苦参醇F调节肠道菌群及免疫应答对溃疡性结肠炎小鼠的改善作用机制研究Δ

何旭东*，宋成竹，倪皓雨，胡蕴铠，李　敏，陈达俊，苏文涛，俞　捷，杨兴鑫#（云南中医药大学中药学院，昆明 650500）

中图分类号　R966　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）17-2088-08
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.17.06

摘　要　目的　探究苦参醇F（KSCF）治疗溃疡性结肠炎（UC）小鼠的作用机制。**方法**　采用网络药理学与分子对接预测KSCF干预UC的潜在靶点。将C57BL/6J小鼠按体重分为模型组、阳性对照组（柳氮磺胺吡啶，703 mg/kg）、KSCF组（100 mg/kg）和正常组，每组6只；采用饮用葡聚糖硫酸钠溶液的方法建立小鼠UC模型；造模期间灌胃给药，每天1次，连续7 d。末次给药后，对小鼠疾病活动指数（DAI）进行评分；测量小鼠结肠长度；观察小鼠结肠组织病理形态学变化；检测小鼠血清中脂多糖（LPS）及结肠中髓过氧化物酶（MPO）、一氧化氮（NO）和超氧化物歧化酶（SOD）水平；检测小鼠结肠组织中闭合蛋白（occludin）、紧密连接蛋白1（ZO-1）表达水平；检测小鼠脾脏中$CD3^+T$、$CD4^+T$、$CD8^+T$淋巴细胞比例及$CD4^+/CD8^+$值变化；采用16S rDNA测序法分析结肠微生物变化。**结果**　网络药理学结果显示，KSCF可能调节磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B、核因子κB（NF-κB）等信号通路治疗UC。分子对接结果表明，KSCF与NF-κB p65蛋白结合最稳定。动物实验结果表明，与模型组比较，KSCF组小鼠结肠组织病理形态学特征得到改善；DAI评分、血清LPS水平、结肠组织中MPO及NF-κB p65磷酸化和NLRP3蛋白表达水平、脾脏中$CD8^+T$淋巴细胞比例显著降低（$P<0.05$）；小鼠体重，结肠组织中SOD水平、occludin和ZO-1表达水平，脾脏中$CD3^+T$、$CD4^+T$淋巴细胞比例及$CD4^+/CD8^+$值显著升高（$P<0.05$）；肠道中厚壁菌门、放线菌门、阿克曼氏菌属和乳酸杆菌属丰度增加，变形菌门丰度减少，菌群结构向正常组趋近。**结论**　KSCF通过修复肠道微生态失调、增强免疫应答来抑制结肠炎症反应，改善肠屏障完整性来缓解UC。

关键词　苦参醇F；溃疡结肠炎；免疫应答；肠道菌群；炎症；氧化应激；16S rDNA测序

Improvement mechanism study of kushenol F on ulcerative colitis mice by regulating gut microbiota and immune response

HE Xudong, SONG Chengzhu, NI Haoyu, HU Yunkai, LI Min, CHEN Dajun, SU Wentao, YU Jie, YANG Xingxin (College of Pharmaceutical Science, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To explore the action mechanism of kushenol F (KSCF) in treating ulcerative colitis (UC) in mice. **METHODS** The potential targets of KSCF intervening in UC were predicted with network pharmacology and molecular docking. C57BL/6J mice were randomly divided by body weight into model group, positive control group (sulfasalazine, 703 mg/kg), KSCF group (100 mg/kg), and normal group, with 6 mice per group. The UC model of mice was induced by dextran sulfate sodium solution. During the modeling period, the mice were given relevant medicine intragastrically, once a day, for 7 consecutive days. After the last administration, the disease activity index (DAI) of the mice was scored; the length of the mice's colon was measured; pathological changes in the colon tissue of mice were observed; the levels of lipopolysaccharide (LPS) in serum, myeloperoxidase (MPO), nitric oxide (NO) and superoxide dismutase (SOD) in the colon were detected in mice; the expression levels of occludin and ZO-1 in colon tissue of mice were detected; the proportions of $CD3^+T$, $CD4^+T$, and $CD8^+T$ lymphocytes in the spleen and the ratio of $CD4^+/CD8^+$ were detected; changes in colonic microbiota were analyzed by 16S rDNA sequencing. **RESULTS** Results of network pharmacology indicated that KSCF may treat UC by regulating signaling pathways such as phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) and nuclear factor kappa B (NF-κB). Molecular docking results showed that KSCF bound most stably with NF-κB p65 protein. Animal experiment results demonstrated that, compared with the model group, the pathological characteristics of colon tissue in mice were improved in KSCF group. DAI scores, serum levels of LPS, the levels of MPO, NF-κB p65 phosphorylation and NLRP3 protein expression in

Δ**基金项目**　国家自然科学基金项目（No.82104381，No.82060707）；云南省南药可持续利用研究重点实验室科技人才和平台计划项目（No.202105AG070012XS2204）；云南省教育厅科学研究基金项目（No.2024Y385）

*　**第一作者**　博士研究生。研究方向：中药药效物质分析。E-mail：2758251701@qq.com

#　**通信作者**　教授，博士生导师。研究方向：中药药效物质分析。E-mail：yxx78945@163.com

the colon, and the proportion of $CD8^+$T lymphocytes in the spleen were reduced significantly ($P<0.05$). Body weight, SOD levels, expression levels of occludin and ZO-1 in the colon, proportions of $CD3^+$T and $CD4^+$T lymphocytes, and the $CD4^+/CD8^+$ ratio in the spleen were significantly increased ($P<0.05$); the abundance of Firmicutes, Actinobacteria, *Akkermansia*, and *Lactobacillus* genera were increased, while Proteobacteria decreased; the microbial community structure tended towards that of the normal group. **CONCLUSIONS** KSCF alleviates UC by restoring intestinal microbial imbalance, enhancing immune response, and inhibiting colonic inflammatory responses, thereby improving intestinal barrier integrity.

