

制附子总生物碱抗小鼠溃疡性结肠炎的作用及其机制研究

金城^b, 喻松霞^a, 赵凡^c, 吴霞^a, 吴明兰^a, 张乔^a, 赵青威^a, 胡兴江^{a*} (浙江大学医学院附属第一医院, a. 临床药学部, 浙江省药物临床研究与评价技术重点实验室, 浙江省中药临床评价与转化研究中医药重点实验室; b. 动物实验中心; c. 乳腺外科, 杭州 310003)

摘要: **目的** 本实验旨在初步探索制附子的总生物碱成分 (*Aconitum carmichaelii* Debx. alkaloids, ACA) 对溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 小鼠的潜在治疗作用及其相关作用机制。 **方法** 通过液质联用技术对 ACA 的化学成分进行分析, 再通过葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 诱导的小鼠 UC 模型, 评估连续 7 d 给予柳氮磺吡啶 (SASP, 200 mg · kg⁻¹) 和 ACA (10、20 mg · kg⁻¹) 对小鼠体质量、疾病活动指数、结肠长度和结肠病理损伤等指标的影响, 并结合体外抗炎活性实验和酶联免疫吸附以及 Western blot 等实验考察 ACA 的抗炎活性和机制。 **结果** ACA 主要由多种特征型单体生物碱组成。ACA (10、20 mg · kg⁻¹) 能显著改善 DSS 诱导的小鼠体质量减轻、疾病指数升高、结肠缩短和病理损伤等。同时, ACA 可降低 DSS 所致的结肠炎症因子 (如 IL-1 β 、IL-18 和 IL-6) 的含量。体外炎症模型同样证实 ACA 具有类似于 NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体的特异性抑制剂 MCC950 的抑制 LPS 和 Nigericin 双重诱导 THP-1 细胞上清中上述炎症因子分泌的作用。蛋白表达结果提示该作用可能与其抑制 NLRP3 信号通路有关。 **结论** ACA 含有多种结构类似的单体生物碱, 具有抗小鼠 UC 的活性, 可能与抑制 NLRP3 炎症小体发挥抗炎作用。

关键词: 附子; 生物碱; 化学成分; 溃疡性结肠炎; NOD 样受体蛋白 3

doi:10.11669/cpj.2024.17.004 中图分类号:R966 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)17-1573-08

Anti-Ulcerative Colitis Effects and the Mechanisms of Total Alkaloids Extracted from Processed *Aconitum carmichaelii* Debx

JIN Cheng^b, YU Songxia^a, ZHAO Fan^c, WU Xia^a, WU Minglan^a, ZHANG Qiao^a, ZHAO Qingwei^a, HU Xingjiang^{a*} (a. Zhejiang Provincial Key Laboratory for Drug Evaluation and Clinical Research, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for Clinical Evaluation and Transformation of Traditional Chinese Medicine, Department of Clinical Pharmacy; b. Laboratory Animal Center; c. Department of General Surgery; the First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the potential therapeutic effects and underlying mechanisms of total alkaloids derived from processed *Aconitum carmichaelii* Debx (ACA) on ulcerative colitis (UC) in mice. **METHODS** The chemical composition of ACA was analyzed using liquid chromatography-mass spectrometry. A mouse model of UC was induced using dextran sodium sulfate (DSS) to assess the effects of continuous administration of salicylazosulfapyridine (SASP) (200 mg · kg⁻¹) and ACA (10 and 20 mg · kg⁻¹) over seven days, evaluating parameters such as body weight, disease activity index, colon length, and pathological damage to the colon. The anti-inflammatory activity and mechanisms of ACA were investigated through *in vitro* experiments, enzyme-linked immunosorbent assay, and Western blotting. **RESULTS** ACA is primarily composed of various characteristic monomeric alkaloids. Treatment with ACA (10 and 20 mg/kg) significantly mitigated weight loss, disease index elevation, colon shortening, and pathological damage induced by DSS in the mice. Additionally, ACA reduced the levels of inflammatory factors, including IL-1 β , IL-18, and IL-6, elevated by DSS in colitis. The *in vitro* inflammatory model further demonstrated that ACA functions as a specific inhibitor, MCC950, similar to the NLRP3 inflammasome, which suppresses the secretion of the aforementioned inflammatory factors in the supernatant of LPS- and Nigericin-induced THP-1 cells. Protein expression analysis suggested that this effect may be linked to the inhibition of the NLRP3 signaling pathway. **CONCLUSION** ACA contains multiple structurally similar monomeric alkaloids that exhibit anti-UC activity in mice, potentially exerting anti-inflammatory effects through the inhibition of the NLRP3 inflammasome.

KEY WORDS: *Aconitum carmichaelii* Debx; alkaloid; chemical composition; ulcerative colitis; NLRP3

基金项目:浙江省自然科学基金项目资助(LTGY24H030001, LQ24H280005, LQ24H280006, LQ23H280019)

作者简介:金城,男,学士,助理实验师 研究方向:中药药理 *通讯作者:胡兴江,男,硕士,主任药师,硕士生导师 研究方向:中药活性成分筛选及其作用机制研究 Tel:(0571)87236537

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种在世界范围内广泛流行的复杂难治性消化系统疾病,与免疫、炎症反应和肠道微生物群等多种因素有关^[1-2],常伴有结肠黏膜和黏膜下层持续的炎性病变和纤维瘢痕以及黏膜糜烂等。NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体是一种先天免疫受体,介导炎症小体复合体的组装,与炎症细胞因子的分泌有关,在 UC 的发病机制中至关重要^[3-4]。NLRP3 炎症小体是由 NOD 样受体 (NLR)、适配分子凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 和效应分子前半胱氨酸蛋白酶-1 (pro-caspase-1) 组成的最重要的与炎症相关的复合物之一。激活的半胱氨酸蛋白酶-1 导致 IL-1 β 的成熟和分泌,引发与炎症相关的多种生物效应。临床上虽然已有较为有效的治疗药物,但 90% 以上的 UC 患者在疾病诊断后不久即开始口服或直肠给药 5-氨基水杨酸类药物,如美沙拉嗪和柳氮磺胺吡啶 (sulfasalazin, SASP)^[3]。但此类药物仍然存在有效率低、不良反应大等很多问题^[5-8]。进一步发掘具有显著抗 UC 作用的高效、低毒和廉价的治疗药物仍具有重要的临床和现实意义。

