分离蛋白,电转移至 PVDF 膜上,5% BSA 室温封闭 1 h,以 1% BSA 稀释液按照相应的稀释比例稀释一抗(TLR4,1:1 000;p-p65,1:1 000;p-I $\kappa$ B $\alpha$ ,1:1 000;GAPDH,1:5 000),4 °C 结合过夜,二抗按照相应的稀释比例稀释(山羊抗兔 IgG、山羊抗鼠 IgG 抗体,1:5 000)常温孵育 1

h,化学发光法检测目的条带。利用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值,以各组目的蛋白条带与各组内参 GAPDH 条带的灰度值比值作为该蛋白的相对表达量并进行统计分析。

**2.2.3 免疫组织化学(IHC)染色检测** 将包埋于石蜡中的组织进行  $5 \mu\text{m}$  厚的切片,组织切片载于玻片上并于 60 °C 烘箱中烘干备用,以 1:100 的比例稀释抗体并用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶联结(streptavidin-peroxidase, SP)两步法进行 IHC 染色,脱水封片后置于 100 倍光学显微镜下观察。

**2.2.4 免疫荧光染色** 分别给予 IEC6 细胞和 RAW264.7 细胞  $10^6$ 、 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 LPS 进行造模,给药组在造模的基础上给予  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Q3,24 h 后弃去培养基,加入 4% 多聚甲醛室温固定细胞 30 min 后加入 0.3% Triton X-100 对细胞进行通透处理。15 min 后弃去透膜液加入 10% 山羊血清封闭 30 min,加入 NF- $\kappa$ B p65 抗体(1:400)4 °C 孵育过夜。荧光二抗室温避光孵育 1 h,冲洗,加入 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)混合封片剂后于共聚焦显微镜下观察。

**2.2.5 肠内容物的 16S rRNA 分析** 收集小鼠粪便并储存于 -80 °C。将小鼠粪便分为 3 组( $n=6 \sim 7$ ):CON 组、MOD 组和 Q3( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )组。粪便样本在干冰条件下送往微基生物科技(上海)有限公司进行 16S rDNA 基因测序。使用 QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit 提取小鼠粪便中总细菌的 DNA。选择对应于细菌 16S rRNA V3-V4 区域的引物进行扩增。所有样本的序列数据的测序结果和统计结果均基于测序读数和操作分类单位(OTU)。

### 2.3 统计学方法

使用 GraphPad Prism 8.3.0 软件进行数据分析,实验结果以“Means  $\pm$  SD”表示。多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  表示有显著统计学差异。

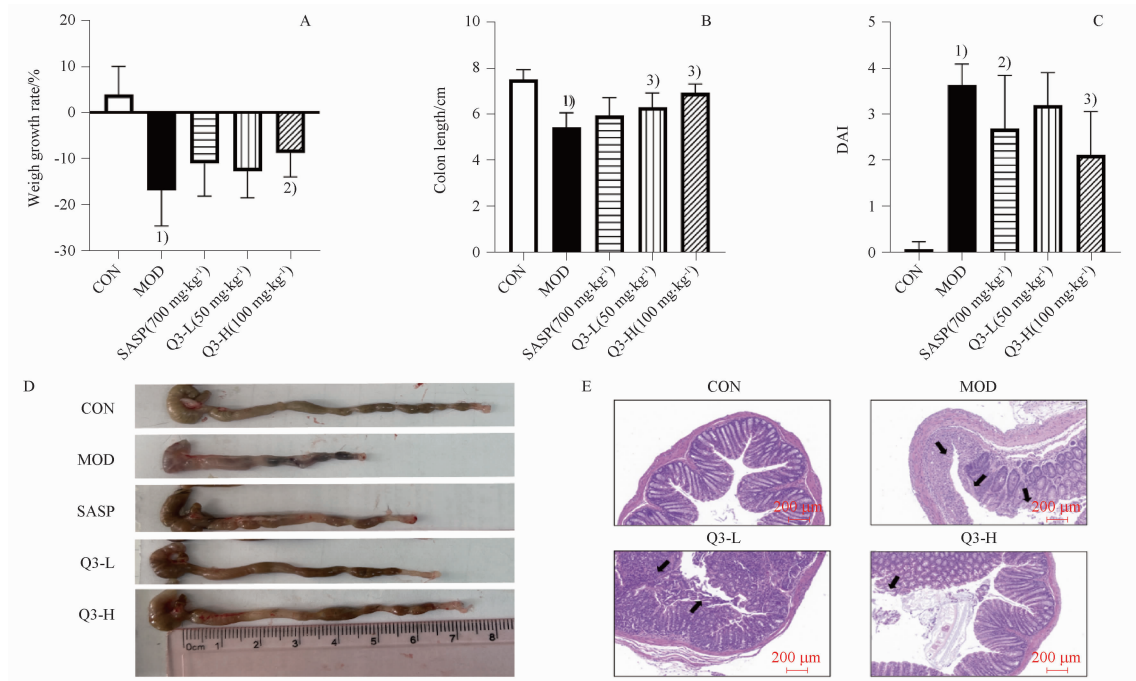
## 3 结果

### 3.1 Q3 能够改善 DSS 诱导的小鼠 UC 症状

本研究构建了 DSS 诱导的小鼠 UC 模型用于评价黄连碱衍生物 Q3 的抗 UC 活性,主要通过小鼠体质量变化率、结肠长度以及疾病活动指数(disease activity index, DAI)三项指标进行综合评价。实验结果(图 1A~D)显示,与正常对照组相比,MOD 组在造模 8 d 后体质量下降了 16.95%,具有显著统计学差异。造模后 8 d MOD 组小鼠体形消瘦,弓背,

