

# 柚皮素对溃疡性结肠炎小鼠肠组织中 miR-30a-3p/PTEN 信号轴表达的影响\*

陈琼<sup>1</sup> 梅红<sup>1</sup> 王宝香<sup>1</sup> 赵玉霞<sup>2</sup> 高源<sup>1</sup>

(华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院 1. 消化内科; 2. 内镜中心, 湖北 武汉 430016)

**【摘要】** **目的** 探讨柚皮素对溃疡性结肠炎小鼠肠组织中 miR-30a-3p/PTEN 信号轴表达的影响。**方法** 选取 60 只健康雄性 BALB/c 小鼠, 按随机数字表法均分为阴性对照组、模型组、阳性对照组、柚皮素低剂量组、柚皮素中剂量组和柚皮素高剂量组, 每组各 10 只。用 DSS 灌胃法制备 BALB/c 小鼠溃疡性结肠炎模型, 阴性对照组和模型组灌胃给予生理盐水(0.2 mL/10g), 阳性对照组灌胃给予泼尼松龙(2 mg/kg), 柚皮素低、中、高剂量组分别灌胃给予柚皮素(剂量依次为 50、100、200 mg/kg), 持续给予 7 d。计算疾病活动度评分(DAI), 对 BALB/c 小鼠肠组织进行形态学检查, 同时采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测肠组织中白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-10(IL-10)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平, 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)法及 Elisa 法分别检测肠组织 miR-30a-3p、PTEN、PI3K、Akt 和 Caspase-3 mRNA 及蛋白水平。**结果** 模型组小鼠结肠有部分肠壁凹陷, 形成溃疡, 周围组织水肿明显, 部分细胞坏死、脱落, 炎性细胞浸润; 与模型组比较, 阳性对照组和各柚皮素剂量组小鼠结肠组织病理损伤明显改善。与阴性对照组比较, 其余各组小鼠肠组织 DAI、IL-4、TNF- $\alpha$ 、PTEN 和 Caspase-3 mRNA 及蛋白升高, IL-10、miR-30a-3p、PI3K 和 Akt mRNA 及蛋白降低(均  $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 阳性对照组和各柚皮素剂量组小鼠肠组织 DAI、IL-4、TNF- $\alpha$ 、PTEN 和 Caspase-3 mRNA 及蛋白降低, IL-10、miR-30a-3p、PI3K 和 Akt mRNA 及蛋白升高, 各柚皮素剂量组效应呈剂量反应关系(均  $P < 0.05$ ); 柚皮素高剂量组与阳性对照组各指标比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 柚皮素可以降低溃疡性结肠炎小鼠的结肠炎性, 减轻病理损伤, 其机制可能与调控 miR-30a-3p/PTEN 信号轴有关。

**【关键词】** 柚皮素; 溃疡性结肠炎; miR-30a-3p/PTEN 信号轴; 小鼠

**【中图分类号】** R574.62 **【文献标志码】** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1672-3511.2022.07.005

## The effect of naringenin on the expression of miR-30a-3p/PTEN signal axis in the intestinal tissue of mice with ulcerative colitis

CHEN Qiong<sup>1</sup>, MEI Hong<sup>1</sup>, WANG Baoxiang<sup>1</sup>, ZHAO Yuxia<sup>2</sup>, GAO Yuan<sup>1</sup>

(1. Department of Gastroenterology, Wuhan Children's Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430016, China;

2. Endoscopy Center, Wuhan Children's Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430016, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect of naringenin on the expression of miR-30a-3p/PTEN signal axis in the intestinal tissue of mice with ulcerative colitis. **Methods** Ulcerative colitis model of BALB/c mice was prepared by DSS gavage method. The negative control group and model group were gavaged with normal saline(0.2 mL/10g), and the positive control group was gavaged with prednisolone(2 mg/kg). The low, middle and high-dose naringenin groups were given naringenin by intragastric administration(the doses were 50, 100, and 200mg/kg) for 7 days. The disease activity score(DAI) was calculated, morphological examination of intestinal tissue in BALB/c mice performed evaluated, and Elisa was used to detect the levels of IL-4, IL-10, and TNF- $\alpha$  in intestinal tissue, RT-PCR and Elisa method measure the levels of miR-30a-3p, PTEN, PI3K, Akt and Caspase-3 mRNA and protein in intestinal tissue respectively. **Results** The mouse colon in the model group had partial intestinal wall depression, formation of ulcers, obvious edema in the

基金项目:湖北省自然科学基金(2015CFC847)

通信作者:高源, E-mail:gaoyuan680925@163.com

引用本文:陈琼,梅红,王宝香,等.柚皮素对溃疡性结肠炎小鼠肠组织中 miR-30a-3p/PTEN 信号轴表达的影响[J].西部医学,2022,34(7):960-