KEYWORDS kushenol F; ulcerative colitis; immune response; gut microbiota; inflammation; oxidative stress; 16S rDNA sequencing

溃疡性结肠炎（ulcerative colitis，UC）是以慢性非特异性结肠炎症为特征的炎症性肠道疾病，主要发生在结肠黏膜层，表现为结肠连续性炎症损害，常伴有黏液脓血便、腹痛等症状[1-2]。UC发病机制尚不清楚，可能与微生物紊乱、肠黏膜屏障功能障碍、氧化应激和炎症介质增加等因素共同作用有关[3-4]。目前，5-氨基水杨酸、皮质类固醇等是治疗UC的常用药物[5-6]，但其存在疗效不足、药物依赖性大、费用高等局限性，故寻找更安全、有效的UC治疗药物具有重要意义。

研究表明，肠道菌群在肠道黏膜形成屏障，从而调节肠道屏障通透性[7]。当肠道菌群失调时，固有层免疫屏障失衡，大量有害因子渗透进入结肠固有层组织，激活炎症细胞，产生大量活性氧，导致氧化应激增强[8]。而氧化应激产生的大量促炎细胞因子和氧化分解产物可进一步加剧身体组织炎症[9]，如白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）等炎症因子通过激活核因子κB（nuclear factor-κB，NF-κB）信号通路放大炎症反应[10]。在炎症环境下，先天淋巴样细胞和抗原呈递细胞的异常激活和浸润会引起免疫应答失调，进而释放致病因子进一步破坏肠道屏障完整性，导致UC恶化[11]。因此，通过改善肠道菌群组成及调节免疫应答可有效缓解UC。

苦参醇F（kushenol F，KSCF）为苦参中异戊烯基黄酮代表性成分，具有抗炎、抗氧化和调节免疫等多种生物活性[12]。本课题组前期研究发现，KSCF可通过抑制IL-1β、IL-6、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor α，TNF-α）等炎症相关因子释放，减少结肠组织炎症损伤，从而改善UC小鼠症状和组织病变[12]。这提示KSCF有望成为UC的有效治疗策略。然而，KSCF对肠道菌群组成及免疫应答的影响尚不清楚。因此，本研究首先采用网络药理学与分子对接预测KSCF干预UC的潜在靶点，再以柳氮磺胺吡啶为阳性对照药物，观察KSCF对UC小鼠免疫应答、结肠组织氧化应激及肠道微生物的影响，并验证KSCF干预UC的潜在靶点，为挖掘UC潜在治疗药物提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有：SpectraMax® Plus384型光吸收酶标仪（美国Molecular Devices公司），Pannoramic DESK型病理切片扫描仪（匈牙利3DHISTECH公司），Chemidoc XRS型图像检测仪（上海珞雅实业有限公司），Fortessa X-20型细胞仪（美国BD Biosciences公司），XCell SureLock Mini-Cell型电泳槽、CRYOSTAR NX50型冰冻切片机[赛默飞世尔科技（中国）有限公司]，NIKON ECLIPSE E100型正置光学显微镜、NIKON DS-U3型成像系统（日本Nikon公司），DYY-6C型电泳仪（北京六一生物科技有限公司）。

1.2 主要药品与试剂

KSCF对照品（批号22082401，纯度＞98%）购自成都普菲德生物科技有限公司；柳氮磺胺吡啶肠溶片（批号09221203，规格0.25 mg）购自上海信谊天平药业有限公司；葡聚糖硫酸钠（dextran sulfate sodium，DSS）（批号S7102）购自广州亿宁生物技术有限公司；NF-κB p65、磷酸化NF-κB p65（p-NF-κB p65）、核苷酸结合寡聚化结构域样受体3（NOD-like receptor family pyrin domain containing 3，NLRP3）单克隆抗体（批号分别为16、19、6）均购自美国CST公司；兔源闭合蛋白（occludin）、紧密连接蛋白1（zonula occludens-1，ZO-1）、β-肌动蛋白（β-actin）多克隆抗体、辣根过氧化物酶（HRP）标记的兔源二抗（批号分别为00147267、00144045、00139414、23006498）均购自武汉三鹰生物技术有限公司；Percp/Cyanine 5.5标记的CD3抗体、FITC标记的CD4抗体以及PE标记的CD8抗体（批号分别为100217、116003、100707）均购自美国Biolegend公司；BCA蛋白定量试剂盒（批号090321211027）购自上海碧云天生物技术有限公司；髓过氧化物酶（myeloperoxidase，MPO）、脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）检测试剂盒（批号分别为230731-022M、230731-064M）均购自江苏酶免实业有限公司；超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、一氧化氮（nitrogen monoxide，NO）检测试剂盒（批号均为20230731）均购自南京建成生物工程研究所；苏木精-伊红（HE）、阿利新蓝-过碘酸雪夫（AB-PAS）染色试剂盒（批号分别为20220321、20220316）均购自北京索莱宝科技有限公司；123-count eBeads流式微球（批号01123442）购自赛默飞世尔科技（中国）有限公司；其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级雄性C57BL/6J小鼠，共24只，体重20～22 g，购自斯贝福（北京）生物科技有限公司，动物生产许可证号为SCXK（京）2019-0010。实验前，所有动物均饲养于温度18～22 ℃、相对湿度50%～60%、光明12 h/黑暗12 h交替的环境下，饲养期间自由摄食、饮水，适应性喂养1周后进行后续实验。本研究方案经云南中医药大学动物实验伦理委员会审查合格，批准号为R-062023111。

2 方法

2.1 网络药理学与分子对接预测KSCF干预UC潜在靶点

2.1.1 KSCF治疗UC核心靶点预测

经Swiss Target Prediction、GeneCards、OMIM和Drug Bank数据库检索KSCF与UC的相关靶点。借助Venny 2.1在线绘图工具获取KSCF与UC交集靶点，并应用DAVID数据库对交集靶点进行基因本体（gene ontology，GO）功能注释及京东基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）通路富集分析，从而揭示KSCF与UC相关靶点的生物学联系。

2.1.2 KSCF-核心靶点分子对接验证

从PubChem数据库和PDB数据库中获取KSCF和核心靶点蛋白的3D结构，随后使用Discovery Studio 3.5软件进行结构预处理，包括加氢、电荷计算和非极性氢原子合并。通过AutoDock Vina 1.1.2软件对KSCF配体与核心靶点受体进行分子对接，并预测KSCF与受体的结合模式与亲和力。