附子为毛茛科植物乌头 (*Aconitum carmichaelii* Debx.) 的子根加工品,味辛、甘,性大热。附子具有回阳救逆、补火助阳、散寒止痛的功效,可治疗亡阳虚脱、虚寒吐泻、肾阳虚衰、风寒湿痹等病症。临床中附子复方制剂如附子理中丸、薏苡附子败酱散等可用于结肠炎的治疗^[9-12]。其中,附子生物碱 (*Aconitum carmichaelii* Debx. alkaloids, ACA) 是附子主要生物活性物质之一,具有强心、镇痛、抗炎、抗老年痴呆、组织再生,抗氧化等活性^[13]。前期研究表明附子总生物碱可通过抑制 MAPK/NF- κ B/STAT3 信号通路抑制髓过氧化物酶和促炎细胞因子,具有显著的抗溃疡性结肠炎活性,而脂溶性生物碱通过抑制 NF- κ B 和 MAPKs 信号通路缓解类风湿性关节炎^[14-16]。一些活性成分已被证明对 α -肿瘤坏死因子 (TNF- α) 刺激的细胞中的 NF- κ B 活性具有强大的调节作用,并对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的大鼠急性肺损伤具有保护作用^[17]。鉴于此,本课题组在前期筛选得到大量具有潜在抗 UC 作用的植物生物碱的基础上,推测 ACA 可能具有抗 UC 的作用,并进一步通过葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 诱导的小鼠 UC 模型对其活性进行了确证。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 制附子购自安国市旭芳中药材经营有限公司,经浙江理工大学生命科学与医药学院张琳教授鉴定为制附子。DSS (批号: YD05012, 美国 MP Biomedical 公司); SASP (批号: D1210A, 含量 > 97%, 大连美仑生物技术有限公司); 酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒 (IL-1 β 、IL-18 和 IL-6) (美国 RayBiotech 公司); LPS 和尼日利亚菌素 (Nigericin) (美国 Glpbio 公司); 所有抗体 (caspase-1, IL-1 β , β -actin) (英国 Abcam 公司)。

1.1.2 仪器 UPLC-TOF-MS/MS 液质联用系统 (UPLC 超高效液相仪, 美国 Waters 公司; 5600⁺ TOF-MS/MS 质谱系统, 美国 AB Sciex 公司); 伯乐酶标仪 (Microplate Reader 680, 美国 BIO-RAD 公司); 切片机 (RM-2235, 德国 Leika 公司); 全套 Western Blot 设备 (碧云天生物技术股份有限公司); BeyoImagerTM 600 化学发光成像系统; 电子天平 (XP26, 瑞士梅特勒公司)。

1.2 方法

1.2.1 TAN 的提取和纯化 附子总碱制备: ①取附子 2.0 kg, 粉碎, 过 24 目药筛。②取上述粉末 400 g 置于 5.0 L 提取瓶, 加入 10 倍量体积分数 85% 乙醇溶液 (pH 值 2~3), 回流提取 2.0 h, 抽滤; 滤渣再加入 10 倍量 85% 乙醇溶液 (pH 调至 2~3), 继续回流提取 2.0 h, 抽滤, 合并滤液。平行提取 5 份。③取上述提取液, 减压浓缩 (真空度 -0.07 至 -0.1, 温度 65 $^{\circ}$ C) 至无醇味, 并继续浓缩至投料量的 2 倍 (约 4.0 L), 离心, 取上清液。④取上述上清液, 加入等体积石油醚溶液连续萃取 3 次, 合并石油醚层, 45 $^{\circ}$ C 减压回收石油醚, 得附子油脂 (25.44 g)。⑤取水相加入等体积二氯甲烷溶液连续萃取 3 次, 合并二氯甲烷层, 45 $^{\circ}$ C 减压回收二氯甲烷, 得附子弱碱性生物碱 (1.74 g)。⑥取酸水层, 用质量分数 4% 氢氧化钠溶液调至 pH 10, 然后加入等体积二氯甲烷溶液连续萃取 3 次, 合并二氯甲烷层, 45 $^{\circ}$ C 减压回收二氯甲烷, 得到附子生物碱 (7.8 g) 见图 1。

1.2.2 ACA 的主要成分鉴定 ACA 用水溶解, 配制成浓度约为 2 μ g \cdot mL⁻¹ 的溶液, 经过超声、离心后取上清进行液相色谱串联质谱 (LC-MS/MS) 检测。液相条件: ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m), 0.1% 甲酸水 (A)-