毛色暗淡无光,肛周明显可见血样黏液分泌。将小鼠安乐死后取结肠进行长度测量与 DAI 评分,MOD 组小鼠结肠挛缩明显,DAI 明显升高,以上结果提示 UC 造模成功。通过给予 Q3 治疗后,UC 小鼠体质量下降、结肠挛缩与 DAI 升高等情况得到了明显的改善,并具有统计学差异。此外,Q3 能够显著改善 UC 小鼠结肠组织的病理损伤。光镜下观察组织

HE 染色切片(图 1E),与 MOD 组相比,Q3 给药组小鼠结肠组织黏膜结构趋于完整,杯状细胞数量有所升高,隐窝结构的破坏得到了明显控制,黏膜固有层中炎性浸润明显减少;SASP 组小鼠结肠组织结构有所恢复,但腺体排列仍紊乱且炎性浸润明显。综上所述,黄连碱衍生物 Q3 具有一定程度上的抗 UC 活性,并且药效优于阳性药 SASP。



A - 体质量增长率变化;B - 结肠长度;C - 疾病活动指数 (DAI);D - 结肠形态;E - 苏木精 - 伊红 (HE) 染色;→标记的是炎性浸润与被破坏的隐窝结构;与对照组相比,<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组相比,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。

A - weight growth rate; B - colon length; C - disease activity index (DAI); D - colon morphology; E - hematoxylin-eosin staining of colons; →labeled inflammatory infiltrations and destroyed crypt structures;<sup>1)</sup> $P < 0.01$ , vs control group; <sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ , vs model group.

图 1 Q3 对溃疡性结肠炎 (UC) 模型小鼠体质量、结肠长度、疾病活动指数 (DAI) 评分以及病理的影响 ( $\times 40$ )。  $n = 10, \bar{x} \pm s$

Fig. 1 Effects of Q3 on body weight, colon length, DAI score and pathology of UC model mice ( $\times 40$ ).  $n = 10, \bar{x} \pm s$

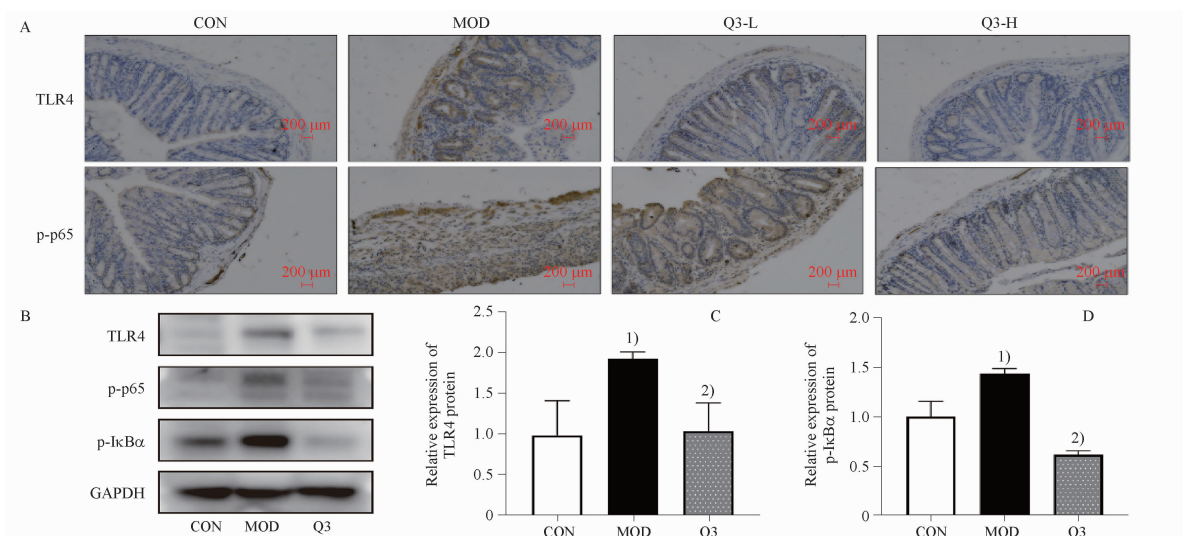
### 3.2 Q3 能够降低 DSS 诱导的小鼠结肠组织 TLR4 高表达

为阐明 Q3 的抗 UC 作用机制,本研究对小鼠结肠组织进行了免疫组织化学分析(图 2A)。与 CON 组相比,MOD 组小鼠结肠组织固有层中 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白,如 TLR4 和 p-p65 等均存在大量表达的情况,而 Q3 降低了 TLR4 和 p-p65 的表达水平。小鼠结肠组织的 Western blot (图 2B ~ D) 结果显示,MOD 组小鼠结肠组织中 TLR4、p-I $\kappa$ B $\alpha$  表达量升高,与模型组相比,Q3 组小鼠结肠组织中 TLR4 和 p-I $\kappa$ B $\alpha$  均有所降低。这提示 Q3 可能通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路改善 DSS 诱导的 UC 炎症。