965. DOI:10.3969/j.issn.1672-3511.2022.07.005

surrounding tissues, necrosis and shedding of some cells, and inflammatory cell infiltration. The damage of colon tissue pathology of the mice in the positive control group and each naringenin dosage group was significantly improved compared with the model group. Compared with the negative control group, DAI, IL-4, TNF- $\alpha$ , PTEN and Caspase-3 mRNA and protein in the intestinal tissues of the other groups of mice increased, and IL-10, miR-30a-3p, PI3K and Akt mRNA and protein decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the DAI, IL-4, TNF- $\alpha$ , PTEN and Caspase-3 mRNA and protein of mice in the positive control group and each naringenin dose group decreased, IL-10, miR-30a-3p, PI3K and Akt mRNA and protein increased, and the effects of each naringenin dose group showed a dose-response relationship ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in indicators between the high-dose naringenin group and the positive control group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Naringenin can reduce colitis and pathological damage in mice with ulcerative colitis. The mechanism may be related to the regulation of miR-30a-3p/PTEN signal axis.

**[Key words]** Naringenin; Ulcerative colitis; miR-30a-3p/PTEN signal axis; Mouse

溃疡性结肠炎是一种反复发作、病因不明的慢性结肠炎,被认为是结肠癌的癌前症状,世界卫生组织(WHO)列为现代难治性疾病之一<sup>[1]</sup>。目前,现代医学治疗常用水杨酸盐、皮质类固醇和免疫抑制剂等药物对溃疡性结肠炎进行治疗,优势在于能够迅速控制炎症,诱导缓解,但长期服用存在副作用大的问题<sup>[2]</sup>。中草药已被证明可有效治疗慢性炎症性疾病,且副作用较小。柚皮素是一种生物类黄酮,具有抗炎和抗氧化剂等多种功能<sup>[3]</sup>。研究发现,柚皮素通过减少肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的积累和抑制细胞凋亡,对肠缺血/再灌注损伤具有保护作用,但其对溃疡性结肠炎的研究较少<sup>[4]</sup>。溃疡性结肠炎的病变部位主要见于结肠黏膜下层到整个黏膜的区域,表现为炎症诱导的肠细胞凋亡过度<sup>[5]</sup>。10号染色体缺失张力蛋白同源的磷酸酶基因(PTEN),通过调控磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路,有助于调节炎症反应和肠炎的肠上皮细胞凋亡<sup>[6]</sup>。微小RNA(miRNA)在细胞代谢调节中起着重要作用<sup>[7]</sup>。在脂多糖诱导的脓毒症中,miR-30a-3p过表达可以抑制脂多糖诱导的细胞凋亡<sup>[8]</sup>。利用TargetScan软件发现,miR-30a-3p通过调控PTEN的表达参与细胞的病理生理过程,提示PTEN可能是miR-30a-3p的潜在靶点。因此,本研究通过制备溃疡性结肠炎模型,观察柚皮素对该模型的治疗作用,并探讨miR-30a-3p/PTEN信号轴在整个过程中的作用。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 选取60只健康BALB/c小鼠,雄性,购自武汉大学实验动物中心,体质量( $20 \pm 2$ )g,动物许可证号:HNXK(鄂)2020-0005,适应性喂养在温度( $23 \pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度60%~70%,光照12h明暗交替的环境中1周。本实验小鼠的处理符合动物伦理要求,并经医院伦理委员会审核同意。

1.2 主要试剂与仪器 泼尼松龙、柚皮素和右旋葡聚糖硫酸钠(Dextran Sodium Sulfate, DSS)(美国Sigma公司);苏木素染色液(上海碧云天生物技术研

究所);白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-10(IL-10)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、PTEN、PI3K、Akt和半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(Caspase-3)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(深圳晶美生物工程有限公司);Trizol试剂(美国Invitrogen公司);mRNA反转录试剂盒和荧光定量PCR试剂盒(上海生工生物技术有限公司);引物由上海生工生物技术有限公司合成;组织脱水机、包埋机、全自动轮转切片机等病理配套设备(上海珂淮仪器有限公司);XSP-9CA显微镜(上海光学仪器一厂);MultiSkan FC型酶标仪[美谷生物科技(浙江)有限公司];NanoDrop2000c型蛋白核酸检测仪(美国Thermo公司);CFX96型实时荧光定量PCR仪(美国BD公司)。

