

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.01.007

米糠多糖通过 MAPK 通路抑制 DSS 诱导的小鼠结肠炎症

Rice bran polysaccharides prevent DSS-induced colitis through MAPK signaling pathway in mice

刘晶^{1,2} 郭婷² 郭天一^{2,3} 邹佳文^{2,3}

LIU Jing^{1,2} GUO Ting² GUO Tian-yi^{2,3} ZOU Jia-wen^{2,3}

周潇恬^{2,3} 何洁² 石雨虹² 罗非君^{2,3}

ZHOU Xiao-tian^{2,3} HE Jie² SHI Yu-hong² LUO Fei-jun^{2,3}

(1. 湘南学院化学生物与环境工程学院, 湖南 郴州 423000; 2. 中南林业科技大学食品科学与工程学院 粮油深加工与品质控制湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410004; 3. 中南林业科技大学食品科学与工程学院 稻谷及副产物深加工国家工程实验室, 湖南 长沙 410004)

(1. College of Chemical Biology and Environmental Engineering, Xiangnan University, Chenzhou, Hunan 423000, China; 2. Hunan Key Laboratory of Grain and Oil Deep Processing and Quality Control, College of Food Science and Engineering, Central South Forestry University, Changsha, Hunan 410004, China; 3. National Engineering Laboratory of Rice and By-Products Deep Processing, College of Food Science and Engineering, Central South Forestry University, Changsha, Hunan 410004, China)

摘要:以 3% 葡聚糖硫酸钠(DSS)为诱导剂建立 ICR 小鼠结肠炎症模型, 评估米糠多糖的抗炎功效与分子机理。采用病理组织分析、RT-qPCR 和 Western blotting 等多种技术比较各组动物组织的病理改变和基因表达的差异。结果发现: 给予 500 mg/(kg·d) 米糠多糖灌胃能明显改善结肠炎症小鼠的整体健康状况, 降低疾病活动指数分数, 减轻小鼠结肠炎症组织的损伤, 改善炎症相关生化指标。RT-qPCR 分析发现, 米糠多糖可使结肠组织炎症因子 TNF α 、IL-1 β 、Cox-2 和 iNOS 等基因 mRNA 表达水平下调, Western blotting 分析进一步证实了米糠多糖抑制炎症因子蛋白表达水平的功效, 同时, 米糠多糖也能抑制 MAPK 信号通路。结果表明米糠多糖具有抗炎作用, 其分子机制可能与下调炎症因子的表达和阻断 MAPK 信号通路相关。

关键词:米糠; 多糖; 炎症; 炎症因子; MAPK

Abstract: To assess the anti-inflammatory function and possible molecular mechanism of rice bran polysaccharide (RBP), DSS-induced colitis model was used in ICR mice. Pathological changes and gene expression were analyzed by histopathological analysis, RT-qPCR and Western blotting among of different experiment groups. The results showed that 500 mg/kg/day RBP could significantly improve the health status of mice and reduced colonic inflammation. RBP reduced the disease active index (DAI) score of DSS-induced mice and alleviated the damage of pathological tissue, with the improvement of the inflammation-related biochemical indicators. qRT-PCR analysis showed that RBP could decrease the mRNA expression level of inflammatory factors, including TNF α , IL-1 β , Cox-2 and iNOS in colon tissues. Western blotting analysis further confirmed the efficacy of RBP inhibiting the expression level of inflammatory factor protein. Moreover, RBP could also inhibit MAPK signaling pathway. The results suggested that RBP had anti-inflammatory effect, and its molecular mechanism might be related to down-regulating the expression of inflammatory factors via inhibiting MAPK signaling pathway.

Keywords: rice bran; polysaccharide; inflammation; inflammatory factors; MAPK

基金项目:湖南省教育厅科研项目(编号:湘教 395 16C1496); 湖南省“2011”协同创新课题(编号:湘教通[2013]448号)

作者简介:刘晶, 女, 湘南学院讲师, 硕士。

共同第一作者:郭婷, 女, 中南林业科技大学在读硕士研究生。

通信作者:罗非君(1968—), 男, 中南林业科技大学教授, 博士。

E-mail: luofeijun888@csuft.edu.cn

收稿日期: 2018-10-11

中国是世界上重要的水稻种植大国之一, 其中稻米

加工的副产物米糠年产生量超过 1.100×10^7 t。米糠中含有优质的营养物质,如蛋白质、生育酚、纤维素、多糖和谷维素等^[1-2]。但目前中国对米糠资源的深加工研究不足,仅用于饲料加工,不利于资源的有效利用。

近年来,米糠中的多糖引起众多学者的研究与关注。米糠多糖(rice bran polysaccharide, RBP)是从稻糠中提取纯化后的一种多糖,结构主要为 α -1, 6 糖苷键^[3]。与 Ito 等^[4]曾报道的米糠中提取 α 活性多糖有相似结构。已有药理及临床研究表明,处于初级研究与开发阶段的米糠多糖和研究较为深入的香菇及云芝等中的多糖有类似的生物学作用,如抗肿瘤^[5-7]、抗炎^[8]、抗氧化^[9-10]、提高机体免疫功能^[11-12]、降血脂^[13]、降血糖^[14]等。

炎症是机体对外界病毒、化学物质等入侵而引发的自发反应,但过度炎症会造成机体组织的损伤。溃疡性结肠炎是较为常见的慢性炎症疾病,采用的药物治疗很难断根,反复发作,因此,从天然产物中寻找无毒副作用的天然产物是重要的防治策略。植物多糖具有多种生物学功能,已有的研究^[15-17]发现多种植物多糖具有抗炎功能。米糠多糖是否具有抗炎功能,目前尚无报道。DSS 能造成小鼠结肠上皮的损伤,内毒素入血,结肠水肿和过度炎症。DSS 诱导的小鼠结肠炎症模型与临床溃疡性结肠炎病症类似,是最常见的结肠炎症模型。本研究使用 DSS 诱导 ICR 小鼠,建立结肠炎症动物模型,评估米糠多糖的抗炎活性以及研究其分子机理,将为包含米糠多糖功能性食品的研究与开发提供基础的理论数据及科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

小鼠:采用 ICR 小鼠,约 8 周龄,数量为 60 只,随机分为 3 组,每组雌雄各半,体重范围为 30.0~34.5 g,湖南斯莱克景达实验动物公司;小鼠置湖南师范大学医学院动物中心饲养,环境温度为 (22 ± 2) °C,相对湿度为 40%~70%。动物使用许可证号:SYXK(湘)-2014-0112。饲养 1 周后,开始试验。小鼠试验期间,每天检查动物房的饲养环境(包括温度、湿度、饮用水、饲料等),确保小鼠生长在相对稳定的良好环境。