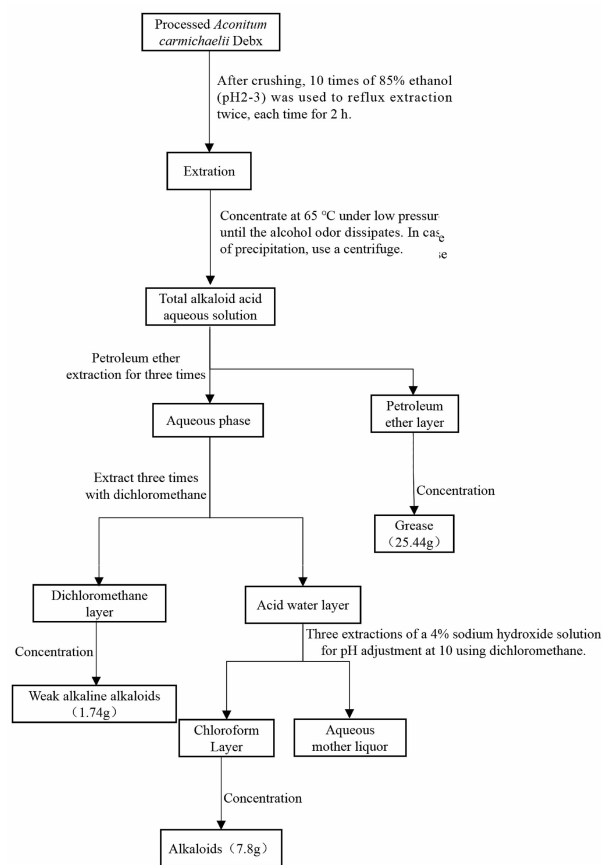


图1 附子生物碱(ACA)的提取流程图

Fig. 1 The diagram of extraction process of ACA

表1 ACA分析物的质谱参数

Tab. 1 Mass spectrometry parameters of the ACA analytes

Compound	Molecular formula	Parent (m/z)	Fragment (m/z)	Cone voltage/V	Collision energy/V
Songorine	$C_{22}H_{31}NO_3$	358.2	340.3	16	15
16 β -Hydroxycardiopetaline	$C_{21}H_{33}NO_4$	364.2	346.3	34	20
Karakoline	$C_{22}H_{35}NO_4$	378.3	360.3	45	20
Chuan-wu-base A	$C_{23}H_{37}NO_5$	408.3	390.3	27	15
Senbusine A	$C_{23}H_{37}NO_6$	424.3	356.2	30	30
Talatizamine	$C_{24}H_{39}NO_5$	422.3	390.3	28	20
Neoline	$C_{24}H_{39}NO_6$	438.3	420.3	34	20
Fuziline	$C_{24}H_{39}NO_7$	454.3	436.3	40	20
Benzoyldeoxyaconine	$C_{32}H_{45}NO_9$	588.3	105.1	56	45
10-OH-benzoylmesaconine	$C_{31}H_{43}NO_{11}$	606.3	542.2	30	30
Monoacetyltalatizamine	$C_{26}H_{41}NO_6$	464.3	432.3	28	15
Benzoyl-8-OH-mesaconine	$C_{31}H_{43}NO_{10}$	590.3	105.1	52	45
10-OH-mesaconitine	$C_{33}H_{45}NO_{12}$	648.3	105.1	52	50
Benzoylhypaconine	$C_{31}H_{43}NO_9$	574.3	478.2	30	30
Hypaconitine	$C_{33}H_{45}NO_{10}$	616.3	105.1	45	45
Mesaconitine	$C_{33}H_{45}NO_{11}$	632.3	572.3	60	20
Aconitine	$C_{34}H_{47}NO_{11}$	646.3	105.1	40	45
10-Hydroxy aconitine	$C_{34}H_{47}NO_{12}$	662.3	105.1	60	40
Benzoyl-8-OCH ₃ -mesaconine	$C_{32}H_{45}NO_{10}$	604.3	105.1	56	60
3-Deoxyaconitine	$C_{34}H_{47}NO_{10}$	630.3	570.3	58	15

乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 0.5 min, 5% B; 0.5 ~ 12 min, 5% ~ 20% B; 12 ~ 15 min, 20% ~ 30% B; 15 ~ 18 min, 30% ~ 60% B; 18 ~ 18.5 min, 60% ~ 90% B; 18.5 ~ 22 min, 95% B)。质谱条件: 正离子模式, SCAN 模式扫描获得总离子流图, MRM 模式提取化合物离子对。离子源温度, 150 °C; 脱溶剂气温度, 400 °C; 脱溶剂气流速, 800 L · h⁻¹。分析物分子式, 监测离子对, 锥孔电压, 碰撞能参数见表1。

1.2.3 小鼠 UC 模型的建立 SPF 级 C57BL/6 小鼠购自浙江省实验动物中心, 雄性, 体质量: 18 ~ 22 g。本研究经浙江大学医学院第一附属医院实验动物伦理委员会批准(伦理审查编号: No. 2021-1200)。根据之前的研究^[15-17]以及本研究的预实验结果, 30 只 C57BL/6 小鼠经适应性饲养一周后, 随机分为 5 组, 每组 6 只: 空白组、模型组、SASP (200 mg · kg⁻¹)组、ACA (10 和 20 mg · kg⁻¹)低剂量和高剂量组。除空白组外, 所有小鼠自由饮用 3% DSS 溶液 7 d 以诱导 UC。在整个 7 d 内, 以 10 mL · kg⁻¹体质量的体积灌胃给药, 早晚各一次。期间观察所有 C57BL/6 小鼠的活动状态, 每天称重一次。疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分: 通过计算小鼠的体质量减轻, 观察每只小鼠肛门处稀便和血便的状态等来进行评估^[6](表2)。

表2 溃疡性结肠炎(UC)的疾病活动指数(DAI)评分标准

Tab. 2 Disease activity index (DAI) scoring criteria for ulcerative colitis (UC)

DAI score	Weight loss /%	Stool consistency	Occult/gross bleeding
0	None	Normal	Normal
1	1~5		
2	5~10	Loose stools	Hemoccult positive
3	10~20		
4	>20	Diarrhea	Gross bleeding

表3 小鼠结肠组织的病理学评分表

Tab. 3 The pathology scoring table of colon tissue in mice

Score	Extent of Inflammation	Infiltration neutrophils + lympho-histiocytes	Extent of crypt damage	Sub-mucosal oedema	Loss of goblet cells	Reactive epithelial hyperplasia
0	None	None	None	None	None	None
1	Mucosa	Focal	Basal one third	Focal	Focal	Focal
2	Mucosa + submucosa	Multifocal	Basal two third	Multifocal	Multifocal	Multifocal
3	Mucosa + submucosa + muscle layer	Diffuse	Entire crypt damage	Diffuse	Diffuse	Diffuse
4	Transmural	-	Crypt damage + ulceration	-	-	-

1.2.5 ACA 抑制 THP-1 细胞中 NLRP3 炎症小体的激活 THP-1 细胞购自中国国家鉴定细胞培养物保藏中心,接种到 24 孔板中(每孔 5×10^5 个细胞),并向每个孔中加入 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 刺激细胞 4 h。随后加入不同质量浓度的 ACA (5 、 10 和 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和 NLRP3 抑制剂 MCC950 ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 h。然后加入 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NLRP3 激活剂 Nigericin 处理 1 h。最后,收集细胞培养基的上清液和细胞质蛋白进行 ELISA 和蛋白质印迹分析。