1.3 分组及造模 小鼠按随机数字表法均分为阴性对照组、模型组、阳性对照组、柚皮素低剂量组、柚皮素中剂量组和柚皮素高剂量组。阴性对照组灌胃给予生理盐水(灌胃体积0.2 mL/10g),其余各组灌胃给予含5% DSS的生理盐水溶液(灌胃体积0.2 mL/10g),连续给予两周后阴性对照组和模型组灌胃给予生理盐水(0.2 mL/10g),阳性对照组灌胃给予泼尼松龙(2 mg/kg),柚皮素低、中、高剂量组分别灌胃给予柚皮素(剂量依次为50、100、200 mg/kg),持续给予7d<sup>[9-10]</sup>。观察整个实验期间小鼠的进食、饮水和精神状态等一般情况,对小鼠进行称重、观察粪便性状和便血情况,计算疾病活动度评分(Disease activity index, DAI), $\text{DAI} = (\text{体重下降分数} + \text{大便性状分数} + \text{便血情况分数}) / 3$ 。脊髓脱臼处死小鼠,取整段结肠(回盲部至肛门)肉眼观察黏膜及浆膜面的变化。将肠组织分成两份,一份用福尔马林固定,其余组织液氮保存。

1.4 肠组织形态学检查 肠组织经脱水、包埋、切片(1  $\mu\text{m}$ ),进行苏木精-伊红(HE)染色,用显微镜观察肠组织学变化。

1.5 ELISA法检测肠组织中IL-4、IL-10、TNF- $\alpha$ 、PTEN、PI3K、Akt和Caspase-3蛋白水平 取部分冻

存的肠组织,制成匀浆,将相应一抗稀释至 10 μg/mL,加入到 96 孔板中(0.1 mL/孔),4℃过夜,洗涤 3 次,加肠组织匀浆(0.1 mL)于上述反应孔中,37℃孵育 1 h;加入新配置相对应的二抗 0.1 mL,孵育 1 h;加入新配置的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethyl benzidine,TMB)底物溶液 0.1 mL,显色 20 min;加入 2 mol/L 硫酸 0.05 mL 终止反应,于 450 nm 处测各孔吸光度(A)值。

1.6 实时荧光 PCR(RT-PCR)检测肠组织中 miR-30a-3p、PTEN、PI3K、Akt 和 Caspase-3 mRNA 水平

取部分冻存的肠组织,制成匀浆,加入 1 mL Trizol 法提取总 RNA,用 NanoDrop 2000c 型蛋白核酸检测仪进行 RNA 的浓度和纯度的测定,根据 RNA 反转录试剂盒说明合成 cDNA,再根据荧光定量 PCR 试剂盒说明,制备 20 μL 反应体系进行扩增,在 CFX-96 PCR 扩增仪中进行扩增。反应条件为预变性(95℃,4 min)、变性(94℃,30 s)、退火(58℃,30 s)、延长(72℃,1 min),共 40 个循环,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 mRNA 的相对表达量(以 GAPDH 作为内对照)。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 The primer sequence

基因	上游引物	下游引物
miR-30a-3p	5'-CGACGUUUGUAG GCUGACUUUC-3'	5'-GCTAGCACAGCAT TAGTACGAAC-3'
PTEN	5'-CTGAGGCTTATG CGTGCTG-3'	5'-AGGCTCAGTACAC CAAATCCTA-3'
PI3K	5'-CGTTTTGAGTTT GAAGGCGTTT-3'	5'-CATCTTGCGCCAA TTCCCG-3'
Akt	5'-AGACAGGGGCTT TTTTGCTAC-3'	5'-AATTCGCCGAGA CACTCG-3'
Caspase-3	5'-CTCCTCTGGTAC GGATGTG-3'	5'-TCCATAAATGAC CCCTTCATCA-3'
GAPDH	5'-AGGTCGGTGTGA ACGGATTTG-3'	5'-GGGGTCGTTGATG GCAACA-3'

1.7 统计学分析 采用 SPSS 23.0 统计软件分析数

据,采用单因素方差分析比较多组间 DAI 评分、miR-30a-3p、PTEN 等,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多重对比采用 LSD-t 检验。以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 柚皮素对小鼠 DAI 评分的影响 造模结束时,与阴性对照组比较,其余各组小鼠 DAI 评分均升高(P<0.05);给予治疗后,与模型组比较,阳性对照组和各柚皮素剂量组小鼠 DAI 评分较模型组均降低,各柚皮素剂量组效应呈剂量反应关系(P<0.05);柚皮素高剂量组与阳性对照组 DAI 评分差异无统计学意义(P>0.05)(表 2)。

表 2 各组小鼠 DAI 评分比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 2 Comparison of DAI scores of mice in each group

组别	造模结束时	治疗后	
		4 d	7 d
阴性对照组	0.08±0.04	0.07±0.10	0.08±0.06
模型组	2.00±0.37 <sup>①</sup>	1.83±0.29 <sup>①</sup>	1.51±0.15 <sup>①</sup>
阳性对照组	1.96±0.42 <sup>①</sup>	1.12±0.24 <sup>①②</sup>	0.65±0.10 <sup>①②</sup>
柚皮素低剂量组	1.89±0.35 <sup>①</sup>	1.75±0.13 <sup>①②③</sup>	1.36±0.18 <sup>①②③</sup>
柚皮素中剂量组	1.93±0.49 <sup>①</sup>	1.58±0.17 <sup>①②③④</sup>	1.04±0.07 <sup>①②③④</sup>
柚皮素高剂量组	2.02±0.76 <sup>①</sup>	1.15±0.24 <sup>①②④⑤</sup>	0.69±0.16 <sup>①②④⑤</sup>