1.2 材料与试剂

米糠多糖:西安天瑞生物技术有限公司(经本课题组进一步纯化,多糖含量为 90%,可分成两种不同分子量,一种为 500 ku,约占 85%,另一种分子量为 25 ku,约占 15%。米糠多糖中含有甘露糖、葡萄糖、木糖和阿拉伯糖四种单糖,且摩尔比为:1.35 : 3.32 : 1.00 : 1.25,结构为杂单糖,单糖间主要由 α -型糖苷键连接而成);

DSS:纯度 99%,分子量 36~50 ku,美国 Pharmacia 公司;

总 RNA 提取试剂盒、RNA 逆转录试剂盒、标记荧光

的 RT-qPCR 试剂盒:北京全式金生物技术有限公司;

总蛋白质提取试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒:上海碧云天生物技术有限责任公司;

抗白细胞介素-1(interleukin-1 β , IL-1 β) 兔抗(Cat # 12507S)、抗诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS) 兔抗(Cat # 13120)、抗肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF α) 兔抗(Cat # 6945S)、环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, Cox-2) 兔抗(Cat # 12282)、 β -Actin 鼠抗(Cat # 12620)、p44/42 MAPK(ERK1/2) 兔抗(Cat # 9194)、phosphor-p44/42 MAPK (p-ERK1/2) 兔抗(Cat # 4370)、p38 MAPK 兔抗(Cat # 9213)、phosphor-p38 MAPK (p-p38) 兔抗(Cat # 4511)、JNK MAPK 兔抗(Cat # 9253)、phosphor-JNK MAPK (p-JNK) 兔抗(Cat # 4668):美国 Cell Signaling Technology 公司;

无水乙醇、甲醇、氯仿、二甲苯、异丙醇等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.3 仪器与设备

超纯水系统:ZWM-UT1-10 型,湖南中沃水务环保科技有限公司;

精密分析天平:AUY220 型,日本岛津公司;

移液枪:P1000-1 型,百得实验室仪器(苏州)有限公司;

低温台式离心机:22331 Hambrug 型,德国 Eppendorf 公司;

-86 °C 超低温冰箱:DW-HL388 型,中科美菱科技有限责任公司;

光学显微镜:XDS-10 型,上海团结仪器制造有限公司;

垂直电泳槽:Mini-PROTEAN Tetra System 型,美国 Bio-Rad 公司;

电泳仪:PowerPac™ Basic 型,美国 Bio-Rad 公司;

荧光定量 PCR 仪:CFX96™ Real-Time System 型,美国 Bio-Rad 公司;

凝胶成像仪:ChemiDoc™ XRS+ 型,美国 Bio-Rad 公司。

1.4 试验方法

1.4.1 米糠多糖的配制

(1) 小鼠米糠多糖灌胃溶液:称取米糠多糖 400 mg,置于装有 20 mL 灭菌超纯水的离心管中,盖紧管盖后上下颠倒,使米糠多糖粉末充分溶解并混匀,4 °C 保存。

(2) 米糠多糖细胞溶液:精确称取米糠多糖 100 mg,溶于 10 mL 灭菌超纯水中,充分震荡混匀后配制制成 10 mg/mL 米糠多糖工作液,使用 0.45 μ m 微孔滤膜进行除菌过滤,分装于 1.0 mL EP 管中,整个配制过程需在无菌环境下进行。

1.4.2 试验小鼠的分组 小鼠进行 1 周喂养后,30 只 ICR 雄性小鼠,随机分成 3 组,30 只 ICR 雌性小鼠也随机

分成 3 组,再随机组合,每组雌雄各半,设为正常对照、DSS 损伤、米糠多糖保护 3 组。对照组试验小鼠自由摄食和饮水,损伤组试验小鼠自由饮食 2 d,从第 3 天开始饮用 3.0% DSS 溶液;保护组小鼠第 1 天起到试验结束灌胃米糠多糖溶液[剂量为 500 mg/(kg·d)],第 3 天起到试验结束饮用 3.0% DSS 溶液和自由摄食。小鼠试验结束后,将试验小鼠颈椎脱臼处死,先摘小鼠眼球,取血液样本,然后解剖小鼠取出结肠、脾脏等器官组织,快速置低温保存备用。

1.4.3 疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分

每只小鼠从试验开始至结束期间,每天早上 8:30 测定体重、饮水量和摄食量,并仔细观察小鼠的精神状态、大便形状以及便血程度。按照表 1 的 DAI 评分标准,由同一个试验员对各试验小鼠进行 DAI(DAI=便血分数+体重下降分数+大便性状分数)^[18]评分。试验小鼠粪便隐血测定:将少量的小鼠粪使用棉签比较均匀地涂抹在载玻片上,分别滴加 3~5 滴邻联甲苯胺溶液和 3.0% H₂O₂ 溶液,仔细观察小鼠粪便的颜色,判断小鼠粪便的隐血程度:① 隐血呈阴性:2 min 内几乎无变化;② 隐血呈弱阳性:10 s 左右由浅(蓝)逐渐变深;③ 隐血呈阳性:由浅蓝褐色逐渐变为蓝褐色;④ 隐血呈强阳性:立即显现为蓝褐色。

表 1 DAI 评分标准

Table 1 Evaluation standard of DAI scoring

积分	体重减少/%	大便性状	便血
0	<1	正常	无
1	1~5	松散型便	弱阳性
2	5~10	半稀状便	阳性
3	10~20	稀便	强阳性
4	>20	水样泻	肉眼可见血便

1.4.4 小鼠结肠组织髓过氧化物酶活性测定 髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)存在于免疫细胞(中性粒细胞)中,利用其还原过氧化氢的能力,可以测定 MPO 的活性。MPO 还原过氧化氢得到的复合物,经供氢体邻连茴香胺作用生成黄色化合物,测定该黄色化合物在 460 nm 处的吸光度得到其生成量,推算出 MPO 的活性。小鼠结肠组织 MPO 活性的测定按照试剂盒说明书进行, MPO 活力单位以每克结肠组织湿片于 37 °C 的反应体系中分解 1 μmol 过氧化氢为 1 个酶活力单位。

1.4.5 小鼠结肠组织丙二醛(MDA)含量的测定 根据 Xu 等^[19]报道的方法稍做改正。取约 90 mg 小鼠结肠组织,在预冷的 PBS 溶液中清洗干净,加入 1.0 mL PBS 溶液,然后在玻璃匀浆中匀浆,10 000 r/min 离心 10 min,取上清,采用 BCA 法,测定样本中总蛋白含量。取组织混悬液加入 0.67% 硫代巴比士酸和 25% 三氯乙酸,95 °C