2.2 KSCF对UC小鼠免疫应答及相关生理指标的影响

2.2.1 动物分组、造模与给药

将24只小鼠按体重随机分为4组，分别为正常组、模型组、阳性对照组和KSCF组，每组6只。正常组小鼠正常饮用水，其余各组小鼠均饮用3%的DSS溶液7 d，以建立UC小鼠模型[8]。造模期间，KSCF组小鼠灌胃KSCF 100 mg/kg（给药剂量根据前期研究结果[12]设置），阳性对照组小鼠灌胃柳氮磺胺吡啶703 mg/kg[根据成人（体重70 kg）临床剂量换算而得]，正常组和模型组小鼠灌胃等体积药物溶剂。灌胃体积均为10 mL/kg，每天1次，连续7 d。所有灌胃药液均以*N*，*N*-二甲基乙酰胺（2.5%）+吐温80（2.5%）+生理盐水的混合溶液为溶剂。

2.2.2 体重和疾病活动指数检测

实验过程中，每天给药前称定并记录小鼠体重，观察其粪便成形和带血情况。参照文献方法[13]计算各组大鼠的疾病活动指数（disease activity index，DAI），DAI＝（体重减少比例评分+便血评分+粪便硬度评分）/3。具体标准为：体重减少比例——无减少为0分，减少1%～＜5%为1分，减少5%～＜10%为2分，减少10%～＜20%为3分，减少20%及以上为4分；便血——未出血为0分，略微带血为1分，较少带血为2分，较多带血为3分，大量带血为4分；粪便硬度——正常粪便为0分，轻微稀便为1分，稀便为2分，水样稀便为3分，严重拉稀为4分。DAI＞0.5则表明UC模型复制成功[13]。

2.2.3 样本采集

末次给药后1 d，用1%戊巴比妥钠（50 mg/kg）麻醉小鼠，眼眶取血。将血样在室温放置1 h后，在4 ℃下以3 000 r/min离心15 min，分离血清。采用颈椎脱位法处死小鼠，打开腹腔，完整取出结肠组织，测量结肠长度后，将部分结肠组织用4%多聚甲醛溶液固定，另一部分结肠组织于－80 ℃下保存；此外，采集新鲜脾脏用于T淋巴细胞亚群分析，收集结肠内容物用于肠道菌群多样性测序。

2.2.4 血清中LPS及结肠组织中MPO、NO、SOD水平检测

按试剂盒说明书方法检测小鼠血清中LPS水平。取各组小鼠冻存的结肠组织10 mg于EP管中，加入100 μL预冷的磷酸盐缓冲液（pH7.4），匀浆，于4 ℃下以12 000 r/min离心15 min，收集上清液，分别按相应试剂盒说明书方法检测小鼠结肠组织中MPO、NO、SOD水平。

2.2.5 结肠组织病理形态学变化观察

在4%多聚甲醛固定的结肠组织中，每组取3个结肠组织样本制备石蜡切片（厚度4 μm），分别按HE和AB-PAS染色试剂盒说明书方法进行染色后，在病理切片扫描仪下观察并采集图像。

2.2.6 结肠组织中occludin、ZO-1表达检测

每组取3个石蜡切片样本，经抗原修复后，在4 ℃下与occludin、ZO-1一抗（稀释比例均为1∶100）孵育过夜，复温洗涤后滴加HRP标记的兔源二抗染液（稀释比例1∶100）；洗涤后使用二氨基联苯胺法进行显色，随后加入苏木精进行细胞核复染，最后用中性树胶封片。在病理切片扫描仪下采集图像信息，细胞核为蓝色，occludin、ZO-1阳性表达为棕黄色。运用Image J软件进行半定量分析，结果以阳性区域百分比展示。

2.2.7 结肠组织中炎症反应相关蛋白表达检测

每组取3只小鼠冻存的结肠组织适量，加入RIPA裂解液，于4 ℃下研磨后，于冰上放置30 min，然后以3 500 r/min离心15 min，收集上清液，以BCA法测定蛋白浓度后作变性处理。取变性蛋白样品，经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后，转膜，封闭；加入NF-κB p65、p-NF-κB p65、NLRP3、*β*-actin一抗（稀释比例均为1∶1 000），于4 ℃下孵育过夜；洗膜后，加入HRP标记的兔源二抗（稀释比例1∶5 000），室温孵育2 h；洗膜3次，使用Chemidoc XRS图像检测仪观察蛋白条带，使用Image J软件分析目的条带灰度值，以目的蛋白与内参蛋白（*β*-actin）条带的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

2.2.8　脾脏中T淋巴细胞亚群水平检测

每组取3只小鼠的脾脏，研磨完全后，使用全血及组织稀释液冲洗筛网，收集细胞悬液。在细胞悬液中加3 mL淋巴细胞分离液，在室温条件下离心20～30 min，弃上清。将细胞重悬后置于流式管中，加入预先配制的一抗（CD3抗体0.5 μL、CD4抗体0.5 μL、CD8抗体0.5 μL），室温条件下振荡混匀后避光孵育30 min；加入2 mL磷酸盐缓冲液清洗后，以1 500 r/min离心5 min，弃上清；加入适量磷酸盐缓冲液重悬后，使用123-count eBeads流式微球进行细胞计数，检测脾脏中$CD3^+$T、$CD4^+$T、$CD8^+$T淋巴细胞比例，并计算$CD4^+/CD8^+$值。流式细胞术数据采集使用Fortessa细胞仪，数据分析使用FlowJo软件。

2.3　KSCF对UC小鼠肠道微生物的影响

采用16S rDNA测序法进行分析。每组取3只小鼠的结肠内容物送至苏州帕诺米克生物医药科技有限公司进行高通量测序。测序引物序列为前引物序列5′-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3′，后引物序列5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′；测序区域为16S V3V4。基于Illumina NovaSeq 6000平台进行生物信息分析。

2.4　统计学方法

采用SPSS 21.0软件对数据进行统计分析。满足正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步的组间两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3　结果

3.1　KSCF治疗UC的核心靶点预测结果

3.1.1　KSCF治疗UC的潜在靶点

KSCF和UC被鉴定的潜在作用靶点分别为100和5 483个。通过对比分析，KSCF与UC的交集靶点共有63个。

3.1.2　GO功能和KEGG通路富集分析结果

GO功能分析结果显示，KSCF在治疗UC的过程中主要涉及以下生物学过程：肽基酪氨酸磷酸化、蛋白质磷酸化、受体复合物、细胞质基质、蛋白酪氨酸激酶活性、非跨膜蛋白酪氨酸激酶活性等。