注:与阴性对照组比较,①P<0.05;与模型组比较,②P<0.05;与阳性对照组比较,③P<0.05;与柚皮素低剂量组比较,④P<0.05;与柚皮素中剂量组比较,⑤P<0.05

2.2 柚皮素对小鼠结肠病理的影响 阴性对照组小鼠结肠无明显病理改变;模型组小鼠结肠有部分肠壁凹陷,形成溃疡,周围组织水肿明显,部分细胞坏死、脱落,炎性细胞浸润;柚皮素低剂量组和柚皮素中剂量组小鼠结肠也可见到溃疡,但组织水肿、细胞坏死和炎细胞浸润减轻;阳性对照组和柚皮素高剂量组小鼠结肠溃疡较少,但组织水肿、细胞坏死和炎细胞浸润明显减轻。见图 1。

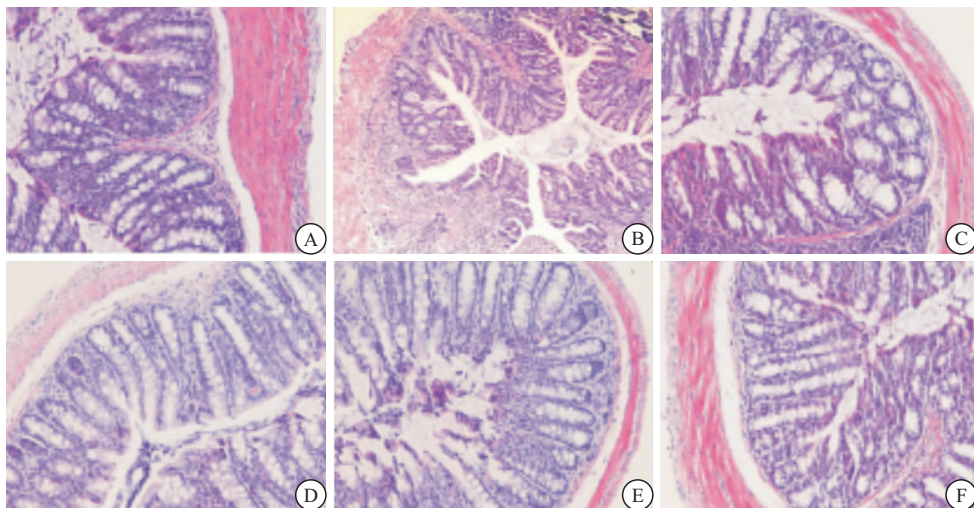


图 1 各组大鼠肾脏组织形态学病理图(HE 染色,200×)

Figure 1 Histopathological and pathological diagrams of rat kidneys in each group

注:A. 阴性对照组;B. 模型组;C. 阳性对照组;D. 柚皮素低剂量组;E. 柚皮素中剂量组;F. 柚皮素高剂量组

2.3 柚皮素对小鼠结肠组织中 IL-4、IL-10 和 TNF- $\alpha$  水平影响 与阴性对照组比较,其余各组小鼠结肠组织中 IL-4 和 TNF- $\alpha$  水平均升高,IL-10 水平均降低(均  $P < 0.05$ );与模型组比较,阳性对照组和各柚皮素

剂量组小鼠结肠组织中 IL-4 和 TNF- $\alpha$  水平均降低,IL-10 水平均升高,各柚皮素剂量组效应呈剂量反应关系(均  $P < 0.05$ );柚皮素高剂量组与阳性对照组各指标差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 3。

表 3 各组小鼠结肠组织中 IL-4、IL-10 和 TNF- $\alpha$  水平比较( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL,  $n = 10$ )

Table 3 Comparison of IL-4, IL-10 and TNF- $\alpha$  levels in the colon tissue of mice in each group

组别	IL-4	IL-10	TNF- $\alpha$
阴性对照组	62.18 $\pm$ 7.59	143.85 $\pm$ 17.62	138.42 $\pm$ 19.27
模型组	217.25 $\pm$ 36.40 <sup>①</sup>	62.43 $\pm$ 8.64 <sup>①</sup>	577.16 $\pm$ 73.31 <sup>①</sup>
阳性对照组	106.53 $\pm$ 15.38 <sup>①②</sup>	113.93 $\pm$ 10.27 <sup>①②</sup>	213.57 $\pm$ 37.70 <sup>①②</sup>
柚皮素低剂量组	184.37 $\pm$ 26.15 <sup>①②③</sup>	78.42 $\pm$ 9.86 <sup>①②③</sup>	503.24 $\pm$ 91.53 <sup>①②③</sup>
柚皮素中剂量组	145.84 $\pm$ 12.45 <sup>①②③④</sup>	88.37 $\pm$ 14.52 <sup>①②③④</sup>	428.66 $\pm$ 56.42 <sup>①②③④</sup>
柚皮素高剂量组	105.59 $\pm$ 13.89 <sup>①②④⑤</sup>	116.50 $\pm$ 7.90 <sup>①②④⑤</sup>	221.46 $\pm$ 50.70 <sup>①②④⑤</sup>