### 3.3 Q3 能够调节 UC 小鼠肠道菌群组成

取小鼠结肠内容物进行 16S rRNA 进行分析。

$\alpha$  多样性指数,包括 Shannon 指数、ACE、Chao1 指数以及观测物种指数等可以用于判断肠内容物中肠道菌群的多样性。与 CON 组相比,MOD 组小鼠结肠肠道菌群  $\alpha$  多样性显著下降( $P < 0.05$ ,图 3),属水平上瘤胃梭菌属 (*Ruminiclostridium*)、副拟杆菌属 (*Parabacteroides*)、另枝菌属 (*Alistipes*) 和阿克曼菌属 (*Akkermansia*) 等有益菌的相对丰度降低;毛梭菌属 (*Lachnoclostridium*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、粘螺菌属 (*Mucispirillum*) 和埃希菌属 (*Escherichia*) 等致病菌的相对丰度升高(图 4 ~ 5)。瘤胃梭菌属 (*Ruminiclostridium*)、阿克曼菌属 (*Akkermansia*) 等有益菌在免疫和炎症应答、短链脂肪酸的产生和肠道屏障完整性维持中起到重要作用;而毛梭菌属 (*Lachnoclostridium*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 等

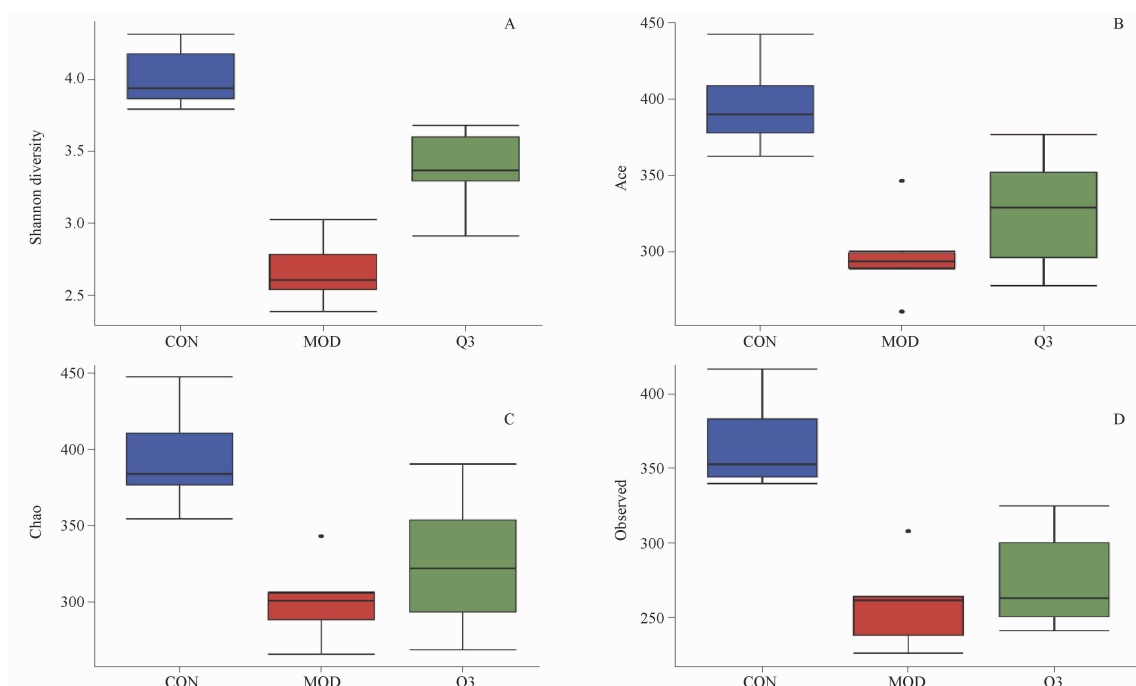


A - 结肠组织免疫组化 ( $\times 200$ ); B - 结肠组织中 TLR4、p-p65、p-I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白的表达变化; C - TLR4 表达的定量结果; D - p-I $\kappa$ B $\alpha$  表达的定量结果; 与对照组相比,  $^1)P < 0.05$ ; 与模型组相比,  $^2)P < 0.05$ 。

A - immunohistochemistry of colon tissues ( $\times 200$ ); B - expression changes of TLR4, p-p65, and p-I $\kappa$ B $\alpha$  protein in colon tissues; C - quantitative results of TLR4 expression; D - quantitative results of p-I $\kappa$ B $\alpha$  expression;  $^1)P < 0.05$ , vs control group;  $^2)P < 0.05$ , vs model group.

图 2 Q3 对小鼠结肠组织 Toll 样受体 4 (TLR4) 相关蛋白表达的影响。  $n = 10, \bar{x} \pm s$

Fig. 2 Effects of Q3 on the expression of TLR4-related proteins in mouse colon tissue.  $n = 10, \bar{x} \pm s$



A - 香农多样性指数; B - 基于丰度的覆盖估计值指数; C - Chao 1 指数; D - 观测物种指数。

A - shannon index; B - ACE index; C - chao 1 index; D - observed-species index.