维持 45 min。13 000 r/min 离心 20 min,取上清液,使用酶标仪检测 535 nm 吸光值,计算 MDA 的含量。

1.4.6 结肠组织亚硝酸盐含量的测定 参考 Miranda 等^[20]的报道稍做改正,具体如下:取 60 mg 小鼠结肠组织,加入 220 μL PBS 中匀浆,取 120 μL 样品加入到 120 μL 甲醇中,3 500 r/min 离心 10 min,取上清液。100 μL 试验样本,依次加入 100 μL 三氯化钒、50 μL 磺胺和 50 μL NEDD,在 37 °C 下培养箱中孵育 30 min,用酶标仪测定 540 nm 吸光值,然后计算结肠样本中亚硝酸盐的含量。

1.4.7 小鼠结肠组织病理学分析 试验完成后,采用颈椎脱臼法,快速处死试验小鼠,然后快速打开小鼠腹腔,分离小鼠的整个结肠,预冷的 PBS 溶液中清洗,取距离肛门约 1 cm 的小段结肠组织,用 10% 中性福尔马林溶液,固定 24~48 h,然后采用流水冲洗过夜,不同浓度梯度酒精依次脱水,用二甲苯透明,透蜡,用苏木精染色液染色 5~10 min,流水冲洗 10~15 min,再用纯水冲洗数秒,95% 乙醇冲洗 5 s。置伊红染色液中染色 1~2 min,纯水洗 2 次,95% 乙醇脱水 2 次。二甲苯透明约 5 min。采用树胶封存,在显微镜下观察结肠组织病理学变化。

1.4.8 RT-qPCR 测定结肠组织炎症因子 mRNA 表达水平 提取 RNA 营造一个无 RNA 酶的环境,将提取 RNA 过程中使用的相关工具采用 0.1% 焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)溶液避光浸泡 24 h,并高压蒸汽灭菌再烘干处理。每组称取动物结肠组织约 100 mg,置于 1.5 mL EP 管中迅速放入液氮中,再倒入已用液氮预冷的研钵中研磨成粉。使用 Trizol 法严格按照 Tranzol-up 试剂盒说明书操作流程提取 RNA。1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性并用超微量分光光度仪测定 RNA 浓度和纯度。测定其浓度,用反转录试剂盒合成 cDNA 后进行 PCR 扩增反应。炎症因子 PCR 引物序列参见刘博等^[21]报道。qPCR 反应条件:94 °C, 3 min; 94 °C, 35 s; 60 °C, 40 s; 72 °C, 1 min; 42 个循环,采用 2^{-ΔΔCt} (RQ) 法计算靶基因 mRNA 相对表达水平。

1.4.9 Western blotting 测定结肠组织炎症因子和 MAPK 磷酸化蛋白的表达 每组称取 100 mg 小鼠结肠组织,加液氮研磨成粉末,用含蛋白酶抑制剂 cocktail 的 RIPA 裂解液充分裂解后,4 °C 下 10 000 r/min 离心 10 min 后取上层透明液体,即为蛋白。取 2 μL 蛋白直接采用 BCA 法测定蛋白浓度。随后按照 1:1 比例加入 2×SDS(sodium dodecyl sulfate, 十二烷基硫酸钠)上样缓冲液,在 95 °C 下加热 5 min 使蛋白变性。根据目的基因分子量的大小配制适宜浓度的 SDS-PAGE 胶(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, 聚丙烯酰胺凝胶),取处理好的样品进行电泳分离,然后将蛋白转到聚偏二氟乙烯膜上。转膜完后,用 1×TBST 配制的 5% 牛血清蛋白

(BSA)封闭液封闭 1 h,再孵育 1:1 000 稀释的一抗,置于脱色摇床上过夜。第 2 天取出膜用 1×TBST 溶液清洗 3 次,10 min/次;接着孵育 1:5 000 稀释的二抗稀释液,置于摇床上孵育 1 h,之后采用一抗孵育完的清洗方式。最后将膜浸泡于自制显影液中于凝胶成像仪中成像并采集图片。目的蛋白的相对表达量为目的条带(基因)积分光密度值与内参照(β -Actin)的积分光密度值的比值。

1.5 统计分析

采用 SPSS 17.0 统计分析软件将试验数据进行处理,数据结果用平均值±标准差(means±SD)表示,试验设立 3 个平行组,组间比较采用方差分析和 *t* 检验, $P<0.01$ 有极显著性差异, $P<0.05$ 有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 米糠多糖对 DSS 诱导小鼠宏观表型的影响

正常对照组小鼠体重、饮食饮水状况保持稳定增加,动作灵活,毛发有光泽,大便性状正常,其他方面也均符合正常小鼠的生长状况。DSS 能造成小鼠结肠上皮的损伤,内毒素入血,结肠水肿和过度炎症。DSS 损伤组小鼠慢慢呈现溃疡性结肠炎症症状:体重增长越来越慢,后期体重呈明显的下降趋势,同时,摄食量下降、精神状态

较差、活动量减少,不同程度的便秘、便血。相比于 DSS 损伤组,米糠多糖灌胃组小鼠体重有部分增加,而疾病活动指数也明显下调,提示米糠多糖能明显地改善小鼠的健康状况,见图 1(a)和(b)。小鼠 DSS 处理后,小鼠出现严重腹泻,腹泻率高达 90%,米糠多糖灌胃组小鼠也有 80%出现了腹泻,但症状相对较轻,见图 1(c)。同时,通过隐血试验分析,DSS 也导致 90%小鼠出现便血,米糠多糖灌胃组小鼠则降为 70%($P<0.05$),说明米糠多糖能部分改善小鼠的便血症状,见图 1(d)。本研究发现米糠多糖能明显改善小鼠的健康状况,说明米糠多糖可能是一种潜在防治溃疡性结肠炎的功能活性成分。

2.2 米糠多糖对 DSS 诱导小鼠结肠、脾脏的影响

小鼠饮用 DSS 能产生结肠炎症典型特征,如试验小鼠结肠呈现水肿、充血、形成溃疡、小鼠结肠的肠壁明显增厚、结肠的重量显著增重和长度呈现缩短等,见图 2(a)。米糠多糖灌胃小鼠,结肠长度明显增加,见图 2(b)。脾脏是重要的免疫器官,是机体的细胞免疫以及体液免疫的中心,脾脏组织中含有大量的淋巴细胞和巨噬细胞。DSS 也能促使小鼠脾脏水肿,形成炎症,脾脏体积增大和重量增加,见图 2(c)和(d)。米糠多糖灌胃小鼠也能部分抑制小鼠脾脏的水肿和炎症,脾脏体积和重量显著降低