注:与阴性对照组比较,① $P < 0.05$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$ ;与阳性对照组比较,③ $P < 0.05$ ;与柚皮素低剂量组比较,④ $P < 0.05$ ;与柚皮素中剂量组比较,⑤ $P < 0.05$

2.4 柚皮素对小鼠结肠组织中 miR-30a-3p、PTEN、PI3K、Akt 和 Caspase-3 mRNA 及蛋白水平的的影响 与阴性对照组比较,其余各组小鼠结肠组织中 miR-30a-3p、PI3K 和 Akt mRNA 相对表达量及蛋白水平均降低,PTEN 和 Caspase-3 mRNA 相对表达量及蛋白水平均升高(均  $P < 0.05$ );与模型组比较,阳性对照

组和各柚皮素剂量组小鼠结肠组织中 miR-30a-3p、PI3K 和 Akt mRNA 相对表达量及蛋白水平均升高,PTEN 和 Caspase-3 mRNA 相对表达量及蛋白水平均降低,各柚皮素剂量组效应呈剂量反应关系(均  $P < 0.05$ );柚皮素高剂量组与阳性对照组各指标差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 4~5、图 2。

表 4 各组小鼠结肠组织中 miR-30a-3p、PTEN、PI3K、Akt 和 Caspase-3 mRNA 比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Table 4 Comparison of miR-30a-3p, PTEN, PI3K, Akt and Caspase-3 mRNA in the colon tissue of mice in each group

组别	miR-30a-3p	PTEN	PI3K	Akt	Caspase-3
阴性对照组	1.00 $\pm$ 0.12	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.11	1.00 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.09
模型组	0.27 $\pm$ 0.09 <sup>①</sup>	1.95 $\pm$ 0.21 <sup>①</sup>	0.43 $\pm$ 0.07 <sup>①</sup>	0.50 $\pm$ 0.06V <sup>①</sup>	1.75 $\pm$ 0.14 <sup>①</sup>
阳性对照组	0.76 $\pm$ 0.08 <sup>①②</sup>	1.34 $\pm$ 0.16 <sup>①②</sup>	0.86 $\pm$ 0.10 <sup>①②</sup>	0.81 $\pm$ 0.10 <sup>①②</sup>	1.24 $\pm$ 0.13 <sup>①②</sup>
柚皮素低剂量组	0.39 $\pm$ 0.04 <sup>①②③</sup>	1.78 $\pm$ 0.14 <sup>①②③</sup>	0.54 $\pm$ 0.06 <sup>①②③</sup>	0.57 $\pm$ 0.07 <sup>①②③</sup>	1.58 $\pm$ 0.24 <sup>①②③</sup>
柚皮素中剂量组	0.52 $\pm$ 0.06 <sup>①②③④</sup>	1.66 $\pm$ 0.19 <sup>①②③④</sup>	0.67 $\pm$ 0.09 <sup>①②③④</sup>	0.66 $\pm$ 0.13 <sup>①②③④</sup>	1.40 $\pm$ 0.09 <sup>①②③④</sup>
柚皮素高剂量组	0.77 $\pm$ 0.06 <sup>①②④⑤</sup>	1.35 $\pm$ 0.10 <sup>①②④⑤</sup>	0.88 $\pm$ 0.12 <sup>①②④⑤</sup>	0.82 $\pm$ 0.09 <sup>①②④⑤</sup>	1.26 $\pm$ 0.12 <sup>①②④⑤</sup>

注:与阴性对照组比较,① $P < 0.05$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$ ;与阳性对照组比较,③ $P < 0.05$ ;与柚皮素低剂量组比较,④ $P < 0.05$ ;与柚皮素中剂量组比较,⑤ $P < 0.05$

表 5 各组小鼠结肠组织中 miR-30a-3p、PTEN、PI3K、Akt 和 Caspase-3 蛋白比较( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL,  $n = 10$ )

Table 5 Comparison of miR-30a-3p, PTEN, PI3K, Akt and Caspase-3 protein in colon tissue of mice in each group