1.2.6 ELISA 分析炎症因子水平 按照制造商的说明进行 ELISA 分析。将准确称量后的小鼠结肠组织置于 2.0 mL 离心管中,加入 100 μL 的预冷磷酸盐缓冲溶液(PBS)缓冲液(1:9, pH 7.4, 不含 Mg^{2+} 和 Ca^{2+}),在碎冰上进行机械匀浆。离心后,通过 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度。收集结肠组织的匀浆和 THP-1 细胞的上清液,并立即使用 ELISA 试剂盒和 Microplate Reader 680 分析促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 的水平。

1.2.7 WB 实验评价 ACA 对小鼠结肠组织 NLRP3 炎症小体的激活作用 与之前的研究方法^[7]类似,本研究对小鼠结肠组织进行破碎、裂解、蛋白提取和定量后,标准化所有样品至相同的浓度。使用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离所有蛋白质样品,并电泳转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。然后将膜与相应的一级和二级抗体孵育。抗体的稀释比:IL-1 β (1:5 000)、Caspase-1

1.2.4 ACA 抗 UC 的活性评价 DAI 评分可以通过评估小鼠的体质量减轻、腹泻、粪便中的血液和其他症状来计算^[6]。在实验的第 8 天,所有小鼠在麻醉后,打开腹腔并对结肠进行解剖、测量和拍照。同时,脾脏系数计算为器官质量/体质量。此外,部分结肠组织用 4% 多聚甲醛固定两天后进行包埋、切片、HE 染色和扫描后观察。采用炎症程度、中性粒细胞浸润、杯状细胞损伤程度等多个指标^[6](表 3)对结肠组织进行病理学评价。其余部分直接冻存在液氮中。

(1:5 000)、 β -actin (1:2 000) 和二抗 (15 000)。使用电化学发光仪检测所有蛋白质条带的灰度值,使用 β -actin 作为内参对照。

1.2.8 统计分析 所有数据以 3 次检测的平均值 \pm 标准差表示,并使用 GraphPad Prism 7.0 软件的 Tukey's HSD 检验通过单因素方差分析评估统计学差异, $P < 0.05$ 被认为具有统计学显著性。

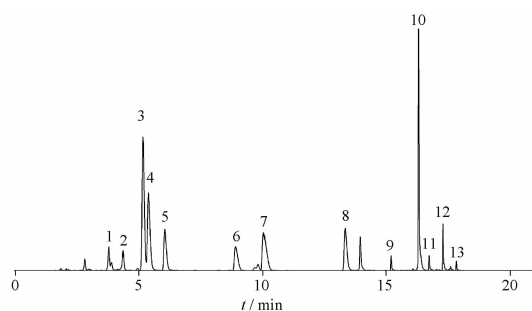
2 结果

2.1 ACA 的化学成分分析

LC-MS/MS 指认 ACA 的主要成分见图 2,在其中发现了含量较高的乌头碱、苯甲酰新乌头原碱、新乌宁碱、塔拉乌头胺、准噶尔乌头碱、附子宁碱、川乌碱甲、森布星 A、16 β -羟基心瓣翠雀碱、10-羟基新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、次乌头碱和苯甲酰-8-甲氧基-新乌头原碱(表 4)。

2.2 ACA 改善 UC 小鼠的多种症状

空白组小鼠生长状况良好,体质量一直稳定上升,模型组与药物组小鼠体质量均出现不同程度的下降(图 3A)。其中,ACA (10 和 $20 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和 SASP ($200 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组均于第 7 天明显改善了这种下降的幅度(图 3A)。同时,DSS 处理的小鼠 DAI 评分显著增加,而 ACA (10 和 $20 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和 SASP ($200 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 均能显著降低 DAI 评分(图 3B)。此外,模型组小鼠结肠长度 (5.11 ± 0.37) cm,较空白组结肠长度 (7.57 ± 0.66) cm 出现显著下降,



1 - 森布星 A; 2 - 16 β -羟基心瓣翠雀碱; 3 - 多根乌头碱; 4 - 异塔拉萨定; 5 - 准噶尔乌头碱; 6 - 附子宁碱; 7 - 新乌宁碱; 8 - 塔拉乌头碱; 9 - 单乙酰塔拉乌头碱; 10 - 苯甲酰新乌头原碱; 11 - 苯甲酰基-8-甲氧基 - 新乌头原碱; 12 - 10-羟基新乌头碱; 13 - 次乌头碱。

1 - senbusineA; 2 - 16 β -Hydroxycardiopetaline; 3 - karakoline; 4 - isotalatizidine; 5 - songorine; 6 - fuziline; 7 - neoline; 8 - talatizamine; 9 - monoacetyltalatizamine; 10 - benzoyl-8-OH-mesaconine; 11 - benzoyl-8-OCH₃ - mesaconine; 12 - 10-OH-aconitine; 13-hypoaconitine.

图2 ACA的主要成分鉴定的LC-MS/MS分析谱图

Fig. 2 Chemical composition analysis results of ACA using HPLC

而 ACA (10 和 20 mg · kg⁻¹) 高低剂量组结肠长度分别为 (6.04 ± 0.35) cm 和 (6.24 ± 0.23) cm, 可显著改善 DSS 引起的结肠缩短 (图 3C), 与 SASP 组改善 DSS 引起的结肠缩短至 (6.07 ± 0.25) cm 的作用相当 (图 3D)。以上数据表明, SASP 和 ACA 可以显著改善 DSS 诱导的小鼠多种 UC 症状。

