

# 五味子醇甲对脂多糖诱导 Caco-2 细胞损伤的影响

王莅瑛,王伊雯,任爽,夏梦茁,宋明杰,王英平

(吉林农业大学中药材学院,人参新品种选育与开发国家地方联合工程研究中心,吉林 长春 130118)

**摘要:**目的 探究五味子醇甲(Schisandrol A,SA)对脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导与分化小肠上皮细胞类似的人结肠癌 Caco-2 细胞损伤的影响。方法 将 Caco-2 细胞随机分为正常对照(不受药物干预,Con)组,模型(0.7 mg·mL<sup>-1</sup>,LPS)组,SA(2.5、5、10 μmol·L<sup>-1</sup>)剂量组。CCK-8 法检测细胞活力;流式细胞术检测细胞凋亡、细胞周期、线粒体膜电位和细胞内活性氧(reactive oxygen species,ROS)水平;ELISA 检测细胞上清中炎症因子的含量;酶标法检测氧化应激水平;Western Blot 检测 NF-κB 信号通路蛋白表达和凋亡相关通路蛋白表达。结果 与 LPS 组相比,SA 在 2.5~10 μmol·L<sup>-1</sup> 范围内对细胞有明显的保护作用且呈一定剂量依赖性( $P<0.01$ , $P<0.001$ ),其减少了丙二醛(malondialdehyde,MDA)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)及 ROS 的含量( $P<0.05$ , $P<0.01$ , $P<0.001$ ),增加了超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)和谷胱甘肽(glutathione,GSH)的活性( $P<0.01$ , $P<0.001$ ),抑制了促炎因子[肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)、白细胞介素-18(interleukin-18,IL-18)]的分泌( $P<0.05$ , $P<0.01$ , $P<0.001$ ),促进了抗炎因子白细胞介素-10(interleukin-10,IL-10)的释放( $P<0.001$ ),升高了线粒体膜电位( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),改善了细胞周期的阻滞( $P<0.05$ ),同时调节了凋亡通路与 NF-κB 通路相关蛋白的表达水平( $P<0.05$ , $P<0.01$ , $P<0.001$ )。结论 通过体外实验证实了五味子醇甲能够改善 LPS 诱导的 Caco-2 细胞损伤,其作用机制可能与抑制 NF-κB 信号通路相关。

**关键词:**五味子醇甲;脂多糖;Caco-2 细胞;NF-κB 信号通路;炎症

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

文章编号:1673-7717(2025)12-0190-12

## Effects of Schisandrol A on Lipopolysaccharide Induced Injury of Caco-2 Cells

WANG Renying, WANG Yiwen, REN Shuang, XIA Mengzhuo, SONG Mingjie, WANG Yingping

(State Local Joint Engineering Research Center of Ginseng Breeding and Application,

College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China)

**Abstract:** *Objective* To investigate the impact of Schisandrol A (SA) on lipopolysaccharide (LPS) - induced and differentiated small intestinal epithelial cell damage in human colorectal cancer Caco-2 cells. *Methods* Caco-2 cells were randomly divided into a normal control group (without drug intervention, Con), a model group (0.7 mg·mL<sup>-1</sup>, LPS) and SA (2.5, 5, 10 μmol·L<sup>-1</sup>) dose groups. The cell viability was assessed by the CCK-8 method. The cell apoptosis, cell cycle, mitochondrial membrane potential and intracellular reactive oxygen species (ROS) were detected by flow cytometry. The levels of inflammatory factors in the cell supernatant were measured using ELISA. Oxidative stress was assessed using an enzyme-labeled method. The expressions of proteins related to the NF-κB signaling pathway and apoptosis-related pathways were determined by Western Blot analysis. *Results* The findings indicated that compared with the LPS group, SA at concentrations between 2.5-10 μmol·L<sup>-1</sup> exhibited a significant protective effect on cells, exhibiting a certain dose-dependent relationship ( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ). It reduced the contents of malondialdehyde (MDA), lactate dehydrogenase (LDH) and ROS ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ), increased the activities of superoxide dismutase (SOD) and GSH ( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ), inhibited the secretion of pro-inflammatory factors tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-18 (IL-18) ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ), promoted the release of anti-inflammatory factor interleukin-10 (IL-10) ( $P<0.001$ ), increased mitochondrial membrane potential ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), improved cell cycle arrest ( $P<0.05$ ) and modulated the expression levels of inflammation

**基金项目:**国家自然科学基金青年科学基金项目(81803733);吉林省科技发展计划医药及健康产业发展专项(20210401112YY)

**作者简介:**王莅瑛(1997-),女,吉林镇赉人,硕士在读,研究方向:天然药物药理学。

**通讯作者:**宋明杰(1986-),女,内蒙古呼伦贝尔人,副教授,硕士研究生导师,博士,研究方向:中药药理与开发利用。E-mail:songmingjie2017@126.com。

and apoptosis-related pathway proteins ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ). **Conclusion** This study has confirmed in vitro that SA is capable of improving LPS-induced damage to Caco-2 cells. The mechanism of action appears to be related to the inhibition of the NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**Keywords:** Schisandrol A; lipopolysaccharide; Caco-2 cells; NF- $\kappa$ B signaling pathway; inflammation

五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill 为木兰科植物五味子的干燥成熟果实。《神农本草经》与《本草备要》中记载,五味子具有补肾宁心、收敛固涩之功效<sup>[1-2]</sup>。五味子醇甲 (Schisandrol A, SA) 为五味子的标志性成分<sup>[3]</sup>。现代药理研究表明,五味子能够改善肠道损伤。其中,五味子提取物通过抗炎、抗氧化、抗凋亡等途径改善肠道损伤的作用近年来尤为受重视<sup>[4-7]</sup>。

脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 是革兰氏阴性菌内壁的主要成分,入血后会产生毒性,是一种常见的强效诱导炎症、致凋亡的造模药物。LPS 诱导的模型是评价肠道损伤的经典实验模型<sup>[8]</sup>。人结肠腺癌细胞 (Caco-2),其结构和功能与分化的小肠上皮细胞类似,常用来进行模拟体内肠功能的细胞实验<sup>[9]</sup>。

课题组前期研究表明,五味子醇甲能够保护肠道组织性状,恢复菌群平衡,从而缓解小鼠的腹泻症状<sup>[10]</sup>。但其对肠上皮损伤的影响和作用机制还不清楚。本研究利用 LPS 诱导 Caco-2 细胞建立模拟肠上皮细胞损伤模型,探讨五味子醇甲改善肠上皮损伤的作用及机制,为五味子提取物改善肠道健康产品的研发提供数据基础和指导。

## 1 材料

1.1 细胞 Caco-2 细胞购自中国科学院细胞库(上海)。

1.2 药品与试剂 五味子醇甲 (HPLC > 98%,批号 MUST-22052011) 购自成都曼思特生物科技有限公司; MEM with NEAA 培养基 (批号 MA0217-Oct-27I)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号 D12200)、CCK-8 检测试剂盒 (批号 MA0218-Oct-24I) 购自大连美仑生物技术有限公司; 脂多糖 (批号 0000189842)、二甲基亚砜 (批号 SHBK2750) 购自美国默克 Sigma 化学公司; 细胞凋亡与周期试剂盒 (批号 012923231012)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS, 批号 S0033S) 试剂盒、BCA 蛋白含量检测试剂盒 (批号 020123230421) 购自碧云天生物技术; 线粒体膜电位试剂盒 (批号 20210108)、细胞裂解液 (批号 2311006)、蛋白酶抑制剂 (批号 20230830) 购自北京索莱宝科技有限公司; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (批号 BB23121) 购自上海贝博生物科技有限公司; 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (批号 20231223)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 试剂盒 (批号 20230603)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (批号 20230503) 和乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 试剂盒 (批号 20230712) 购自南京建成生物工程研究室; 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) ELISA 试剂盒 (批号 202312)、IL-6 ELISA (批号 202312)、白细胞介素-18 (interleukin-18, IL-18) ELISA (批号 202312)、白细胞介素-10 (interleukin-6, IL-10) ELISA 试剂盒 (批号 202312) 购自江苏酶免实业有限公司。