KEGG通路富集分析结果显示，KSCF在UC的治疗过程中主要参与前列腺癌、内分泌抵抗、肿瘤通路以及磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B（phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B，PI3K/Akt）、NF-κB等信号通路。其中，前列腺癌和肿瘤通路主要靶点为基质金属蛋白酶1、基质金属蛋白酶3、雷帕霉素靶蛋白等。

由于KSCF主要应用目标是UC，故本研究选择与UC直接相关的PI3K/Akt、NF-κB等信号通路作为研究重点。

3.2　KSCF与靶蛋白的分子对接验证结果

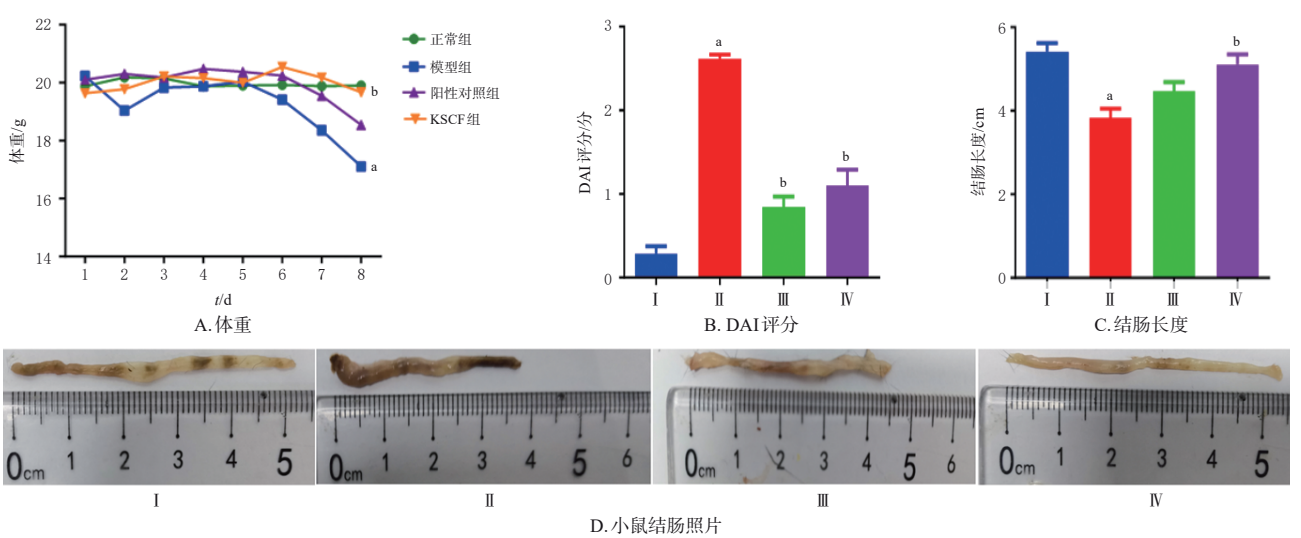
分子对接表明，KSCF与PI3K、Akt、NF-κB p65、NLRP3之间可形成氢键作用，对应的结合自由能分别为−8.9、−10.0、−10.3、−7.7 kcal/mol（1 kcal/mol=4 184 J/mol）。结果提示，KSCF与NF-κB p65蛋白的结合最为稳定。

3.3　KSCF对UC小鼠体重、DAI评分及结肠长度的影响

与正常组比较，模型组小鼠精神状态不佳，皮毛较暗，活动较少，体重显著降低（$P<0.05$），DAI评分显著升高（$P<0.05$），结肠长度显著变短（$P<0.05$）。与模型组比较，阳性对照组、KSCF组小鼠精神状态、皮毛光泽以及活动量均改善，DAI评分显著降低（$P<0.05$）；KSCF组小鼠体重显著升高（$P<0.05$），结肠长度显著增加（$P<0.05$）。结果见图1。

3.4　KSCF对UC小鼠血清中LPS以及结肠组织中MPO、NO、SOD水平的影响

与正常组比较，模型组小鼠血清中LPS水平及结肠组织中MPO水平均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比



Ⅰ：正常组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：阳性对照组；Ⅳ：KSCF组；a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

图1　KSCF对DSS诱导的UC小鼠模型体重、DAI评分及结肠长度的调节作用（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

较，阳性对照组、KSCF组小鼠血清中LPS水平显著降低（$P<0.05$）；KSCF组小鼠结肠组织中MPO水平显著降低（$P<0.05$），SOD水平显著升高（$P<0.05$）。结果见表1。

表1　各组小鼠血清中LPS以及结肠组织中MPO、NO、SOD水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	LPS/(ng/L)	MPO/(ng/L)	NO/(μmol/g prot)	SOD/(U/mg prot)
正常组	25.91±2.23	8.95±0.53	6.78±1.95	45.95±14.11
模型组	37.70±2.10[a]	12.04±0.53[a]	11.71±4.35	34.88±3.47
阳性对照组	33.71±1.39[b]	11.17±0.59	10.50±3.36	32.33±7.57
KSCF组	23.56±2.63[b]	8.05±0.82[b]	7.39±2.06	54.39±11.51[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

3.5　KSCF对UC小鼠结肠组织病理形态学的影响

与正常组比较，模型组小鼠炎症细胞浸润严重，隐窝结构被大量破坏，杯状细胞减少。与模型组比较，阳性对照组、KSCF组小鼠结肠组织隐窝结构形态得到明显改善，且杯状细胞数量增加，炎症细胞浸润情况改善。结果见图2。

3.6　KSCF对UC小鼠结肠组织中occludin、ZO-1表达的影响

与正常组比较，模型组小鼠结肠组织中occludin、ZO-1蛋白分布不均且染色变淡，表达显著减少（$P<0.05$）；与模型组比较，阳性对照组、KSCF组小鼠结肠组织中occludin、ZO-1蛋白分布较为均匀，表达显著升高（$P<0.05$）。结果见图3（仅展示模型组和KSCF组图片结果）、表2。