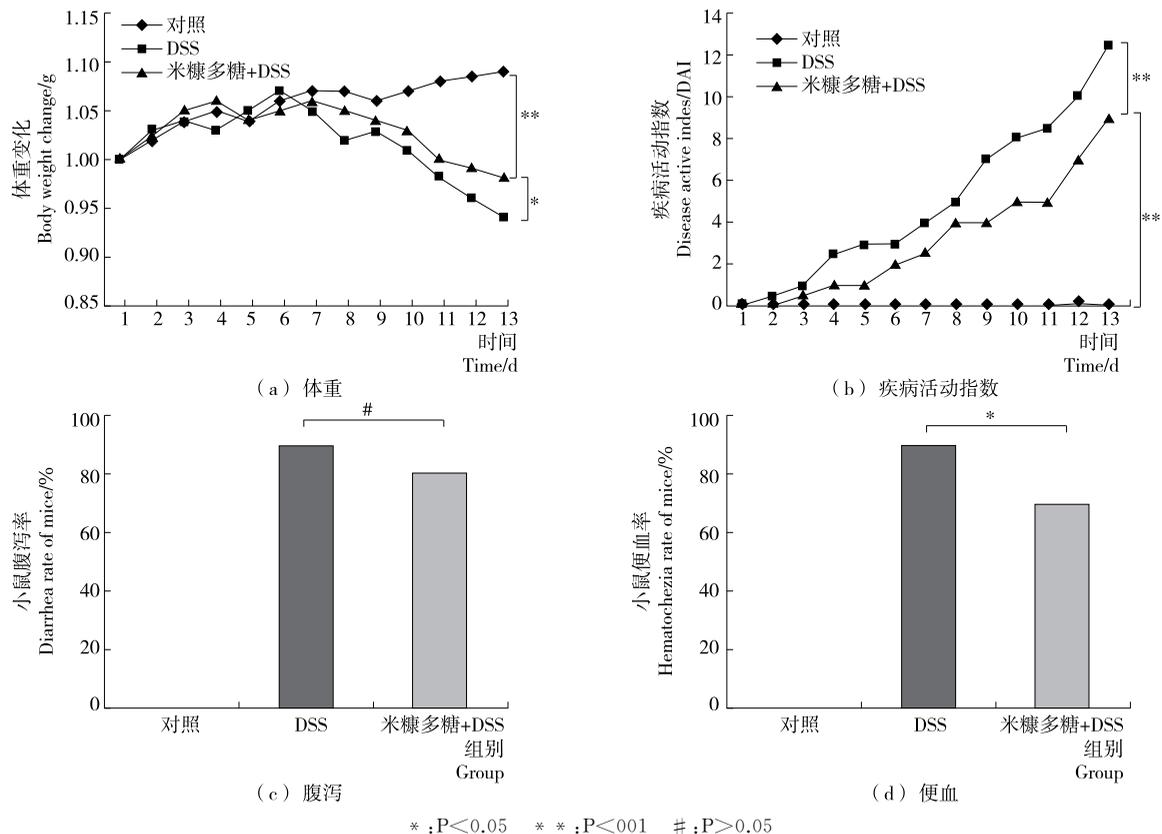


图 1 米糠多糖对小鼠健康状况的影响

Figure 1 Effects of rice bran polysaccharide on health status of mice

($P < 0.05$), 见图 2(c) 和 (d)。结果提示米糠多糖能改善 DSS 诱导小鼠的结肠炎症和脾脏炎症, 可能具有较广泛的抗炎功效。

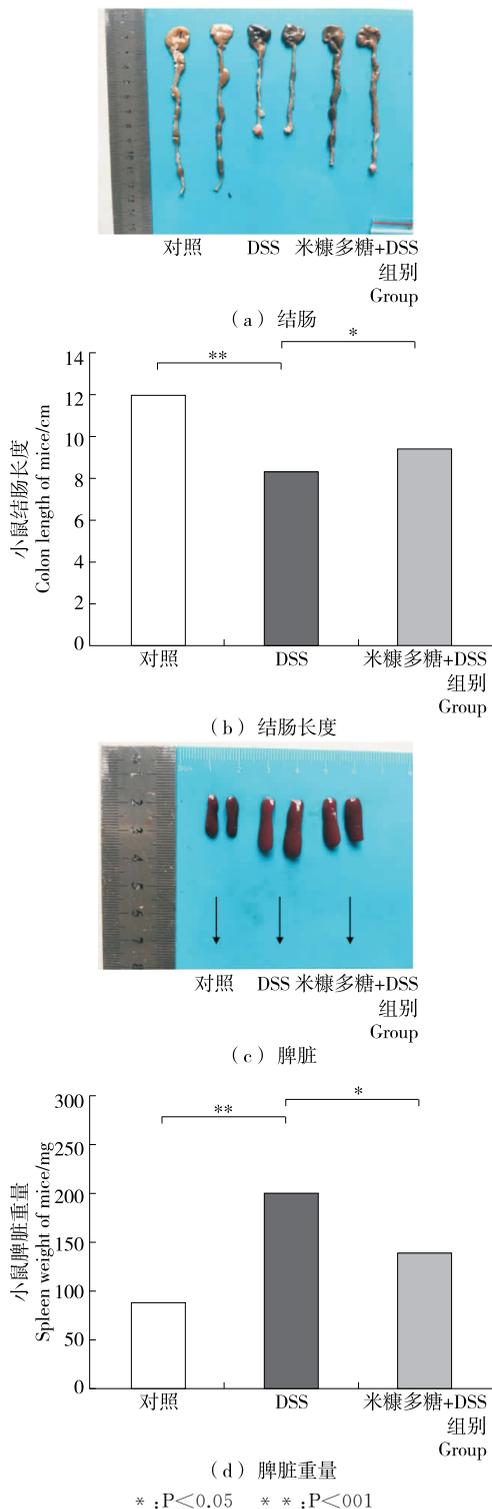


图 2 米糠多糖对小鼠结肠和脾脏的影响
Figure 2 Effects of rice bran polysaccharide on colon and spleen of mice

2.3 米糠多糖对 DSS 诱导小鼠结肠组织 MPO、MDA 和亚硝酸盐含量的影响

髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 又叫过氧化物酶, 是由中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞分泌的血红素蛋白酶。机体发生炎症时, 免疫细胞被征集到损伤组织, 是重要的损伤指标之一。DSS 诱导促使小鼠结肠炎症, 结果发现结肠组织 MPO 含量明显上升, 增加了 3.46 倍; 米糠多糖能部分抑制 MPO 含量的增加, 下调 25.9%, 见图 3(a)。丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 是膜脂过氧化最重要的产物之一, 可以通过测定 MDA 的含量来评估细胞膜损伤的程度, 是组织重要的损伤指标之一。在

