

救必应对葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠结肠炎相关肠纤维化的保护作用

李瑶¹, 张萌萌¹, 王娟¹, 李敏¹, 欧莉¹, 卫培峰¹, 唐于平¹, 谢艳华², 王四旺^{2*}

(1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046; 2. 西北大学, 陕西 西安 710069)

摘要: 目的 探讨救必应对结肠炎相关肠纤维化小鼠的保护作用。方法 C57BL/6J 小鼠随机分为正常组、模型组、巴柳氮钠组 (1.0 g/kg) 和救必应低、中、高剂量组 (0.45、0.9、1.8 g/kg), 每组 10 只。除正常组外, 其余组小鼠自由饮用 2% 葡聚糖硫酸钠 (DSS) 建立结肠炎相关肠纤维化模型, 造模第 2 个循环开始灌胃相应剂量药物, 每周记录小鼠体质量及小鼠存活率。给药结束后, 分离小鼠结肠, Masson 染色检测结肠纤维化程度, 免疫荧光染色检测结肠组织 α -SMA 和 Collagen I 蛋白表达, ELISA 法检测结肠组织 IL-1 β 、TNF- α 水平, Western blot 法检测结肠组织 TGF- β 1、Smad2/3 和 p-Smad2/3 蛋白表达。结果 与模型组比较, 救必应组小鼠体质量、存活率升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 结肠组织 Masson 染色阳性区域减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 结肠组织 IL-1 β 、TNF- α 水平降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), Collagen I、TGF- β 1、p-Smad2/3 蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 救必应可能通过调控 TGF- β /Smad 信号通路, 减少结肠胶原纤维沉积, 发挥对结肠炎相关肠纤维化小鼠的治疗作用。

关键词: 救必应; 结肠炎相关肠纤维化; 胶原沉积; TGF- β /Smad 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)09-3110-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.09.044

肠纤维化是炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 的严重并发症, 可导致肠壁形成过多的瘢痕组织, 引起肠道狭窄和肠道功能受损^[1]。据报道, 高达 11% 的溃疡性结肠炎患者出现肠纤维化, 且溃疡性结肠炎患者的肠纤维化并发症可能被严重低估^[2]。目前, 尚没有针对 IBD 相关肠纤维化的治疗方法, 尽管一些抗炎药物能减轻 IBD 患者的症状, 但对阻止肠纤维化的发生和发展效果甚微^[3]。救必应来源于冬青科植物铁冬青 *Ilex rotunda* Thunb. 的干燥树皮, 具有清热解毒、祛湿止泻、凉血止血作用。江西《草药手册》记载救必应“治急性肠胃炎、胃及十二指肠溃疡等”, 《广西本草选编》中记载“救必应 2~3 钱, 水煎服治疗急性胃肠炎、急性阑尾炎”^[4-5]。我国名老中医劳绍贤教授常用救必应与败酱草治疗溃疡性结肠炎^[6]。现代研究发现, 救必应能上调紧密连接粘附连接蛋白表达, 修复无水乙醇引起的大鼠胃及小肠黏膜损伤^[7]。课题组前期研究发现, 救必应提取物对急、慢性溃疡性结肠炎小鼠症状有改善作用^[8]。然而, 救必应能否减轻结肠炎相关肠纤维化尚不清楚, 故本实验通过建立结肠炎相关肠纤维化小鼠模型, 探究救必应对结肠炎相关肠纤维化的保护作用, 以期寻找肠纤维化的治疗药物提供参考。

1 材料

1.1 动物 C57BL/6J 小鼠 60 只, 雄性, 体质量 20~24 g,

购自空军军医大学实验动物中心 [实验动物生产许可证号 SCXK (陕) 2014-002]。适应性饲养 1 周后用于实验, 饲养环境室内温度 22~25 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 60%~70%。本实验所涉及的动物实验研究遵照国际公认的动物实验室操作规范和标准操作程序实施, 并经陕西中医药大学实验动物伦理委员会批准 (伦理批准号 SUCMDL20230303016)。

1.2 药物 救必应购自安徽贺林中药饮片科技有限公司, 并经西北大学谢艳华副主任药师鉴定为铁冬青 *Ilex rotunda* Thunb. 的干燥树皮。巴柳氮钠颗粒 (湖北百科亨迪药业股份有限公司, 国药准字 H20030748)。

1.3 试剂 葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) (美国 MP Biomedicals 公司, 货号 160110); Masson 染色试剂盒、小鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒、小鼠 TNF- α ELISA 试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 货号 G1340、SEKM-0002、SEKM-0034); 全蛋白提取试剂盒 (江苏凯基生物技术股份有限公司, 货号 KGP2100); BCA 定量试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 货号 E-BC-K318-M); anti- α -SMA, anti-Collagen I, Smad2/3, p-Smad2/3 (沈阳万类生物科技有限公司, 货号 WL02510、WL0088、WL01520、WL02305); anti- β -actin (美国 Engibody 公司, 货号 AT0048)。

1.4 仪器 ME204 分析天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司);

收稿日期: 2024-03-08

基金项目: 国家自然科学基金 (82304865); 陕西省教育厅自然科学专项 (23JK0408); 陕西中医药大学博士科研启动金 (2022)

作者简介: 李瑶 (1991—), 女, 博士, 讲师, 从事中药抗溃疡性结肠炎研究。Tel: 18700967208, E-mail: 18792768149@163.com

*通信作者: 王四旺 (1957—), 男, 硕士, 教授, 从事中药药效物质及创新药物研究。Tel: 13909259880, E-mail: wangsiw@

fmmu.edu.cn

Mini-Protean 电泳仪、Mini-Trans-Blot 湿转印槽、ChemiDoc XRS+化学发光成像仪（美国 Bio-Rad 公司）；超纯水系统（德国 Merck Millipore 公司）；Nikon Eclipse E100 光学显微镜、Nikon Eclipse C1 荧光显微镜（日本 Nikon 公司）。

2 方法

2.1 救必应水提物制备 取救必应药材适量，第1次加8倍量水回流提取2 h，第2次加6倍量水回流提取1 h，合并2次滤液，浓缩，置于真空干燥箱中干燥，粉碎，得救必应水提物。每1 g 救必应提取物粉末相当于3.9 g 救必应生药。

2.2 分组、造模及给药 小鼠随机分为正常组、模型组、巴柳氮钠组（1.0 g/kg）和救必应低、中、高剂量组（0.45、0.9、1.8 g/kg），每组10只。正常组小鼠自由饮用自来水，其余组小鼠连续饮用2% DSS 7 d，更换自来水继续饮用14 d为1个循环，重复3个循环，第3个循环时的自来水饮用调整为7 d^[9]。实验第3周开始灌胃给予相应剂量药物，给药量20 mL/kg，正常组和模型组灌胃给予等量去离子水。实验第8周给药结束后，戊巴比妥钠麻醉小鼠，分离小鼠结肠，一部分于4%多聚甲醛中固定，一部分于-80℃冷冻保存，用于后续检测。

2.3 Masson 染色观察结肠组织病理形态 将固定好的结肠组织包埋、切片、脱蜡至水，用铁苏木素染色10 min，分化及返蓝后，依次用丽春红染液染色8 min、磷钼酸染色1 min、苯胺蓝染液染色2 min，脱水封片后于显微镜下观察并采集图像。