3.7　KSCF对UC小鼠结肠组织中NF-κB p65、p-NF-κB p65及NLRP3表达的影响

与正常组比较，模型组小鼠结肠组织中p-NF-κB p65、NLRP3蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，阳性对照组、KSCF组小鼠结肠组织中p-NF-κB p65、NLRP3蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见图4、表3。

表2　各组小鼠结肠组织中ZO-1、occludin的表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，%）

组别	occludin	ZO-1
正常组	25.48±1.52	22.91±0.48
模型组	19.23±0.45[a]	17.64±2.35[a]
阳性对照组	22.95±0.95[b]	25.40±1.54[b]
KSCF组	23.10±2.16[b]	27.07±1.35[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

3.8　KSCF对UC小鼠脾脏中T淋巴细胞亚群变化的影响

与正常组比较，模型组小鼠脾脏中$CD3^+T$、$CD4^+T$淋巴细胞比例及$CD4^+/CD8^+$值显著降低（$P<0.05$），$CD8^+T$淋巴细胞比例显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，阳性对照组、KSCF组小鼠脾脏中$CD3^+T$、$CD4^+T$淋巴细胞比例及$CD4^+/CD8^+$值显著增加（$P<0.05$），且KSCF组小鼠脾脏中$CD8^+T$淋巴细胞比例显著降低（$P<0.05$）。结果见表4和图5。

3.9　KSCF对UC小鼠肠道微生物的影响

Alpha多样性分析结果（图6A）显示，与正常组比较，模型组小鼠Simpson、Pielou_e指数呈降低趋势，Shannon、Goods_coverage指数呈升高趋势；与模型组比较，KSCF组小鼠Shannon、Goods_coverage指数呈下降趋势，Simpson、Pieloun_e指数呈升高趋势。Beta多样性PCoA分析结果（图6B）显示，模型组小鼠肠道菌群结构偏离正常组；与模型组比较，KSCF组小鼠肠道菌群结构更倾向于正常组，且各组之间存在显著差异（$P<0.05$）。肠道菌群在门水平的结构组成分析结果（图6C）显示，与正常组比较，模型组小鼠肠道厚壁菌门（Firmicutes）、拟

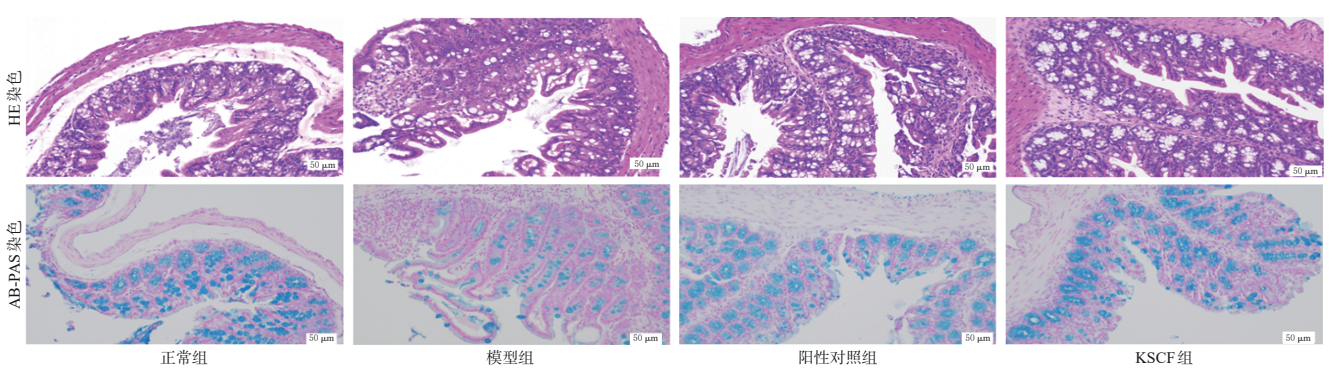


图2　各组小鼠结肠组织病理形态学观察显微图

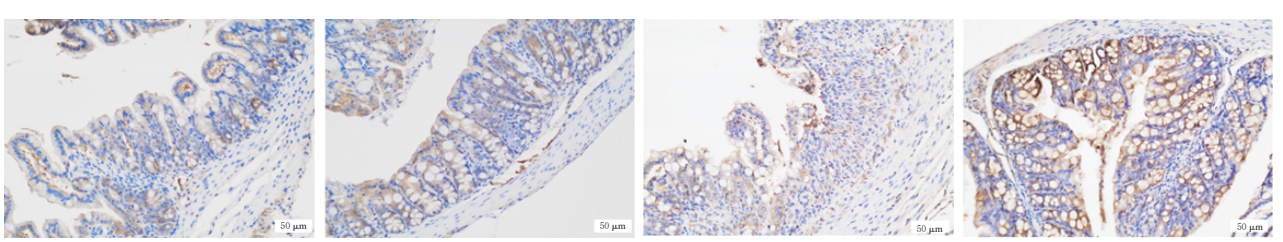
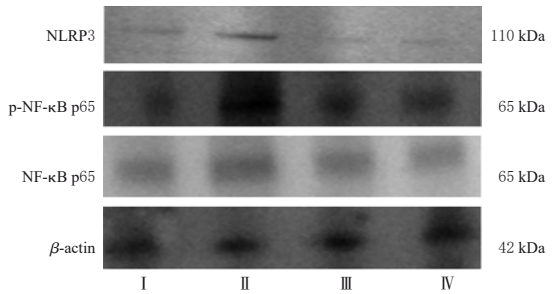


图3　各组小鼠结肠组织中occludin、ZO-1表达的显微图



Ⅰ：正常组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：阳性对照组；Ⅳ：KSCF组。

图4　各组小鼠结肠组织中NF-κB p65、p-NF-κB p65及NLRP3蛋白表达的电泳图

表3　各组小鼠结肠组织中NF-κB p65、p-NF-κB p65及NLRP3蛋白表达水平检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	NF-κB p65/β-actin	p-NF-κB p65/β-actin	NLRP3/β-actin
正常组	0.69±0.06	0.61±0.01	0.72±0.07
模型组	0.66±0.04	1.37±0.10[a]	1.16±0.08[a]
阳性对照组	0.67±0.05	0.89±0.02[b]	0.61±0.08[b]
KSCF组	0.67±0.04	0.72±0.03[b]	0.67±0.15[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