组别	PTEN	PI3K	Akt	Caspase-3
阴性对照组	14.28 $\pm$ 2.69	76.01 $\pm$ 10.66	34.18 $\pm$ 5.71	103.59 $\pm$ 14.28
模型组	3.19 $\pm$ 0.47 <sup>①</sup>	31.52 $\pm$ 4.58 <sup>①</sup>	19.67 $\pm$ 2.58 <sup>①</sup>	224.27 $\pm$ 20.56 <sup>①</sup>
阳性对照组	11.28 $\pm$ 1.72 <sup>①②</sup>	64.61 $\pm$ 7.16 <sup>①②</sup>	27.13 $\pm$ 3.60 <sup>①②</sup>	127.35 $\pm$ 17.62 <sup>①②</sup>
柚皮素低剂量组	5.40 $\pm$ 0.28 <sup>①②③</sup>	37.49 $\pm$ 6.10 <sup>①②③</sup>	22.42 $\pm$ 3.78 <sup>①②③</sup>	197.80 $\pm$ 24.57 <sup>①②③</sup>
柚皮素中剂量组	8.12 $\pm$ 0.94 <sup>①②③④</sup>	44.57 $\pm$ 2.19 <sup>①②③④</sup>	24.89 $\pm$ 3.21 <sup>①②③④</sup>	160.21 $\pm$ 13.52 <sup>①②③④</sup>
柚皮素高剂量组	11.21 $\pm$ 2.63 <sup>①②④⑤</sup>	63.84 $\pm$ 9.55 <sup>①②④⑤</sup>	27.51 $\pm$ 2.40 <sup>①②④⑤</sup>	125.48 $\pm$ 23.84 <sup>①②④⑤</sup>

注:与阴性对照组比较,① $P < 0.05$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$ ;与阳性对照组比较,③ $P < 0.05$ ;与柚皮素低剂量组比较,④ $P < 0.05$ ;与柚皮素中剂量组比较,⑤ $P < 0.05$

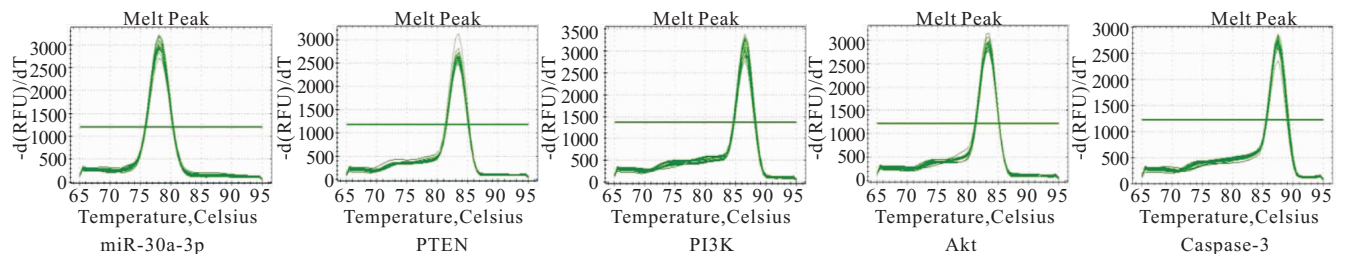


图 2 各组小鼠结肠组织中 miR-30a-3p、PTEN、PI3K、Akt 和 Caspase-3 mRNA 扩增情况

Figure 2 The mRNA amplification of miR-30a-3p, PTEN, PI3K, Akt and Caspase-3 in colon tissue of mice in each group

### 3 讨论

溃疡性结肠炎是一种复发性慢性结肠炎,因其顽固性和易复发性被列为现代难治性疾病。关于溃疡性结肠炎的临床药物开发和治疗的研究较多,但目前还未发现突破性药物。因此,探讨新的溃疡性结肠炎治疗药物具有重要意义。多酚或酚类化合物是从药用植物中提取的天然活性成分,类黄酮被归类为多酚的结构基团。研究发现,白藜芦醇、槲皮素、杨梅素和柚皮素等多酚类和类黄酮化合物被认为对醋酸和 DSS 诱导的小鼠实验性结肠炎有保护作用<sup>[11]</sup>。柚皮素具有较强的抗炎和免疫调节功能。在溃疡性结肠炎发生过程中,游离脂肪酸(FFA)水平升高,FFA 通过对 Toll 样受体 4 多克隆抗体(TLR4)的作用产生促炎细胞因子,然后启动核转录因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)和 c-JunN 端蛋白激酶(c-JNK)级联反应,导致肠系膜脂肪组织的慢性炎症<sup>[12]</sup>。TNF- $\alpha$  诱导多种炎症基因表达,促进溃疡性结肠炎的发展<sup>[13]</sup>。同时,IL-4 通过刺激中性粒细胞浸润和趋化产生组织坏死和破坏,抑制 Th1/Th2 细胞分泌 IL-10 产生,在溃疡性结肠炎的发病机制中起着关键作用<sup>[14]</sup>。本研究结果显示,柚皮素能降低溃疡性结肠炎小鼠结肠组织中 IL-4 和 TNF- $\alpha$  水平降低,同时升高 IL-10 水平,提示柚皮素对促炎细胞因子有抑制作用,从而对溃疡性结肠炎发挥保护作用。