1.3 主要仪器 生物安全柜 (美国 Thermo 公司, 型号 MSC Advantage 1.8); CO<sub>2</sub> 恒温培养箱 (美国 Thermo 公司, 型号 HERAccl 240i); 全波长酶标仪 (美国 Thermo 公司, 型号 1510); 流式细胞仪 (美国贝克曼库尔特公司, 型号 A00-1-1102); 高速冷冻离心机 (北京大龙兴创实验仪器公司, 型号 D1524R); 电泳仪 (上海天能科技有限公司, 型号 EPS 300); 近红外荧光分子成像仪 (美国 Azure 公司, c500)。

## 2 实验方法

2.1 细胞培养方法 Caco-2 细胞采用 MEM with NEAA 培养基 (含 20% FBS) 于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 的培养箱中培养,待细胞贴壁且生长至对数生长期时进行后续实验。

2.2 细胞活力检测 不同质量浓度 SA 对 Caco-2 细胞活性的影响:将细胞随机分为 12 组,除正常对照 (Con) 组外,分别用浓度为 0.5、1、2、2.5、5、7.5、10、20、25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 SA 与细胞共培养 24 h。

LPS 对 Caco-2 细胞活性的影响:将细胞随机分为 10 组,除正常对照 (Con) 组外,分别用浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 LPS 处理细胞 24 h。

SA 剂量依赖性保护作用:将细胞随机分为 7 组,除 Con 组和 LPS 组外,分别用 2、2.5、5、7.5、10 和 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 SA 处理 24 h 后,加入 0.7  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 LPS 处理 24 h。用于进一步确认 SA 的有效保护剂量以及后续实验。

将 Caco-2 细胞 ( $2 \times 10^3$  cells/mL) 接种于 96 孔板中,按照上述处理后每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液,在 37 °C 继续培养 2 h,在酶标仪 450 nm 处记录其吸光度,计算细胞活力。

细胞活力计算公式:细胞存活率 (%) = 实验组吸光度值 / Con 组吸光度值

2.3 炎症因子含量测定 将 Caco-2 细胞 ( $5 \times 10^5$  cells/mL) 接种于 6 孔板中,孵育 48 h 后弃去上清,随机分为 Con 组、LPS 组、SA 组 (分别为 2.5、5、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),SA 3 个剂量组加入对应浓度 SA 的含药培养基,孵育 24 h 后弃去上清,除 Con 组外每组加入 0.7  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS 含药培养基,继续孵育 24 h 后收集细胞上清液,按照相应 ELISA 试剂盒要求操作,酶标仪记录其吸光度值,测定 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-18、IL-10 等细胞因子含量。

2.4 氧化应激水平测定 将 Caco-2 细胞 ( $5 \times 10^5$  cells/mL) 接种于 6 孔板中,按照“2.3”项给药处理后收集细胞,按照相应试剂盒说明书操作,用流式细胞仪检测 ROS 含量水平或用酶标仪测定 SOD、MDA、LDH、GSH 的吸光度值,分析氧化应激相关因子水平的变化情况。

2.5 细胞凋亡、细胞周期、线粒体膜电位相关因子水平测定 样品前处理:将 Caco-2 细胞 ( $5 \times 10^5$  cells/mL) 接种于 6 孔板中,按照“2.3”项给药处理完后收集细胞,以预冷的 PBS 清洗后离心弃去上清,分别按照相应试剂盒进行操作。

**2.6 Western Blot 细胞蛋白提取:**将 Caco-2 细胞 ( $5 \times 10^5$  cells/mL) 接种于 6 孔板中,按“2.3”项下分组培养,每孔加入 200  $\mu$ L 裂解液冰上裂解 10~15 min,收集液体后 10 000  $r \cdot \text{min}^{-1}$ 、4  $^{\circ}\text{C}$  离心 5 min,使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。将蛋白裂解液置于金属浴中 95  $^{\circ}\text{C}$  加热 5 min 使蛋白变性,分装后冻存于 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

**检测:**按照电泳、电转、封闭、孵一抗、孵二抗等操作,后加入 ECL 发光液进行显影。Image J 进行条带分析处理。

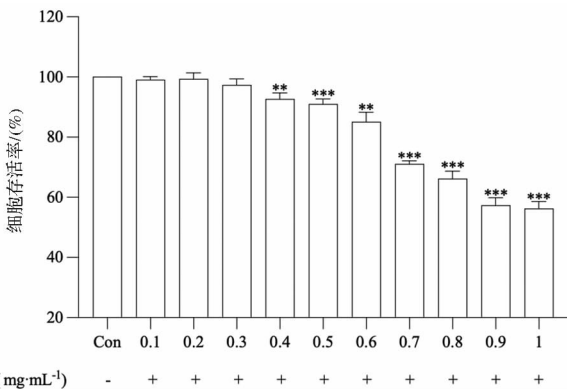
**2.7 统计学方法** 所有数据使用 Graphpad Prism 9.5 进行统计分析,所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

**3 实验结果**

**3.1 SA 对细胞存活率的影响** 通过 CCK-8 法测定 LPS 对 Caco-2 细胞存活率的影响,结果如图 1 所示。与 Con 组相比,当 LPS 浓度为  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,细胞存活率明显降低至  $(92.73 \pm 2.27)\%$  ( $P < 0.001$ ),说明 LPS 能够影响细胞存活率。随着 LPS 浓度升高,细胞存活率随之降低,当 LPS 浓度为  $0.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,细胞存活率低于 70% ( $P < 0.01$ ),不适合进行造模。因此,本研究选择  $0.7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS 处理作为肠损伤模型的造模剂量,此时细胞存活率为  $(71.33 \pm 0.33)\%$  ( $P < 0.001$ )。

CCK-8 法测定 SA 对 Caco-2 细胞存活率的影响,结果表明(图 2),随着 SA 浓度的增高并未对细胞造成损伤,即 SA 浓度在  $0 \sim 25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时对 Caco-2 细胞无明显毒性,可以在此浓度范围内开展后续实验。

SA 对 LPS 损伤 Caco-2 细胞存活率的影响结果如图 3 所示,与 Con 组相比,LPS 组细胞的存活率降低至 72.47% ( $P < 0.001$ ),表明模型建立成功。经 SA 给药处理后,细胞存活率显著升高,且在  $2 \sim 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内呈剂量依赖性。SA 浓度为  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,对细胞存活率的影响最大,此时细胞存活率为 95.37% ( $P < 0.001$ )。因此,SA 能够改善 LPS 诱导的 Caco-2 细胞损伤。依据本实验结果,后续 SA 处理组给药浓度分别为  $2.5$ 、 $5$  和  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



注: \*\* 与 Con 组比较,  $P < 0.01$ ; \*\*\* 与 Con 组比较,  $P < 0.001$ 。

图 1 LPS 对 Caco-2 细胞活力的影响 ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

**3.2 SA 对炎症因子的影响** 为探究 SA 对 LPS 诱导的 Caco-2 肠损伤模型炎症反应的影响,本实验检测了炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-18 和 IL-10 的含量。如插页 XXXV 图 4 所示,与

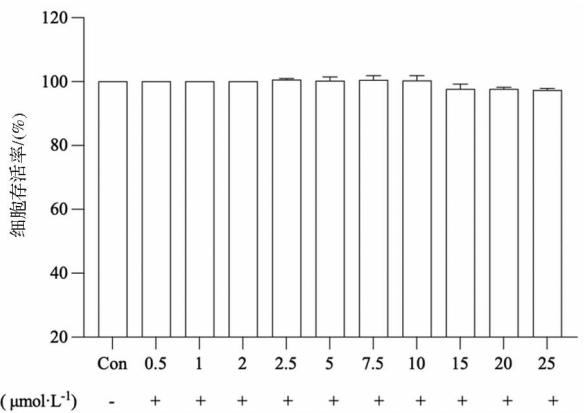
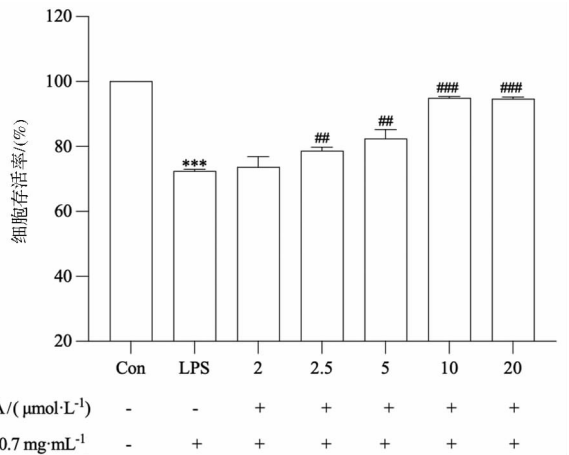