表4　各组小鼠脾脏中T淋巴细胞亚群比例检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	$CD3^+$T淋巴细胞比例/%	$CD4^+$T淋巴细胞比例/%	$CD8^+$T淋巴细胞比例/%	$CD4^+/CD8^+$值
正常组	71.63±0.06	78.13±0.21	6.64±0.53	11.81±0.95
模型组	43.97±0.91[a]	68.03±2.33[a]	9.58±0.79[a]	7.13±0.58[a]
阳性对照组	58.13±0.49[b]	75.47±2.54[b]	8.88±0.45	8.51±0.29[b]
KSCF组	58.57±0.55[b]	76.77±2.52[b]	7.49±0.69[b]	10.31±1.21[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

杆菌门（Bacteroidetes）丰度呈降低趋势，变形菌门（Proteobacteria）、放线菌门（Actinobacteria）丰度呈增加趋势；与模型组比较，KSCF组小鼠肠道拟杆菌门、变形菌门丰度呈降低趋势，厚壁菌门、放线菌门丰度呈增加趋势。肠道菌群在属水平的结构组成分析结果（图6D）显示，与正常组比较，模型组小鼠肠道异杆菌属（*Allobaculum*）、拟杆菌属（*Bacteroides*）、颤螺菌属（*Oscillospira*）、*Turicibacter*、阿克曼氏菌属（*Akkermansia*）丰度呈增加趋势，乳酸杆菌属（*Lactobacillus*）丰度呈降低趋势；与模型组比较，KSCF组小鼠肠道阿克曼氏菌属、乳酸杆菌属丰度呈增加趋势，拟杆菌属、颤螺菌属丰度呈降低趋势。

4　讨论

UC是一种以结肠持续性和弥漫性炎症为特征的疾病，其临床表现包括大便出血、腹泻及体重减轻[9,14]。本研究结果发现KSCF干预后可显著降低UC小鼠模型DAI评分，增加结肠长度和杯状细胞数量，并改善隐窝结构，表明KSCF能有效缓解UC小鼠症状并抑制炎症细胞浸润。

通过网络药理学预测，KSCF可能通过靶向作用于PI3K/Akt和NF-κB p65信号通路发挥UC治疗作用。分子对接结果显示，KSCF与NF-κB p65蛋白结合能最低，表明其可能通过直接抑制NF-κB p65磷酸化发挥抗炎效果。本研究结果表明，KSCF可显著降低UC小鼠结肠组织中NF-κB p65磷酸化水平和NLRP3蛋白表达水平，进一步证实了其是通过抑制NF-κB p65信号通路来减轻结肠炎症的。

已有研究发现，在结肠炎小鼠结肠黏膜中，NF-κB p65/NLRP3信号通路被激活[15]，进而促进中性粒细胞和巨噬细胞释放炎症细胞因子[16]。肠道中激活的炎症细胞会产生活性氧，导致组织损伤和氧化应激[9,14,17]，进一步导致肠道上皮细胞屏障通透性增加，促进LPS吸收入血，引发炎症反应[18]。本研究结果显示，KSCF可降低UC小鼠结肠组织中NO、MPO水平并提升SOD活性，表明其可能通过调节氧化应激反应来保护结肠免受损伤。此外，KSCF对UC小鼠肠屏障功能相关蛋白occludin和ZO-1表达的正面调节作用，以及其降低UC小鼠血清中