表4 ACA的主要生物碱成分的组成情况

Tab. 4 The composition of the main alkaloid components of ACA

Peak number	Names	Abbreviations of names	t _R /min	Chemical formula
1	Senbusine A	SA	3.79	C ₂₃ H ₃₇ NO ₆
2	16 β -Hydroxycardiopetaline	16-OH-CPTL	4.37	C ₂₁ H ₃₃ NO ₄
3	Karakoline	KCL	5.17	C ₂₂ H ₃₅ NO ₄
4	Isotalatizidine	ITZD	5.39	C ₂₃ H ₃₇ NO ₅
5	Songorine	SCR	6.06	C ₂₂ H ₃₁ NO ₃
6	Fuziline	FZL	8.92	C ₂₄ H ₃₉ NO ₇
7	Neoline	NOL	10.04	C ₂₄ H ₃₉ NO ₆
8	Talatizamine	TLSM	13.35	C ₂₄ H ₃₉ NO ₅
9	Monoacetyltalatizamine	Ac-TLSM	15.2	C ₂₆ H ₄₁ NO ₆
10	Benzoyl-8-OH-mesaconine	BMA	16.31	C ₃₁ H ₄₃ NO ₁₀
11	Benzoyl-8-OCH ₃ -mesaconine	8-MeO-BMA	16.74	C ₃₂ H ₄₅ NO ₁₀
12	10-OH-aconitine	10-OH-MA	17.3	C ₃₄ H ₄₇ NO ₁₂
13	Hypoaconitine	HA	17.84	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₀

2.3 ACA 减轻 DSS 诱导的 UC 小鼠的结肠组织损伤

正常小鼠结肠上皮组织完整, 组织结构正常, 腺体排列规则, 无炎症细胞浸润。相比之下, 模型组小

鼠结肠组织黏膜层不完整, 腺体不规则, 炎症细胞浸润较多。SASP (200 mg · kg⁻¹) 和 ACA (10 和 20 mg · kg⁻¹) 组小鼠结肠组织具有更完整的组织和规则的腺体排列, 以及更少的浸润炎症细胞 (图 4A)。SASP 和 ACA 显著逆转了结肠组织损伤, 并改善了结肠炎症的组织病理学评分 (图 4B)。这些结果表明 SASP 和 ACA 可以减轻 DSS 诱导的小鼠结肠损伤。

2.4 ACA 可在体内和体外抑制 NLRP3 炎症小体的激活

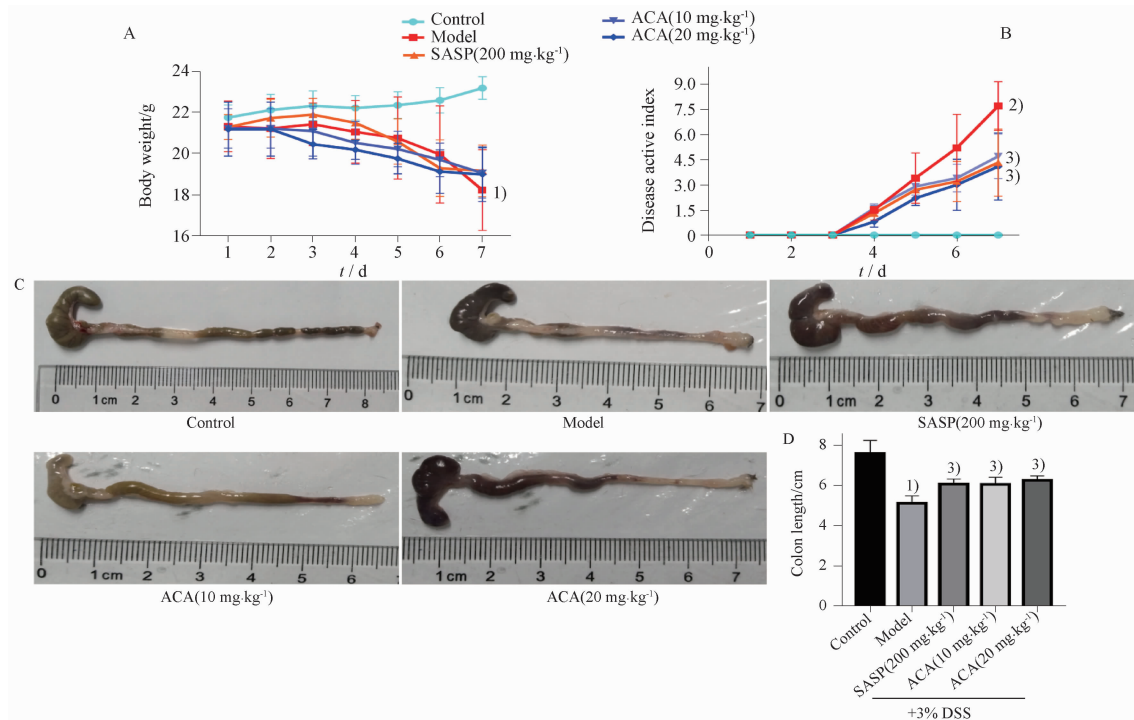
与空白组相比, DSS 诱导小鼠结肠中的炎症因子 IL-1 β (图 5A)、IL-6 (图 5B) 和 IL-18 (图 5C) 水平出现显著升高。而与模型组相比, ACA 和 SASP 均可显著降低 IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 的水平。为了进一步证实这种作用机制, 本研究检测了 ACA 对 LPS 和 Nigericin 联合诱导的 THP-1 细胞中 NLRP3 炎症小体激活的抑制作用。ACA (5、10 和 20 μ g · mL⁻¹) 在体外可有效抑制 LPS 和 Nigericin 诱导的 IL-1 β (图 5D)、IL-6 (图 5E) 和 IL-18 (图 5F) 的释放, 其抑制作用与 NLRP3 炎症小体激活的特异性抑制剂 MCC950 (5 μ mol · L⁻¹) 的抑制作用相当。这些结果表明, ACA 可能有效的抑制 NLRP3 炎症小体的激活, 从而抑制多种炎症因子的释放。

2.5 ACA 抑制小鼠 NLRP3 caspase-1 和 IL-1 β 的激活

蛋白表达结果显示模型组激活后的 Caspase-1 和 IL-1 β 表达水平显著升高 (图 6A)。而 SASP 和 ACA 显著抑制了 Caspase-1 (图 6B) 和 IL-1 β (图 6C) 的表达水平。这些结果表明, ACA 可以有效抑制 DSS 处理的小鼠 NLRP3 炎症小体的激活, 从而抑制多种炎症因子的释放而发挥抗 UC 的作用。