图 2 SA 对 Caco-2 细胞活力的影响 ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )



注: \*\*\* 与 Con 组比较,  $P < 0.001$ ; ## 与 LPS 组比较,  $P < 0.01$ ; ### 与 LPS 组比较,  $P < 0.001$ 。

图 3 SA 对 LPS 损伤 Caco-2 细胞活力的影响 ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

Con 组比较,LPS 组中促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-18 均显著升高 ( $P < 0.001$ ),抗炎因子 IL-10 显著降低 ( $P < 0.001$ );与 LPS 组比较,SA 给药组抑制了促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-18 的分泌,促进了抗炎因子 IL-10 的释放,且呈剂量依赖性。因此,SA 能够有效减轻 LPS 诱导的肠损伤模型细胞的炎症反应。

为了进一步确定 SA 的抗炎作用机制,通过 Western blot 对 LPS 诱导的 Caco-2 细胞在炎症途径 NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白 ( $p65$ 、IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$ 、I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-p65) 表达量的变化进行了分析。结果如插页 XXXV 图 5 所示,LPS 组的炎症相关通路蛋白表达量均明显上升 ( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ ),而经 SA 给药后的蛋白表达量得到显著下调 ( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ ),且呈浓度依赖性。因此,SA 可通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活,来达到调节炎症因子水平、降低肠损伤的作用。

**3.3 SA 对氧化应激水平的影响** 为了探究 SA 是否能够改善 LPS 诱导的 Caco-2 氧化应激反应,本实验检测了 ROS、SOD、LDH、GSH 和 MDA 等代表性氧化应激因子的含量。如插页 XXXV 图 6 所示,与 Con 组相比,LPS 组 SOD 水平和 GSH 含量显著降低,分别为  $(125.33 \pm 5.33) \text{ U} \cdot \text{mgprot}^{-1}$  和  $(5.36 \pm 0.37) \mu\text{mol} \cdot \text{gprot}^{-1}$  ( $P < 0.001$ ),ROS 水平、MDA 含量和 LDH 含量显著上升,可达到  $(75.33 \pm 0.33)\%$ 、 $(0.92 \pm 0.02) \text{ nmol} \cdot \text{mgprot}^{-1}$ 、 $(7.16 \pm 0.14) \text{ U} \cdot \text{gprot}^{-1}$  ( $P < 0.001$ )。经不同浓度 SA

给药后,与LPS组相比,ROS、SOD、LDH、GSH、MDA的含量均有明显变化,当SA给药浓度为 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,检测指标含量分别为 $(27.07\pm 1.03)\%$ 、 $(373.33\pm 19.33)\ \text{U}\cdot\text{mgprot}^{-1}$ 、 $(0.52\pm 0.02)\ \text{U}\cdot\text{gprot}^{-1}$ 、 $(14.66\pm 0.62)\ \mu\text{mol}\cdot\text{gprot}^{-1}$ 、 $(3.41\pm 0.26)\ \text{nmol}\cdot\text{mgprot}^{-1}$  ( $P<0.001$ ),且该作用呈剂量依赖性。因此,SA能改善LPS诱导的肠上皮细胞氧化损伤。

**3.4 SA对线粒体膜电位的影响** 线粒体膜电位的下降是判断细胞凋亡的重要指标,通过插页XXXVII图7所知。与Con组相比,LPS组细胞的线粒体膜电位显著下降率最高,可达到 $(32.35\pm 0.67)\%$  ( $P<0.05$ ),给药不同浓度SA后,线粒体膜电位下降率逐渐降低。当SA浓度达到 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,线粒体膜电位下降率达 $(17.95\pm 0.95)\%$  ( $P<0.01$ ),且呈现明显的剂量依赖性。实验结果表明,SA可通过调节线粒体膜电位水平来改善LPS诱导的Caco-2细胞凋亡。

**3.5 SA对细胞周期的影响** 通过PI染色法检测细胞周期不同时相DNA含量的变化,如插页XXXVIII图8所示。结果表明,与Con组相比,LPS组G1期与S期比例分别为 $(54.04\pm 0.98)\%$  ( $P<0.05$ )和 $(14.06\pm 0.42)\%$ ,说明细胞能够在G1/S期阻滞Caco-2细胞周期进程,使细胞不能进行DNA复制。随着SA浓度增加,S期细胞比例逐步上升,当浓度达到 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,S期细胞比例为 $(16.82\pm 0.54)\%$  ( $P<0.05$ )。实验结果说明SA能够缓解LPS造成的G1/S期阻滞,使细胞周期恢复正常。

**3.6 SA对细胞凋亡的影响** 通过流式细胞仪对FITC和PI染色的细胞进行检测,如插页XXXIX图9所示,与Con组相比,LPS组凋亡率可达 $(54.42\pm 0.42)\%$  ( $P<0.001$ )。给药SA浓度为 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时凋亡率显著下降至 $(25.03\pm 0.68)\%$  ( $P<0.001$ ),且呈现明显的剂量依赖性。表明SA能够改善由LPS引起的肠上皮细胞凋亡。

为了进一步确定SA对LPS诱导细胞凋亡的保护作用,我们通过Western Blot对LPS致Caco-2细胞凋亡的相关通路蛋白Caspase-3、Bcl-2、Bax、Cytochrome C和cleaved-Caspase-3进行了分析。结果如插页XL图10所示,与Con组相比,LPS组Caspase-3、Cytochrome C、Bax的表达显著增加 ( $P<0.01,0.05,0.05$ ),Bcl-2蛋白表达下降 ( $P<0.01$ )。与LPS组比较,SA给药处理后,上调了Bcl-2/Bax的比值 ( $P<0.05, P<0.01, P<0.01$ ),且SA给药组Caspase-3、Cytochrome C蛋白表达显著降低 ( $P<0.01,0.05$ )。因此,SA能够通过调节线粒体凋亡途径,进而抑制LPS诱导的Caco-2细胞凋亡。

#### 4 讨论

肠道作为人体独一无二的器官,不仅是重要的消化器官,也是最大的免疫器官。肠道屏障是阻止肠道疾病乃至全身疾病的重要防线<sup>[11]</sup>,由于肠道结构的特殊及大量细菌的存在,其具有防止肠道内病原微生物及毒素由肠腔侵入肠外器官的作用<sup>[12-13]</sup>;肠上皮细胞是肠道屏障的基础,其凋亡增加会直接导致腹泻以及炎症性疾病的发生,改善肠上皮屏障破损是治疗肠损伤的关键<sup>[14-15]</sup>。故本研究采用LPS诱导Caco-2细胞建立肠道细胞屏障损伤模型,模拟肠上皮细胞的受损情况。

ROS保持着氧化还原平衡,其大量增加会触发细胞内脂

质、蛋白质以及核酸的氧化,进而造成细胞损伤导致细胞凋亡;MDA是脂质氧化的主要次生产物之一,用来反映机体抗氧化能力和ROS的生成程度;SOD可以清除体内产生的自由基,为主要抗氧化剂;GSH可以保护细胞膜结构和功能免受氧化的损害<sup>[16]</sup>;LDH是一种存在于细胞内的酶,当细胞受损或死亡时会释放LDH,使细胞合成SOD能力变弱,细胞内GSH含量降低,ROS、MDA和LDH含量大幅度升高<sup>[17]</sup>,故通过检测LDH的释放量也可以了解细胞受损程度。在LPS诱导后,Caco-2细胞中SOD和GSH水平显著降低导致自由基大量堆积,具有较强的氧化能力,诱发细胞损伤。本研究中经SA给药后细胞中MDA、ROS和LDH水平明显降低,SOD和GSH活性上升,从而平衡Caco-2细胞的氧化应激反应,减少细胞损伤。