图 3 16S rRNA 分析 Q3 对小鼠肠道菌群多样性的影响。  $n = 6 \sim 7$

Fig. 3 16S rRNA analysis of the effects of Q3 on the diversity of intestinal microbiota in mice.  $n = 6 \sim 7$

致病菌属与持续的炎症反应密切相关。给予 Q3 后小鼠肠道菌群的多样性增加,并逆转了部分菌群在 MOD 组中的含量变化,例如:瘤胃梭菌属等的相对丰度增加,而毛梭菌属等的相对丰度降低。基操作分类单元 (operational taxonomic units, OTU) 的主成

分分析 (principal component analysis, PCA) 结果 (图 6) 显示, DSS 显著改变了小鼠肠道微生物群组成, 给予 Q3 可以调节 UC 小鼠的肠道微生物群组成。以上结果表明, Q3 可以通过调节肠道微生物群有益菌与致病菌的稳态平衡发挥抗 UC 的作用。

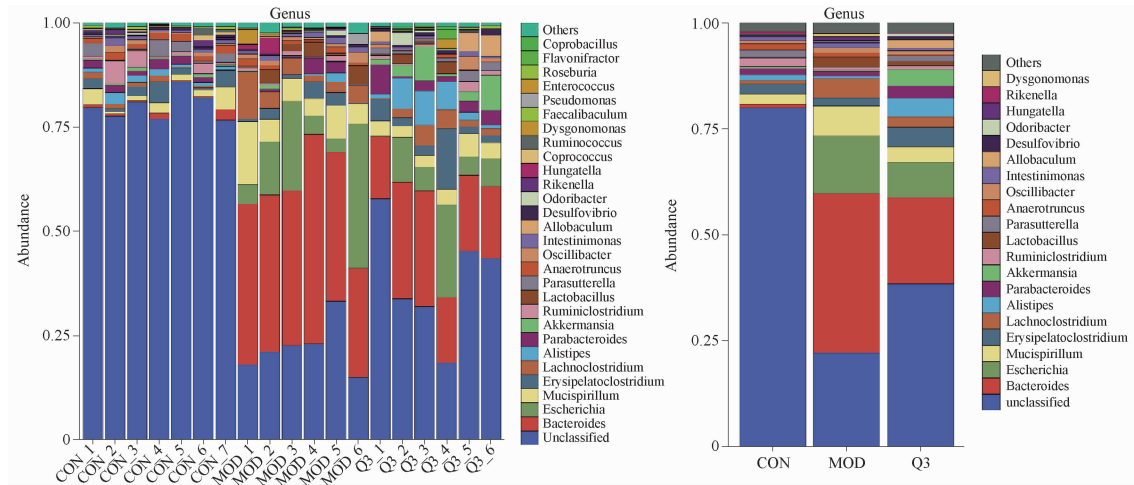
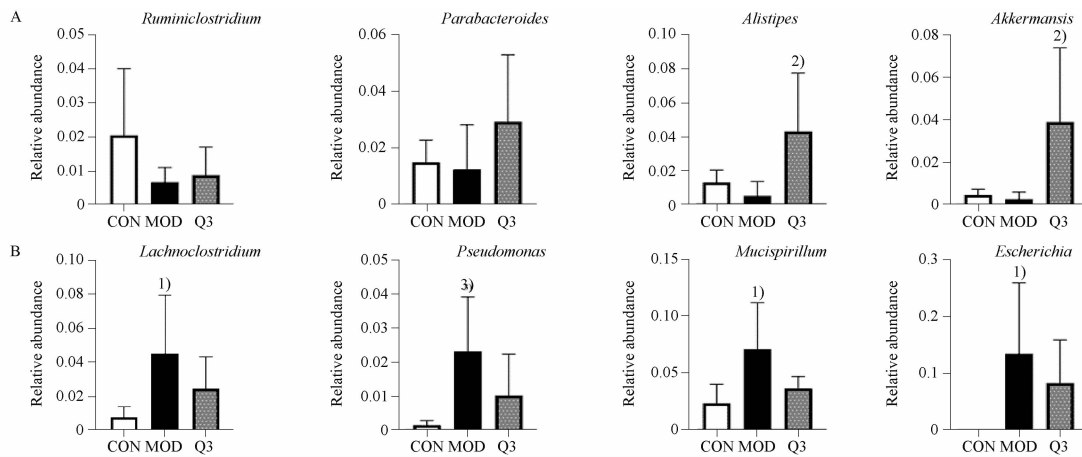


图4 Q3在属水平对小鼠肠道菌群丰度的影响。n=6~7,  $\bar{x} \pm s$

Fig. 4 Effects of Q3 on intestinal microbiota abundance in mice at genus level. n=6-7,  $\bar{x} \pm s$



A - 属水平下 Q3 对有益菌群丰度的影响; B - 属水平下 Q3 对致病菌群丰度的影响; 与对照组相比, <sup>1)</sup>P < 0.05, <sup>3)</sup>P < 0.01; 与模型组相比, <sup>2)</sup>P < 0.05。

A - Effect of Q3 on the abundance of beneficial bacteria at the genus level; B - Effect of Q3 on the abundance of pathogenic bacteria at the genus level; <sup>1)</sup>P < 0.05, <sup>3)</sup>P < 0.01, vs control group; <sup>2)</sup>P < 0.05, vs model group.