溃疡性结肠炎通常表现为体重减轻、粪便粘稠和便血,统称为 DAI,是评价溃疡性结肠炎严重程度的一个众所周知的参数,也是药物治疗效果的一个预测因素<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,给予 DSS 灌胃各组小鼠 DAI 评分增加,再给予柚皮素治疗后,DAI 评分显著降低,且其作用效果与泼尼松龙类似。泼尼松龙是溃疡性结肠炎的标准临床治疗方法,表明柚皮素对溃疡性结肠炎具有治疗作用。同时,本研究对柚皮素治疗溃疡性结肠炎的作用机制进行探讨。

研究证实,miRNA 与炎症和免疫系统功能有关。在上皮细胞中,脂多糖下调 miR-30a-3p,miR-30a-3p 模拟物显著抑制了 II 型上皮细胞凋亡<sup>[16]</sup>。同时,miR-30a-3p 过表达也可以改善脓毒症诱导的身体损伤<sup>[17]</sup>。本研究结果显示,柚皮素能促进结肠组织中 miR-30a-3p 表达。最新研究表明,在 PTEN/PI3K/AKT 信号通路中,PTEN 能编码一种具有蛋白质和脂质磷酸酶活性的多功能蛋白,干扰 PI3K/AKT 信号转导,导致细胞周期 G 期的阻断<sup>[18-19]</sup>。当缺乏 PTEN 表达时,PI3K 被激活后可催化 3,4,5-磷酸磷脂酰肌醇三磷酸磷酸化,然后激活 Akt,抑制细胞凋亡并促进细胞增殖,失去对细胞生长的控制<sup>[20]</sup>。既往研究报道,

miRNA 通过直接下调 PTEN 调控 PI3K/Akt 信号通路,从而促进 Akt 磷酸化,影响 Th2 细胞因子 IL-4、IL-8、IL-10 的表达,打破 Th1/Th2 细胞因子平衡,导致促炎细胞因子的产生减少,提示 miRNA 与 PTEN/PI3K/Akt 信号通路相关<sup>[21]</sup>。同时,结肠细胞凋亡增加可以加重溃疡性结肠炎小鼠的病情,而炎症反应可以促进细胞凋亡<sup>[22-24]</sup>。本研究结果显示,过表达的 miR-30a-3p 抑制 PTEN 的表达,促进 PI3K 和 Akt 表达,从而抑制 Caspase-3 表达。

### 4 结论

柚皮素通过促进 miR-30a-3p 表达,负调控 PTEN 表达,减轻炎症因子诱导的细胞凋亡,改善溃疡性结肠炎症状,为柚皮素治疗溃疡性结肠炎提供了理论依据,也为溃疡性结肠炎的机制研究提供了实验数据。

### 【参考文献】

- [1] KUCHARZIK T, KOLETZKO S, KANNENGIESSER K, *et al.* Ulcerative Colitis-Diagnostic and Therapeutic Algorithms [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2020, 117(33-34):564-574.
- [2] PRAVDA J. Can ulcerative colitis be cured? [J]. *Discov Med*, 2019, 27(149):197-200.
- [3] JOSHI R, KULKARNI Y A, WAIRKAR S. Pharmacokinetic, pharmacodynamic and formulations aspects of Naringenin: An update [J]. *Life Sci*, 2018, 215:43-56.
- [4] 魏莱, 荣愈平, 刘胜武, 等. 柚皮素对肠缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *贵州医药*, 2017, 41(9):914-916.
- [5] PORTER R J, KALLA R, HO G T. Ulcerative colitis; Recent advances in the understanding of disease pathogenesis [J]. *F1000Res*, 2020, 9:F1000 Faculty Rev-294.
- [6] WANG B, WANG D, YAN T, *et al.* MiR-138-5p promotes TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in human intervertebral disc degeneration by targeting SIRT1 through PTEN/PI3K/Akt signaling [J]. *Exp Cell Res*, 2016, 345(2): 199-205.
- [7] DO D N, DUDEMAINE P L, FOMENKY B E, *et al.* Integration of miRNA weighted gene co-expression network and miRNA-mRNA co-expression analyses reveals potential regulatory functions of miRNAs in calf rumen development [J]. *Genomics*, 2019, 111(4):849-859.
- [8] LV X, HUANG J, WANG H. MiR-30a-3p ameliorates oxidative stress in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via activation of Nrf2-ARE signaling pathway [J]. *Immunol Lett*, 2021, 232: 1-8.
- [9] ARISAKA T, KANAZAWA M, TOMINAGA K, *et al.* Hematemesis Due to Drug Allergy to Oral Prednisolone in a Patient with Ulcerative Colitis [J]. *Intern Med*, 2019, 58(8):1093-1096.
- [10] WANG Q, OU Y, HU G, *et al.* Naringenin attenuates non-alcoholic fatty liver disease by down-regulating the NLRP3/NF- $\kappa$ B pathway in mice [J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177(8): 1806-1821.
- [11] 王坚衡, 赵刚, 张立泽, 等. 白藜芦醇对溃疡性结肠炎小鼠肠上