3 讨论

生物碱是附子的主要化学成分之一, 是其发挥疗效的主要活性成分^[13]。许多含有 ACA 的中药制剂如参附注射液、右归丸和小金胶囊等已被广泛用于治疗多种人体疾病^[10-11]。而抗炎和补阳作用可能是 ACA 的两个重要药理学特性。迄今为止, 研究人员已从附子中分离出一系列生物碱, 并初步确定了其心脏保护、镇痛、抗炎、抗肿瘤和抗氧化等药理活性^[13]。然而, ACA 化学成分的不确定性和复杂性在一定程度上限制了其进一步开发和临床应用^[9, 14, 18-19]。本研究利用改进的生物碱提取工艺,

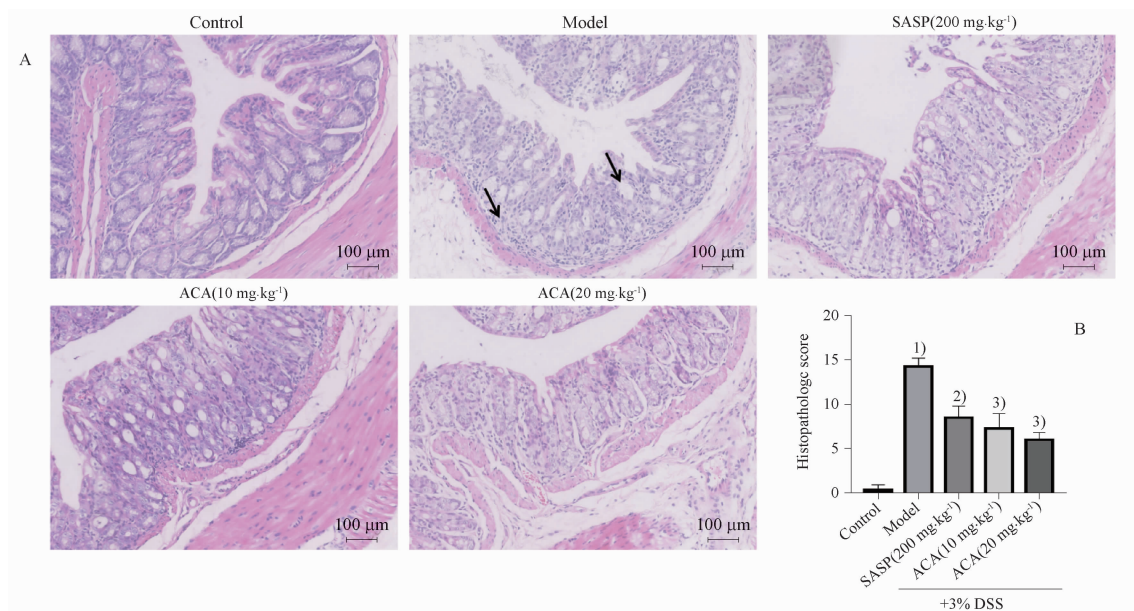


A - 各组小鼠的体质量变化; B - 各组小鼠的疾病指数的变化; C - 各组小鼠结肠长度的变化; D - 结肠长度的定量结果。与空白组相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.001$; 与模型组相比, ³⁾ $P < 0.05$ 。

A - curves of body weight changes; B - DAI change in different groups; C - shorten of colon tissues; D - quantitative results of colon length. ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.001$, vs control; ³⁾ $P < 0.05$, vs model.

图3 ACA 抗葡聚糖硫酸钠 (DSS) 诱导小鼠 UC 的作用。 $n = 6, \bar{x} \pm s$

Fig. 3 The effect of ACA on DSS-induced UC mice. $n = 6, \bar{x} \pm s$



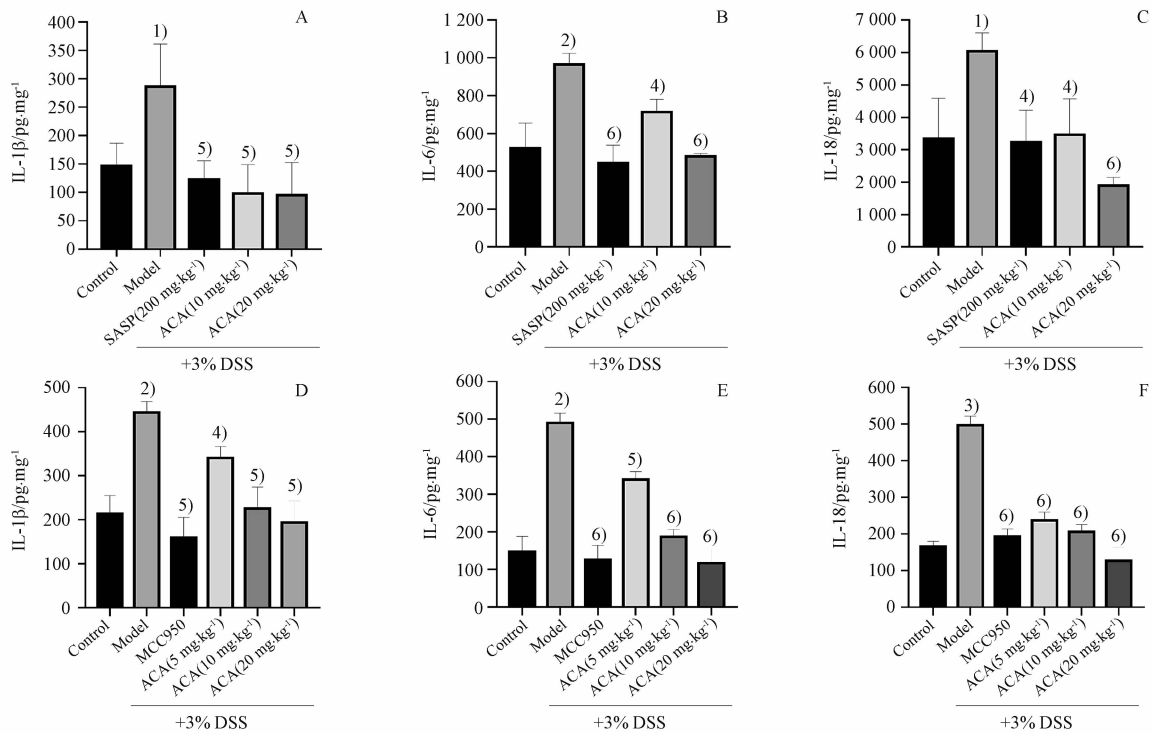
A - 结肠段的典型组织学照片 (箭头显示不完整组织、不规则腺体和许多浸润的炎性细胞的病理变化); B - 结肠切片的形态学评分计算; 与空白组相比, ¹⁾ $P < 0.001$; 与模型组相比, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ 。