图5 Q3在属水平对小鼠肠道有益菌群和致病菌群丰度的影响。n=6~7,  $\bar{x} \pm s$

Fig. 5 Effects of Q3 on the abundance of beneficial and pathogenic bacteria in the intestine of mice at the genus level. n=6-7,  $\bar{x} \pm s$

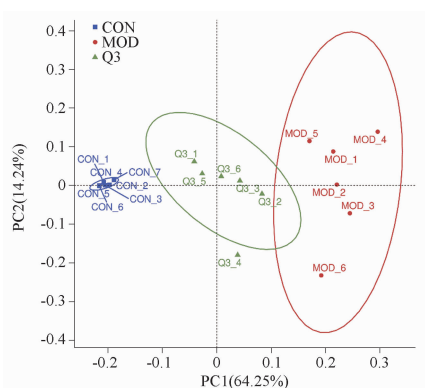
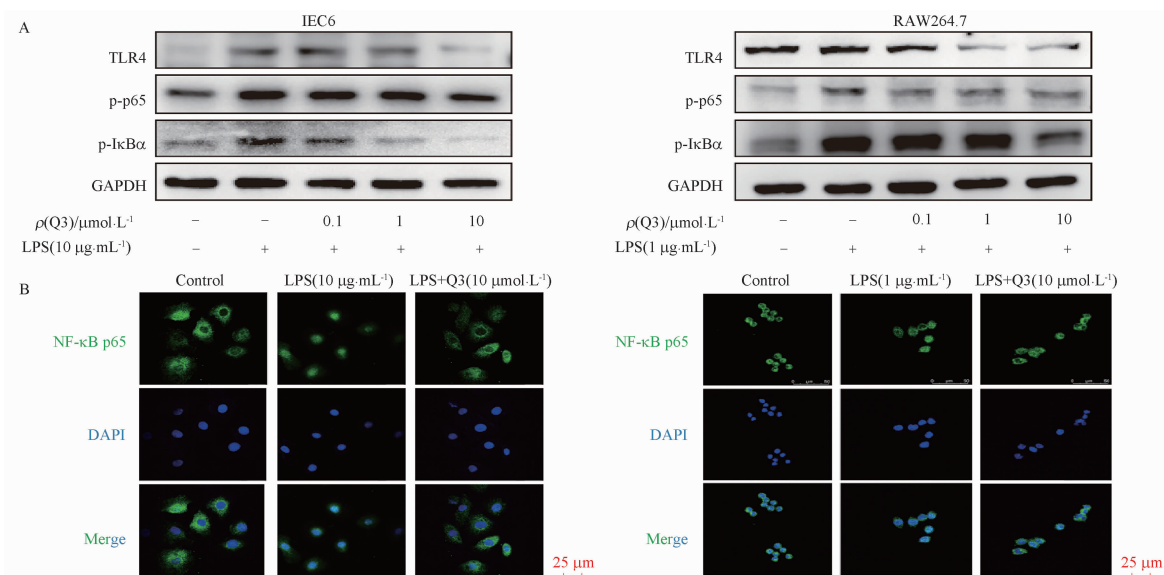


图6 小鼠肠道菌群基于操作分类单元(OTU)的主成分分析(PCA)结果。n=6~7,  $\bar{x} \pm s$

Fig. 6 The intestinal microbiota of mice in each group was based on the results of principal component analysis (PCA) of OTU. n=6-7,  $\bar{x} \pm s$

### 3.4 Q3可以在体外通过TLR4/NF- $\kappa$ B通路抑制炎症

为了进一步研究Q3抑制DSS诱导的UC机制,本研究在体外建立LPS诱导的IEC6细胞和RAW264.7细胞两种模型,通过检测Q3对LPS诱导后两种细胞炎症介质蛋白表达水平的影响判断Q3的作用机制。Western blot结果显示(图7A),LPS处理后IEC6和RAW264.7细胞中TLR4、p-p65和p-I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白表达水平增加,表明存在NF- $\kappa$ B通路的活化,而Q3可显著抑制这些异常活化的NF- $\kappa$ B通路相关蛋白的表达水平。此外,免疫荧光结果证明黄连碱衍生物Q3可以通过抑制NF- $\kappa$ B p65的核转位抑制TLR4/NF- $\kappa$ B通路(图7B)。这些结果表明,Q3可能通过抑制NF- $\kappa$ B p65的核转位减弱TLR4/NF- $\kappa$ B信号级联,从而发挥抗UC作用。



A - IEC6 和 RAW264.7 细胞中 TLR4/NF-κB 相关蛋白表达; B - IEC6 和 RAW264.7 细胞中 NF-κB p65 核转位情况 (×63)。  
A - expression of TLR4/NF-κB related proteins in IEC6 and RAW264.7 cells; B - nuclear translocation of NF-κB p65 in IEC6 and RAW264.7 cells(×63).

图 7 Q3 对脂多糖(LPS)刺激 IEC6 与 RAW264.7 细胞后 TLR4/NF-κB 相关蛋白表达变化。n = 3,  $\bar{x} \pm s$

Fig. 7 Effects of Q3 on changes of TLR4/NF-κB related protein expression in IEC6 and RAW 264.7 cells stimulated by LPS. n = 3,  $\bar{x} \pm s$

#### 4 讨论

UC 具有复杂的发病机制。研究表明,UC 的致病机制与宿主炎症反应和肠道微生态失调有关<sup>[18-19]</sup>,是一种由基因-环境相互作用驱动的对肠道微生物群的异常免疫反应<sup>[20]</sup>。目前的治疗措施着重于抑制炎症,比如 5-氨基水杨酸类药物、糖皮质激素等在轻度至重度 UC 中的应用。但除此之外,已有的小分子药物与生物制剂仍无法达到理想的治疗效果,伴随着 UC 的高复发性,往往为患者带来巨大痛苦的同时也加重社会医疗体系的负担<sup>[21]</sup>。因此,寻找药效更佳且对患者经济负担更小的药物已成为当务之急。目前已有多方研究报道提示中药治疗在 UC 中发挥着不可小觑的作用<sup>[22]</sup>。