2.4 免疫荧光法检测结肠组织 α -SMA 和 Collagen I 蛋白表达 将脱蜡至水的切片在抗原修复液中进行抗原修复，随后放入0.3%的双氧水溶液中室温孵育30 min，防止组织中内源性过氧化物酶干扰后续染色结果。切片上滴加100 μ L 3% BSA 溶液，室温封闭30 min，去除封闭液，更换为 anti- α -SMA 或 anti-Collagen I 一抗，于4℃冰箱孵育过夜，次日 PBS 洗片并滴加二抗，室温避光孵育60 min，洗片并用 DAPI 染核，封片后于荧光显微镜下观察并采集图像。

2.5 ELISA 法检测结肠组织 IL-1 β 、TNF- α 水平 称取50

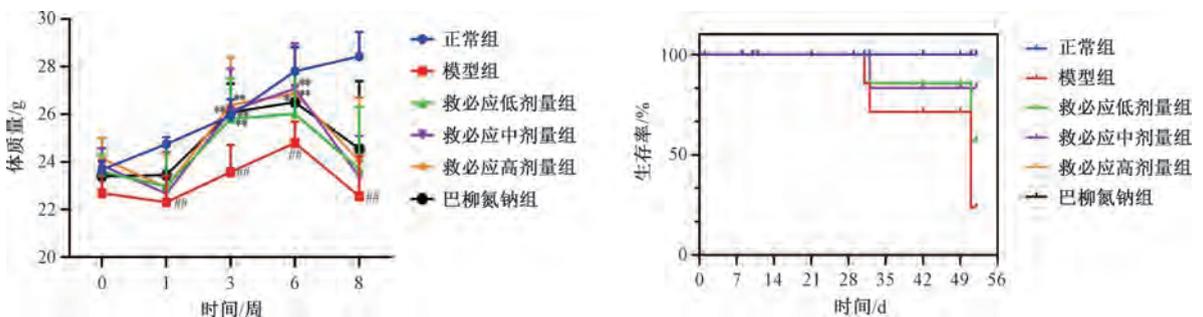
mg 结肠组织，预冷 PBS 冲洗去除残留内容物及血液，剪碎后加入450 μ L PBS，于玻璃匀浆器中充分研磨，4℃、5 000 r/min 离心10 min，分离得到上清。将小鼠 IL-1 β 和 TNF- α ELISA 试剂盒恢复至室温，按照说明书检测结肠组织中 IL-1 β 和 TNF- α 水平。

2.6 Western blot 法检测结肠组织 TGF- β 1、Smad2/3、p-Smad2/3 蛋白表达 将冷冻保存于-80℃的结肠组织在冰上解冻，称取25 mg，加入125 μ L 蛋白裂解液，研磨后将匀浆液于4℃、12 000 r/min 条件下离心15 min，分离得到上清液，BCA 定量后加入 loading buffer，沸水煮5 min 变性，于-20℃保存。按照 SDS-PAGE 配胶试剂盒说明书配制8%分离胶，蛋白上样后恒压电泳分离蛋白，恒流将蛋白转移至 PVDF 膜上，5%脱脂牛奶室温封闭60 min，放入 anti-TGF- β 1、Smad2/3、p-Smad2/3 一抗孵育液中，4℃孵育过夜，次日洗膜后放入二抗（1:3 000）孵育液中，室温孵育60 min，最后滴加超敏显色液，于化学发光仪上显色，导出图像用 Image J 软件分析各组蛋白条带灰度值。

2.7 统计学分析 通过 SPSS 23.0 软件进行处理，实验数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，当方差齐性时，多组间比较采用单因素方差分析，2组间比较采用 LSD 法；方差不齐时，则采用非参数检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 救必应对结肠炎相关肠纤维化小鼠一般状态、体质量及生存率的影响 实验期间正常组小鼠精神状态良好，毛发有光泽，粪便成形无异常，体质量稳定增加；与正常组比较，模型组小鼠精神萎靡，毛发无光泽，生存率降低，造模第31天时出现死亡，实验期间模型组死亡小鼠4只，在饮用 DSS 5~7 d 时出现黏液脓血便，体质量降低，在第1、3、6、8周时低于正常组 ($P<0.01$)；与模型组比较，救必应各剂量组和巴柳氮钠组均能改善小鼠的精神状态及粪便性状，减少血便，改善小鼠体质量降低，提高生存率，其中救必应高剂量组小鼠实验期间未见死亡，且在第3和6周时，救必应中、高剂量组及巴柳氮钠组小鼠体质量高于模型组 ($P<0.01$)，见图1。



注：与正常组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P<0.01$ 。

图1 各组小鼠体质量及生存率变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

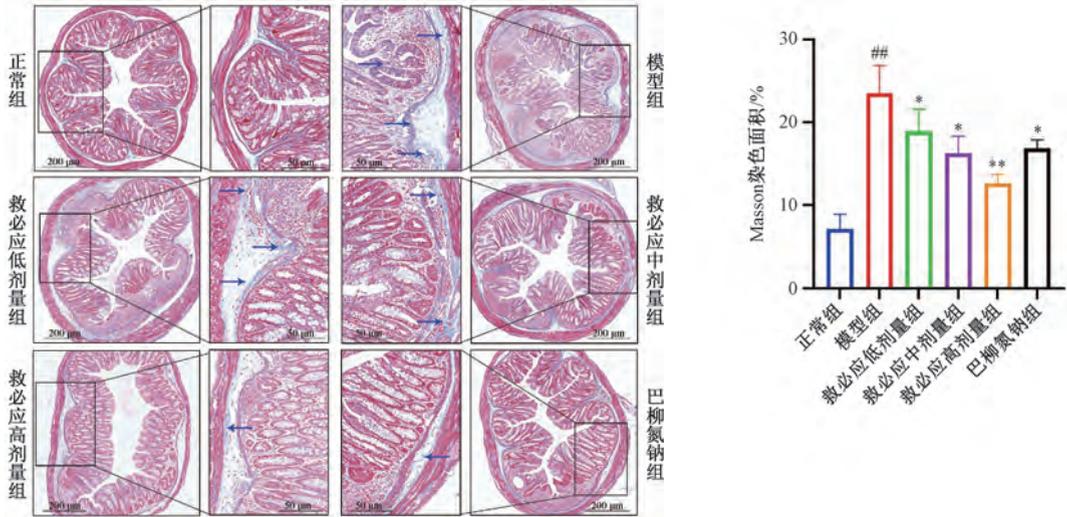
3.2 救必应对结肠炎相关肠纤维化小鼠结肠组织纤维化程度的影响 Masson 染色能使沉积于结肠的胶原纤维呈蓝色。如图2所示，正常组小鼠结肠组织排列整齐，黏膜层和黏

膜下层无纤维化区域；与正常组比较，模型组小鼠结肠组织黏膜及黏膜下层大量蓝染区域，胶原纤维沉积和增生 ($P<0.01$)；与模型组比较，救必应各剂量组及巴柳氮钠组

小鼠结肠组织胶原纤维沉积减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3.3 救必应对结肠炎相关肠纤维化小鼠结肠组织 α -SMA、Collagen I 蛋白表达的影响 免疫荧光结果显示, 与正常组比较, 模型组小鼠结肠组织中的 Collagen I 荧光强度增加 ($P < 0.01$), 而 α -SMA 蛋白荧光强度无明显变化 ($P >$