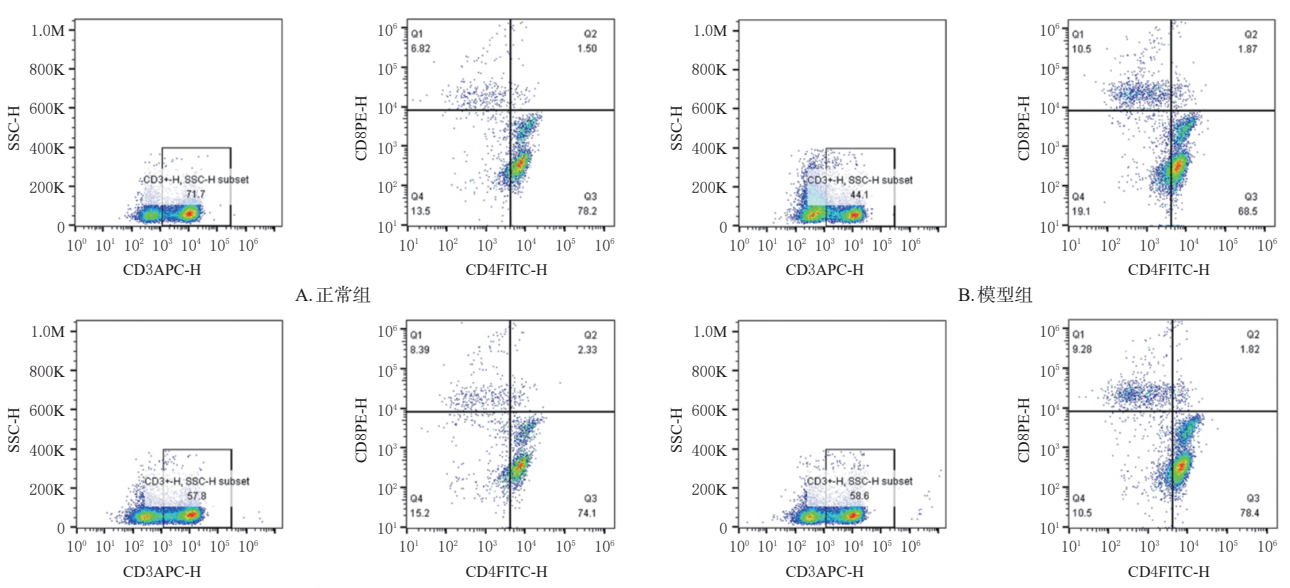
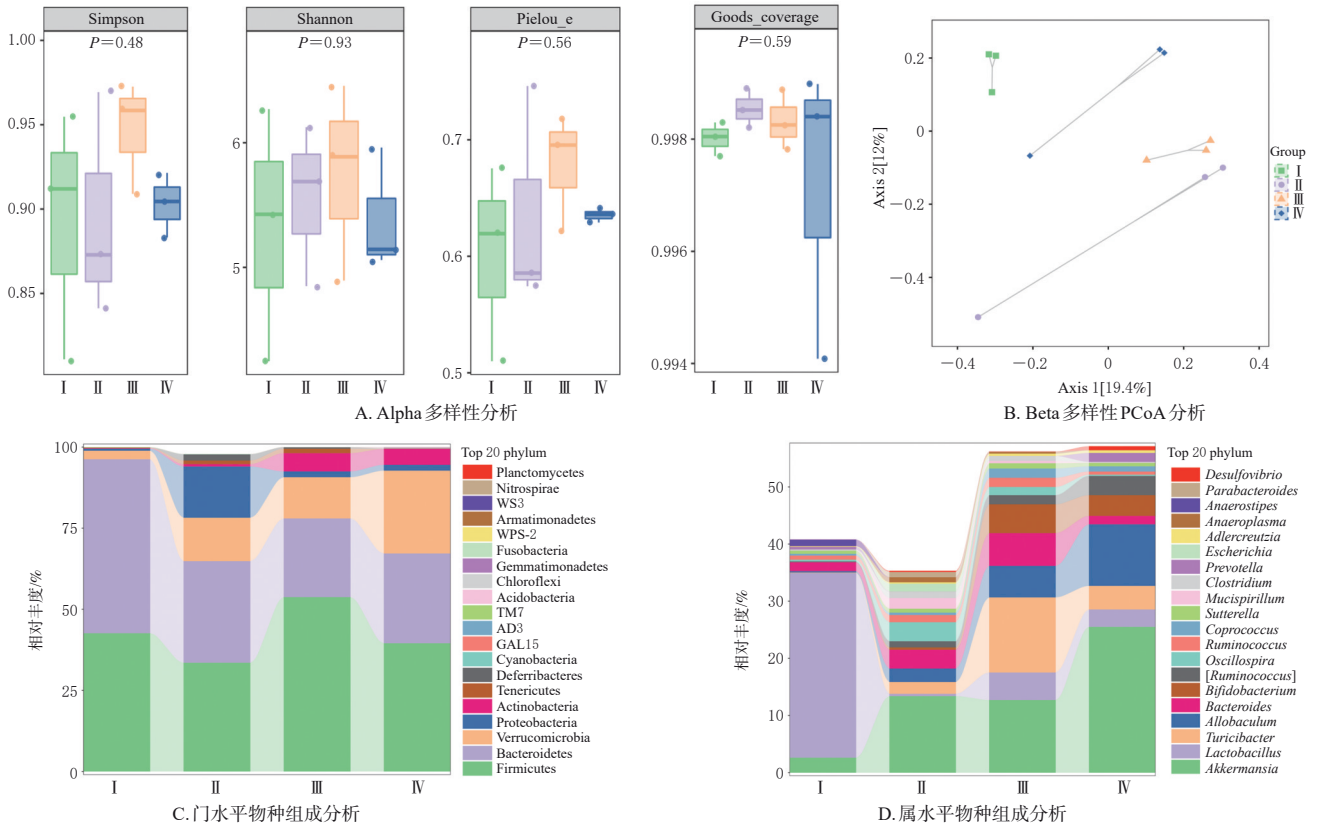


图5　各组小鼠脾脏T淋巴细胞亚群比例检测的流式细胞图



A. Alpha多样性分析　　B. Beta多样性PCoA分析

C.门水平物种组成分析　　D.属水平物种组成分析

Ⅰ:正常组;Ⅱ:模型组;Ⅲ:阳性对照组;Ⅳ:KSCF组。

图6　KSCF改善UC小鼠肠道菌群失衡效应分析

LPS水平的能力,进一步支持了其在增强肠道屏障功能和减少病原体及LPS易位方面的潜在作用。

已有研究发现,$CD4^+$T、$CD8^+$T淋巴细胞在UC活动期的比例会升高[19—20]。而在本研究中,$CD4^+$T淋巴细胞在UC活动期比例降低,$CD8^+$T淋巴细胞在UC活动期比例升高。针对$CD4^+$T淋巴细胞比例的降低,笔者推测原因可能有以下几点:(1)肠道炎症可能导致脾脏$CD4^+$T淋巴细胞迁移到炎症部位;(2)UC小鼠可能存在免疫调节失衡,导致$CD4^+$T淋巴细胞亚群之间失衡。例如,调节性T细胞和辅助性T细胞17之间失衡会导致脾脏中$CD4^+$T淋巴细胞相对或绝对数量减少。

肠道菌群失衡与肠道屏障功能降低和炎症反应密切相关[17]。研究发现,厚壁菌门可通过促进抗炎介质分泌调节炎症反应,放线菌门能产生大量短链脂肪酸维持肠道屏障完整性,变形菌门细菌增多导致LPS增加进而促发炎症反应,阿克曼氏菌可恢复肠道屏障功能和促进短链脂肪酸生成[21];乳酸杆菌属可通过减少炎症细胞浸润、抑制炎症细胞因子产生及调节免疫平衡减轻UC肠道炎症[7]。本研究中,UC小鼠肠道厚壁菌门、拟杆菌门以及乳酸杆菌属丰度降低;KSCF干预后,肠道生态群落物种均匀度增加,菌落组成趋向正常,厚壁菌门、放线菌门以及阿克曼氏菌属、乳酸杆菌属丰度增加,变形菌门丰度降低。这表明KSCF可能通过修复肠道微生态失调促进抗炎介质分泌、抑制炎症反应、恢复肠道屏障功能等来发挥治疗UC的作用。由于肠道菌群与宿主的免疫系统存在密切联系,炎症发生和氧化应激可能对肠道菌群平衡造成不利影响。因此,笔者推测KSCF对肠道菌群的正面影响可能与其内在的抗炎和抗氧化特性密切相关。

综上所述,KSCF通过增强免疫应答,修复肠道微生态失调而减轻结肠氧化应激,改善肠屏障完整性来缓解UC。未来本课题组将进一步验证KSCF的临床应用潜力,并深入探索其分子作用机制,为UC的治疗提供更多的策略和选择。

参考文献

[1] NEURATH M F. Cytokines in inflammatory bowel disease[J]. Nat Rev Immunol,2014,14(5):329-342.