黄连是一种著名的中药材,在距今 1 800 年前的《神农本草经》就已提到黄连清热燥湿,泻火解毒的突出疗效。近些年来,由于在临床上展现了治疗 UC 等多种潜在用途,黄连受到了各国学者的广泛关注<sup>[23]</sup>。作为黄连的特色活性成分之一,黄连碱表现出类似的治疗效应和突出的药理活性,但较低的生物利用度阻碍了黄连碱药效的进一步提高<sup>[24]</sup>。因此,笔者通过一定的结构修饰和改造合成了一种源自黄连碱的单体化合物 Q3,意图通过有针对性地改善黄连碱的药动学特性提高其成药性,最大程度上发挥黄连碱治疗 UC 的药用潜力。

TLR4 是模式识别受体 (PRR) 家族的重要成

员,是肠道微生物群变化的关键感应器,在肠道中可特异性识别病原体相关分子模式 (PAMP) 和损伤相关分子模式 (damage associated molecular patterns, DAMPs)<sup>[25-26]</sup>。在 UC 中,TLR4 作为传感器介导肠道共生微生物群与宿主免疫之间的串扰<sup>[27]</sup>,细胞表面的 TLR4 感知肠道微生物的变化并对相关分子模式进行特异性识别,通过 MyD88 和 TRIF 依赖途径进行上下游信号传递,最终激活 NF-κB<sup>[28]</sup>。在未激活状态下,NF-κB 与其抑制蛋白 IκB 结合,作为非活性二聚体复合物存在于细胞质中。在各种炎症刺激激活后,IκBα 被 IκB 激酶磷酸化后降解,NF-κB p65 释放进入细胞核激活相关基因转录表达,促进炎症细胞因子的产生,引发炎症反应<sup>[29-30]</sup>。正常生理过程中,炎性细胞因子生成有利于组织修复,但过度活化的 NF-κB 通路会引起炎症介质和细胞因子过度释放,最终形成持续的、不可控的炎症,导致组织损伤<sup>[31]</sup>。研究表明,TLR4 在 IBD 患者的上皮和固有层细胞中高表达<sup>[32]</sup>,由于 TLR4/NF-κB 信号通路的持续激活肠道炎症反复不断,迁延难愈<sup>[33]</sup>。

TLR4/NF-κB 信号通路的异常持续激活与肠道致病菌丰度显著增加有关。肠道致病菌与有益菌的稳态失调使得肠道内 LPS 含量增加,进而激活 TLR4/NF-κB 信号通路,诱发下游炎症级联反应。这种肠道菌群结构或数量失衡并不仅仅局限于消化道疾病,在代谢综合征以及高脂血症、肥胖等疾病领域也体现出

一定的疾病相关性<sup>[34]</sup>。

DSS 诱发的结肠炎能够导致结肠功能障碍,包括严重的肠道屏障损伤、炎症浸润、直肠出血和肠道菌群变化,与人类 UC 的临床和组织学表现相似<sup>[35-36]</sup>。在本研究中,通过构建 DSS 诱导的小鼠 UC 模型,考察并确认了黄连碱衍生物 Q3 在体内的抗 UC 活性。在评估 UC 进展时,体质量变化率、DAI 评分和结肠长度通常被视为炎症指标<sup>[37]</sup>。研究结果显示,Q3 显著改善了小鼠 UC 症状,具体体现在与 MOD 组相比,给予 Q3 的小鼠体质量有所恢复、DAI 评分降低、结肠挛缩得到改善、组织病理学损伤减轻。在正常生理条件下,TLR4 在肠上皮细胞中低水平表达<sup>[38]</sup>;在 UC 的病理条件下,细菌释放的 LPS 通过作用于 TLR4 受体激活宿主炎症反应<sup>[29]</sup>,这一作用触发下游 NF- $\kappa$ B 通路的激活和促炎介质的产生,从而促进 UC 肠道炎症发展。因此,提出 Q3 是否通过调节 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路抑制 DSS 诱导的小鼠 UC 的猜想。IHC 和 WB 结果表明,给予 DSS 进行造模后小鼠结肠组织中 TLR4、p-p65 和 p-I $\kappa$ B $\alpha$  的表达显著上调,Q3 可以显著降低小鼠结肠组织中 TLR4、p-p65 和 p-I $\kappa$ B $\alpha$  的蛋白表达。在 IEC6 和 RAW264.7 两种细胞上建立 LPS 刺激的体外炎症模型也表明 Q3 可以通过抑制 NF- $\kappa$ B p65 的核转位抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活。以上体内体外结果表明 Q3 可通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路发挥抗 UC 药效。

在一些小鼠肠道炎症模型中,UC 可以通过具有 IBD 样表型小鼠的粪便转移至无菌小鼠身上<sup>[39]</sup>,在常规条件下饲养时自发发生 UC 的几种模型在无菌条件下饲养时并未显示出炎症<sup>[40-41]</sup>,这提示我们肠道微生物群在 IBD 的炎症发展中起到重要作用。此前的研究表明,单味中药和众多名方中药均可发挥不同程度的抗炎作用,并能够有效改善 UC 小鼠肠道菌群<sup>[42-43]</sup>。中药有效成分能够与肠道菌群发生相互作用,通过调节肠道菌群结构及其代谢产物发挥维持肠道微生物稳态的功能<sup>[44]</sup>。最新研究显示,TLR4 信号通路对于肠道上皮的损伤以及共生菌群的识别均起到不可或缺的作用,是一把“双刃剑”<sup>[13]</sup>。慢性炎症不可避免地被 TLR4 通路放大,导致 UC 持续进展;而在稳态条件下识别共生菌群保证耐受性,消除病原微生物方面 TLR4 又是必要的<sup>[45-47]</sup>。结合 Q3 对 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路抑制作用的初期验证,为了研究 Q3 是否对肠道菌群具有一定改善作用,对不同给药组小鼠的肠道微生物群组成进行了 16S rRNA 分析。肠道菌群多样性结果表