A - representative pictures of colonic segments, arrows showed pathological changes of incomplete tissue, irregular glands, and infiltrating inflammatory cells; B - morphology score of colon sections. ¹⁾ $P < 0.001$, vs control; ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$, vs model.

图4 ACA 和柳氮磺吡啶 (SASP) 抗 DSS 诱导的 UC 小鼠代表性结肠样本的组织学结果。 $n = 6, \bar{x} \pm s$

Fig. 4 HE-stained of representative cross-sectional colon sections in DSS-treated mice after the treatment of ACA and SASP.

$n = 6, \bar{x} \pm s$

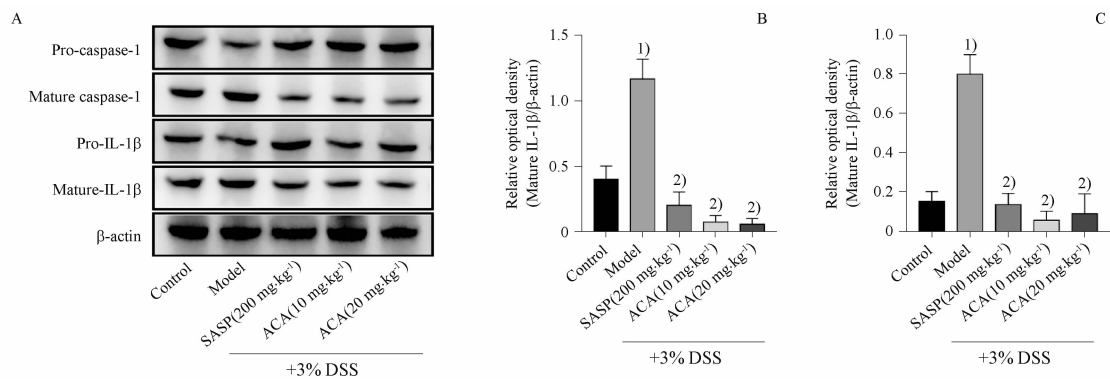


A - ACA 抑制 UC 小鼠结肠组织中 IL-1 β 含量; B - ACA 抑制 UC 小鼠结肠组织中 IL-6 含量; C - ACA 抑制 UC 小鼠结肠组织中 IL-18 的定量结果 ($n = 6$); D - ACA 抑制 THP-1 细胞上清液中 IL-1 β 的分泌; E - ACA 抑制 THP-1 细胞上清液中 IL-6 的分泌; F - ACA 抑制 THP-1 细胞上清液中 IL-18 的分泌 ($n = 3$)。与空白组相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$; 与模型组相比, ⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$, ⁶⁾ $P < 0.001$ 。

A - quantitative results of ACA inhibit the expression levels of IL-1 β in colon tissue of mice; B - ACA inhibit the expression levels of IL-6 in colon tissue of mice; C - ACA inhibit the expression levels of IL-18 in colon tissue of mice ($n = 6$); D - ACA significantly decreased the levels of IL-1 β in the supernatant of LPS and Nigericin induced THP-1 cells; E - ACA significantly decreased the levels of IL-6 in the supernatant of LPS and Nigericin induced THP-1 cells; F - ACA significantly decreased the levels of IL-18 in the supernatant of LPS and Nigericin induced THP-1 cells ($n = 3$). ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$, vs control; ⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$, ⁶⁾ $P < 0.001$, vs model.

图 5 ACA 抑制 UC 小鼠结肠中炎症因子的释放和体外抑制 NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体激活的作用。 $n = 6, \bar{x} \pm s$

Fig. 5 ACA inhibits the release of inflammatory cytokines in the colon of UC mice and suppresses NLRP3 inflammasome activation *in vitro*. $n = 6, \bar{x} \pm s$



A - ACA 抑制 UC 小鼠 caspase-1 和 IL-1 β 的表达水平; B - caspase-1 相对灰度值的定量结果; C - IL-1 β 的相对定量结果; 与空白组相比, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P < 0.001$ 。

A - ACA inhibit the expression levels of mature caspase-1 and IL-1 β on UC mice; B - quantitative results of mature caspase-1; C - quantitative results of mature IL-1 β were determined by densitometry; ¹⁾ $P < 0.01$, vs control; ²⁾ $P < 0.001$, vs model.

图 6 ACA 在体内对 NLRP3 炎症小体下游 caspase-1 和 IL-1 β 激活的抑制作用。 $n = 6, \bar{x} \pm s$

Fig. 6 The inhibition of ACA on the activation of caspase-1 and IL-1 β *in vivo*. $n = 6, \bar{x} \pm s$

从制附子中提取得到 ACA 并初步鉴定出多种单体生物碱成分,与已经报道的结果基本一致^[13]。另外,本研究首次证实 ACA 通过改善 DSS 所致的小鼠多种疾病指标来发挥抗 UC 的作用,可能与其抗炎活性作用有关。本研究扩大了 ACA 在抗炎领域的应用范围,并表明 ACA 可能适应于治疗 UC 等肠道炎症性疾病。