0.05), 说明结肠炎小鼠结肠组织纤维化主要与 Collagen I 胶原蛋白沉积增多有关; 与模型组比较, 救必应中、高剂量组小鼠结肠组织 Collagen I 蛋白荧光强度降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), α -SMA 蛋白荧光强度无明显变化 ($P > 0.05$), 见图 3~4。



注: 箭头代表结肠纤维化区域。与正常组比较, $## P < 0.01$; 与模型组比较, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$ 。

图 2 各组小鼠结肠纤维化程度比较 (Masson 染色, $\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

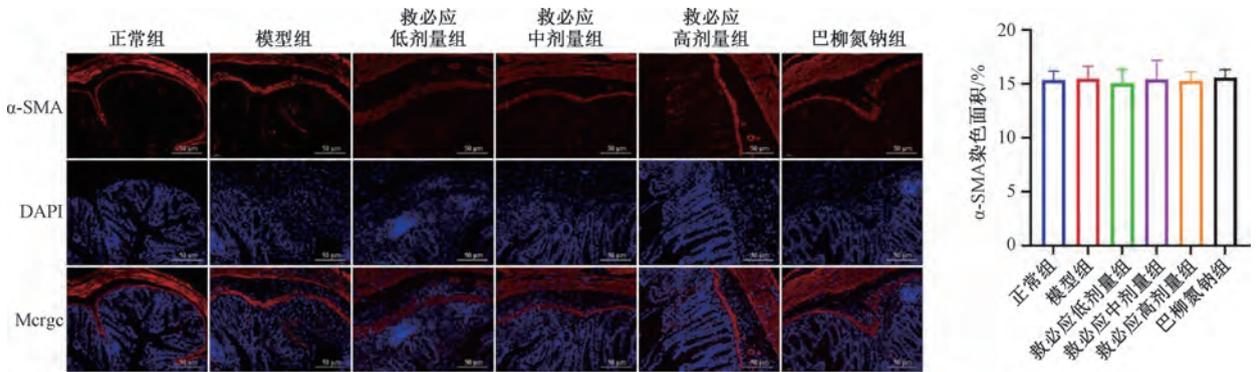
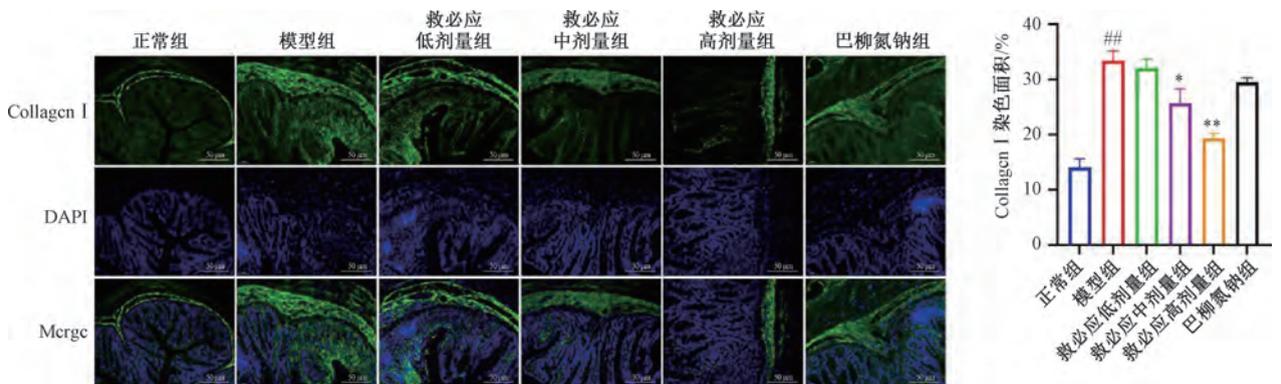


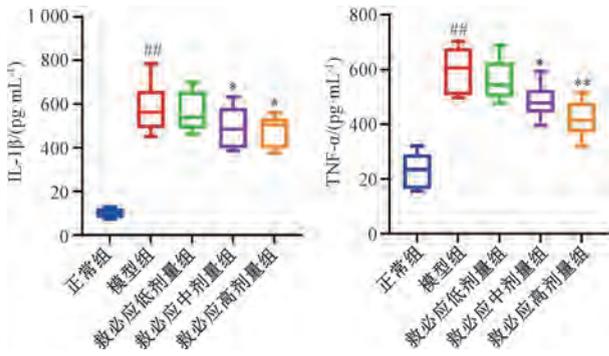
图 3 各组小鼠结肠 α -SMA 蛋白表达比较 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



注: 与正常组比较, $## P < 0.01$; 与模型组比较, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$ 。

图 4 各组小鼠结肠 Collagen I 蛋白表达比较 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.4 救必应对结肠炎相关肠纤维化小鼠结肠组织 IL-1 β 和 TNF- α 水平的影响 如图 5 所示,与正常组比较,模型组小鼠结肠组织 IL-1 β 和 TNF- α 水平升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,救必应中、高剂量组小鼠结肠组织 IL-1 β 和 TNF- α 水平降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

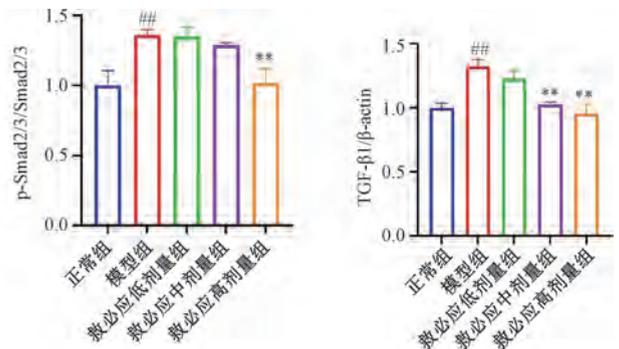
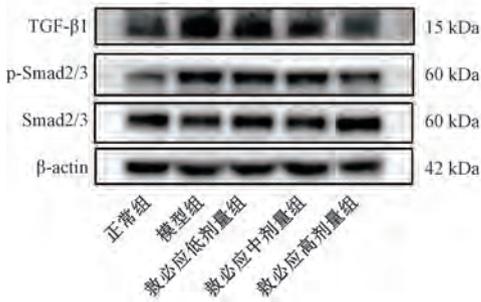


注:与正常组比较,## $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。
图 5 各组小鼠结肠中 IL-1 β 、TNF- α 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.5 救必应对结肠炎相关肠纤维化小鼠结肠组织 TGF- β /Smad 信号通路的影响 如图 6 所示,与正常组比较,模型组小鼠结肠组织中 TGF- β 1、p-Smad2/3 蛋白表达升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,救必应高剂量组小鼠结肠组织 TGF- β 1、p-Smad2/3 蛋白表达降低 ($P < 0.01$),提示救必应可能通过调节 TGF- β /Smad 通路减轻结肠炎小鼠肠纤维化进展。