[2] HINDRYCKX P, NOVAK G, VANDE CASTEELE N, et al. Review article: dose optimisation of infliximab for acute severe ulcerative colitis[J]. Aliment Pharmacol Ther,2017,45(5):617-630.

[3] LIU J Z,VAN SOMMEREN S,HUANG H L,et al. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations[J]. Nat Genet,2015,47(9):979-986.

[4] NG S C, TANG W, LEONG R W, et al. Environmental risk factors in inflammatory bowel disease: a population-

based case-control study in Asia-Pacific[J]. Gut, 2015, 64(7): 1063-1071.

[5] GUIDI L, PUGLIESE D, ARMUZZI A. Update on the management of inflammatory bowel disease: specific role of adalimumab[J]. Clin Exp Gastroenterol, 2011, 4: 163-172.

[6] CELIBERTO L S, GRAEF F A, HEALEY G R, et al. Inflammatory bowel disease and immunonutrition: novel therapeutic approaches through modulation of diet and the gut microbiome[J]. Immunology, 2018, 155(1): 36-52.

[7] 陶柱萍, 龙宇, 李灿委, 等. 肠道菌群在中草药抗溃疡性结肠炎中的作用[J]. 药学学报, 2021, 56(2): 391-402.
TAO Z P, LONG Y, LI C W, et al. Role of gut microbiota in the treatment of ulcerative colitis with traditional Chinese medicine[J]. Acta Pharm Sin, 2021, 56(2): 391-402.

[8] QU L H, LIU C L, KE C, et al. *Atractylodes lancea* rhizoma attenuates DSS-induced colitis by regulating intestinal flora and metabolites[J]. 2022, 50(2): 525-552.

[9] LI L Y, QIU N, MENG Y Q, et al. Preserved egg white alleviates DSS-induced colitis in mice through the reduction of oxidative stress, modulation of inflammatory cytokines, NF-κB, MAPK and gut microbiota composition[J]. Food Sci Hum Wellness, 2023, 12(1): 312-323.

[10] 张仪霖, 刘禹杉, 杨树森, 等. Nrf2通过调控巨噬细胞极化治疗溃疡性结肠炎的机制[J]. 中南大学学报(医学版), 2023, 48(11): 1746-1752.
ZHANG Y L, LIU Y S, YANG S S, et al. Mechanism of Nrf2 in the treatment of ulcerative colitis via regulating macrophage polarization[J]. J Cent South Univ Med Sci, 2023, 48(11): 1746-1752.

[11] 马祥雪, 温永天, 尹晓岚, 等. 从“脾为之卫”理论探讨肠道黏膜免疫与溃疡性结肠炎的中医机制[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2024, 26(3): 640-645.
MA X X, WEN Y T, YIN X L, et al. To explore the mechanism of intestinal mucosal immunity and ulcerative colitis in Chinese medicine from perspective of “spleen as the defense”[J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2024, 26(3): 640-645.

[12] 何旭东, 倪皓雨, 何金彪, 等. 苦参醇F对溃疡性结肠炎小鼠的干预作用[J]. 中国药房, 2024, 35(4): 419-424.
HE X D, NI H Y, HE J B, et al. Intervention effect of kushenol F on ulcerative colitis mice[J]. China Pharm, 2024, 35(4): 419-424.

[13] 杨阳, 周协琛, 李涛, 等. 急性溃疡性结肠炎昆明小鼠模型的制备与评价[J]. 动物医学进展, 2023, 44(2): 72-77.
YANG Y, ZHOU X C, LI T, et al. Establishment and evaluation of acute ulcerative colitis model in Kunming mice[J]. Prog Vet Med, 2023, 44(2): 72-77.

[14] WANG J J, ZHU G N, SUN C, et al. TAK-242 ameliorates DSS-induced colitis by regulating the gut microbiota and the JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. Microb Cell Fact, 2020, 19(1): 158.

[15] ZHOU G X, LIU Z J. Potential roles of neutrophils in regulating intestinal mucosal inflammation of inflammatory bowel disease[J]. J Dig Dis, 2017, 18(9): 495-503.

[16] LI H, FAN C, LU H M, et al. Protective role of berberine on ulcerative colitis through modulating enteric glial cells-intestinal epithelial cells-immune cells interactions[J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10(3): 447-461.

[17] LI F, HAN Y H, CAI X K, et al. Dietary resveratrol attenuated colitis and modulated gut microbiota in dextran sulfate sodium-treated mice[J]. Food Funct, 2020, 11(1): 1063-1073.

[18] 陈教华, 彭迎迎, 胡晓阳, 等. 补益脾胃溃结方对脾胃虚弱型溃疡性结肠炎患者的临床疗效[J]. 中成药, 2024, 46(4): 1173-1177.
CHEN J H, PENG Y Y, HU X Y, et al. Clinical effects of Buyi Piwei Kuijie Recipe on patients with ulcerative colitis due to spleen-stomach weakness[J]. Chin Tradit Pat Med, 2024, 46(4): 1173-1177.

[19] FAN Q J, LI M C, ZHAO W W, et al. Hyper α2, 6-sialylation promotes $CD4^+$ T-cell activation and induces the occurrence of ulcerative colitis[J]. Adv Sci, 2023, 10(26): e2302607.

[20] 袁柏思, 金鑫鑫, 路又可, 等. 溃疡性结肠炎外周血$CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$ T细胞的活化及其与炎症标志物的关系[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2015, 24(8): 939-942.
YUAN B S, JIN X X, LU Y K, et al. Activation of $CD3^+$, $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in peripheral blood of ulcerative colitis and the relationship with inflammatory markers[J]. Chin J Gastroenterol Hepatol, 2015, 24(8): 939-942.

[21] 朱凯, 戴志远, 沈清, 等. 3种不同海洋脂质对溃疡性结肠炎小鼠及其肠道菌群的影响[J]. 水产学报, 2021, 45(7): 1213-1224.
ZHU K, DAI Z Y, SHEN Q, et al. Effects of three different marine lipids on ulcerative colitis mice and their gut microbiome[J]. J Fish China, 2021, 45(7): 1213-1224.

（收稿日期：2024-03-15　修回日期：2024-08-06）
（编辑：林　静）