明,Q3 有助于恢复 UC 小鼠肠道菌群的多样性。从群落结构来看,Q3 能够恢复瘤胃梭菌属 (*Ruminiclostridium*)、副拟杆菌属 (*Parabacteroides*) 等的丰度。同时,阿克曼菌 (*Akkermansia*) 等几种益生菌的丰度在给予 Q3 后显著增加。这证明 Q3 发挥的抗 UC 药效部分依托于对肠道菌群的调节作用。

综上所述,本研究发现经过结构修饰改造后的黄连碱衍生物 Q3 具有明显的抗 UC 活性,该作用强于 SASP 且剂量优势明显,具有进一步开发成为治疗 UC 的候选药物的潜力。Q3 的治疗作用一方面体现在可以通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路缓解炎症反应;另一方面,Q3 可以调节肠道菌群的组成,提高有益菌的丰度,从而改善肠道菌群状态,使肠道炎症损伤得到一定程度的恢复。尽管证明了 Q3 对 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路的抑制作用,但 Q3 通过 TLR4 对 UC 过程中肠道菌群和宿主免疫的影响还需要未来进行深入探究。本研究为黄连碱衍生物 Q3 继续开发应用于市场进行 UC 的治疗提供了可靠的实验依据。

## REFERENCES

- [1] KOBAYASHI T, SIEGMUND B, LE BERRE C, et al. Ulcerative colitis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6(1):74.
- [2] LE BERRE C, HONAP S, PEYRIN-BIROULET L. Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2023, 402(10401):571-584.
- [3] GROS B, KAPLAN G G. Ulcerative colitis in adults: A review [J]. *JAMA*, 2023, 330(10):951-965.
- [4] COWARD S, CLEMENT F, BENCHIMOL E I, et al. Past and future burden of inflammatory bowel diseases based on modeling of population-based data [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(5):1345-1353.
- [5] NG S C, SHI H Y, 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(10114):2769-2778.
- [6] ISKANDAR H N, DHERE T, FARRAYE F A. Ulcerative colitis: Update on medical management [J]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2015, 17(11):44.
- [7] SEO G S, CHAE S C. Biological therapy for ulcerative colitis: An update [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(37):13234-13238.
- [8] TANG Z H, PENG J, REN Z, et al. New role of PCSK9 in atherosclerotic inflammation promotion involving the TLR4/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Atherosclerosis*, 2017, 262:113-122.
- [9] XUE B, LIU X L, DONG W W, et al. EGCG maintains Th1/Th2 balance and mitigates ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium through TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway in rats [J]. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2017 (2017):3057268. doi: 10.1155/2017/3057268.
- [10] KE X, ZHOU F, GAO Y L, et al. Qing Hua Chang Yin exerts therapeutic effects against ulcerative colitis through the inhibition of the TLR4/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32(4):926-930.
- [11] PENG Y J, YAN Y M, WAN P, et al. Gut microbiota modulation and anti-inflammatory properties of anthocyanins from the fruits of *Lycium ruthenicum* Murray in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 136:

- 96-108.
- [12] KARAKAN T, OZKUL C, AKKOL E K, *et al.* Gut-Brain-Microbiota Axis: Antibiotics and functional gastrointestinal disorders [J]. *Nutrients*, 2021, 13(2):389.
- [13] LIU Y J, YANG M, TANG L, *et al.* TLR4 regulates ROR $\gamma$ <sup>+</sup> regulatory T-cell responses and susceptibility to colon inflammation through interaction with *Akkermansia muciniphila* [J]. *Microbiome*, 2022, 10(1):98.
- [14] DONG Y, CHEN H W, GAO J L, *et al.* Bioactive ingredients in Chinese herbal medicines that target non-coding RNAs: Promising new choices for disease treatment [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10:515.
- [15] MENG F C, WU Z F, YIN Z Q, *et al.* Coptidis rhizoma and its main bioactive components: recent advances in chemical investigation, quality evaluation and pharmacological activity [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2018, 13(1):13.
- [16] WU J S, ZHANG H, HU B Y, *et al.* Coptisine from *Coptis chinensis* inhibits production of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 780:106-114.
- [17] QIN H L, WU L Q, XIE M, *et al.* Coptine derivatives, preparation methods, pharmaceutical compositions and anti-tumor uses thereof; China, 201610130488.9[P]. 2019-10-01.
- [18] GALIPEAU H J, CAMINERO A, TURPIN W, *et al.* Novel fecal biomarkers that precede clinical diagnosis of ulcerative colitis [J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(5):1532-1545.
- [19] CASTRO-DOPICO T, DENNISON T W, FERDINAND J R, *et al.* Anti-commensal IgG drives intestinal inflammation and type 17 immunity in ulcerative colitis [J]. *Immunity*, 2019, 50(4):1099-1114.
- [20] CHANG J T. Pathophysiology of inflammatory bowel diseases [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(27):2652-2664.
- [21] KAPLAN G G. The global burden of IBD: from 2015 to 2025 [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 12(12):720-727.
- [22] LIU Y, LI B G, SU Y H, *et al.* Potential activity of Traditional Chinese Medicine against ulcerative colitis: A review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 289:115084.
- [23] WU J S, LUO Y, DENG D H, *et al.* Coptisine from *Coptis chinensis* exerts diverse beneficial properties: A concise review [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(12):7946-7960.
- [24] REN W, NAN F C, LI S M, *et al.* Red Emissive carbon dots prepared from polymers as an efficient nanocarrier for coptisine delivery *in vivo* and *in vitro* [J]. *Chem Med Chem*, 2021, 16(4):646-653.
- [25] BRENNAN J J, GILMORE T D. Evolutionary origins of Toll-like receptor signaling [J]. *Mol Biol Evol*, 2018, 35(7):1576-1587.
- [26] BLASIUS A L, BEUTLER B. Intracellular Toll-like receptors [J]. *Immunity*, 2010, 32(3):305-315.
- [27] BRUNING E E, COLLIER J K, WARDILL H R, *et al.* Site-specific contribution of Toll-like receptor 4 to intestinal homeostasis and inflammatory disease [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(2):877-888.
- [28] HUI Y, LI J T, WEI H L, *et al.* Study on the action mechanism of 6-Shogaol in the treatment of ulcerative colitis from the signaling pathway of Notch and TLR4/NF- $\kappa$ B [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2020, 55(16):1331-1338.
- [29] YU C Y, WANG D, YANG Z B, *et al.* Pharmacological effects of polyphenol phytochemicals on the intestinal inflammation via targeting TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(13):6939.
- [30] WANG N, WANG H G, YAO H, *et al.* Expression and activity of the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway in mouse intestine following administration of a short-term high-fat diet [J]. *Exp Ther Med*, 2013, 6(3):635-640.
- [31] NEURATH M F. Cytokines in inflammatory bowel disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(5):329-342.
- [32] SZE BENI B, VERES G, DEZSOFI A, *et al.* Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease [J]. *Clin Exp Immunol*, 2008, 151(1):34-41.
- [33] BURGE K, GUNASEKARAN A, ECKERT J, *et al.* Curcumin and intestinal inflammatory diseases: Molecular mechanisms of protection [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(8):1912.
- [34] HAO Q H, YANG X, YANG Y P, *et al.* Effects of Jiedu-jiangzhuo Granules on gut microbiota and TLR4/NF- $\kappa$ B pathway of metabolic syndrome rats [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2020, 55(8):595-602.
- [35] LI D T, FENG Y, TIAN M L, *et al.* Gut microbiota-derived inosine from dietary barley leaf supplementation attenuates colitis through PPAR $\gamma$  signaling activation [J]. *Microbiome*, 2021, 9(1):83.
- [36] BILSBOROUGH J, FIORINO M F, HENKLE B W. Select animal models of colitis and their value in predicting clinical efficacy of biological therapies in ulcerative colitis [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2021, 16(5):567-577.
- [37] YU P, KE C X, GUO J X, *et al.* *Lactobacillus plantarum* L15 alleviates colitis by inhibiting LPS-mediated NF- $\kappa$ B activation and ameliorates DSS-induced gut microbiota dysbiosis [J]. *Front Immunol*, 2020, 11:575173.
- [38] TOIYAMA Y, ARAKI T I, YOSHIYAMA S, *et al.* The expression patterns of toll-like receptors in the heal pouch mucosa of postoperative ulcerative colitis patients [J]. *Surg Today*, 2006, 36(3):287-290.
- [39] SCHAUBECK M, CLAVEL T, CALASAN J, *et al.* Dysbiotic gut microbiota causes transmissible Crohn's disease-like ileitis independent of failure in antimicrobial defence [J]. *Gut*, 2016, 65(2):225-237.
- [40] BALISH E, WARNER T. Enterococcus faecalis induces inflammatory bowel disease in interleukin-10 knockout mice [J]. *Am J Pathol*, 2002, 160(6):2253-2257.
- [41] WAIMANN M, BECHTOLD O, FRICK J S, *et al.* Bacteroides vulgatus protects against Escherichia coli-induced colitis in gnotobiotic interleukin-2-deficient mice [J]. *Gastroenterology*, 2003, 125(1):162-177.
- [42] LUO S, WEN R Y, WANG Q, *et al.* Rhubarb Peony Decoction ameliorates ulcerative colitis in mice by regulating gut microbiota to restoring Th17/Treg balance [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 231:39-49.
- [43] ZHU L, XU L Z, ZHAO S, *et al.* Protective effect of baicalin on the regulation of Treg/Th17 balance, gut microbiota and short-chain fatty acids in rats with ulcerative colitis [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(12):5449-5460.
- [44] LIU J, FANG W L, TANG Z, *et al.* An overview of the mutual regulation research between traditional Chinese medicine and gut microbes [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2023, 58(17):1533-1539.
- [45] DHEER R, SANTAOLALLA R, DAVIES J M, *et al.* Intestinal epithelial Toll-like receptor 4 signaling affects epithelial function and colonic microbiota and promotes a risk for transmissible colitis [J]. *I Infect Immun*, 2016, 84(3):798-810.
- [46] FUKATA M, MICHELSEN K S, ERI R, *et al.* Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005, 288(5):G1055-1065.
- [47] HIMMEL M E, HARDENBERG G, PICCIRILLO C A, *et al.* The role of T - regulatory cells and Toll - like receptors in the pathogenesis of human inflammatory bowel disease [J]. *Immunology*, 2008, 125(2):145-153. (收稿日期:2024-05-11)