然而,在小鼠结肠中是哪一种信号通路的改变导致炎症因子分泌的抑制仍不清楚。NLRP3 炎症小体是由 NOD 样受体、衔接分子 ASC 和效应分子 pro-caspase-1 形成的最重要的炎症相关复合物之一。活化的 caspase-1 导致 IL-1 β 的成熟和分泌,从而诱导与炎症相关的几种生物学效应,包括 IL-18 等的成熟和分泌^[20]。本研究发现 ACA 和 NLRP3 抑制剂 MCC950 可抑制 LPS 和 Nigericin 诱导的 THP-1 细胞中 IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 的分泌水平。同时,ACA 显著降低 DSS 诱导的 UC 小鼠的 IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 水平。表明抑制炎症因子的分泌和 NLRP3 炎症小体的激活可能是 ACA 抗 UC 作用的机制之一。ACA 可能通过抑制 NLRP3 发挥抑制 caspase-1 和 IL-1 β 等的激活,最终抑制 IL-1 β 和 IL-18 的分泌而发挥抗 UC 的作用。

综上所述,本研究对制附子中提取得到的 ACA 进行了主要组成成分指认,发现其含有多种附子中特有的生物碱成分。同时,本研究首次在 DSS 诱导的小鼠体内证实了 ACA 具有与 SASP 类似的抗 UC 活性,包括改善体重减轻、疾病指数升高、结肠缩短、病理损伤和肠黏膜完整性等,可能与其抑制 NLRP3 的激活进而抑制 IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 等多种炎症因子的分泌有关。本研究扩大了 ACA 在抗炎领域的应用范围,ACA 可能具有治疗 UC 和其他肠道炎症性疾病的潜力。

REFERENCES

[1] LUO H, CAO G, LUO C, *et al.* Emerging pharmacotherapy for inflammatory bowel diseases [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 178: 106146.

[2] WANG G, ACAG H, ZHANG Y, *et al.* The intervention effects of *Lactobacillus casei* LC2W on *Escherichia coli* O157: H7-induced mouse colitis [J]. *Food Sci Hum Well*, 2020, 9(3):289-294.

[3] CAI J, LIU J, FAN P, *et al.* Dioscin prevents DSS-induced colitis in mice with enhancing intestinal barrier function and reducing colon inflammation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 99: 108015.

[4] ZHANG Q, XU N N, HU X J, *et al.* Anti-colitic effects of Physalin B on dextran sodium sulfate-induced BALB/c mice by suppressing multiple inflammatory signaling pathways [J]. *J Ethno-*

pharmacol, 2020, 259: 112956.

[5] CUI M X, ZHANG M, LIU K H. Colon-targeted drug delivery of polysaccharide-based nanocarriers for synergistic treatment of inflammatory bowel disease: A review [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 118530.

[6] HU X J, XU N N, YANG X, *et al.* Nigella A ameliorates inflammation and intestinal flora imbalance in DSS induced colitis mice [J]. *AMB Express*, 2020, 10: 1-10.

[7] LI X D, WU X, WANG Q, *et al.* Sanguinarine ameliorates DSS induced ulcerative colitis by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and modulating intestinal microbiota in C57BL/6 mice [J]. *Phytomedicine*, 2022, 104: 154321.

[8] ANTUNES J C, SEABRA C L, DOMINGUES J M, *et al.* Drug targeting of inflammatory bowel diseases by biomolecules [J]. *Nanomaterials*, 2021, 11(8): 2035.

[9] FU Y P, ZOU Y F, LEI F Y, *et al.* *Aconitum carmichaelii* Debeaux: A systematic review on traditional use, and the chemical structures and pharmacological properties of polysaccharides and phenolic compounds in the roots [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 291: 115148.

[10] LI Y L, ZUO Z P, TIAN Y Y, *et al.* Research progress in the treatment of ulcerative colitis by Fuzi Lizhong Prescription [J]. *Chin J Integr Tradit West Med Dig* (中国中西医结合消化杂志), 2024, 32(1):78-83.

[11] MI LY, ZHANG S X, CHEN S, *et al.* Yiyi Fuzi Baijiangsan in Treatment of Ulcerative Colitis: A Review [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2023, 29(10):254-263.

[12] LI W Q, LV G H. The application of Fuzi in treating chronic enteritis [J]. *Clin J Chin Med* (中医临床研究), 2022, 14(16):30-32.

[13] TAO H L, LIU X F, TIAN RM, *et al.* A review: Pharmacokinetics and pharmacology of aminoalcohol-diterpenoid alkaloids from *Aconitum* species [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 301: 115726.

[14] WANG M, HU W J, ZHOU X, *et al.* Ethnopharmacological use, pharmacology, toxicology, phytochemistry, and progress in Chinese crude drug processing of the lateral root of *Aconitum carmichaelii* Debeaux. (Fuzi): A review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 301: 115838.

[15] HUANG C Q, DONG J L, CHENG L, *et al.* Alkaloids from *Aconitum carmichaelii* Alleviates DSS-Induced Ulcerative Colitis in Mice via MAPK/NF- κ B/STAT3 Signaling Inhibition [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022: 6257778.

[16] GUO C C, HE L F, HU N H, *et al.* Aconiti Lateralis Radix Preparata lipid-soluble alkaloids alleviates IL-1 β -induced inflammation of human fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis by inhibiting NF- κ B and MAPKs signaling pathways and inducing apoptosis [J]. *Cytokine*, 2022, 151: 155809.

[17] WU G T, DU L D, ZHAO L, *et al.* The total alkaloids of *Aconitum tanguticum* protect against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155: 1483-1491.

[18] HE G N, WANG X X, LIU W R, *et al.* Chemical constituents, pharmacological effects, toxicology, processing and compatibility of Fuzi (lateral root of *Aconitum carmichaelii* Debx): A review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 307: 116160.

[19] ZHOU G H, TANG L Y, ZHOU X D, *et al.* A review on phytochemistry and pharmacological activities of the processed lateral root of *Aconitum carmichaelii* Debeaux [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 160: 173-193.

[20] ALCOCER-GÓMEZ E, CASTEJÓN-VEGA B, CORDERO M D. Stress-induced NLRP3 inflammasome in human diseases [J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2017, 108: 127-162.

(收稿日期:2024-05-10)