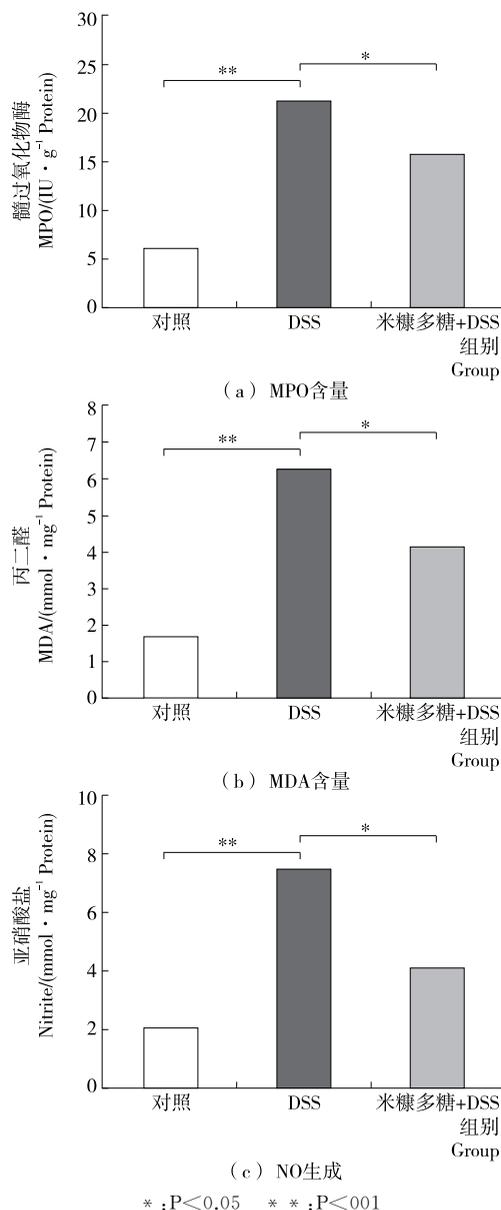


图 3 米糠多糖对小鼠结肠组织损伤的影响
Figure 3 Effects of rice bran polysaccharide on the damage of colonic tissues in mice

DSS 诱导的小鼠结肠组织中,MDA 的含量显著增加,增加了 3.71 倍,米糠多糖能部分抑制 MDA 含量的增加,下调 33.4%,见图 3(b)。通过对小鼠结肠损伤的评估,提示米糠多糖能降低 DSS 诱导结肠组织的损伤。NO 是一种重要的炎症介质,但 NO 在组织中极不稳定,快速形成硝酸盐和亚硝酸盐,因此,测定组织中硝酸盐和亚硝酸盐的含量,可间接定量组织中 NO 释放量,在 DSS 诱导的小鼠结肠组织中,硝酸盐的含量显著增加 3.54 倍,米糠多糖能部分抑制硝酸盐含量的增加,下调 45.1%,见图 3(c)。试验结果说明米糠多糖也能抑制炎症介质 NO 的释放。

2.4 米糠多糖对 DSS 诱导小鼠结肠组织病理的影响

由图 4 可知,对照组小鼠结肠黏膜没有损伤,无炎性细胞浸润结肠组织;DSS 损伤组试验小鼠结肠组织中上皮细胞损伤严重,黏膜上皮充血、糜烂,杯状细胞明显减少,腺体隐窝不完全或完全缺失,并且大量炎性细胞浸润结肠组织;相比 DSS 损伤组,米糠多糖灌胃小鼠的结肠组织损伤明显减轻,结肠上皮相对完好,腺体隐窝排列比较规则,炎性细胞浸润部分减少。结果进一步证实米糠多糖能减少 DSS 诱导的小鼠结肠组织损伤。

2.5 米糠多糖对 DSS 诱导小鼠结肠组织炎症因子表达的影响

过度的炎症反应产生大量的炎症因子,从而对机体

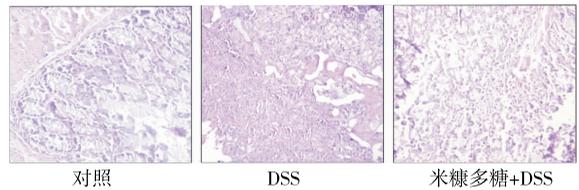


图 4 米糠多糖对小鼠结肠组织损伤的影响 (200×)

Figure 4 Effects of rice bran polysaccharide on the pathological damages of colonic tissues in mice (200×)

产生极大的损伤。TNF α 在溃疡性结肠炎患者血清中 TNF α 的浓度明显增高,且与病情呈正相关。TNF α 能使单核细胞在炎症组织局部聚集,同时也能产生许多炎症因子或前体炎症因子如白细胞介素和一氧化氮等,使炎症大爆发,诱导结肠水肿,使得组织黏膜损伤坏死^[22-23]。在 DSS 诱导结肠炎中,TNF α 被认为是一种关键的促进炎子。取各组小鼠结肠组织提取总 RNA,荧光实时定量 PCR 分析发现:正常结肠组织炎症因子表达均很低;相对于正常小鼠结肠组织,当 DSS 诱导小鼠产生结肠炎症后,结肠组织 TNF α mRNA 表达增加 6.81 倍,米糠多糖灌胃小鼠结肠组织 TNF α mRNA 表达下调 29.4% [图 5(a)]。这样就能中断 TNF α 引发的瀑布效应,米糠

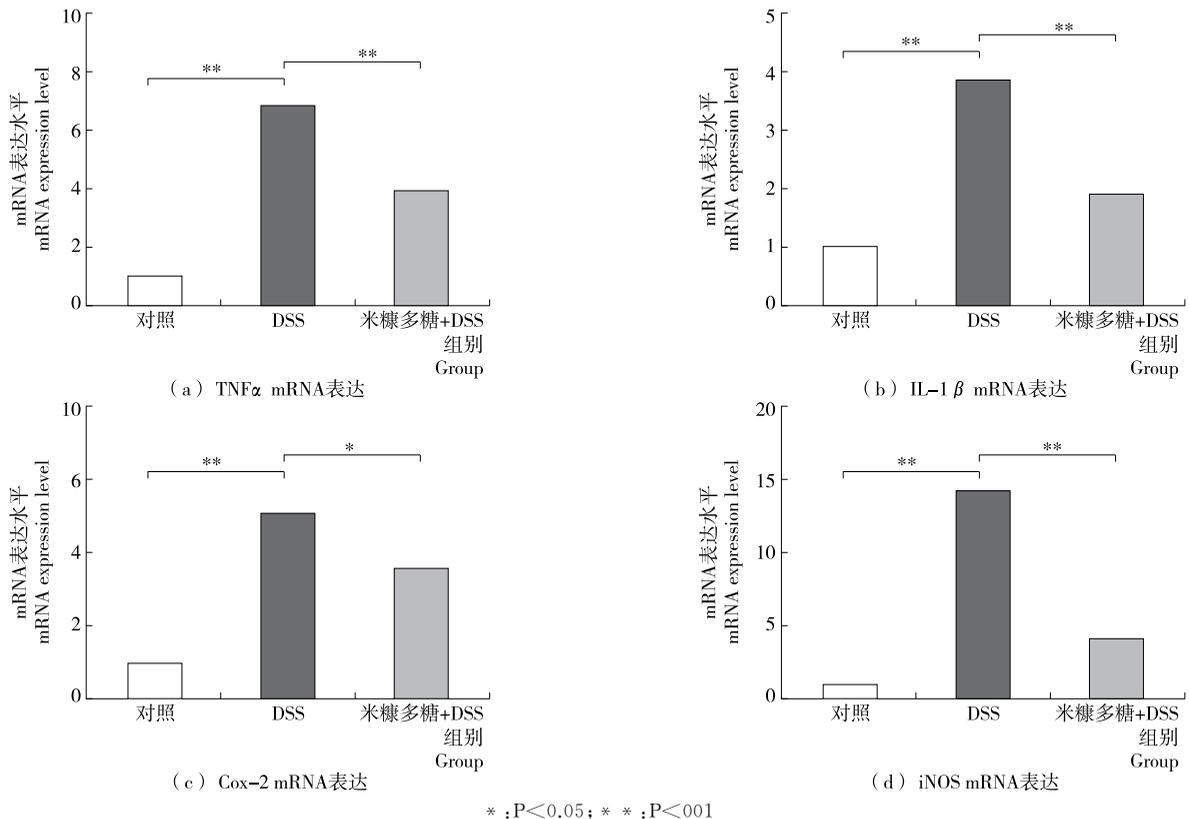


图 5 米糠多糖对小鼠结肠组织炎症因子 mRNA 表达的影响

Figure 5 Effect of rice bran polysaccharide on the mRNA expressions of inflammatory factors in colonic tissues of mice

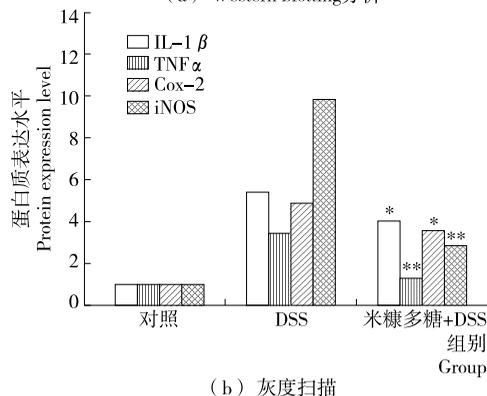
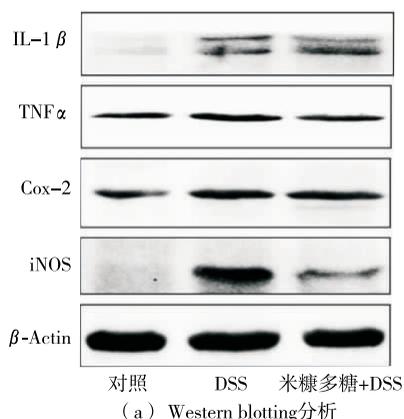
多糖对结肠炎症组织的保护作用可能与减少 TNF α 表达相关。如有报道^[24]采用 siRNA 干预小鼠结肠的 TNF α 表达量,能部分改善结肠炎患者的临床病征。

炎症因子 IL-1 β 也是炎症的主要驱动因子,IL-1 β 主要由浸润结肠黏膜的单核细胞(巨噬细胞)分泌^[25]。IL-1 β 也能与其他的促炎因子协同,引发炎症反应和组织损伤的梯级炎症反应,从而进一步加重炎症^[26]。临床研究也发现结肠炎患者 IL-1 β 明显升高^[27]。本研究发现相对于正常小鼠结肠组织,炎症因子 IL-1 β mRNA 表达在 DSS 损伤组小鼠结肠组织上升了 3.86 倍,米糠多糖下调 IL-1 β mRNA 表达 50.1%^[图 5(b)]。与 TNF α 类似,也能中断 IL-1 β 和其他的细胞因子协同引发的炎症瀑布效应。同时,米糠多糖也可能与部分改善小鼠的便血相关,如用紫草萘醌降低小鼠的 IL-1 β 表达,能促进粪便的形成,减少便血^[28]。

环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, Cox-2)为一种在正常组织中较少表达的诱导酶,而当细胞受到炎症刺激时大量表达。由于 Cox-2 可以快速应答一系列促炎介质和细胞因子,因此,长久以来一直被认为在炎症发生的病理过程中扮演重要角色。Cox-2 mRNA 表达水平在 DSS 损伤组小鼠结肠组织上升了 5.12 倍,米糠多糖下调 Cox-2 mRNA 表达 30.1%^[图 5(c)];试验结果提示米糠多糖能抑制 DSS 诱导小鼠结肠组织炎症的转录。

NO 也是一种炎症介质,可以直接杀灭入侵的细菌,在炎症状态下,可以作为炎症递质起到信号传导作用。在机体处于急性炎症反应的时候,许多中性粒细胞和少量巨噬细胞便会激活诱生型一氧化氮合酶(iNOS),诱导精氨酸生出大量的 NO,在溃疡性结肠炎中主要是 iNOS 起作用,测定结肠组织 iNOS、NO 水平可作为反映溃疡性结肠炎病变程度和判断预后的一个客观指标^[29]。本研究发现结肠组织中 iNOS 有少量的表达,DSS 诱导小鼠结肠组织 iNOS 表达显著上升,米糠多糖能明显抑制 iNOS 表达和结肠组织亚硝酸盐的形成^[图 5(d)]。

通过 Western blotting 进一步分析显示,正常对照组小鼠结肠组织中 IL-1 β 和 iNOS 蛋白表达极低,TNF α 和 Cox-2 蛋白表达较低;DSS 诱导组小鼠结肠组织 IL-1 β 蛋白表达水平增加了 5.47 倍,米糠多糖灌胃使小鼠结肠组织 IL-1 β 蛋白表达水平下降 26.5%^[图 6(a)];炎症因子 TNF α 在 DSS 损伤组小鼠结肠组织中蛋白表达水平上升 3.43 倍,米糠多糖灌胃使小鼠结肠组织 IL-1 β 蛋白表达水平下降 61.8%^[图 6(b)];相对于正常小鼠结肠组织,DSS 损伤组小鼠结肠组织 Cox-2 蛋白表达水平上升 4.85 倍,米糠多糖灌胃使小鼠结肠组织 Cox-2 蛋白表达水平下降 26.4%^[图 6(c)];iNOS 是炎症因子 NO 释放的关键调控酶,在 DSS 损伤组小鼠结肠组织中蛋白表达水平上调了 9.87 倍,米糠多糖灌胃使小鼠结肠组织 iNOS 蛋白表达水



米糠多糖+DSS 组与 DSS 组比较, * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$

图 6 米糠多糖对小鼠结肠组织炎症因子蛋白表达的影响

Figure 6 Effect of rice bran polysaccharide on the protein expressions of inflammatory factors in colonic tissues of mice

平下降达 70.9%^[图 6(d)]。小鼠结肠组织蛋白表达分析进一步证实了米糠多糖能抑制 DSS 诱导小鼠结肠组织炎症因子的表达。

2.6 米糠多糖对 DSS 诱导小鼠结肠组织 MAPK 信号通路的影响

MAPK 是机体最重要的信号传导通路,参与多种生物学功能。MAPK 也是炎症启动和发展的重要信号通路,MAPK 家族包括 ERK1、ERK2、JNK、p38 等成员,其均与炎症的发生、发展密切相关^[30]。为了进一步探讨米糠多糖抗炎性质的机理,研究了米糠多糖对重要炎症信号通路 MAPK 的影响。采用非磷酸化 ERK1/2、JNK 和 p38 抗体 Western blotting 分析发现,对照组、DSS 损伤组和米糠多糖保护组小鼠结肠组织 ERK1/2、JNK 和 p38 表达无明显变化,提示 DSS 诱导并不能调控此 3 种蛋白基因的转录和翻译,同时,米糠多糖灌胃也不能改变小鼠结肠组织 ERK1/2、JNK 和 p38 基因的转录和翻译。采用磷酸化 ERK1/2 抗体 Western blotting 分析发现,DSS 诱导促使小鼠结肠组织 ERK1/2 磷酸化蛋白含量增加,上升

了 2.24 倍,米糠多糖灌胃 ERK1/2 磷酸化蛋白含量下降了 30.8%[图 7(a)];JNK 磷酸化蛋白含量在 DSS 损伤组小鼠结肠组织中蛋白表达水平上升 2.78 倍,米糠多糖灌胃使小鼠结肠组织 JNK 磷酸化蛋白含量下降 51.4% [图 7(b)];相对于 ERK1/2 和 JNK 磷酸化蛋白含量,p38 磷酸化蛋白含量在正常小鼠结肠组织中极低,DSS 损伤组小鼠结肠组织 p38 磷酸化蛋白含量增加了 3.35 倍,米糠多糖灌胃使小鼠结肠组织 Cox-2 蛋白表达水平下降 26.0%[图 7(c)]. ERK1/2、JNK 和 p38 蛋白磷酸化是 MAPK 的激活状态,米糠多糖能抑制结肠组织 ERK1/2、JNK 和 p38 蛋白的磷酸化,说明米糠多糖能抑制 MAPK 信号通路的活化,参与其抗炎作用。MAPK 家族成员能使促转录因子 AP-1(如 c-Jun)和 NF- κ B (p65)的磷酸化,促使转录因子活化和核移位^[31-32]。在炎症因子 IL-1 β 、TNF α 和基因启动子区域,均存在一个或多个 AP-1 和 NF- κ B,调控炎症因子的表达^[33-35]。本研究发现米糠多糖能部分抑制 DSS 诱导的小鼠结肠组织 MAPK 活化,提示米糠多糖可能通过抑制 MAPK 信号通路,下调转录因

子 AP-1 和 NF- κ B 的活性,从而抑制炎症因子表达。

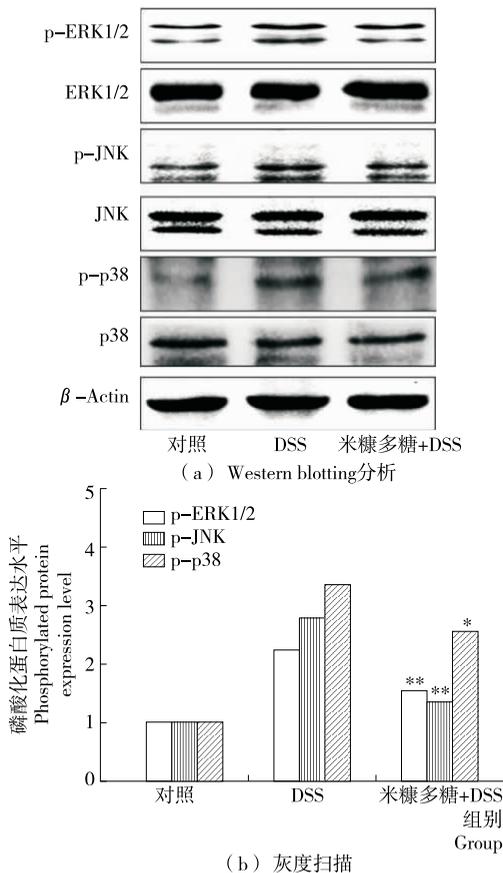
3 结论

米糠多糖无毒副作用且具有抗结肠炎症的作用,为防治结肠炎症提供了新的思路。本研究发现米糠多糖可明显改善 DSS 诱导的结肠炎症小鼠健康状况,减轻 DSS 导致的小鼠结肠组织的损伤,下调结肠中炎症因子的表达,对 DSS 诱导的小鼠结肠炎症具有一定的防治功能,提示添加米糠多糖可能开发相关辅助药物和预防肠炎的功能性食品、保健食品提供科学理论依据。

当前已证实有许多食品来源的多糖具有抗炎作用,但其作用的分子机理尚不清楚^[16]。米糠多糖能抑制 MAPK 信号通路,但 MAPK 通路如何调控炎症因子的表达尚需要进一步研究,同时,米糠多糖如何调控 MAPK 通路,也需要进一步探索。除此之外,多糖是一类结构非常复杂的混合物,不同的分子量组分可能呈现相反的生物功能^[16],因此,多糖的结构差异、分子量大小与免疫调节的关系还需要采用新的技术手段来解决。

参考文献

- [1] 肖云,张迎庆,糜志远. 米糠多糖提取纯化工艺的研究进展[J]. 食品与药品, 2012, 14(6): 448-450.
- [2] 聂莹,罗非君,曾晓楠. 米糠多糖生理功能研究及应用新进展[J]. 粮食与油脂, 2015(11): 10-13.
- [3] 汪艳,吴曙光,周杰,等. 和活性分析[J]. 生命科学研究, 2000, 4(3): 273-277.
- [4] ITO E, TAKEO S, KADO H, et al. Studies on an antitumor polysaccharide RBS derived from rice bran. I. Preparation, physico-chemical properties, and biological activities of RBS [J]. Yakugaku Zasshi, 1985, 105(2): 188-193.
- [5] 朱丽丹. 基于离子液体的米糠多糖硫酸酯化及其抗肿瘤、免疫活性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014: 1-4.
- [6] 朱丽丹,王莉,徐逸木,等. 米糠多糖及硫酸酯化米糠多糖的体外免疫应答和抗肿瘤活性研究[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(3): 35-40.
- [7] 汪艳,吴曙光,徐伟,等. 米糠多糖抗肿瘤作用及其作用的部分机制[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(1): 70-72.
- [8] 姜元荣,姚惠源,王勇,等. 米糠多糖 RBP 及 RBP-II 对小鼠体外细胞因子分泌的影响研究[J]. 粮食科技与经济, 2014, 39(4): 61-63.
- [9] 魏明,王晨,杨超英,等. 酶法协同超声波提取米糠多糖及其抗氧化活性研究[J]. 中国油脂, 2015, 40(1): 78-82.
- [10] 张秀媛,何扩,王丽霞,等. 张杂谷米糠多糖微波提取及其对肥胖大鼠肝脏自由基代谢的影响[J]. 中国粮油学报, 2016, 31(5): 38-42.
- [11] 丘成楨. 米糠多糖与黄芪多糖单糖组分鉴定及对机体免疫功能的影响[J]. 中国家禽, 2015, 37(10): 57-60.
- [12] 许旭. 米糠多糖的提取、免疫调节活性及其口含片制备工艺研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2014: 42-43.



米糠多糖+DSS组与DSS组比较,* :P<0.05; ** : P<0.001

图 7 米糠多糖对小鼠结肠组织 MAPK 信号通路的影响

Figure 7 Effect of rice bran polysaccharide on MAPK signaling pathway in colonic tissues of mice

- [13] KAHLON T, SAUNDERS R, CHOW F, et al. Influence of rice bran, oat bran and wheat bran on cholesterol and tri-glycerides in hamsters [J]. *Cereal Chemistry*, 1990, 67 (5): 439-443.
- [14] 胡忠泽, 金光明, 王立克, 等. 米糠多糖对糖尿病小鼠的降血糖作用研究[J]. *中国粮油学报*, 2006, 21(4): 21-24.
- [15] HU Tao, LIN Qin-lu, GUO Ting, et al. Polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* mycelia exerts anti-inflammatory effects via MAPK and PPAR signaling pathways[J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 200: 487-497.
- [16] NIE Ying, LIN Qin-lu, LUO Fei-jun. Effects of non-starch polysaccharides on inflammatory bowel disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(7): 1 372-1 395.
- [17] CASANOVA M J, CHAPARRO M, DOMENECH E, et al. Safety of thiopurines and anti-TNF- α drugs during pregnancy in patients with inflammatory bowel disease[J]. *Am J Gastroenterol*, 2013, 108(3): 433-440.
- [18] GRIVENNIKOV S, GRETEN F, KARIN M. Immunity, inflammation, and cancer[J]. *Cell*, 2010, 140(6): 883-899.
- [19] XU Bei-lei, ZHANG Gui-jun, JI Yu-bin. Active components alignment of Gegenqinlian decoction protects ulcerative colitis by attenuating inflammatory and oxidative stress[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 162: 253-60.
- [20] MIRANDA K M, ESPEY M G, WINK D A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite[J]. *Nitric Oxide*, 2001, 5(1): 62-71.
- [21] LIU Bo, LIN Qin-lu, YANG Tao, et al. Oat β -glucan ameliorates dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis in mice[J]. *Food Func*, 2015, 6(11): 3 454-3 463.
- [22] CHAPARRO M, GUERRA I, MUNOZ-LINARES P, et al. Systematic review: antibodies and anti-TNF- α levels in inflammatory bowel disease [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2012, 35(9): 971-986.
- [23] MCCARTHY J, O'NEILL MJ, BOURRE L, et al. Gene silencing of TNF- α in a murine model of acute colitis using a modified cyclodextrin delivery system[J]. *J Control Release*, 2013, 168(1): 28-34.
- [24] MCALINDON M E, HAWKEY C J, MAHIDA Y R. Expression of interleukin 1 beta and interleukin 1 beta converting enzyme by intestinal macrophages in health and inflammatory bowel disease[J]. *Gut*, 1998, 42(2): 214-219.
- [25] DINARELLO C A, WOLFF S M. The role of interleukin-1 in disease[J]. *N Engl J Med*, 1993, 328(2): 106-113.
- [26] LUDWICZEK O, VANNIER E, BORGGRAEFE I, et al. Imbalance between interleukin-1 agonists and antagonists: relationship to severity of inflammatory bowel disease[J]. *Clin Exp Immunol*, 2004, 138(2): 323-329.
- [27] ANDUJAR I, RIOS J L, GINER R M, et al. Beneficial effect of shikonin on experimental colitis induced by dextran sulfate sodium in BALB/c mice[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2 012: 271-606.
- [28] THOMAS S, METZKE D, SCHMITZ J, et al. Anti-inflammatory effects of *Saccharomyces boulardii* mediated by myeloid dendritic cells from patients with Crohn's disease and ulcerative colitis[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011, 301(6): G1 083-G1 092.
- [29] SEO M J, LEE Y J, HWANG J H, et al. The inhibitory effects of quercetin on obesity and obesity-induced inflammation by regulation of MAPK signaling[J]. *J Nutr Biochem*, 2015, 26(11): 1 308-1 316.
- [30] EMAMI H, VUCIC E, SUBRAMANIAN S, et al. The effect of BMS-582949, a P38 mitogen-activated protein kinase (P38 MAPK) inhibitor on arterial inflammation; a multicenter FDG-PET trial [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 240 (2): 490-496.
- [31] SHI Li-ming, LIN Qin-lu, LI Xin-hua, et al. Alliin, a garlic organosulfur compound, ameliorates gut inflammation through MAPK-NF- κ B/AP-1/STAT-1 inactivation and PPAR- γ activation[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2017, 61 (9): 1-12.
- [32] GUO Tian-yi, LIN Qin-lu, LI Xin-hua, et al. Octacosanol attenuates inflammation in both RAW264. 7 macrophages and a mouse model of colitis[J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(18): 3 647-3 658.
- [33] ROMAN J, RITZENTHALER J D, FENTON M J, et al. Transcriptional regulation of the human interleukin 1beta gene by fibronectin: role of protein kinase C and activator protein 1 (AP-1) [J]. *Cytokine*, 2000, 12 (11): 1 581-1 596.
- [34] RAHMAN I. Regulation of nuclear factor-kappa B, activator protein-1, and glutathione levels by tumor necrosis factor-alpha and dexamethasone in alveolar epithelial cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 60(8): 1 041-1 049.
- [35] BOND M, FABUNMI R P, BAKER A H, et al. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B[J]. *FEBS Lett*, 1998, 435(1): 29-34.
- (本文系 2018 年湖南省研究生创新论坛一等奖论文)