4 讨论

溃疡性结肠炎可归属于中医的“泄泻”“痢疾”“肠癖”等范畴,中医认为其病理因素主要包括湿邪、瘀热、热毒、痰浊及气滞等,在活动期时以湿热之实邪为主,而缓解期时以脾肾亏虚为主^[10-11]。由于溃疡性结肠炎病程漫长、反复发作,患者肠道黏膜反复愈合时引起肠道细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉积,诱发结肠炎相关肠纤维化^[12]。救必应是岭南特色药材,瑶医及岭南名医将救必应与其他药物配伍治疗胃痛、胃肠炎、溃疡性结肠炎等



注:与正常组比较,## $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.01$ 。

图 6 各组小鼠结肠中 TGF- β 1、p-Smad2/3 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

胃肠道疾病疗效显著,以救必应为君药的复方制剂如复方救必应胶囊、救必应胃痛胶囊及肠胃适胶囊等已被批准上市用于胃肠炎的治疗^[13-14]。本研究选择经典的化学制剂诱导建立结肠炎相关肠纤维化小鼠模型,通过间歇性重复给予 2% DSS,引起小鼠肠道黏膜反复炎症和黏膜愈合,诱发肠道纤维化,通过该模型对救必应治疗结肠炎相关肠纤维化作用进行研究,结果发现救必应能降低结肠炎相关肠纤维化小鼠的死亡率,改善小鼠体质量降低及结肠胶原蛋白沉积。

TGF- β 是研究最为广泛的促纤维化因子,经典的 TGF- β /Smad 通路已被证实肠纤维化中发挥关键作用^[15-16]。TGF- β 能与细胞膜上的 TGF- β 受体结合,从而激活细胞内的 Smad 信号通路,促进 Smad2/3 磷酸化,释放并转运到细胞核中,诱导 α -SMA、Collagen I 等胶原蛋白的表达^[17]。研究发现,通过腺病毒在小鼠结肠过表达 TGF- β ,可致小鼠出现结肠纤维化,但 Smad3 缺失的小鼠对三硝基苯磺酸诱导的结直肠纤维化产生抗性^[18-19]。通过敲除 Smad3 或过表达 Smad7 能阻止 TGF- β /Smad 通路激活,从而减轻包括肠道在内的多个器官的纤维化^[20-21]。因此,在细胞外或细胞内水平阻断 TGF- β 信号通路有望成为预防或治疗肠纤维化

的有效策略。本研究结果显示,模型组小鼠结肠中 Collagen I 蛋白荧光增强,且 TGF- β 1 和 p-Smad2/3 蛋白表达增加,而 α -SMA 无明显变化,说明模型小鼠的 TGF- β /Smad 信号通路被激活,主要引起结肠 Collagen I 蛋白沉积诱发肠纤维化;救必应干预后,能降低 Collagen I、TGF- β 1 及 p-Smad2/3 蛋白表达,说明救必应能抑制 TGF- β /Smad 通路的激活,减少胶原蛋白 Collagen I 沉积。

综上所述,救必应能减轻 DSS 诱导的小鼠结肠炎相关肠纤维化,其作用可能是通过抑制 TGF- β /Smad 信号通路激活,减少 Collagen I 等胶原蛋白表达,从而抑制肠纤维化的形成。

参考文献:

[1] Gundersen M D, Goll R, Fenton C G, et al. Fibrosis mediators in the colonic mucosa of acute and healed ulcerative colitis[J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2019, 10(10): e00082.
[2] D'Haens G, Rieder F, Feagan B G, et al. Challenges in the pathophysiology, diagnosis, and management of intestinal fibrosis in inflammatory bowel disease [J]. *Gastroenterology*, 2022, 162(1): 26-31.

- [3] Scheibe K, Kersten C, Schmied A, *et al.* Inhibiting interleukin 36 receptor signaling reduces fibrosis in mice with chronic intestinal inflammation [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156: 1082-1097.
- [4] 江西药科学学校革命委员会. 草药手册[M]. 江西: 江西新华印刷厂, 1970: 882-884.
- [5] 广西壮族自治区革委会卫生局. 广西本草选编[M]. 南宁: 广西人民出版社, 1974.
- [6] 庄昆海, 刘凤斌. 劳绍贤教授对溃疡性结肠炎的辨证论治思想[J]. 广州中医药大学学报, 2013, 30(6): 914-916.
- [7] 梁欣仪. 岭南中药救必应胃肠黏膜损伤修复作用机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2021.
- [8] Li Y, Yang X, Yuan J N, *et al.* *Ilex rotunda Thunb* protects against dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice by restoring the intestinal mucosal barrier and modulating the oncostatin M/oncostatin M receptor pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 819826.
- [9] Wu Y, Ran L, Yang Y, *et al.* Deferasirox alleviates DSS-induced ulcerative colitis in mice by inhibiting ferroptosis and improving intestinal microbiota [J]. *Life Sci*, 2023, 314: 121312.
- [10] 张声生, 沈洪, 郑凯, 等. 溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识意见(2017) [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(8): 3585-3589.
- [11] 郭富彬, 包海兰, 徐伟. 溃疡性结肠炎患者中医证候特点及与“伏邪”相关性研究[J]. 内蒙古中医药, 2021, 40(5): 133-135.
- [12] Park J M, Kim J, Lee Y J, *et al.* Inflammatory bowel disease-associated intestinal fibrosis[J]. *J Pathol Transl Med*, 2023, 57(1): 60-66.
- [13] 覃迅云, 李彤. 中国瑶医学[M]. 北京: 民族出版社, 2001.
- [14] 黄明萍. 复方救必应胶囊中3种活性成分的含量测定与药代动力学研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2019.
- [15] Hu H H, Chen D Q, Wang Y N, *et al.* New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis [J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 292: 76-83.
- [16] Latella G, Di Gregorio J, Flati V, *et al.* Mechanisms of initiation and progression of intestinal fibrosis in IBD[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2015, 50(1): 53-65.
- [17] Guo H, Jian Z, Liu H, *et al.* TGF- β 1-induced EMT activation *via* both Smad-dependent and MAPK signaling pathways in Cu-induced pulmonary fibrosis[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2021, 18: 115500.
- [18] Wu F, Shao Q, Hu M, *et al.* Wu-Mei-Wan ameliorates chronic colitis-associated intestinal fibrosis through inhibiting fibroblast activation[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 252: 112580.
- [19] Latella G, Vetusch A, Sferra R, *et al.* Smad3 loss confers resistance to the development of trinitrobenzene sulfonic acid-induced colorectal fibrosis[J]. *Eur J Clin Invest*, 2009, 39(2): 145-156.
- [20] Wu W, Wang X, Yu X, *et al.* Smad3 signatures in renal inflammation and fibrosis [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(7): 2795-2806.
- [21] Wu X, Wang H, Chen H, *et al.* Overexpression of smad7 inhibits the TGF- β /Smad signaling pathway and EMT in NPHP1-defective MDCK cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 582: 57-63.

山柰酚对 TNF- α /INF- γ 诱导 C2C12 细胞炎症及成肌分化的作用

解灿灿^{1,2}, 郝婷婷^{1,2}, 吴春梅², 左建平^{1,2*}

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

摘要: **目的** 探讨山柰酚对 TNF- α /INF- γ 诱导 C2C12 细胞炎症及成肌分化的作用。**方法** 采用生长培养基培养 C2C12 成肌细胞, 用山柰酚 (10、20、30、40、50、60 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h, CCK8 法检测细胞活力。10 ng/mL TNF- α 和 10 ng/mL INF- γ 与山柰酚 (30、50 $\mu\text{mol/L}$) 共处理 C2C12 细胞 24 h, RT-qPCR 法检测炎症因子 mRNA 表达。采用分化培养基诱导 C2C12 细胞肌分化, 在分化第 5 天, 加入 TNF- α /INF- γ 与山柰酚共处理细胞 24 h, RT-qPCR 法检测生肌调节因子 (MRFs) mRNA 表达, 免疫荧光观察肌管细胞形态, Western blot 法检测 PI3K/Akt 和 MAPKs 相关功能蛋白表达。**结果** 与刺激组比较, 山柰酚组成肌细胞促炎因子 (*IL-1 β* 、*IL-6*), α 趋化因子 (*CCL2~5*)、 β 趋化因子 (*CCL9~11*) mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 肌管细胞形态萎缩得到改善, *Myogenin*、*Myf6* mRNA 表达和 p-PI3K、p-ERK1/2 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 山柰酚通过降低促炎因子和 α 、 β 趋化因子 mRNA 表达抑制 TNF- α /INF- γ 诱导 C2C12 细胞炎症进程; 山柰酚促进肌源性分化, 其机制可能与上调 PI3K 和 ERK1/2 有关。

关键词: 山柰酚; C2C12 细胞; 炎症; 趋化因子; 成肌分化; PI3K/Akt; MAPK

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)09-3115-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.09.045

特发性炎症性肌病 (idiopathic inflammatory myopathies, IIM) 是一组异质性自身免疫性结缔组织病, 基于其临床和病理特征主要分为皮肌炎、多发性肌炎、免疫介导的坏死性肌病和散发性包涵体肌炎四类, 其共同特征为肌无力和肌活检呈炎性细胞浸润^[1]。疾病发展后期可致肌肉萎缩, 引起不同程度的功能障碍^[2]。研究表明, 炎症是骨骼肌萎缩的主要原因, 炎症因子 TNF- α 是最重要的肌肉消耗细胞因子之一, TNF- α 在 INF- γ 辅助下能够抑制肌纤维再生并损害现有肌纤维^[3-4]。磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路作为受体信号向细胞内传导的重要途径之一, 具有调节细胞增殖、分化及蛋白合成等的功能, 已被证明参与骨骼肌损伤、修复和再生^[5]。PI3K/Akt 信号通路有助于肌源性分化, 阻碍其表达或激活会显著抑制肌细胞转分化, 诱导细胞凋亡^[6]。MAPK 途径是肌原分化所必需的^[7]。山柰酚是一种常见的天然黄酮类化合物, 广泛存在于沙姜、大戟、银杏等传统中草药中, 具有抗炎、抗病毒、抗癌等多种生物活性^[8-9], 但尚未有报道山柰酚治疗肌萎缩的相关研究。因此, 本实验通过构建 TNF- α 和 INF- γ 诱导 C2C12 细胞萎缩模型, 观察山柰酚对细胞活力、炎症因子表达、肌管细胞形态、PI3K/Akt 和 MAPK 信号通路相关蛋白及下游生肌调节

因子 (myogenic regulation factors, MRFs) 表达的影响, 以期为骨骼肌相关疾病的研究提供实验基础。

1 材料

1.1 细胞 小鼠成肌细胞 C2C12, 由中科院上海药物研究所冷颖研究员课题组提供。复苏细胞, 移入含有生长培养基 (DMEM 高糖培养基+10% 胎牛血清+双抗) 的培养瓶中, 轻轻摇匀, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中培养, 隔天换液。

1.2 药物与试剂 山柰酚 (货号 512-18-3, 纯度 $\geq 98\%$) 购自上海陶素生化科技有限公司。重组小鼠 TNF- α 、INF- γ 蛋白 (货号 554589、554587) 购自美国 BD 公司; 标准胎牛血清 (货号 AHW87326) 购自美国 HyClone 公司; DMEM 高糖培养基、热灭活马血清、0.25% Trypsin-EDTA (货号 23101130、26050070、2186970) 购自美国 Gibco 公司; CCK8 试剂盒 (货号 CK04) 购自日本同仁化学研究所; 无菌 DMSO、胎牛血清白蛋白 (货号 D2650、9048-46-8) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 总 RNA 提取试剂盒 (货号 DP419) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒、HRP 标记羊抗兔 GAPDH 抗体 (货号 23225、34577) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; PI3 kinase p85 (19H8) mAb、phospho-PI3 kinase p85 (Tyr458) /p55 (Tyr199) mAb、Akt mAb、p-Akt (T308)

收稿日期: 2023-05-23

基金项目: 上海市科学技术委员会基金项目 (21S11907700, 22ZR1473700)

作者简介: 解灿灿 (1997—), 女, 硕士生, 从事抗炎免疫药理学研究。E-mail: xcc51217@163.com

* 通信作者: 左建平 (1960—), 男, 博士, 研究员, 从事抗炎免疫药理研究。E-mail: jjpuzo@simm.ac.cn

网络出版日期: 2023-07-20

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20230720.1408.002.html>

(244F9) mAb、p38 MAPK mAb、p-p38 MAPK (T180/Y182) mAb、p44/42 MAPK (ERK1/2) (137F5) mAb、p-p44/42 MAPK (T202/Y204) (197G2) mAb (货号 4257S、4228S、9272S、4056L、9212、9251L、4695S、4377S) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司；HRP 标记羊抗兔二抗 (货号 1705046) 购自美国 Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 C2C12 细胞诱导肌分化培养 待 C2C12 成肌细胞生长融合至 70%~80% 时，弃生长培养基，加入无血清培养基饥饿过夜，继而更换分化培养基 (DMEM 高糖培养基+2% 马血清+双抗) 诱导肌分化 6 d 以形成肌管，间隔 1 d 更换新的分化培养基继续培养。

2.2 细胞分组及给药 将 C2C12 成肌细胞随机分为对照组、TNF- α /IFN- γ 刺激组、山柰酚组 (30、50 $\mu\text{mol/L}$)，每组设置 3 个复孔。对照组加入生长培养基培养 24 h；刺激组加入含 10 ng/mL TNF- α 和 10 ng/mL IFN- γ 的生长培养基培养 24 h；山柰酚组加入含 10 ng/mL TNF- α 、10 ng/mL IFN- γ 和山柰酚 (30、50 $\mu\text{mol/L}$) 的生长培养基培养 24 h。在诱导肌分化第 5 天，各组加入含药或不含药的分化培养基培养 24 h，并于荧光倒置显微镜下实时观察各组肌管细胞形态并拍照。

2.3 CCK8 法检测细胞活力 取对数生长期 C2C12 成肌细胞，以每孔 5×10^3 个的密度接种于 96 孔板，培养过夜至贴壁，加不同浓度山柰酚 (0、10、20、30、40、50、60 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 24 h，每孔加入 20 μL CCK8 试剂继续培养 1 h，采用酶标仪于 450 nm 波长处检测各孔光密度 (OD) 值，计算细胞活力，每组设置 3 个复孔。

2.4 RT-qPCR 法检测成肌细胞炎性因子和分化肌管细胞 MRFs 家族因子 mRNA 表达 细胞按“2.2”项下方法处理，收集成肌细胞和分化肌管细胞，加入 RZ 裂解液，使用总 RNA 提取试剂盒提取 RNA 并逆转录得 cDNA，检测成肌细胞炎性因子 mRNA 表达和分化肌管细胞 MRFs 家族因子 mRNA 表达。以 GAPDH 为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行分析。引物序列来源于 PrimerBank，见表 1，由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

2.5 Western blot 法检测分化肌管细胞 PI3K/Akt 和 MAPKs 信号通路蛋白表达 细胞按“2.2”项下方法处理，收集各组细胞，每孔加 100 μL 含蛋白酶抑制剂的 SDS 裂解液，反复吹打至细胞裂解完全，BCA 法进行蛋白定量，100 $^{\circ}\text{C}$ 恒温金属浴加热 10 min 使蛋白变性。10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离目的蛋白，湿转法转至 NC 膜上，5% BSA 室温封闭 1 h，一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，TBST 洗涤，二抗室温孵育 1 h，TBST 洗涤，ECL 法显影曝光，采用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析条带灰度值，以 GAPDH 为内参，计算目的蛋白相对表达。

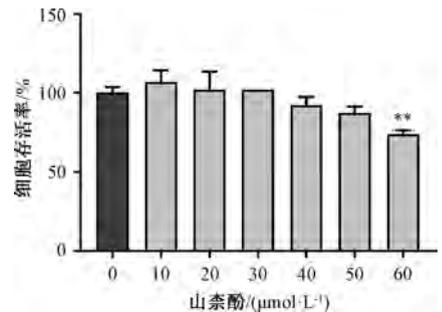
2.6 统计学分析 通过 GraphPad 7.0 软件进行处理，数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用双侧 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

表 1 引物序列

基因	序列(5'→3')
<i>IL-1β</i>	正向 GCAACTGTTCTCTGAACTCAACT 反向 ATCTTTTGGGGTCCGTCACACT
<i>IL-6</i>	正向 CTGCAAGAGACTTCCATCCAG 反向 AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG
<i>CCL2</i>	正向 TTA AAAACCTGGATCGGAACCAA 反向 GCATTAGCTTCAGATTACGGGT
<i>CCL3</i>	正向 TTCTCTGTACCATGACACTCTGC 反向 CGTGGAACTCTCCGGCTGTAG
<i>CCL4</i>	正向 TTCCTGTGTTTCTCTTACACCT 反向 CTGTCTGCCTCTTTTGGTCAG
<i>CCL5</i>	正向 CTGTCTTGGCCTACCTCTCC 反向 TCGAGTGACAAAACGACTGC
<i>CXCL9</i>	正向 TCCTTTTGGGATCATCTTCC 反向 TTTGTAGTGGATCGTGCCCTCG
<i>CXCL10</i>	正向 CCAAGTGCTGCCGTCATTTTC 反向 GGCTCGCAGGGATGATTCAA
<i>CXCL11</i>	正向 GGCTTCTTATGTTCAAACAGGG 反向 GCCGTTACTCGGGTAAATTACA
<i>MyoD</i>	正向 CCACTCCGGGACATAGACTTG 反向 AAAAGCGCAGGTCTGCTGAG
<i>Myf5</i>	正向 AAGGCTCCTGTATCCCCTCAC 反向 TGACCTTCTTCAGGCGTCTAC
<i>Myogenin</i>	正向 GAGACATCCCCTATTCTACCA 反向 GCTCAGTCCGCTCATAGCC
<i>Myf6</i>	正向 AGAGGGCTCTCCTTTGTATCC 反向 CTGCTTCCGACGATCTGTGG
<i>GAPDH</i>	正向 TGCTCGCTGTATTCTTGCTG 反向 GGCTCCTCTGTCCAGTGAC

3 结果

3.1 山柰酚对 C2C12 成肌细胞活力的影响 如图 1 所示，与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 比较，60 $\mu\text{mol/L}$ 山柰酚对 C2C12 成肌细胞存活率有抑制作用 ($P < 0.01$)，故选取 30、50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度用于后续实验。

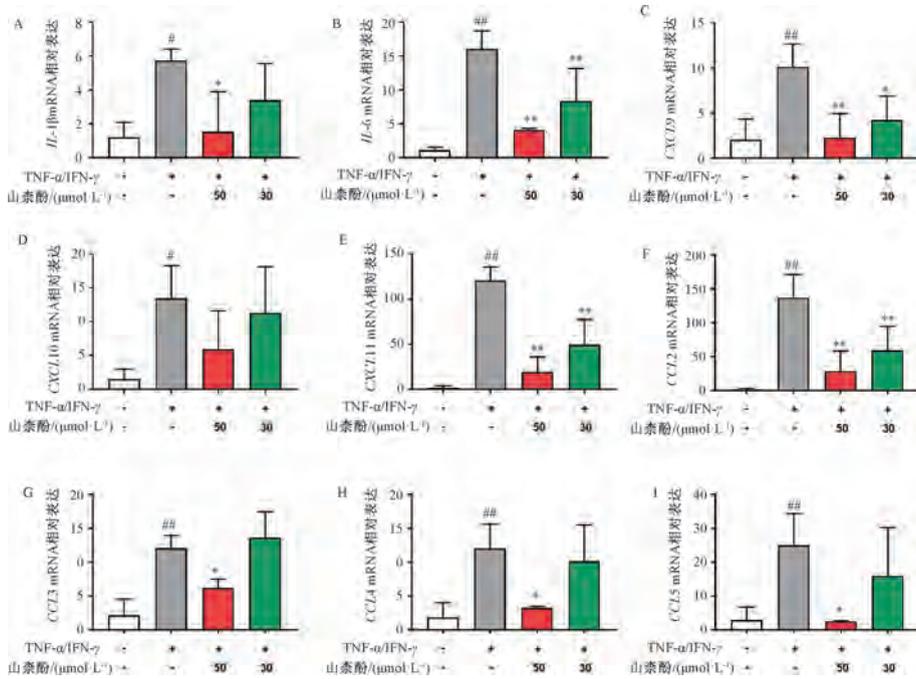


注：与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 比较，** $P < 0.01$ 。

图 1 不同浓度山柰酚对 C2C12 成肌细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.2 山柰酚对 TNF- α /IFN- γ 诱导 C2C12 成肌细胞炎性因子 mRNA 表达的影响 与对照组比较，刺激组成肌细胞促炎因子 (*IL-1 β* 、*IL-6*)、 α 趋化因子 (*CXCL9*~*11*) 和 β 趋化因子 (*CCL2*~*5*) mRNA 表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)；与刺激组比较，山柰酚组 *IL-1 β* 、*IL-6*、*CXCL9*、*CXCL11*、

CCL2~*5* mRNA 表达均降低, 其中 50 $\mu\text{mol/L}$ 组作用更显著 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见图 2。

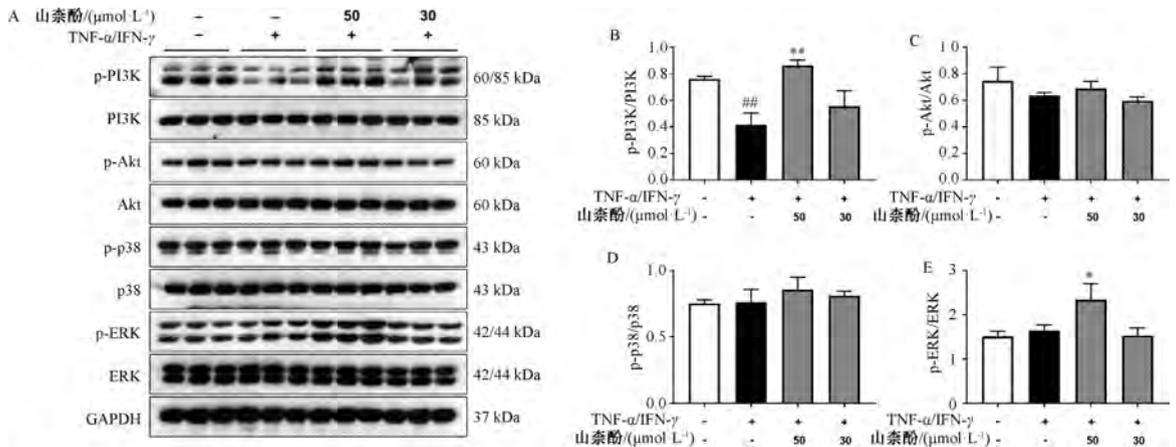


注: A~B 为促炎因子 mRNA 表达, C~E 为 α 趋化因子 mRNA 表达, F~I 为 β 趋化因子 mRNA 表达。与对照组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与刺激组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 2 山柰酚对成肌细胞炎症因子 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.3 山柰酚对分化肌管细胞 PI3K/Akt 和 MAPKs 信号通路蛋白表达的影响 与对照组比较, 刺激组肌管细胞 p-PI3K 蛋白表达降低 ($P < 0.01$); 与刺激组比较, 50 $\mu\text{mol/L}$ 山柰

酚组 p-PI3K、p-ERK 蛋白表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), p-Akt 和 p-p38 蛋白表达无明显变化 ($P > 0.05$), 见图 3。



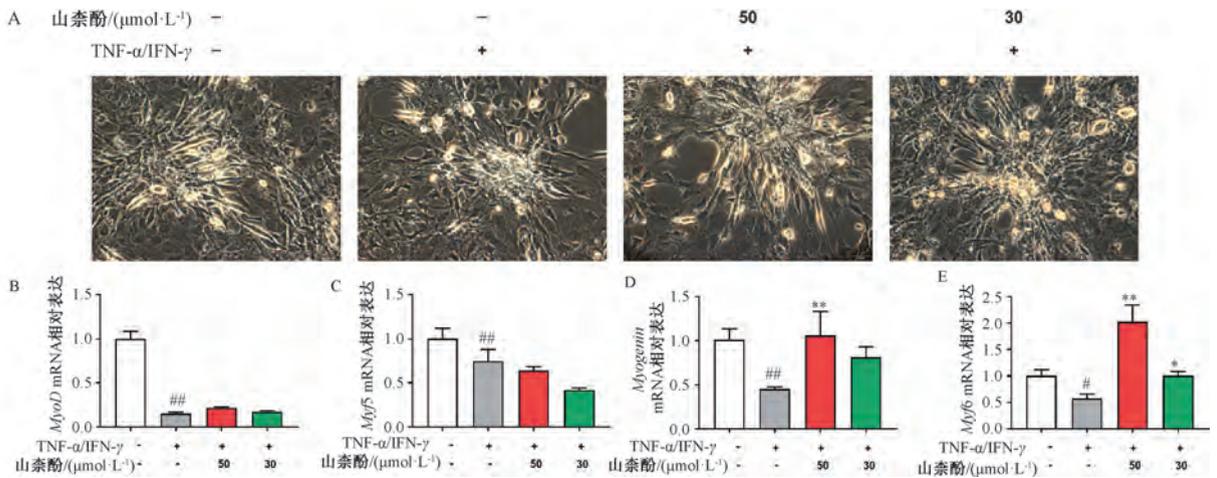
注: A 为蛋白条带图, B~E 为蛋白表达统计图。与对照组比较, ## $P < 0.01$; 与刺激组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3 山柰酚对分化肌管细胞 PI3K/Akt 和 MAPKs 信号通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.4 山柰酚对分化肌管细胞形态和 MRFs 基因表达的影响 与对照组比较, 刺激组肌管细胞核融合减少, 形态萎缩, 直径和长度缩小, *MyoD*、*Mrf5*、*Myogenin*、*Myf6* mRNA 表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与刺激组比较, 山柰酚 50 $\mu\text{mol/L}$ 组肌管细胞形态改善, *Myogenin*、*Myf6* mRNA 表达升高 ($P < 0.01$), *MyoD*、*Mrf5* mRNA 表达无明显变化 ($P > 0.05$), 见图 4。

4 讨论

骨骼肌作为人体最大的组织, 约占体质量的 40%, 在维持机体生长发育、运动、甚至糖代谢和脂肪代谢活动中具有不可或缺的作用, 骨骼肌损伤或弱化严重影响机体的正常运动和生产生活。IIM 是一组累及肌肉和四肢的慢性炎症性肌病, 疾病进展后期会导致严重的肌肉无力和萎缩。炎症所导致的骨骼肌弱化是许多骨骼肌疾病的典型后果,



注: A 为各组分化肌管细胞形态 ($\times 200$), B~E 为肌管细胞 *MyoD*、*Mrf5*、*Myogenin*、*Myf6* mRNA 表达。与对照组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与刺激组比较, ** $P < 0.01$ 。

图4 山柰酚对分化肌管细胞形态和 MRFs 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

减轻炎症反应、改善肌肉萎缩可能是治疗 IIM 以及其他骨骼肌相关疾病的有效手段之一。

C2C12 成肌细胞常被广泛用于阐明骨骼肌细胞生长、发育和分化的生物学功能特征, 是一个良好的细胞模型。TNF- α 能通过激活 NF- κ B 信号通路抑制 C2C12 细胞的分化, 而 IGF-1 能够抵消 TNF- α 引起的分化受阻。TNF- α 与 IFN- γ 的组合导致 MyoD 的下调和肌管功能障碍^[4], 因此本实验采用 TNF+IFN 处理的细胞系来阐明与山柰酚对 C2C12 成肌细胞炎症损伤的保护作用及成肌分化的作用。

细胞因子和趋化因子是 IIM 发生和发展的重要参与者。趋化因子根据保守的半胱氨酸残基周围氨基酸的定位被细分为家族, 并且大多数属于 α 和 β 家族, 大多数趋化因子可以与一种以上的受体结合^[10]。已有研究表明, IFN- γ 诱导的 α 趋化因子 (CXCLs) 在 IIM 中具有重要作用, CXCL9 和 CXCL10 mRNA 表达在 sIBM 患者肌肉中上调^[11]。 β 趋化因子 (CCLs) 能够激活和趋化 T 细胞和单核细胞, 在 IIM 慢性炎症性疾病中具有重要的促炎和调节作用^[12]。体外研究表明, 骨骼肌细胞暴露于 TNF- α 导致许多炎症蛋白的合成增加, 包括 CCL2、CCL5、CXCL5、VCAM-1 和 IL-6^[13-14]; IFN- γ 诱导的成肌细胞和肌管细胞中的促炎细胞因子 IL-1、IL-6、IL-18 和趋化因子 CCL2 mRNA 表达^[15]。以上研究提示, 抑制促炎因子和趋化因子表达是治疗肌炎的有效手段之一。本研究发现, 山柰酚干预能够抑制 TNF- α /IFN- γ 诱导的成肌细胞促炎因子、 α 和 β 趋化因子基因表达上调, 提示山柰酚可能通过抑制肌细胞分泌促炎因子和趋化因子发挥抗炎的作用。

骨骼肌的分化和成熟需要信号通路之间的相互作用^[16]。胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 在控制发育过程中骨骼肌生长中起着至关重要的作用^[17], 而 PI3K/Akt, MAPK 是 IGF-1 代谢途径的主要效应物^[18]。IGF-1 与其受体结合诱导 PI3K/Akt 途径磷酸化, 诱导肌母细胞分化和存活。此外, Akt 激活哺乳动物雷帕霉素靶标 (mTOR), 并通过激

活核糖体蛋白 S6 激酶 (S6K) 来增加蛋白质合成使肌纤维肥大^[19]。丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 家族成员主要包括 ERK1/2、JNK/SAPK、p38 MAPK、ERK5/BMK1 以及非典型 MAPK^[20]。p38 MAPK 和 ERK1/2 MAPK 在肌肉细胞增殖和分化机制中起着关键作用, 具有促进人卫星细胞成肌分化, 抑制移植卫星细胞增殖的能力^[7,21]。最新文献报道, 山柰酚通过 JAK2/AMPK 和 PI3K 信号通路促进肌管中的葡萄糖摄取^[22]。生肌调节因子家族 (MRFs), 包括成肌分化抗原 (MyoD)、生肌素 (Myogenin)、Myf5 和 Mrf6 四种肌肉特异性转录因子, 控制着肌细胞增殖和分化, 与肌纤维的数量、大小有着密切的关系^[23]。MyoD 在肌肉特异基因转录调控中起着总开关作用, Myf5 协同 MyoD 在肌肉形成过程中发挥作用。Myogenin 位于 MyoD 下游, 具有抗增殖活性, 促使成肌细胞退出细胞周期进入分化阶段。Myf6 位于其他生肌因子的下游, Myogenin 与 Myf6 具有同源性, 二者协同控制肌肉分化。研究表明, MyoD 和 Myogenin 通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与受损骨骼肌的修复^[24]。本研究发现, 山柰酚通过上调 PI3K 和 ERK 蛋白磷酸化, 促进 *Myogenin*、*Myf6* 基因表达, 从而影响 C2C12 细胞中的肌源分化。

综上所述, 山柰酚能够降低 TNF- α /IFN- γ 诱导的成肌细胞中促炎因子和趋化因子表达, 发挥其抗炎作用; 山柰酚可能是通过调节 PI3K 和 ERK 蛋白磷酸化影响 C2C12 细胞中的肌源分化, 改善成肌分化形态。本研究表明山柰酚可作为保护肌肉免于炎症损伤和促进肌肉分化的功能性候选化合物, 可为临床上炎症性肌病的治疗提供参考依据。

参考文献:

- [1] Lazarou I N, Guerne P A. Classification, diagnosis, and management of idiopathic inflammatory myopathies [J]. *J Rheumatol*, 2013, 40(5): 550-564.
- [2] Jørgensen A N, Aagaard P, Nielsen J L, et al. Physical function and muscle strength in sporadic inclusion body

- myositis[J]. *Muscle Nerve*, 2017, 56(6): E50-E58.
- [3] Jackman R W, Kandarian S C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287(4): C834-C843.
- [4] Sheriff S, Kadeer N, Joshi R, et al. Des-acyl ghrelin exhibits pro-anabolic and anti-catabolic effects on C2C12 myotubes exposed to cytokines and reduces burn-induced muscle proteolysis in rats[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 351(2): 286-295.
- [5] 吕欣, 周达岸. PI3K/AKT 信号通路对骨骼肌再生的影响研究进展[J]. *中国运动医学杂志*, 2020, 39(11): 908-912.
- [6] Zanou N, Gailly P. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(21): 4117-4130.
- [7] Segalés J, Perdiguero E, Muñoz-Cánoves P. Epigenetic control of adult skeletal muscle stem cell functions[J]. *FEBS J*, 2015, 282(9): 1571-1588.
- [8] Devi K P, Malar D S, Nabavi S F, et al. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine[J]. *Pharmacol Res*, 2015, 99: 1-10.
- [9] 张雅雯, 邵东燕, 师俊玲, 等. 山奈酚生物功能研究进展[J]. *生命科学*, 2017, 29(4): 400-405.
- [10] Palomino D C, Marti L C. Chemokines and immunity [J]. *Einstein (Sao Paulo)*, 2015, 13(3): 469-473.
- [11] De Paepe B, Creus K K, De Bleecker J L. Chemokines in idiopathic inflammatory myopathies[J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 2548-2577.
- [12] Civatte M, Bartoli C, Schleinitz N, et al. Expression of the beta chemokines CCL3, CCL4, CCL5 and their receptors in idiopathic inflammatory myopathies [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2005, 31(1): 70-79.
- [13] Lightfoot A P, Sakellariou G K, Nye G A, et al. SS-31 attenuates TNF- α induced cytokine release from C2C12 myotubes[J]. *Redox Biol*, 2015, 6: 253-259.
- [14] Bhatnagar S, Panguluri S K, Gupta S K, et al. Tumor necrosis factor-alpha regulates distinct molecular pathways and gene networks in cultured skeletal muscle cells[J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13262.
- [15] Ding M, Huang T, Zhu R, et al. Immunological behavior analysis of muscle cells under IFN- γ stimulation *in vitro* and *in vivo*[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2018, 301(9): 1551-1563.
- [16] Tureckova J, Wilson E M, Cappalonga J L, et al. Insulin-like growth factor-mediated muscle differentiation: collaboration between phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-signaling pathways and myogenin [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(42): 39264-39270.
- [17] Jacquemin V, Butler-Browne G S, Furling D, et al. IL-13 mediates the recruitment of reserve cells for fusion during IGF-1-induced hypertrophy of human myotubes[J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 4): 670-681.
- [18] Schultze S M, Hemmings B A, Niessen M, et al. PI3K/Akt, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis[J]. *Expert Rev Mol Med*, 2012, 14: e1.
- [19] Kim J, Park M Y, Kim H K, et al. Cortisone and dexamethasone inhibit myogenesis by modulating the Akt/mTOR signaling pathway in C2C12 [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2016, 80(11): 2093-2099.
- [20] Cargnello M, Roux P P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2011, 75(1): 50-83.
- [21] Zeng W, Yan Y, Zhang F, et al. Chrysin promotes osteogenic differentiation via ERK/MAPK activation [J]. *Protein Cell*, 2013, 4(7): 539-547.
- [22] Kitakaze T, Jiang H, Nomura T, et al. Kaempferol promotes glucose uptake in myotubes through a JAK2-dependent pathway[J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(47): 13720-13729.
- [23] Zammit P S. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 72: 19-32.
- [24] Elkina Y, von Haehling S, Anker S D, et al. The role of myostatin in muscle wasting: an overview [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2011, 2(3): 143-151.