氧化应激加速了细胞凋亡<sup>[18]</sup>,氧化应激反应产生大量ROS生成可导致线粒体膜电位分解,使线粒体膜电位下降,进而导致能量缺乏和进一步加重线粒体损伤<sup>[19-23]</sup>,故SA通过上调线粒体膜电位可以抑制细胞凋亡来减少细胞损伤。许多促炎途径都发生在线粒体外膜通透化过程中,在细胞凋亡过程中,调节线粒体膜通道开关的Bcl-2家族,通过激活Bax以及Bcl-2来促进线粒体通透性<sup>[24]</sup>,减少Bcl-2和Bax的比值,改变线粒体膜的通透性,促进Cytochrome C从线粒体大量释放激活Caspase-3,表明凋亡进入不可逆阶段,是细胞发生凋亡的重要标志<sup>[25]</sup>。本研究表明,在LPS诱导下,Caco-2细胞中Bax、Caspase-3、Cytochrome C的表达水平上升,Bcl-2的表达水平下降,Bcl-2与Bax的比值减小,细胞凋亡趋势明显提高,而SA调节了这一变化,减少了细胞凋亡。

细胞凋亡是细胞周期中自带的检查与制衡机制,细胞周期的正常运行是保证细胞正常增殖的必要条件<sup>[26]</sup>,作为有丝分裂的起始,G1/S期是多数细胞的细胞周期关键点<sup>[27-28]</sup>,本研究中,经LPS诱导后G1期占比明显上升且S期占比明显下降,说明细胞在G1/S期被阻滞,无法进行DNA的合成,抑制了细胞增殖,而经SA保护后缓解了G1/S期阻滞,使细胞周期顺利进行,减轻肠上皮细胞的损伤,从而改善肠损伤。

炎症反应和氧化应激之间存在密切联系,炎症会引起细胞的氧化损伤,导致损伤部位ROS大量释放,从而加重局部损伤导致慢性炎症<sup>[29-30]</sup>。炎症是机体由内部或外部刺激诱发的复杂生物过程,参与多种疾病的病理进程<sup>[31]</sup>。在肠道炎症中所产生的促炎因子是肠道屏障损伤的重要促成因素之一<sup>[32-33]</sup>,NF- $\kappa$ B信号通路已被证实是重要的促炎信号通路之一<sup>[34-38]</sup>。本研究表明了SA可能通过抑制NF- $\kappa$ B途径的激活,增加抗炎因子IL-10的释放,降低促炎因子TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-18的分泌,从而有效改善了Caco-2细胞的炎症损伤。

#### 小结

SA能够显著改善LPS诱导的Caco-2肠上皮细胞损伤,修复氧化应激水平,通过改善细胞周期和线粒体膜电位来抑制细胞凋亡,并通过抑制NF- $\kappa$ B信号通路的激活来调节炎症因子水平,进而达到改善肠上皮损伤的作用。研究结果可为五味子功效成分改善胃肠健康产品研制提供基础与指导。

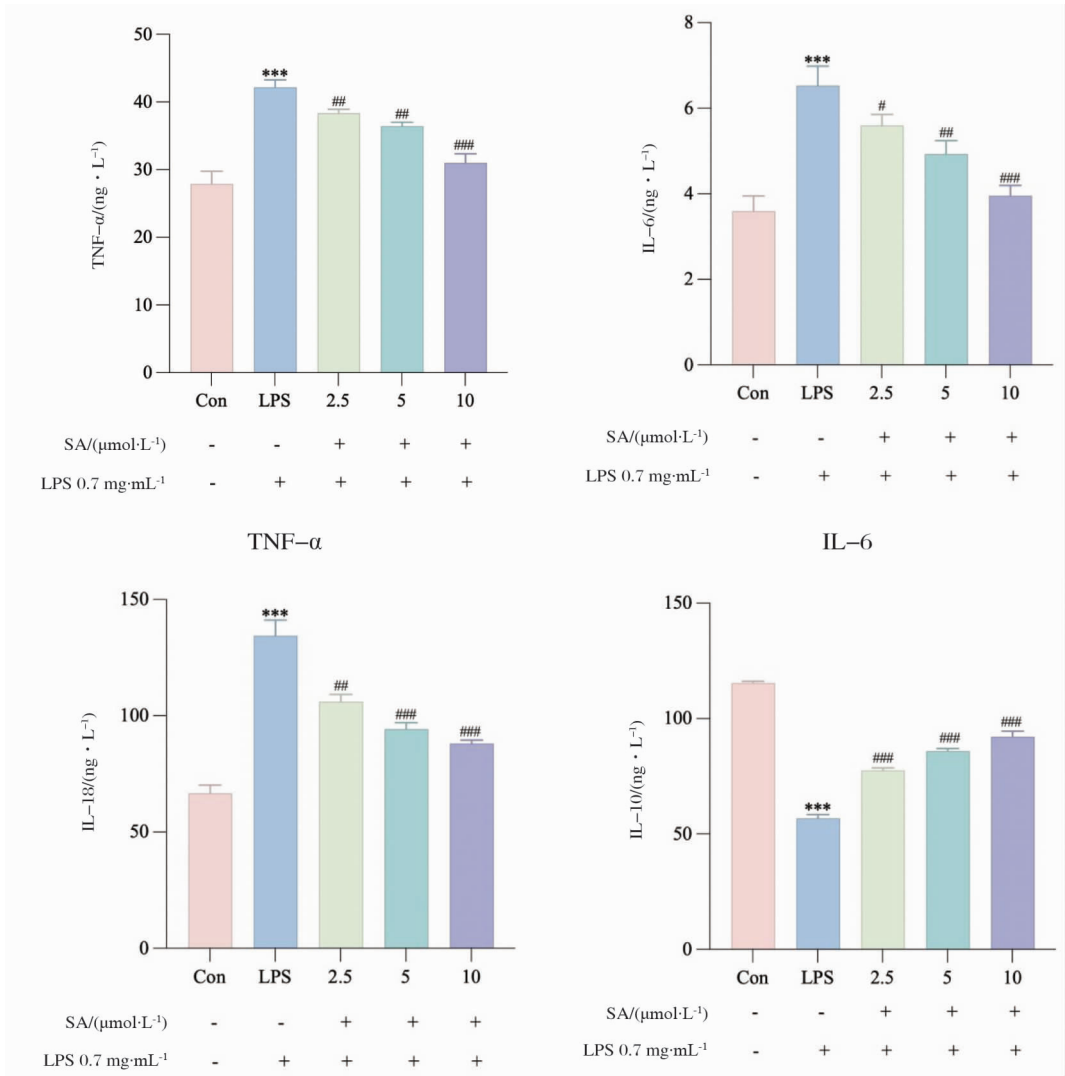
#### 参考文献

[1] 神农本草经[M].北京:学苑出版社,2004.