- 皮 Toll 样受体 4/髓样分化因子/核转录因子- $\kappa$ B 信号通路的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2021, 38(4):662-664.
- [12] 王其进, 陈玉, 张涛, 等. FOXO3 调控 NF- $\kappa$ Bp50 表达介导肠上皮细胞凋亡参与溃疡性结肠炎相关癌变及健脾清热活血方药干预研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(12):3043-3046.
- [13] 陈勇华, 曹群奋, 洪琼怪, 等. 黄芩汤辅助柳氮磺吡啶对溃疡性结肠炎患者血清 TNF- $\alpha$  及白介素族水平影响研究[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(2):500-503.
- [14] EBRAHIMPOUR S, SHAHBAZI M, KHALILI A, *et al.* Elevated levels of IL-2 and IL-21 produced by CD4<sup>+</sup> T cells in inflammatory bowel disease[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2017, 31(2): 279-287.
- [15] ISHIDA N, MIYAZU T, MATSUURA T, *et al.* Effect of ulcerative colitis duration on the usefulness of immunochemical fecal occult blood test result as a disease activity biomarker[J]. Int J Colorectal Dis. 2020, 35(9):1729-1739.
- [16] RATHNAM G. Formulation and Evaluation of Colon Targeted Compression Coated Tablet of Mesalamine and Prednisolone for Ulcerative Colitis[J]. Asian J Pharmaceutics, 2017, 11(3): 231-239.
- [17] SINGH A K, PANDEY R K, SHAHA C, *et al.* MicroRNA expression profiling of Leishmania donovani-infected host cells uncovers the regulatory role of MIR30A-3p in host autophagy [J]. Autophagy, 2016, 12(10):1817-1831.
- [18] YANG S, WANG Y, GAO H, *et al.* MicroRNA-30a-3p over-expression improves sepsis-induced cell apoptosis in vitro and in vivo via the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(2): 2081-2087.
- [19] YIN Y, YANG C. miRNA-30a-3p improves myocardial ischemia via the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(10):17326-17336.
- [20] 王龙飞, 彭洪, 苏强, 等. miRNA-301a-3p 调控结肠癌对 5-氟尿嘧啶敏感性的机制研究[J]. 西部医学, 2019, 31(8):1165-1169.
- [21] ZHANG R, ZHU H, YUAN Y, *et al.* SPAG6 promotes cell proliferation and inhibits apoptosis through the PTEN/PI3K/AKT pathway in Burkitt lymphoma[J]. Oncol Rep, 2020, 44(5):2021-2030.
- [22] YIN R, JIANG J, DENG H, *et al.* miR-140-3p aggregates osteoporosis by targeting PTEN and activating PTEN/PI3K/AKT signaling pathway[J]. Human Cell, 2020, 33(3):569-581.
- [23] 周海新, 方健松, 张涛, 等. miR-21 介导肠上皮细胞凋亡维持肠道稳态参与溃疡性结肠炎相关癌变研究[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(4):523-527.
- [24] 随何欢, 赵海霞, 朱丽莎, 等. 内质网应激-自噬参与葫芦素 E 诱导的结肠癌细胞凋亡[J]. 西部医学, 2020, 32(11):1604-1607.

(收稿日期:2021-06-07;修回日期:2022-02-11;编辑:刘灵敏)

(上接第 959 页)

- [21] 李永辉, 李婷婷, 郭强, 等. 食管癌组织中 VEGF-C 表达量与淋巴管新生及肿瘤组织生长的相关性[J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(22):44-48.
- [22] 折胜利, 宋兴华, 周杨, 等. 骨肉瘤细胞外泌体调控 JAK2/STAT3 信号通路影响成纤维细胞向肿瘤相关成纤维细胞转化[J]. 西部医学, 2021, 33(8):1096-1100, 1105.
- [23] 言成一, 杨继承, 袁跃西, 等. 微小 RNA-520e 对非小细胞肺癌细胞侵袭迁移和 JAK1/STAT3 信号通路的影响[J]. 临床肿瘤学杂志, 2019, 24(11):978-983.
- [24] 商华, 任宪辉, 杨红欣, 等. 姜黄素对 A $\beta$ 25-35 诱导的 PC12 细胞 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(1):168-172, 182.

(收稿日期:2021-07-12;修回日期:2022-03-25;编辑:刘灵敏)