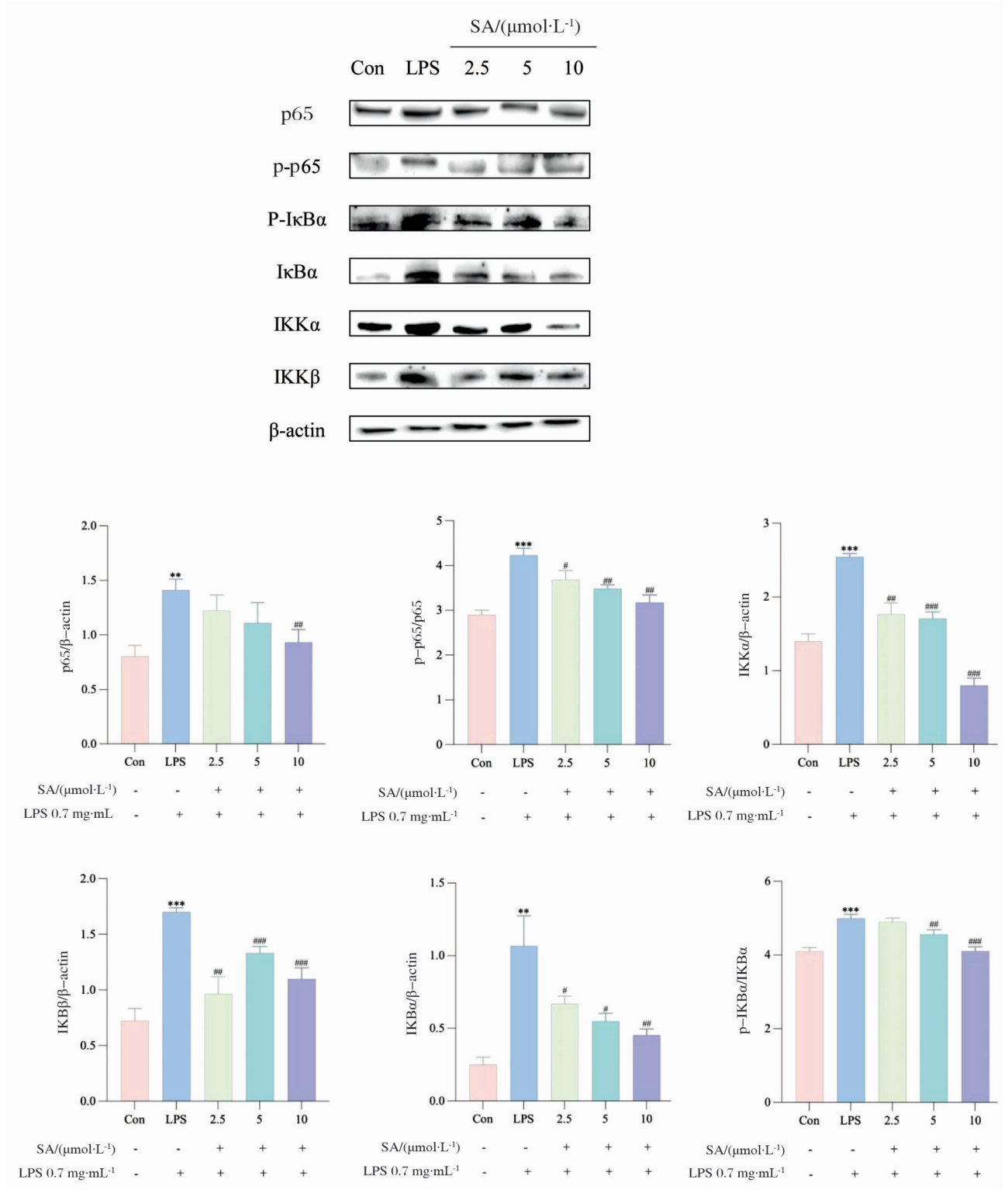
- [2] 汪昂. 本草备要[M]. 郑金生, 整理. 北京: 人民卫生出版社, 2005:258.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 68.
- [4] 邢楠楠, 屈怀东, 任伟超, 等. 五味子主要化学成分及现代药理学作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(15): 210-218.
- [5] 刘媛媛, 黄仕其, 李玉泽, 等. 五味子属植物木脂素类化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(6): 1903-1918.
- [6] 胡俊男. 五味子藤茎有效成分改善顺铂致肠道损伤的作用及机制研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2021.
- [7] 包佳鹭, 张妍, 王晓丹. 五味子醇甲对鸡大肠杆菌病的预防效果观察[J]. 畜牧兽医学报, 2024, 55(10): 4735-4746.
- [8] ZHUANG S, ZHONG J, BIAN Y F, et al. Rhein ameliorates lipopolysaccharide-induced intestinal barrier injury via modulation of Nrf2 and MAPKs[J]. Life Sci, 2019, 216: 168-175.
- [9] YANG Q, XING M C, WANG K, et al. Application of fucoidan in caco-2 model establishment[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2022, 15(4): 418.
- [10] 赵子平. 基于“肠-肾轴”理论对五味子醇甲改善肾损伤作用机制的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2023.
- [11] 丁鑫, 庄黎航, 李盛文, 等. 黄连素通过改善肠道炎症与黏膜屏障损伤抗肝纤维化的研究[J]. 中华中医药学刊, 2023, 42(3): 154-159, 271-273.
- [12] DI TOMMASO N, GASBARRINI A, PONZIANI F R. Intestinal barrier in human health and disease[J]. Int J Environ Res Public Health, 2021, 18(23): 12836.
- [13] 阿卜力克木·买买提吐尔逊, 古力孜热木·艾尼瓦尔, 骆新. 基于肠道菌群探讨黄芩苷对脾虚泄泻小鼠肠道功能的影响[J]. 中南药学, 2024, 22(3): 699-707.
- [14] JERGENS A E, PARVINROO S, KOPPER J, et al. Rules of engagement: epithelial-microbe interactions and inflammatory bowel disease[J]. Front Med (Lausanne), 2021, 8: 669913.
- [15] WANG X J, HUANG S W, ZHANG M L, et al. Gegen Qinlian decoction activates AhR/IL-22 to repair intestinal barrier by modulating gut microbiota-related tryptophan metabolism in ulcerative colitis mice[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 302(Pt B): 115919.
- [16] WANG X H, DAI C, WANG J, et al. Therapeutic effect of neohesperidin on TNF- $\alpha$ -stimulated human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. Chin J Nat Med, 2021, 19(10): 741-749.
- [17] 林川, 董文敏, 张倩芸, 等. 葛根苓连汤抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 Caco-2 细胞氧化损伤配伍规律研究[J]. 中草药, 2022, 53(20): 6492-6499.
- [18] 李磊, 孙秀兰. 代谢重编程对小胶质细胞功能的调节作用[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2024, 44(1): 105-114.
- [19] LIU Y, WU Y, ZHU Y, et al. Role of excessive mitochondrial fission in seawater immersion aggravated hemorrhagic shock-induced cardiac dysfunction and the protective effect of mitochondrial division inhibitor-1[J]. Antioxid Redox Signal, 2024, 41(7-9): 462-478.
- [20] 汤同娟, 王翔, 周鹏, 等. 基于 Nrf2/BNIP3 信号通路探讨苓桂术甘汤含药血清对心肌细胞线粒体氧化应激的影响[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(12): 3303-3311.
- [21] 宋亚男, 袁丁, 张长城, 等. 竹节参总皂苷通过调节 AMPK/Sirt1/NF- $\kappa$ B 通路抑制衰老大鼠心肌细胞凋亡的作用研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(23): 4656-4660.
- [22] 张曼, 王艳慧, 李寒笑, 等. ROS 积聚在黄曲霉毒素 B1 诱导仔猪空肠上皮细胞凋亡中的作用[J]. 中国畜牧兽医, 2024, 51(9): 3857-3866.
- [23] 文建庭, 刘健, 王馨, 等. 新风胶囊含药血清对 TNF- $\alpha$  诱导的类风湿关节炎滑膜成纤维细胞凋亡和炎症的影响[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(2): 436-443.
- [24] ZHANG L J, DU Z D, HE L, et al. ROS-induced oxidative damage and mitochondrial dysfunction mediated by inhibition of SIRT3 in cultured cochlear cells[J]. Neural Plast, 2022, 2022: 5567174.
- [25] YAO X Y, JIAO S F, QIN M M, et al. Vanillic acid alleviates acute myocardial hypoxia/reoxygenation injury by inhibiting oxidative stress[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 8348035.
- [26] 周欢思, 李艳萍, 金明静, 等. 消瘤藤乙酸乙酯提取物对结直肠癌细胞增殖、凋亡及 Bax/Bcl-2/Caspase-3 信号通路的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2024, 32(10): 1767-1773.
- [27] 吕童歌, 巩双铭, 李磊. 细胞周期蛋白依赖性激酶及其在肿瘤治疗中的意义[J]. 生物学教学, 2023, 48(3): 5-8.
- [28] 李旭, 徐天娇, 刘立琨, 等. 天麻素联合异钩藤碱抑制 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞凋亡的抗氧化机制[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(2): 420-425.
- [29] 凌颖, 沈琪, 王剑, 等. 盐酸小檗碱对脓毒症大鼠肠黏膜屏障损伤的保护作用及机制[J]. 中华危重病急救医学, 2024, 36(6): 597-603.
- [30] DU H R, ZHANG Y L, GUO H C, et al. *Malus toringoides* (Rehd.) Hughes decoction alleviates isoproterenol-induced cardiac fibrosis by inhibiting cardiomyocyte inflammation and pyroptosis via the HK1/NLRP3 signaling pathway[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2024, 88(8): 956-965.
- [31] LI X X, ZHENG X T, LIU Z J, et al. Cryptotanshinone from *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen) inhibited inflammatory responses via TLR4/MyD88 signaling pathway[J]. Chin Med, 2020, 15: 20.
- [32] KAMINSKY L W, AL-SADI R, MA T Y. IL-1 $\beta$  and the intestinal epithelial tight junction barrier[J]. Front Immunol, 2021, 12: 767456.
- [33] 陆宁, 刘慧, 徐央波, 等. 健脾清肠法通过调控 TLRs/NF- $\kappa$ B 通路抑制化疗致肠黏膜炎作用的机制探究[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(7): 47-50, 261.
- [34] LAWRENCE T. The nuclear factor NF- $\kappa$ B pathway in inflammation[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1(6): a001651.
- [35] 高飞云, 刘婷, 张转红, 等. 基于 NF- $\kappa$ B 途径探讨溃疡性结肠炎发病机制及中药干预作用研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(6): 123-127.
- [36] 张钰异, 王浩, 王思琳, 等. 中医药调控 NF- $\kappa$ B 相关信号通路干预溃疡性结肠炎相关性癌变的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(6): 1455-1466.
- [37] 黄文炼, 刘鸿雁, 任丽蓉, 等. 梔子苷抑制 TLR4/RIP3/NF- $\kappa$ B 信号通路对急性胰腺炎大鼠肠损伤的影响[J]. 四川医学, 2022, 43(12): 1178-1184.
- [38] 裴琳秀, 江恬妮, 刘悦, 等. 苦参及其炮制品对湿热型溃疡性结肠炎小鼠 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路的调节作用[J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(9): 85-90, 269-270.

# 五味子醇甲对脂多糖诱导 Caco-2 细胞损伤的影响

(正文见 190 - 194 页)

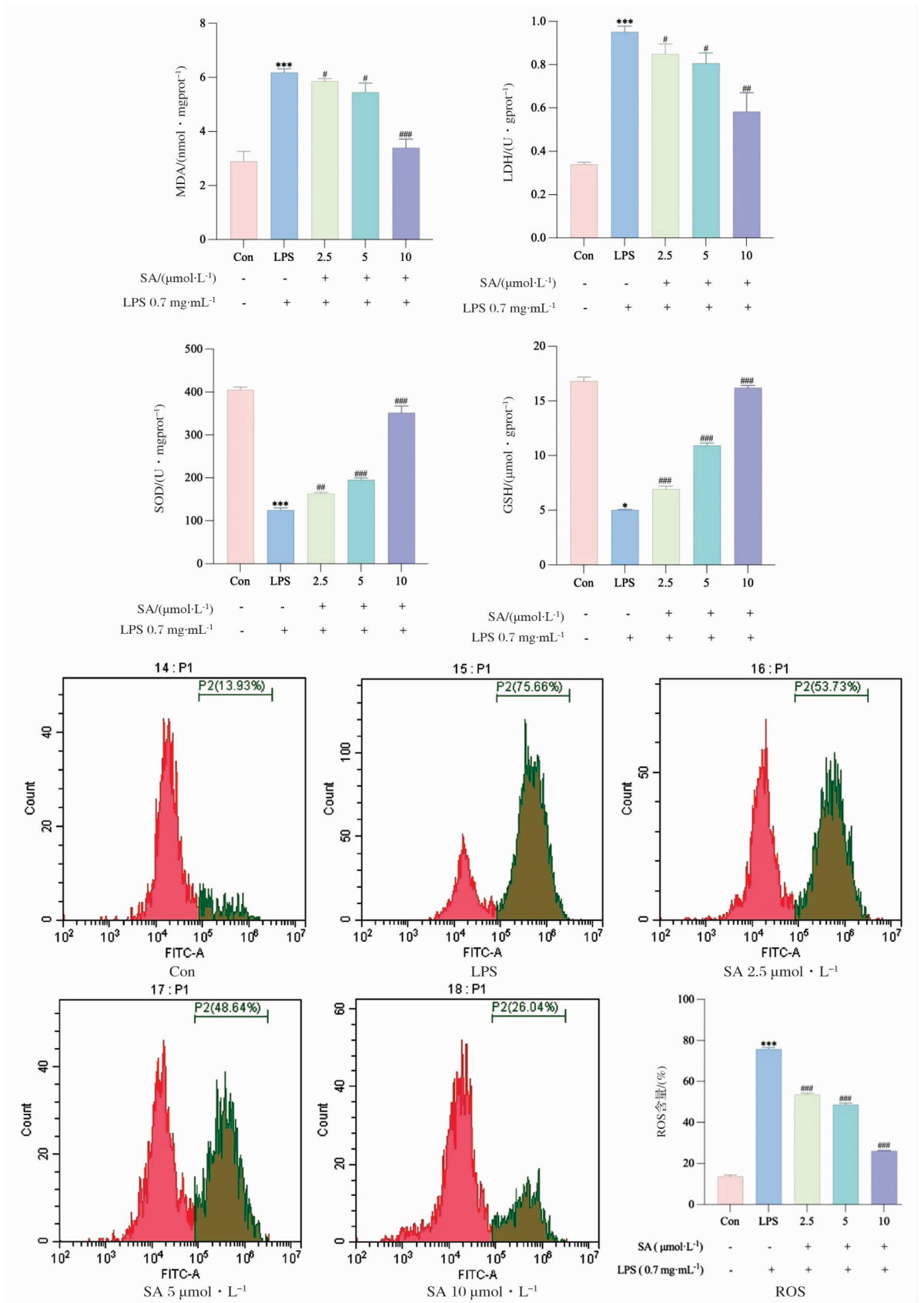


注: \* \* \* 与 Con 组比较,  $P < 0.001$ ; # 与 LPS 组比较,  $P < 0.05$ ; ## 与 LPS 组比较,  $P < 0.01$ ; ### 与 LPS 组比较,  $P < 0.001$ 。  
图4 SA 改善 LPS 诱导的炎症反应 ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )



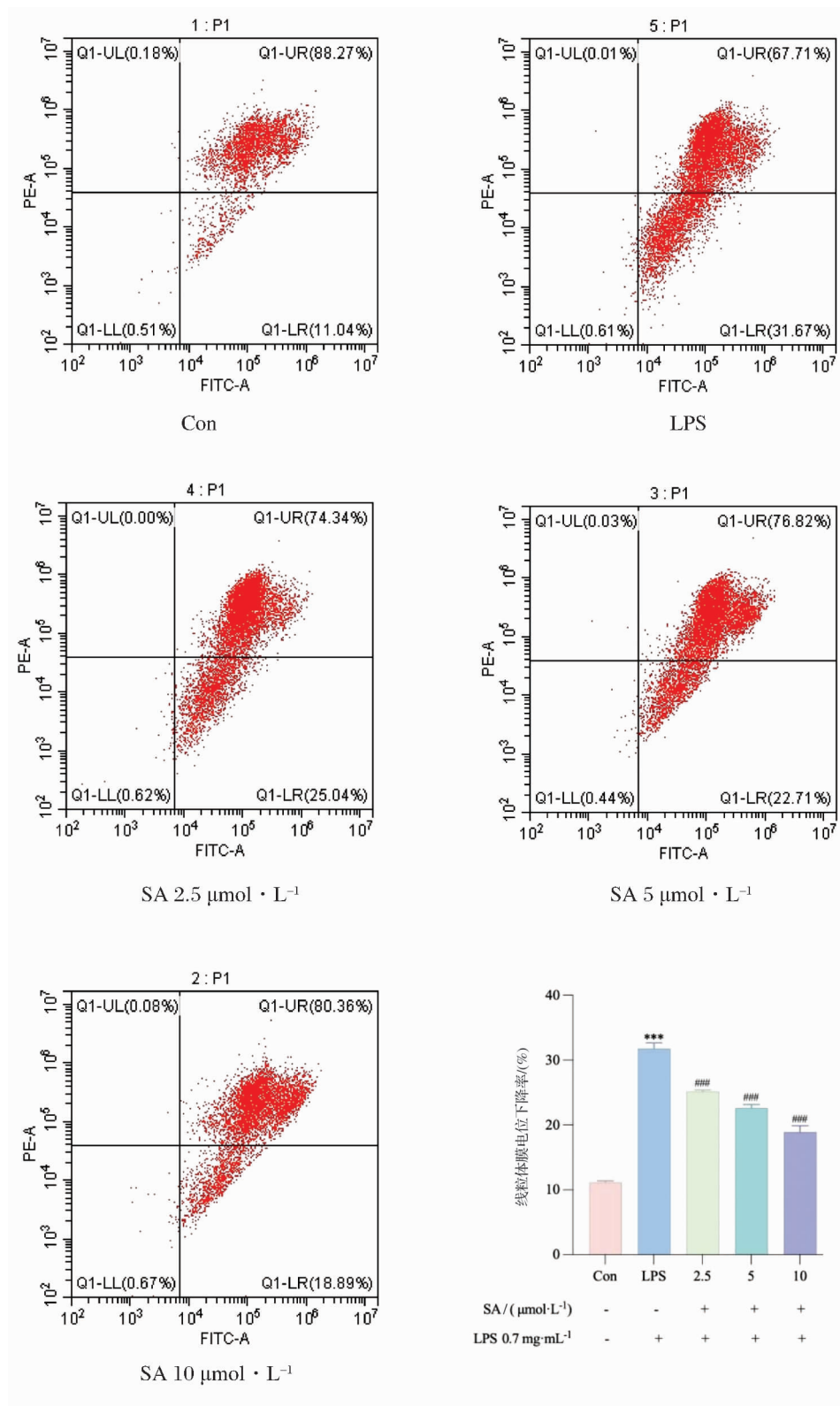
注: \* 与 Con 组比较,  $P < 0.01$ ; \*\* 与 Con 组比较,  $P < 0.001$ ; # 与 LPS 组比较,  $P < 0.05$ ; ## 与 LPS 组比较,  $P < 0.01$ ; ### 与 LPS 组比较,  $P < 0.001$ 。

图5 NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白表达水平变化( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )



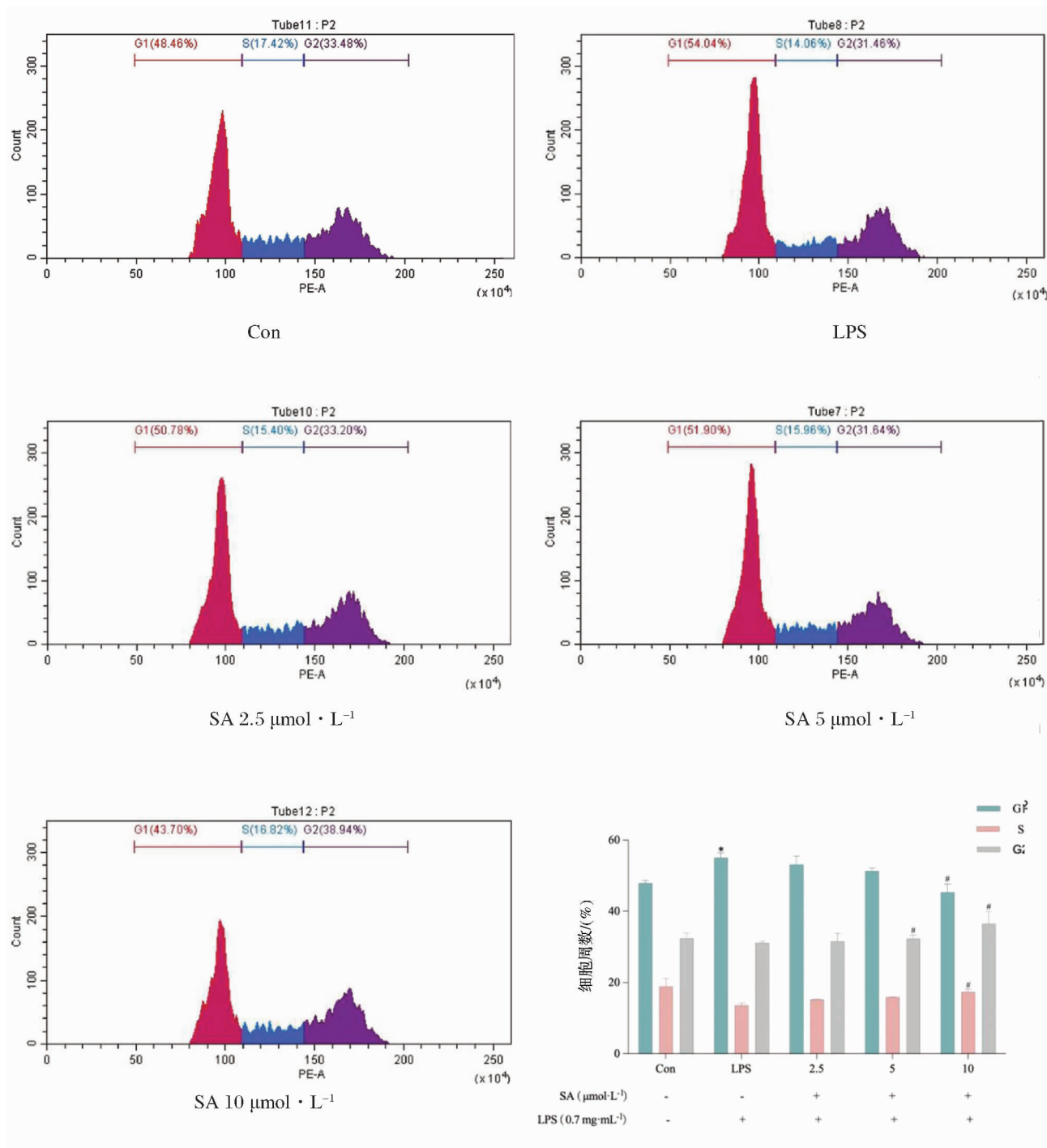
注：\* 与 Con 组比较,  $P < 0.05$ ; \*\*\* 与 Con 组比较,  $P < 0.001$ ; # 与 LPS 组比较,  $P < 0.05$ ; ## 与 LPS 组比较,  $P < 0.01$ ; ### 与 LPS 组比较,  $P < 0.001$ 。

图6 SA 改善 LPS 诱导的炎症反应 ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )



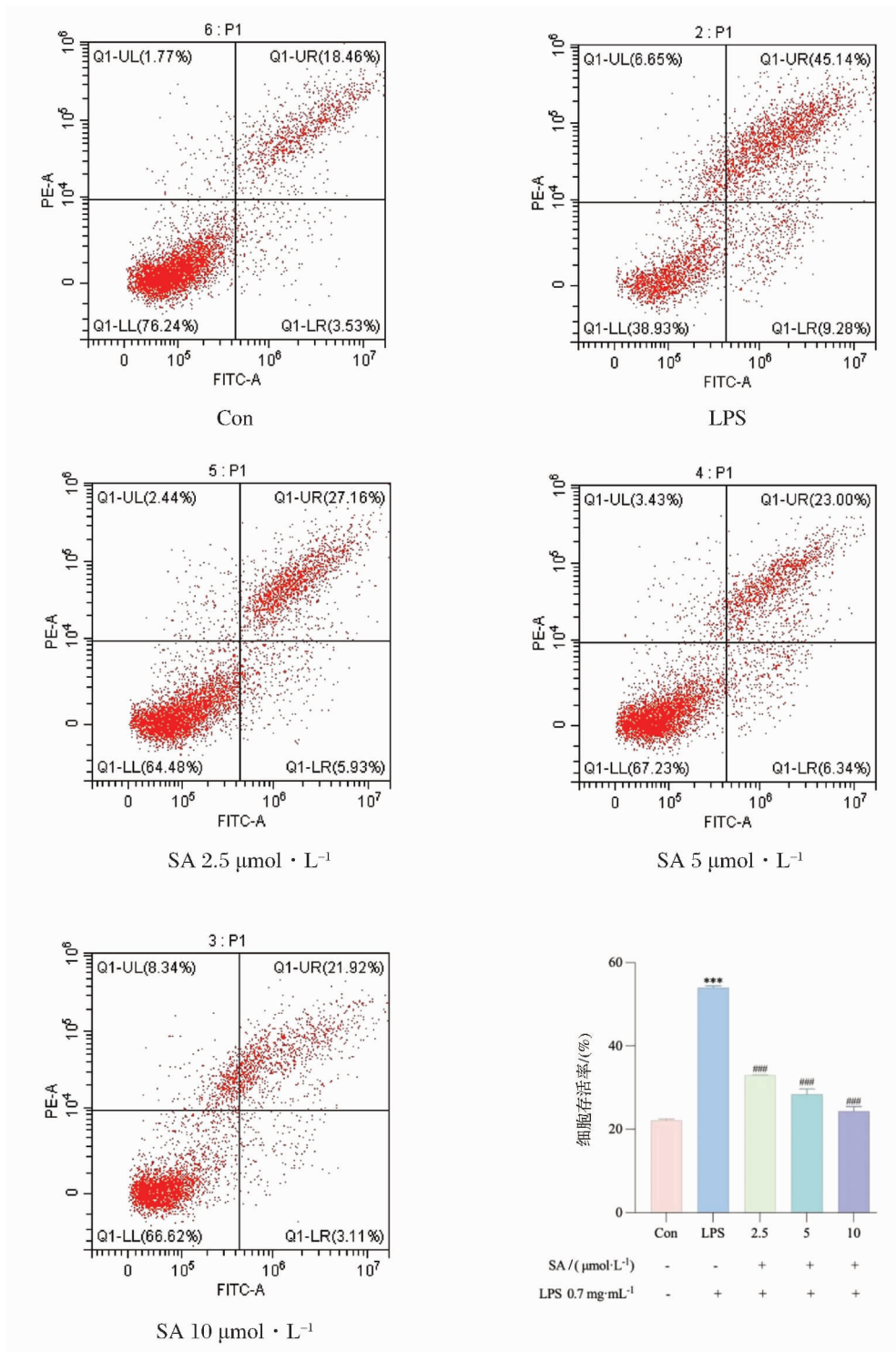
注：\*\*\*与Con组比较， $P < 0.001$ ；###与LPS组比较， $P < 0.001$ 。

图7 SA对Caco-2细胞线粒体膜电位水平的影响( $n=3, \bar{x} \pm s$ )



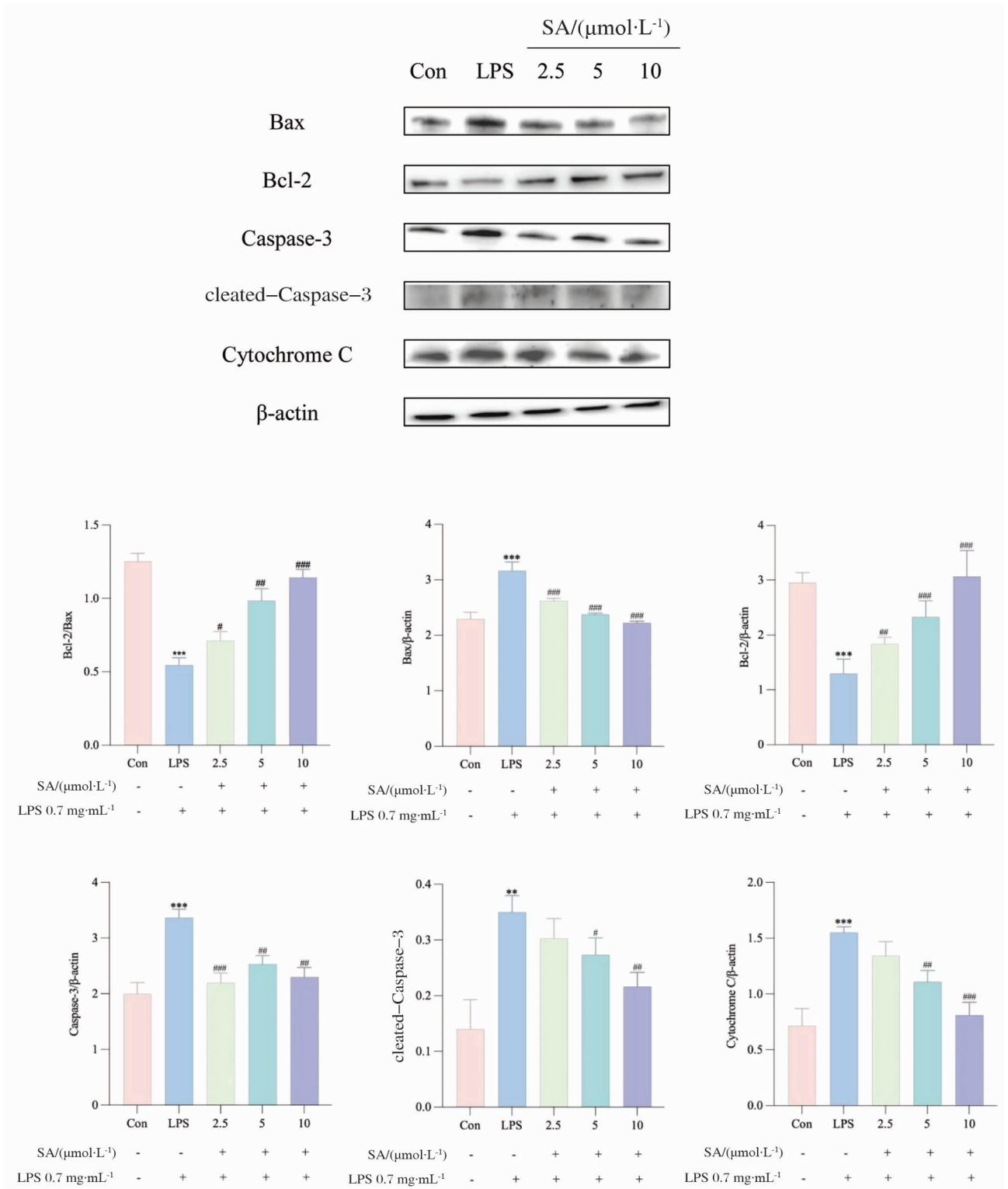
注: \* 与 Con 组比较,  $P < 0.05$ ; \*\* 与 Con 组比较,  $P < 0.01$ ; \*\*\* 与 Con 组比较,  $P < 0.001$ ; # 与 LPS 组比较,  $P < 0.05$ ; ## 与 LPS 组比较,  $P < 0.01$ ; ### 与 LPS 组比较,  $P < 0.001$ 。

图8 SA 对 LPS 造成的细胞周期阻滞的影响 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )



注:\*\*\*与Con组比较, $P < 0.001$ ;###与LPS组比较, $P < 0.001$ 。

图9 SA对LPS诱导的细胞凋亡的影响( $n=3, \bar{x} \pm s$ )



注: \* 与 Con 组比较,  $P < 0.01$ ; \*\* 与 Con 组比较,  $P < 0.001$ ; ## 与 LPS 组比较,  $P < 0.01$ ; ### 与 LPS 组比较,  $P < 0.001$ 。

图 10 SA 调控凋亡相关蛋白 ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )