



(10) 授权公告号 CN 116262124 B

(45) 授权公告日 2025. 02. 25

(21) 申请号 202310116318.5

(22) 申请日 2023.02.15

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 116262124 A

(43) 申请公布日 2023.06.16

(73) 专利权人 浙江中医药大学

地址 310051 浙江省杭州市滨江区滨文路
548号

(72) 发明人 周芳美 周铭源 朱炳祺 陈宇驰
丁志山

(74) 专利代理机构 杭州杭诚专利事务有限公
司 33109

专利代理师 施雨婧

(51) Int. Cl.

A61K 31/715 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

A61K 36/87 (2006.01)

(56) 对比文件

KR 20170110381 A, 2017.10.11

Wang, J.等.Gut microbiota and
transcriptome profiling revealed the
protective effect of aqueous extract of

Tetrastigma hemsleyanum leaves on
ulcerative colitis in mice.Current
research in food science.2022,第6卷第
100426页.

Wang, J.等.Gut microbiota and
transcriptome profiling revealed the
protective effect of aqueous extract of
Tetrastigma hemsleyanum leaves on
ulcerative colitis in mice.Current
research in food science.2022,第6卷第
100426页.

吕兰.三叶青多糖提取工艺与抗肝损伤作用
研究.中国硕士学位论文全文数据库医药卫生科
技辑.2022, (第6期), 第E057-176页.

吕兰.三叶青多糖提取工艺与抗肝损伤作用
研究.中国硕士学位论文全文数据库医药卫生科
技辑.2022, (第6期), 第E057-176页. (续)

审查员 林丹丹

权利要求书1页 说明书10页 附图11页

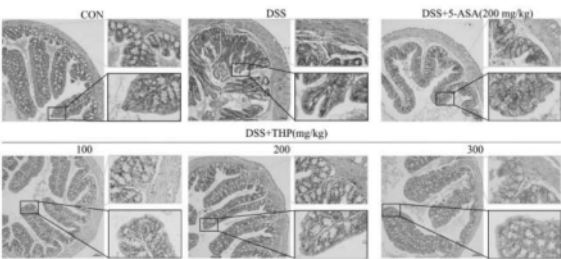
(54) 发明名称

三叶青多糖在制备防治炎症性肠病药物中
的应用

(57) 摘要

本发明涉及医药技术领域,公开了三叶青多
糖在制备防治炎症性肠病药物中的应用.本发明
首次发现三叶青多糖能够防治炎症性肠病,发挥
减轻结肠粘膜内炎性细胞的浸润、修复肠粘膜屏
障、缓解肠壁水肿等作用,这拓宽了三叶青多糖
的应用范围,也为治疗炎症性肠病提供了新途
径.此外,本发明首次发现三叶青多糖能够在体
内和体外提高结肠中紧密连接蛋白如Claudin-
1、Occludin、ZO-1以及G蛋白偶联受体如GPR41、

GPR43的表达水平,不仅能够炎症性肠病防治
中发挥作用,还有望为其相关疾病的治疗及其生
理功能的研究提供新的途径。



[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

Zhou, Fangmei等. Antitumor effects of polysaccharides from *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg via regulation of intestinal flora and enhancing immunomodulatory effects in vivo. *Frontiers in immunology*. 2022, 第13卷第1009530页.

Zhou, Fangmei等. Antitumor effects of

polysaccharides from *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg via regulation of intestinal flora and enhancing immunomodulatory effects in vivo. *Frontiers in immunology*. 2022, 第13卷第1009530页.

王碧旭等. 三叶青地上部分提取物对H22荷瘤小鼠的抗转移作用. *中成药*. 2022, 第44卷 (第11期), 第3671-3676页.

1. 三叶青多糖在制备防治溃疡性结肠炎药物中的应用, 其特征在于, 所述三叶青多糖的制备步骤包括: 取三叶青药材粉碎, 以95%乙醇水溶液75~85℃冷浸提取2次, 药渣于室温下置通风处晾干, 95~100℃热水提取2次, 过滤, 合并提取液, 浓缩, 离心, 上清液以sevage法去游离蛋白, 离心, 上清液浓缩后加95%乙醇水溶液使多糖沉淀, 离心, 沉淀冷冻干燥得到总多糖, 即为三叶青多糖。

2. 如权利要求1所述的应用, 其特征在于, 所述药物用于保护肠道粘膜屏障完整或修复肠粘膜屏障损伤。

3. 如权利要求1所述的应用, 其特征在于, 所述药物用于缓解溃疡性结肠炎导致的肠壁水肿, 或者用于缓解溃疡性结肠炎导致的结肠长度缩短, 或者用于减小溃疡性结肠炎导致的肠道菌群变化。

4. 如权利要求1所述的应用, 其特征在于, 所述药物用于减少溃疡性结肠炎导致的体重下降。

5. 如权利要求1所述的应用, 其特征在于, 所述药物用于降低结肠组织中促炎因子的水平。

6. 如权利要求1所述的应用, 其特征在于, 用于提高结肠组织中G蛋白偶联受体、黏蛋白2、分泌型免疫球蛋白A、 β -防御素或紧密连接蛋白的水平。

7. 如权利要求5所述的应用, 其特征在于, 所述促炎因子包括IL-6、TNF- α 和IFN- γ 中的一种或多种。

8. 如权利要求6所述的应用, 其特征在于, 所述G蛋白偶联受体包括GPR41和/或GPR43。

9. 如权利要求6所述的应用, 其特征在于, 所述紧密连接蛋白包括Claudin-1、Occludin和ZO-1中的一种或多种。

三叶青多糖在制备防治炎症性肠病药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医药技术领域,尤其涉及三叶青多糖在制备防治炎症性肠病药物中的应用。

背景技术

[0002] 炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种慢性、过度炎症引起的肠道免疫功能障碍疾病,以肠道炎性反复发作和肠黏膜损伤为特征,主要包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)。IBD死亡率低但致残率高,难以根治,严重的甚至会发生癌变,对人体健康构成严重威胁。对于IBD的治疗,临床药物以水杨酸(ASA)类、糖皮质激素(GC)类、免疫抑制(ISD)类药物为主,但是只能缓解症状,无法起到根治的效果,且长期服药,不良反应多。迄今为止仍有很大比例的患者对一线和二线药物治疗IBD无反应。因此,制备能深度缓解甚至治愈IBD的药物具有重要的临床意义。

[0003] 研究已证实肠黏膜屏障功能在IBD发生发展中起着重要作用。临床实验表明,肠道通透性增加是IBD的早期症状,这使得致敏性物质(微生物、蛋白质颗粒)进入肠道组织,接着肠道IECs紧密连接破坏以及免疫细胞的浸润,使免疫系统产生过度应答,导致炎症反复发生,诱导IBD的进一步发展。肠黏膜屏障功能障碍已成为IBD患者复发和产生严重并发症的重要预测指标。此外,肠道菌群在肠道修复及再生过程中起到关键的调节作用。益生菌可促进肠上皮细胞紧密连接蛋白的表达,减少上皮细胞的凋亡,调节肠黏液层的厚度,增强肠屏障功能。而肠道内致病菌直接侵袭肠上皮细胞,影响肠上皮细胞的能量代谢,导致上皮细胞损伤,分泌的肠毒素使肠上皮通透性增高,分泌的免疫抑制性蛋白导致黏膜免疫失调,诱导肠道炎症的发生。这些研究表明调控肠道菌群,纠正免疫功能紊乱,改善炎症反应,修复肠黏膜屏障为IBD治疗提供了新的治疗靶点。

[0004] 中医药临床治疗IBD具有疗效稳定、不良反应和复发率低等优点。三叶青学名为三叶崖爬藤(Tetrastigma hemsleyanum Diels et Gilg),是我国特有的葡萄科崖爬藤属珍稀药用植物,主要分布于浙江、广西、江西等少数省份,以地下块根或全草入药。目前,对于三叶青药用价值的研究重点多为黄酮、乙酸乙酯提取物,关于其中多糖成分的关注较少,并且,关于三叶青多糖的研究多集中在抗肿瘤、抗肝损伤方面,尚未报道过其具有防治炎症性肠病的作用。

发明内容

[0005] 为了解决上述技术问题,本发明提供了三叶青多糖在制备防治炎症性肠病药物中的应用。本发明首次发现三叶青多糖具有防治炎症性肠病的作用,安全有效,拓宽了三叶青多糖的应用范围,也为炎症性肠病的治疗提供了新的途径。

[0006] 本发明的具体技术方案为:

[0007] 第一方面,本发明提供了三叶青多糖在制备防治炎症性肠病药物中的应用。

[0008] 本发明团队研究发现,三叶青多糖能够防治炎症性肠病(IBD)。实验证据和具体体

现如下:

[0009] (1) 体内试验结果表明:三叶青多糖能够缓解IBD中的结肠损伤,减轻体重下降、结肠长度缩短等症状;进一步病理学检测发现,三叶青多糖可减弱IBD中的肠壁水肿程度、肠壁炎症浸润程度以及粘膜上皮缺失程度。

[0010] (2) 体内试验结果表明:三叶青多糖会影响结肠炎症性细胞因子的水平,可抑制促炎因子(如IL-6、TNF- α 、IFN- γ)的表达水平。

[0011] (3) 体内试验结果表明:三叶青多糖能够提高结肠组织中黏蛋白2(MUC-2)、 β -防御素和分泌型免疫球蛋白A的水平。已有研究表明,MUC-2、 β -防御素和SIgA可以反映肠道化学屏障功能;其中,MUC-2是一种主要附着在肠道黏液层表面上的高度糖基化修饰的大分子黏液状糖蛋白物质,MUC-2的蛋白主体不仅可以润滑和保护肠黏膜上皮,并且附着在黏蛋白表面上的糖链还可以参与细胞间的信号转导和肠黏膜相关免疫因子的调控。

[0012] (4) 体内试验结果表明:三叶青多糖能够减轻IBD中肠道菌群结构的变化,增加厚壁菌门和拟杆菌门(如乳酸菌、瘤胃球菌、真杆菌属、毛螺菌属等)细菌的丰度,促使肠道菌群恢复到正常情况。而肠道菌群在肠道修复及再生过程中起到关键的调节作用,因此,通过调控肠道菌群结构,三叶青多糖能够发挥防治IBD的作用。

[0013] (5) 体内和体外试验结果表明:三叶青多糖能够提高结肠紧密连接蛋白(如Claudin-1、Occludin、ZO-1)的表达水平;并且,在体外对Caco-2细胞的实验表明,三叶青多糖对Caco-2细胞的毒副作用较小。细胞间紧密连接蛋白(如Claudin-1、Occludin、ZO-1)可以反映小鼠肠道屏障的完整性,其表达在细胞膜上,与紧密连接密切相关,紧密连接位于上皮细胞间的顶端,是维持粘膜通透性的重要组成部分。因此,通过提高结肠紧密连接蛋白的表达水平,三叶青多糖能够缓解IBD中的肠粘膜屏障损伤。

[0014] (6) 体内和体外试验结果表明:三叶青多糖能够激活结肠组织中G蛋白偶联受体(如GPR41、GPR43)的表达;并且,在体外对Caco-2细胞的实验表明,三叶青多糖对Caco-2细胞的毒副作用较小。提示三叶青多糖可能是通过GPR41/43信号通路,来应对肠道菌群组成和SCFAs的变化而产生抗炎作用,以及发挥修复结肠细胞紧密连接的作用。

[0015] 作为优选,所述炎症性肠病是急性炎症性肠病。

[0016] 作为优选,所述药物用于保护肠道粘膜屏障完整或修复肠粘膜屏障损伤,或者用于缓解炎症性肠病导致的肠壁水肿,或者用于缓解炎症性肠病导致的结肠长度缩短,或者用于减少炎症性肠病导致的体重下降,或者用于减小炎症性肠病导致的肠道菌群变化。

[0017] 进一步地,所述药物用于增加肠道菌群中乳酸菌、瘤胃球菌、真杆菌属和毛螺菌属中的一种或多种细菌的丰度。

[0018] 作为优选,所述药物用于降低结肠组织中促炎因子的水平,或者用于提高结肠组织中G蛋白偶联受体、黏蛋白2、分泌型免疫球蛋白A、 β -防御素或紧密连接蛋白的水平。

[0019] 进一步地,所述促炎因子包括IL-6、TNF- α 和IFN- γ 中的一种或多种。

[0020] 进一步地,所述G蛋白偶联受体包括GPR41和/或GPR43。

[0021] 进一步地,所述紧密连接蛋白包括Claudin-1、Occludin和ZO-1中的一种或多种。

[0022] 作为优选,所述三叶青多糖的制备方法包括以下步骤:取三叶青药材粉碎,用乙醇水溶液浸提后,取药渣,进行水提,收集水提获得的提取液,浓缩后,分离出上清液,去除游离蛋白,再加入沉淀剂使多糖沉淀,分离沉淀并干燥,获得三叶青多糖。

[0023] 采用本发明的方法制备的三叶青多糖中,具有较高的糖和糖醛酸含量,有利于其发挥较好的防治炎症性肠病的作用。

[0024] 进一步地,所述浸提的温度为75~85℃。

[0025] 进一步地,所述水提的温度为95~100℃。

[0026] 第二方面,本发明提供了三叶青多糖在制备体内调节结肠组织中G蛋白偶联受体、黏蛋白2、分泌型免疫球蛋白A、 β -防御素或紧密连接蛋白水平的药物中的应用。

[0027] 本发明发现,三叶青多糖能够增加结肠组织中G蛋白偶联受体(如GPR41、GPR43)的表达。已有研究表明,G蛋白偶联受体GPR41和GPR43能够在瘦素水平、肠道对营养物质的吸收、体内脂肪形成以及脊柱动物的生长发育等方面发挥调节作用。因此,除了防治炎症性肠病以外,通过调节结肠组织中G蛋白偶联受体水平,三叶青多糖还有望用于改善肥胖、动物品种改良和选种等领域。

[0028] 作为优选,所述促炎因子包括IL-6、TNF- α 和IFN- γ 中的一种或多种。

[0029] 作为优选,所述G蛋白偶联受体包括GPR41和/或GPR43。

[0030] 作为优选,所述紧密连接蛋白包括Claudin-1、Occludin和ZO-1中的一种或多种。

[0031] 第三方面,本发明提供了三叶青多糖在体外调节结肠组织中G蛋白偶联受体或紧密连接蛋白水平中的应用。

[0032] 在体外细胞学实验中发现,三叶青多糖能够提高结肠组织中G蛋白偶联受体(如GPR41、GPR43)和紧密连接蛋白的表达水平(如Claudin-1、Occludin、ZO-1),这能为结肠组织中G蛋白偶联受体和紧密连接蛋白生理功能的研究提供新的工具。

[0033] 作为优选,所述G蛋白偶联受体包括GPR41和/或GPR43。

[0034] 作为优选,所述紧密连接蛋白包括Claudin-1、Occludin和ZO-1中的一种或多种。

[0035] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0036] (1) 本发明首次发现三叶青多糖能够防治炎症性肠病,发挥减轻结肠粘膜内炎性细胞的浸润、修复肠粘膜屏障、缓解肠壁水肿等作用,这拓宽了三叶青多糖的应用范围,也为治疗炎症性肠病提供了新途径;

[0037] (2) 本发明首次发现三叶青多糖能够在体内和体外提高结肠中紧密连接蛋白(如Claudin-1、Occludin、ZO-1)和G蛋白偶联受体(如GPR41、GPR43)的表达水平,有望为其相关疾病的治疗及其生理功能的研究提供新的途径。

附图说明

[0038] 图1是三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠结肠组织HE染色病理变化的影响(40 $\times$)。

[0039] 图2是三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠体重的影响。其中,*表示 $p<0.05$,**表示 $p<0.01$ 。

[0040] 图3是三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠结肠长度的影响。其中,*表示 $p<0.05$,**表示 $p<0.01$ 。

[0041] 图4是三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠结肠组织PAS染色的影响(40 $\times$)。

[0042] 图5是三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠MUC-2、SIgA、 β -防御素的表达的影响。其中,图5(A)是三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠MUC-2表达的影响;图5(B)是三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠SIgA表达的影响;图5(C)是三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠 β -防御素表

达的影响。图5(A) ~ 图5(C) 中,*表示 $p<0.05$,**表示 $p<0.01$ 。

[0043] 图6是三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠血清中细胞因子含量的影响。其中,图6(A)是三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠血清TNF- α 含量的影响;图6(B)是三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠血清IL-6含量的影响;图6(C)是三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠血清INF- γ 含量的影响。图6(A) ~ 图6(C) 中,*表示 $p<0.05$,**表示 $p<0.01$ 。

[0044] 图7是三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠结肠紧密连接蛋白(Claudin-1、Occludin、ZO-1) 蛋白表达的影响。其中,*表示 $p<0.05$,**表示 $p<0.01$ 。

[0045] 图8是三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠结肠组织中Claudin-1表达的影响(免疫荧光)。

[0046] 图9是三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠结肠组织中Occludin表达的影响(免疫荧光)。

[0047] 图10是三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠结肠组织中ZO-1表达的影响(免疫荧光)。

[0048] 图11是三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠粪便菌群组成的影响(物种组成)。其中,图11(A)是粪便菌群在门水平的物种组成图;图11(B)是粪便菌群在属水平的物种组成图。

[0049] 图12是三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠粪便菌群组成的影响(门和属水平的统计图)。

[0050] 图13是三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠粪便短链脂肪酸含量的影响。其中,图13(A)是三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠粪便乙酸含量的影响;图13(B)是三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠粪便丙酸含量的影响;图13(C)是三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠粪便丁酸含量的影响;图13(D)是三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠粪便异丁酸含量的影响;图13(E)是三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠粪便戊酸含量的影响;图13(F)是三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠粪便异戊酸含量的影响。图13(A) ~ 13(F) 中,*表示 $p<0.05$,**表示 $p<0.01$ 。

[0051] 图14是三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠结肠组织G蛋白偶联受体(GPR41、GPR43) 表达水平的影响。

[0052] 图15是三叶青多糖发酵液对Caco-2细胞活力的影响,其中,*表示 $p<0.05$,**表示 $p<0.01$ 。

[0053] 图16是三叶青多糖发酵液对LPS刺激的Caco-2细胞紧密连接蛋白和G蛋白偶联受体表达的影响。其中,图16(A)是三叶青多糖发酵液对LPS刺激的Caco-2细胞claudin-1mRNA水平的影响;图16(B)是三叶青多糖发酵液对LPS刺激的Caco-2细胞occludin mRNA水平的影响;图16(C)是三叶青多糖发酵液对LPS刺激的Caco-2细胞ZO-1mRNA水平的影响;图16(D)是三叶青多糖发酵液对LPS刺激的Caco-2细胞GPR41 mRNA水平的影响;图16(E)是三叶青多糖发酵液对LPS刺激的Caco-2细胞GPR43 mRNA水平的影响;图16(F)是三叶青多糖发酵液对GPRs抑制剂刺激的Caco-2细胞GPR41 mRNA水平的影响;图16(G)是三叶青多糖发酵液对GPRs抑制剂刺激的Caco-2细胞GPR43 mRNA水平的影响。图16(A) ~ 16(G) 中,*表示 $p<0.05$,**表示 $p<0.01$ 。

具体实施方式

[0054] 下面结合实施例对本发明作进一步的描述。

[0055] 应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围,在不背离发

明构思的精神和范围下,本领域技术人员能够想到的变化和优点都被包括在本发明中,并且以所附的权利要求及其任何等同物为本发明的保护范围。

[0056] 除非另有描述,本发明的实施将采用细胞生物学、分子生物学、基因工程技术等常规技术,这些均是本领域技术人员所知的。

[0057] 总实施例

[0058] 三叶青多糖在制备防治炎症性肠病药物中的应用。

[0059] 作为一种具体实施方式,所述炎症性肠病是急性炎症性肠病。

[0060] 作为一种具体实施方式,所述药物用于保护肠道粘膜屏障完整或修复肠粘膜屏障损伤,或者用于缓解炎症性肠病导致的肠壁水肿,或者用于缓解炎症性肠病导致的结肠长度缩短,或者用于减少炎症性肠病导致的体重下降,或者用于减小炎症性肠病导致的肠道菌群变化。

[0061] 进一步地,所述药物用于增加肠道菌群中乳酸菌、瘤胃球菌、真杆菌属和毛螺菌属中的一种或多种细菌的丰度。

[0062] 作为一种具体实施方式,所述药物用于降低结肠组织中促炎因子的水平,或者用于提高结肠组织中G蛋白偶联受体、黏蛋白2、分泌型免疫球蛋白A、 β -防御素或紧密连接蛋白的水平。

[0063] 进一步地,所述促炎因子包括IL-6、TNF- α 和IFN- γ 中的一种或多种。

[0064] 进一步地,所述G蛋白偶联受体包括GPR41和/或GPR43。

[0065] 进一步地,所述紧密连接蛋白包括Claudin-1、Occludin和ZO-1中的一种或多种。

[0066] 作为一种具体实施方式,所述三叶青多糖的制备方法包括以下步骤:取三叶青药材粉碎,用乙醇水溶液75~85℃浸提后,取药渣,进行95~100℃水提,收集水提获得的提取液,浓缩后,分离出上清液,去除游离蛋白,再加入沉淀剂使多糖沉淀,分离沉淀并干燥,获得三叶青多糖。

[0067] 三叶青多糖在制备体内调节结肠组织中G蛋白偶联受体、黏蛋白2、分泌型免疫球蛋白A、 β -防御素或紧密连接蛋白水平的药物中的应用。

[0068] 作为一种具体实施方式,所述促炎因子包括IL-6、TNF- α 和IFN- γ 中的一种或多种。

[0069] 作为一种具体实施方式,所述G蛋白偶联受体包括GPR41和/或GPR43。

[0070] 作为一种具体实施方式,所述紧密连接蛋白包括Claudin-1、Occludin和ZO-1中的一种或多种。

[0071] 三叶青多糖在体外调节结肠组织中G蛋白偶联受体或紧密连接蛋白水平中的应用。

[0072] 作为一种具体实施方式,所述G蛋白偶联受体包括GPR41和/或GPR43。

[0073] 作为一种具体实施方式,所述紧密连接蛋白包括Claudin-1、Occludin和ZO-1中的一种或多种。

[0074] 实施例1:三叶青多糖的制备

[0075] 取三叶青药材100g,粉碎,以95% (v/v) 乙醇水溶液冷浸(温度为80℃)提取2次,药渣于室温下置通风处晾干,然后用热水(温度为100℃)提取2次,过滤,合并提取液,浓缩,离心,上清液以sevage法去游离蛋白,离心,上清液浓缩至小体积加95% (v/v) 乙醇水溶液,离

心,沉淀冷冻干燥得到总多糖,即为三叶青多糖。

[0076] 采用硫酸-苯酚法测得三叶青多糖中的糖含量为39.6%;三叶青多糖中的糖醛酸含量为51.6%;三叶青多糖中的蛋白质含量为0.93%。

[0077] 实施例2:三叶青多糖缓解炎症性肠病的药效试验

[0078] 2.1实验材料

[0079] 2.1.1实验动物及药品

[0080] C57BL/6雄性小鼠40只,体重16~18g,购于浙江中医药大学动物实验中心,动物合格证号:SYXK(浙)2018-0012。实验动物分笼饲养,每3天更换一次垫料,适应性饲养2天,实验期间自由饮水和进食。饲养环境温度为 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$,相对湿度为60%,每天12小时光照和12小时黑夜循环。

[0081] 三叶青多糖,即由实施例1从三叶青中提取的多糖。

[0082] 2.1.2实验试剂和仪器化学试剂:DSS(葡聚糖硫酸钠,MP Biomedicals,LOT NO:116531050),PBS缓冲液,分析纯甲醛溶液,10%福尔马林。氯化钠,氯化钾,磷酸氢二钠,磷酸二氢钾(由国药集团化学试剂有限公司提供)。

[0083] 试剂盒:BCA蛋白浓度检测试剂盒(碧云天生物科技有限公司,批号P0012),小鼠MUC-2酶联免疫试剂盒(武汉酶免疫生物技术有限公司,MM-44508M1),小鼠SIgA酶联免疫试剂盒(武汉酶免疫生物技术有限公司,MM-0040M1),小鼠 β -防御素酶联免疫试剂盒(武汉酶免疫生物技术有限公司,MM-1116M1)。

[0084] 实验仪器:FA2204电子天平(上海力辰邦西仪器科技有限公司),微孔板分光光度计(bio-tek),Allegra64R台式高速冷冻离心机(Beckman库尔特商贸中国有限公司),移液枪,涡旋仪,迷你微量离心机。

[0085] 实验器械:弯头镊,手术剪,烧杯,量筒,EP管,离心管。

[0086] 2.1.3药品配置

[0087] 2.1.3.1三叶青多糖悬液制备

[0088] 用电子天平称量10、20、30mg三叶青多糖粉末倒入15mL离心管中,加入双蒸水,定容至10mL;超声溶解,配制终浓度为10、20、30mg/mL工作液,置于 4°C 冰箱中,每次使用前恢复室温,涡旋混匀。

[0089] 2.1.3.2DSS溶液配制

[0090] 称量12.5g DSS粉末,倒入1000mL烧杯中,加双蒸水至500mL,搅拌至彻底溶解,配置成终浓度为2.5%的DSS溶液,每两天重新配置,给动物换上新配的溶液。

[0091] 2.1.3.3组织固定液配制

[0092] 用量筒量取50mL分析纯甲醛溶液至广口瓶,再加入配制的PBS缓冲液450mL,得500mL4%甲醛溶液。

[0093] 2.2实验方法

[0094] 2.2.1动物分组及模型建立

[0095] C57BL/6小鼠40只,随机分为6组:CON组为正常对照组;DSS组为DSS模型组;DSS+5-ASA组为5-氨基水杨酸阳性对照组;DSS+THP-L组为三叶青多糖低剂量组(100mg/kg);DSS+THP-M组为三叶青多糖中剂量组(200mg/kg);DSS+THP-H组为三叶青多糖高剂量组(300mg/kg)。除DSS组10只外,每组6只;除CON组外的所有组动物的饮用水换成含有2.5%DSS的水溶

液,DSS+5-ASA和DSS+THP-L/M/H组灌胃给药,剂量分别为300mg/kg、100mg/kg、200mg/kg、300mg/kg;同时CON组与DSS组给予灌胃等量双蒸水,一天给药1次,连续给药7d。

[0096] 2.2.2实验过程

[0097] 每天观察记录小鼠活动、进食、精神状态、体重、粪便状态和死亡等情况;造模结束7天后,称量体重,摘眼球取血,剪下盲肠与结肠,结肠记录下长度并拍照保存,剪取连接盲肠一侧的部分结肠置于10%福尔马林中;将剩下的结肠置于-80℃保存。

[0098] 2.2.3动物分组及模型建立

[0099] 小鼠解剖后选取靠近盲肠一侧的结肠,剪下大约0.5cm长度的组织,浸泡于10%福尔马林固定,固定组织切片脱水,石蜡包埋。HE染色:先将样品水化,然后用苏木精与伊红染色,最后再对样品脱水;PAS染色:将切片水化,用过碘酸与雪夫氏液染色,最后脱水;免疫荧光:在提取抗原后,在4℃下分别用Claudin-1、Occludin、ZO-1孵育肠切片,37℃水浴用二抗结合抗体孵育30min,切片在倒置显微镜下观察标本并拍照。

[0100] 2.2.4肠组织匀浆制备及MUC-2、SIgA、 β -防御素测定

[0101] 称量约50mg结肠组织于2mL EP管中,加500 μ L PBS缓冲液,用匀浆机匀浆,将匀浆液吸出到新的1.5mL EP管中,进行离心,条件为3500rpm,10min,离心后的上清分装到0.6mL EP管中,每管装100 μ L,做好标记,置于-80℃贮存;每个样品取出一管肠匀浆液,应用ELISA法(参照MUC-2、SIgA、 β -防御素试剂盒说明书)测定肠匀浆上清中MUC-2、SIgA、 β -防御素的含量。

[0102] 2.2.5肠组织Claudin-1、Occludin、ZO-1蛋白WB检测小鼠结肠组织用RIPA裂解液裂解提取蛋白,蛋白质经过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转到聚偏氟乙烯膜(PVDF膜);用碧云天封闭液封闭1h,室温下用相应抗体孵育过夜,用二抗孵育1h,用显色剂在Bio-Rad凝胶成像仪下显色。

[0103] 2.2.6高通量测序技术检测小鼠粪便肠道菌群

[0104] 无菌采集每只小鼠粪便,置液氮冻透后,送检至上海美吉生物有限公司。

[0105] 2.2.7高效气相色谱检测小鼠粪便肠道短链脂肪酸含量

[0106] 取100mg粪便样品置于10mL离心管中,加入1.6mL去离子水溶解,涡旋振荡2min,加入0.4mL的硫酸(50%硫酸溶液)和1.5mL乙醚,250r/min的摇床中摇晃45min、3000r/min离心5min。取上清液于无菌试管中,加入无水氯化钙在0.22 μ m滤膜中脱水,用乙醚定容至1mL后进样,采用气相色谱检测SCFAs。

[0107] 2.2.8肠组织G蛋白偶联受体GPR41、GPR43蛋白WB检测小鼠结肠组织用RIPA裂解液裂解提取蛋白,蛋白质经过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转到聚偏氟乙烯膜(PVDF膜);用碧云天封闭液封闭1h,室温下用相应抗体孵育过夜,用二抗孵育1h,用显色剂在Bio-Rad凝胶成像仪下显色。

[0108] 2.2.9数据统计

[0109] 计量资料均用均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD),各组间差异比较用方差分析检验,两两比较用单因素方差分析(one-way ANOVA),以 $p < 0.05$ 判断统计学意义,“#”表示与正常对照组相比 $p < 0.05$,“##”表示与正常对照组相比 $p < 0.01$,“*”表示与模型组相比 $p < 0.05$;“**”表示与模型组相比 $p < 0.01$;用Graphpad Prism9.0进行统计。

[0110] 2.3实验结果

[0111] 2.3.1三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠体重的影响

[0112] 研究结果如图2所示:正常对照组自第1d至第8d体重平均上升5.35%,而连续饮用2.5% DSS的小鼠在第1d至第8d体重平均下降了8.6%,这表明模型组小鼠健康状况急剧下降,是造模成功的标志之一。THP干预的小鼠,其体重下降速度与模型组相比相对缓慢,直至实验结束THP中、高剂量组和阳性对照组的小鼠体重均有回升。而阳性对照药(美沙拉嗪)改善体重减轻的效果不佳。

[0113] 2.3.2三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠结肠长度的影响

[0114] 研究结果如图3所示:实验结果显示模型组小鼠结肠长度与正常组相比相对缩短;而在THP干预后结肠长度发生了变化,其中THP高剂量组与正常组的长度最接近,THP中剂量组与正常组相比变长,而低剂量组与正常组相比变短。

[0115] 2.3.3三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠结肠组织形态的影响

[0116] HE染色结果显示(图1):通过观察正常对照组的小鼠结肠切片发现,其结肠组织状态完好,层次分明,结肠组织黏膜层、黏膜下层、浆膜层和肌层结构完整,结肠黏膜上皮细胞整齐有序,黏膜下层无水肿和炎性细胞浸润。模型组小鼠其结肠组织结构完整性被破坏,结肠黏膜上皮细胞紊乱,黏膜层细胞坏死脱落,黏膜下层出现炎性细胞浸润,腺体结构消失。然而,THP干预后结肠结构的完整性有不同程度的加强,炎症反应减轻,表现在结肠组织黏膜层、黏膜下层结构基本完整,炎细胞浸润减少,其组织结构完整性趋于正常对照组。

[0117] PAS染色结果如图4所示:正常组结肠中杯状细胞呈紫红色着色,表达量高;而模型组结肠结构破坏,杯状细胞表达量少,与正常组相比杯状细胞数量显著减少;给药组结肠结构受到保护,杯状细胞数量与正常组接近,与模型组相比显著增加。

[0118] 2.3.4三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠结肠组织中MUC-2、SIgA以及 β -防御素的影响

[0119] MUC-2、 β -防御素和SIgA可以反应肠道化学屏障功能,DSS造模后肠道中SIgA的水平显著降低,且 β -防御素含量处于一个高水平状态,说明模型建立成功。建模成功后给药一周,如图5所示:THP给药后小鼠肠道SIgA及 β -防御素分泌水平平均高于模型组;与正常组相比,模型组小鼠肠道中MUC-2含量下降;与模型组相比,THP低、中、高剂量组和美沙拉嗪组MUC-2含量均升高。

[0120] 2.3.5三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠血清中IL-6、TNF- α 、IFN- γ 水平的影响结果显示(图6):与模型组相比,THP可显著降低小鼠肠中TNF- α ($p<0.01$)、IL-6 ($p<0.01$)、IFN- γ ($p<0.01$) 水平的升高。

[0121] 2.3.6三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠结肠紧密连接蛋白(Claudin-1、Occludin、ZO-1)表达水平的影响

[0122] 细胞间紧密连接蛋白(Claudin-1、Occludin、ZO-1)可以反映小鼠肠道屏障的完整性,在细胞膜上表达并发挥作用,与紧密连接密切相关,紧密连接位于上皮细胞间的顶端,是维持粘膜通透性的重要组成部分。蛋白表达结果如图7所示,免疫荧光结果如图8~10所示:正常组小鼠中紧密连接蛋白呈高表达;模型组小鼠三种紧密连接蛋白的蛋白表达量均下降,免疫荧光强度降低;给药组荧光强度与正常组接近,呈高表达量,高于模型组。

[0123] 2.3.7三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠粪便菌群组成的影响结果表明(图11和12):THP处理显著改变了肠道菌群向正常组转化,而DSS处理显著改变了肠道菌群的整体结

构。值得注意的是,THP-H组也被证明与THP-L和THP-M组具有差异性,这表明300mg/kg THP可能会极大地改变肠道菌群的组成。厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)是最常见的两个门,但这些门在DSS组中的比例要低得多,而药物治疗组的物种组成与正常对照组相当。我们对物种组成图的属级分析结果显示,DSS组中乳酸菌、瘤胃球菌、真杆菌属、毛螺菌属等的比例显著下调,THP处理后其丰度增加,THP-H组差异显著。

[0124] 2.3.8三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠粪便短链脂肪酸(SCFAs)含量的影响微生物及其代谢产物如SCFAs(乙酸、丙酸、丁酸等)在维持肠道内稳态中起着重要作用。乙酸是粪便中含量最高的短链脂肪酸。如图13所示:模型组粪便中乙酸、异丁酸、戊酸和异戊酸的含量均有所下降,而THP处理显著增加了粪便中乙酸和异戊酸的含量,但仅轻微增加了粪便中丙酸、丁酸和戊酸的含量。

[0125] 2.3.9三叶青多糖对DSS诱导的IBD小鼠结肠组织G蛋白偶联受体(GPR41、GPR43)表达水平的影响我们通过Western blotting研究了G蛋白偶联受体(包括GPR41和GPR43)在结肠组织中的表达模式。如图14所示:在蛋白水平上,模型组GPR41/43的表达较对照组明显降低,而THP给药后其表达明显增加。以上结果提示THP可能是通过激活结肠细胞中的GPR41/43,以应对肠道菌群组成的变化和SCFAs的增加而产生抗炎作用。

[0126] 实施例3:体外三叶青多糖治疗炎症性肠病的信号通路研究

[0127] 3.1实验材料

[0128] 3.1.1实验细胞及药品配制

[0129] Caco-2细胞是一种人结肠癌细胞系,在37℃、5% CO₂的DMEM(Gibco,USA)中培养,添加20%热灭活胎牛血清和1%青霉素和链霉素。

[0130] 培养上清(CS)来自于实施2各组小鼠粪便中的肠道细菌。为了获得CS,肠道细菌在37℃厌氧培养基中厌氧培养24h,然后3000rpm离心10min,通过0.22μm过滤器过滤。

[0131] 3.1.2实验试剂化学试剂:CCK8(Biosharp,cat.no.BS350A),脂多糖(Sigma-Aldrich,cat.no.12880),百日咳素(Glplibio,cat.no.70323-44-3),U71322(Macklin,cat.no.112648-68-7),细胞RNA提取试剂盒(ES Science),高容量cDNA反转录试剂盒(生物系统),SYBR预混液(赛默飞,LOT,91231261)

[0132] 3.2实验方法

[0133] 3.2.1Caco-2细胞活力测定

[0134] 根据制造商的说明,使用CCK-8进行细胞活力分析。将细胞以 1×10^4 cells/well的密度种植于96孔板中,与不同THP组肠道细菌的CS(THP-CS)一起培养24小时。37℃孵育1-2h。最后,在450nm处测量光密度(OD)。

[0135] 3.2.2RT-qPCR检测Caco-2细胞紧密连接蛋白(Claudin-1、Occludin、ZO-1)及GPR41、GPR43 mRNA表达水平

[0136] Caco-2细胞在6孔板中培养。Caco-2细胞经LPS(2μg/mL)刺激6小时后,用DSS-CS和THP-CS(10μL/mL)孵育24小时,收集细胞样本进行后续检测。我们将Caco-2细胞与百日咳毒素(200ng/mL)和U73122(10μM)孵育24小时以抑制GPRs信号通路,然后在THP-CS孵育24h后采集细胞样本进行后续检测。按照细胞RNA提取试剂盒的说明书提取RNA。采用高容量cDNA反转录试剂盒进行cDNA合成。定量实时荧光定量PCR(qRT-PCR)使用SYBR绿色预混液(使用生物系统)进行。

[0137] 3.3实验结果

[0138] 3.3.1三叶青多糖发酵液 (THP-CS) 对Caco-2细胞活力的影响

[0139] 如图15所示:当三叶青多糖组小鼠的肠道菌群培养上清液的浓度在0~62.5 μ L/mL时,与正常对照细胞相比,细胞活力值没有显著性差异 ($p>0.05$),表明在0~62.5 μ L/mL的浓度范围内,粪便发酵液对Caco-2细胞没有毒副作用。小鼠粪便发酵液在125~500 μ L/mL时显著降低了Caco-2细胞的活力 ($p<0.05$),说明在该剂量范围内会抑制Caco-2细胞的生长,产生毒副作用。在安全范围内,选择的所考察的最大剂量对Caco-2细胞进行处理,故选择100 μ L/mL的浓度进行后续实验。

[0140] 3.3.2三叶青多糖发酵液 (THP-CS) 对LPS刺激的Caco-2细胞紧密连接及GPR41、GPR43表达的影响为了确认THP对肠道菌群的调节作用是否主要是通过激活SCFAs-GPRs来改善肠道屏障,我们将Caco-2细胞单分子膜与对照组和处理组肠道细菌的CS孵育24h。然后,我们检测了从不同组收集的肠道细菌对LPS刺激的Caco-2细胞单分子层中ZO-1、occludin和claudin-2表达水平的影响。如图16(A)~16(E)所示:DSS-CS处理24h后,Caco-2细胞ZO-1、occludin和claudin-1mRNA表达明显降低;THP-CS处理可以调节这些基因的表达,且在用THP-CS处理Caco-2细胞后,GPR41/43的表达明显增加,表明GPRs已经被THP-CS激活。此外,THP-CS可以显著上调GPRs抑制剂处理的Caco-2中GPR41/43mRNA的水平,如图16(F)和16(G)所示。

[0141] 在本发明中,除非另有说明,否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且,本文中所述实验方法,如无特殊说明,均为常规方法;所述试剂、生物材料和设备,如无特殊说明,均可从商业途径获得。

[0142] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例,并非对本发明作任何限制,凡是根据本发明技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、变更以及等效变换,均仍属于本发明技术方案的保护范围。

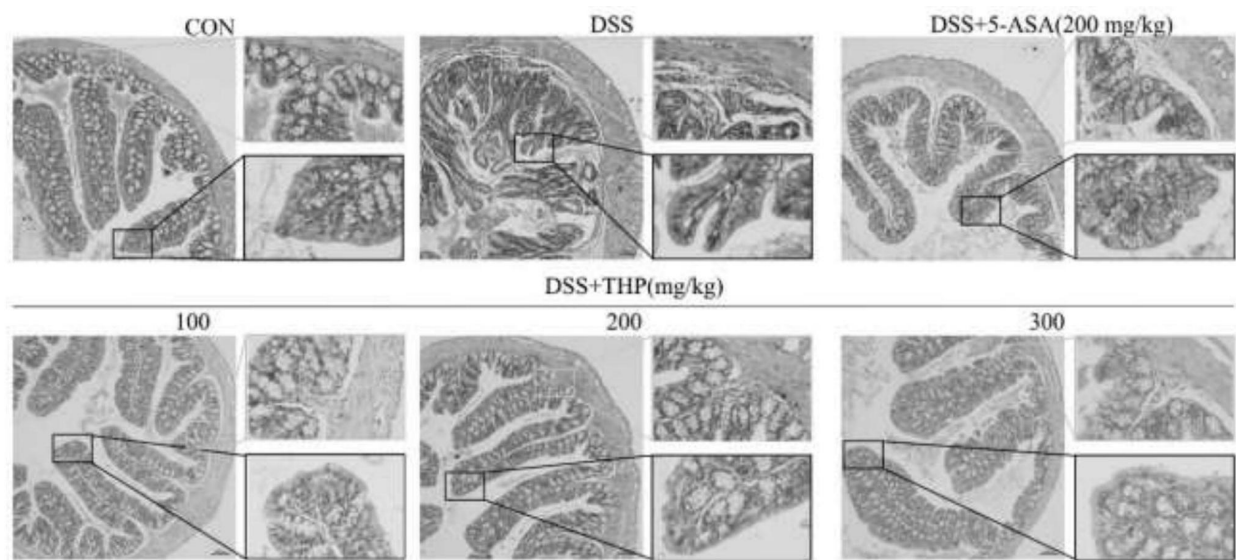


图1

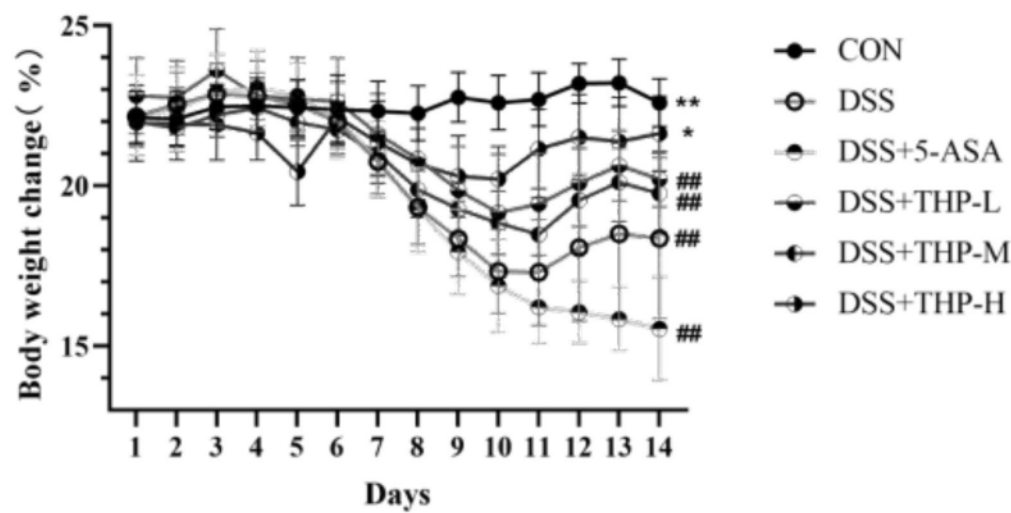


图2

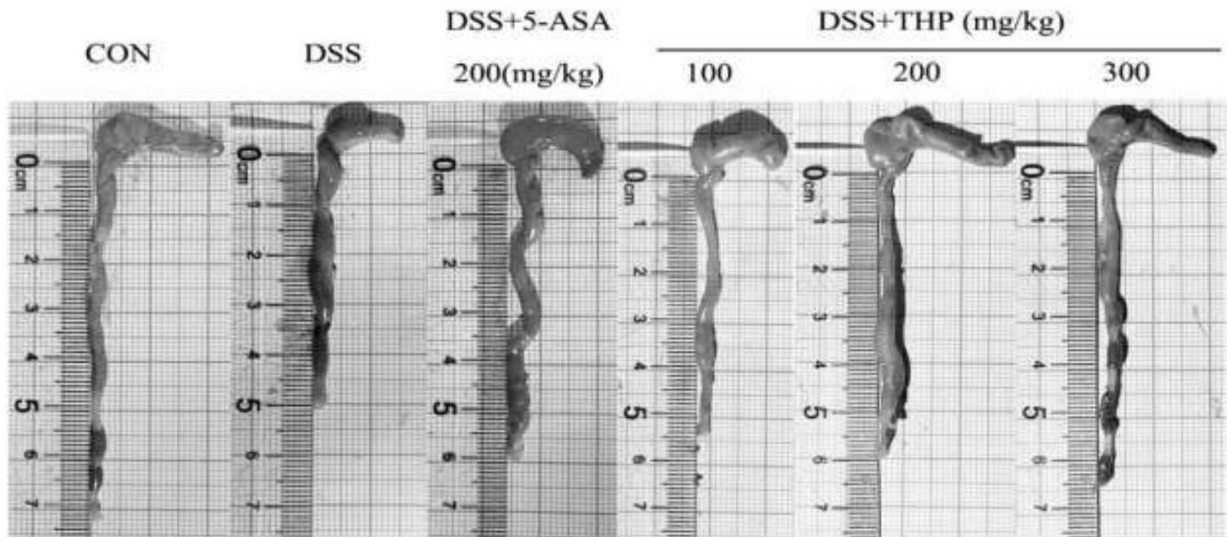


图3

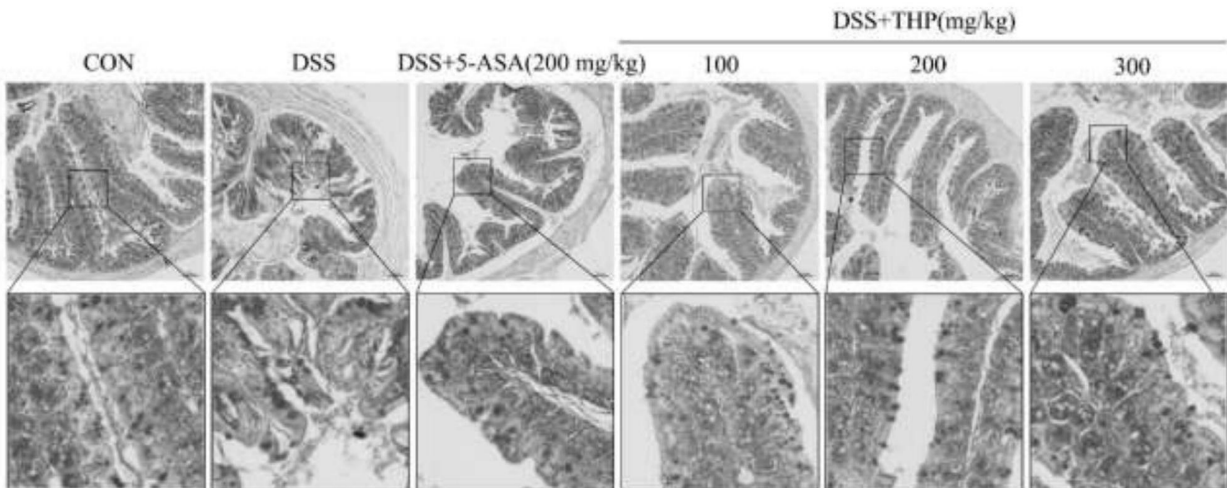


图4

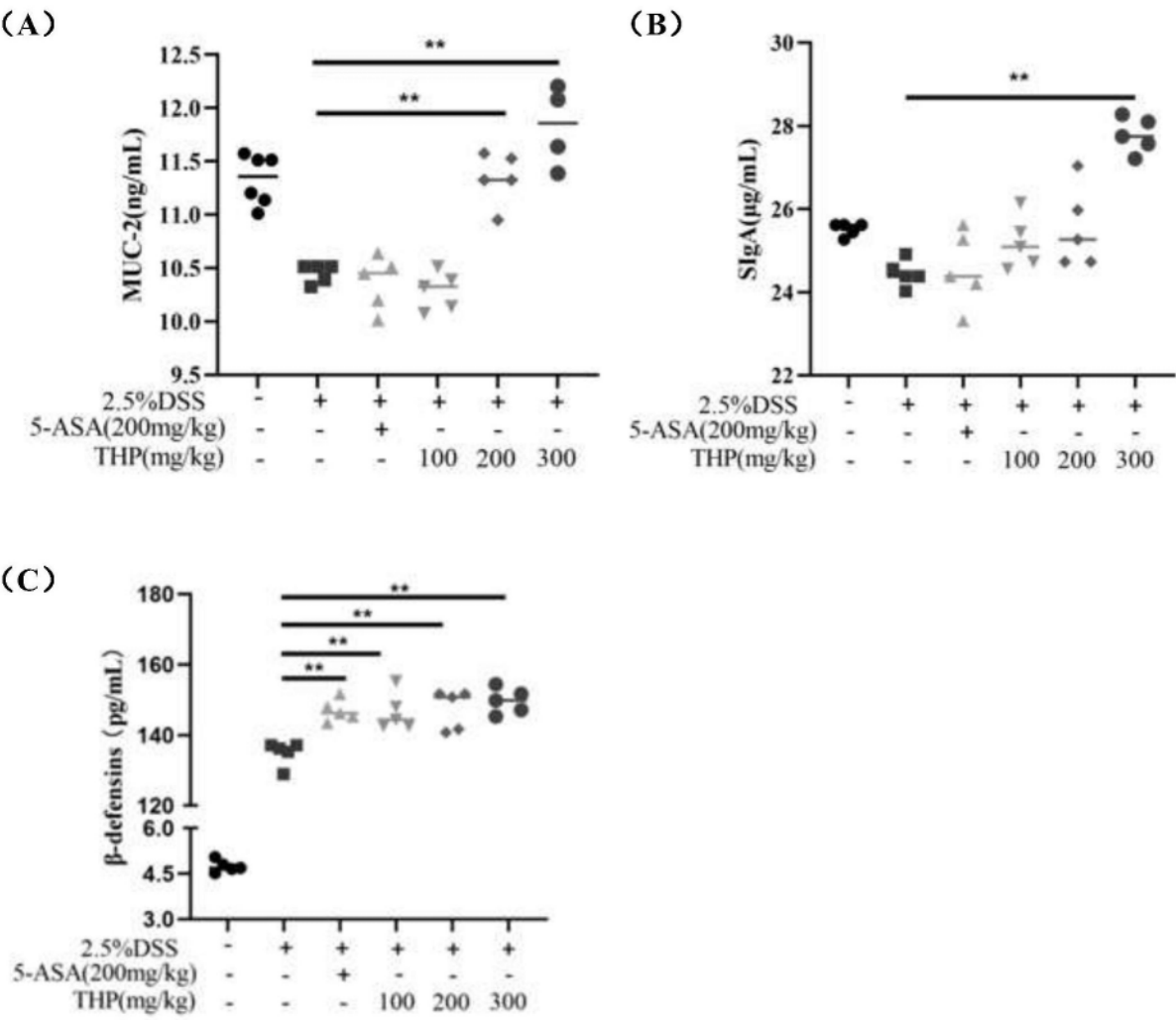


图5

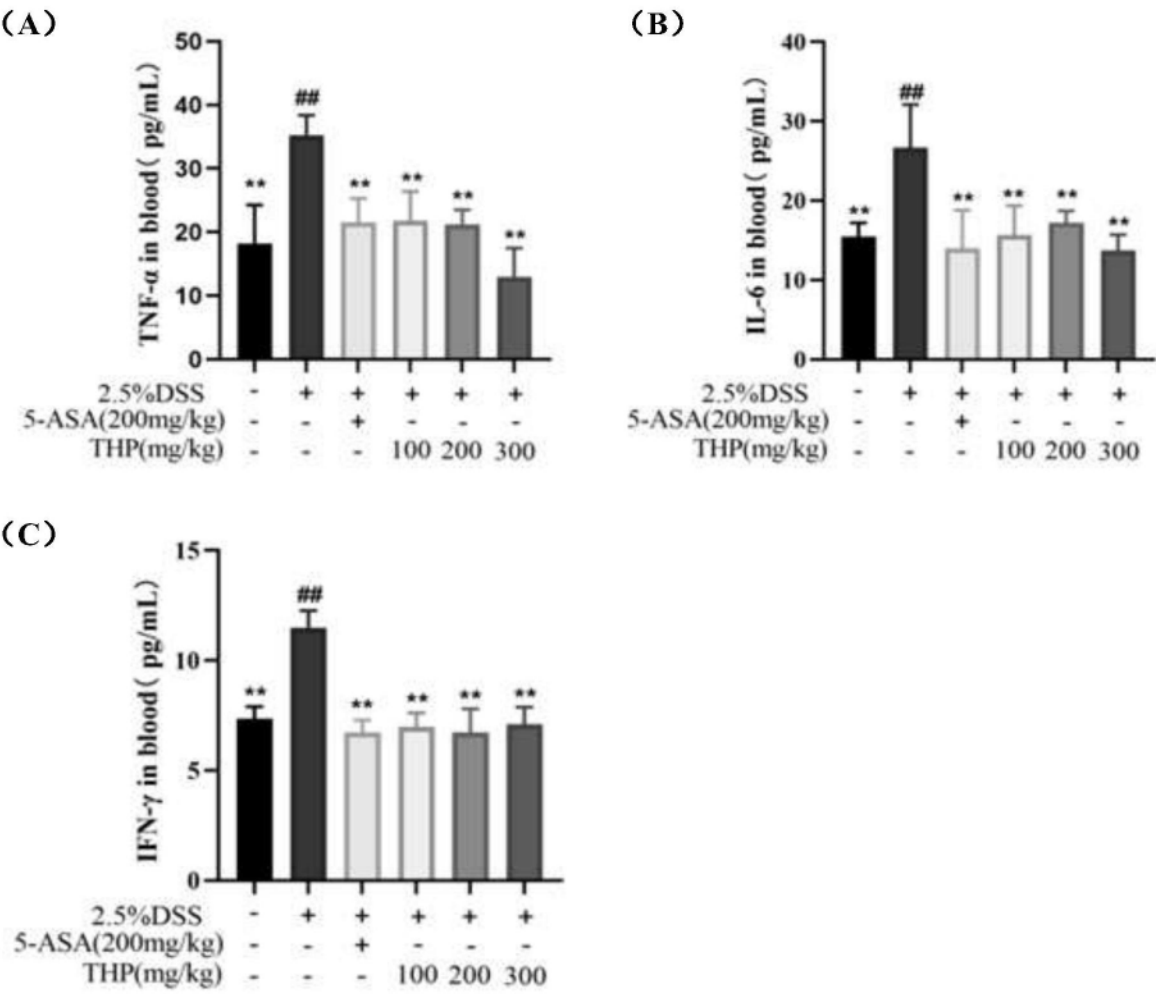


图6

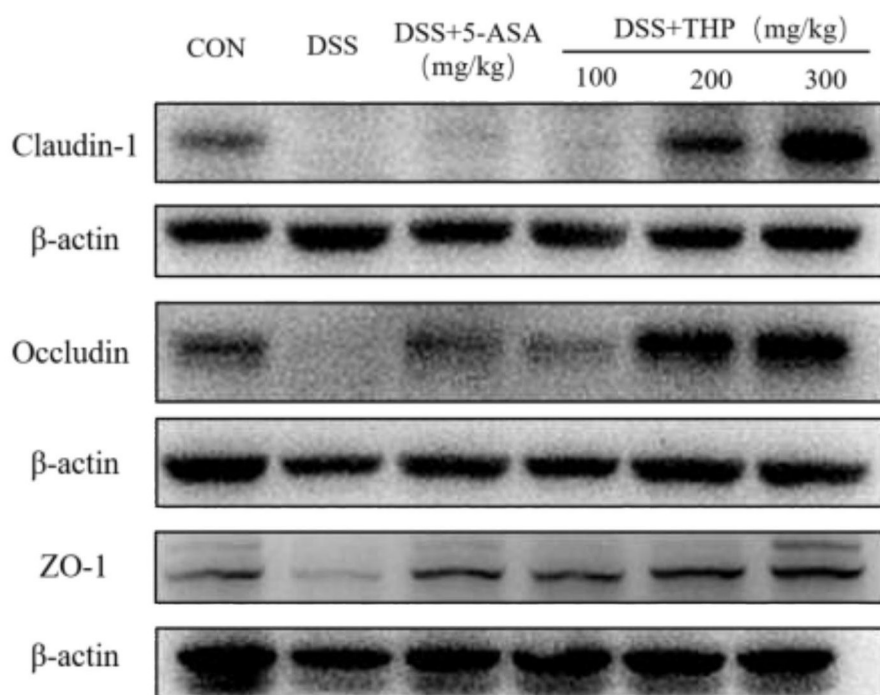


图7

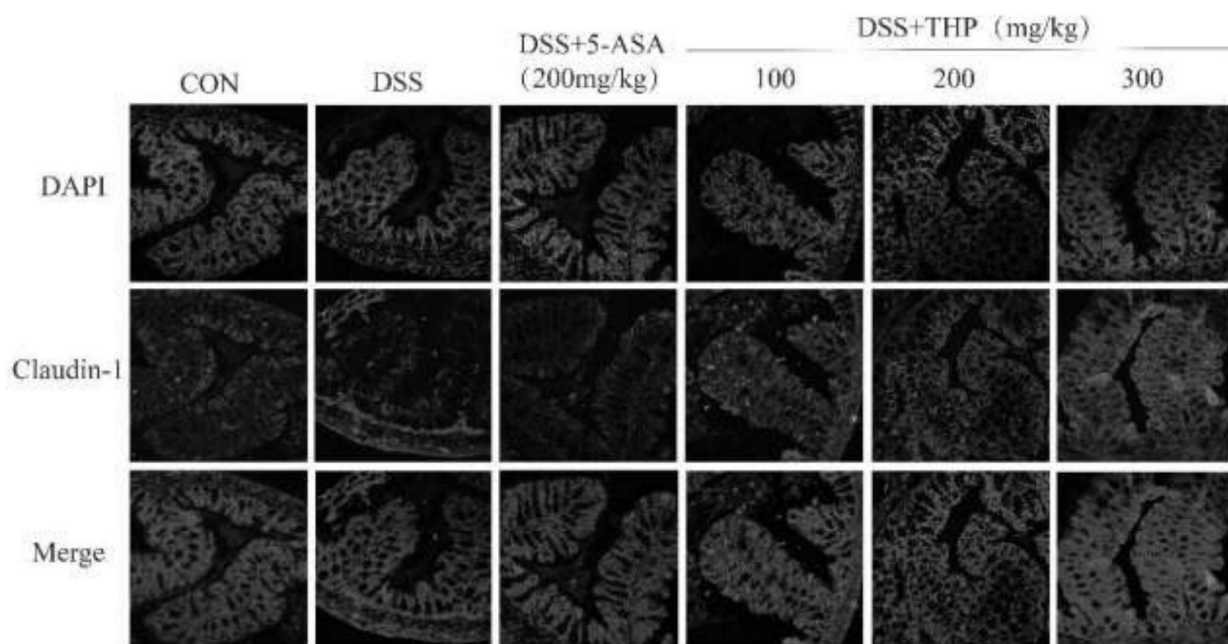


图8

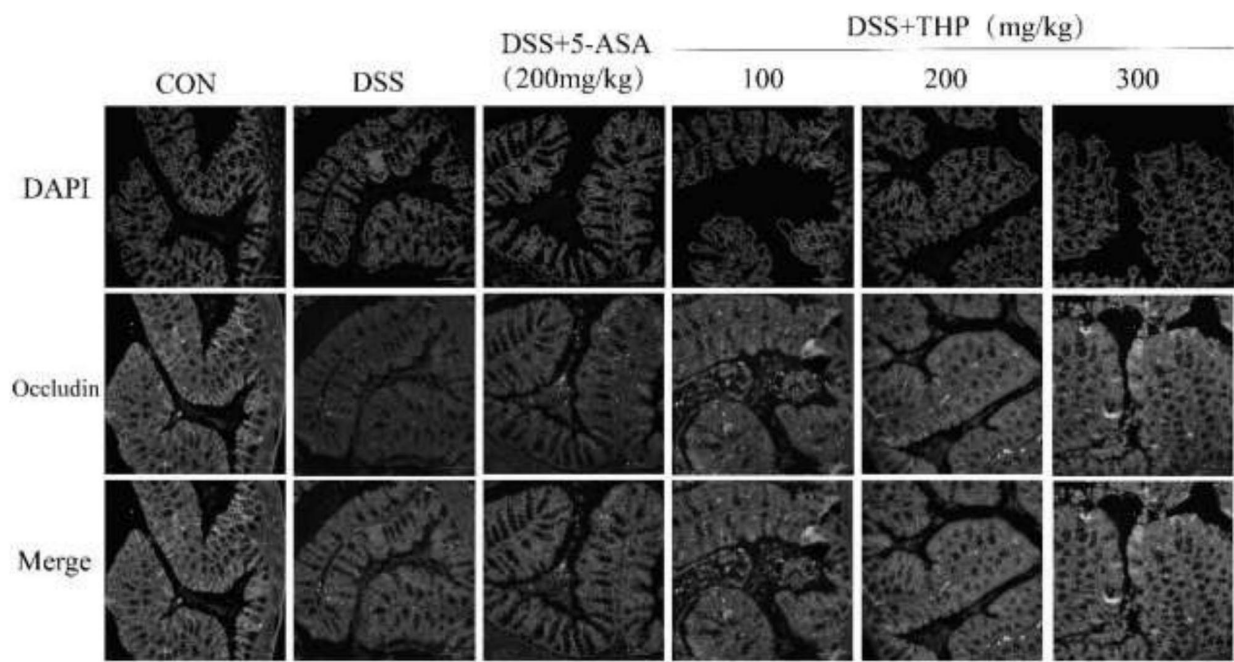


图9

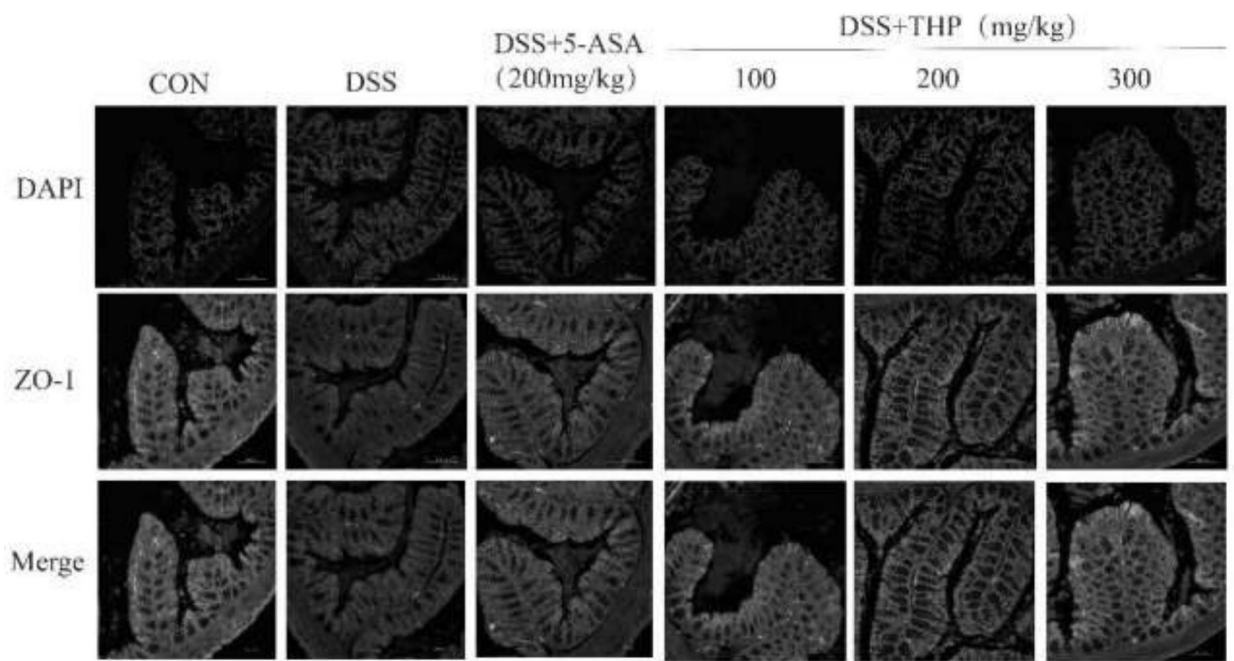
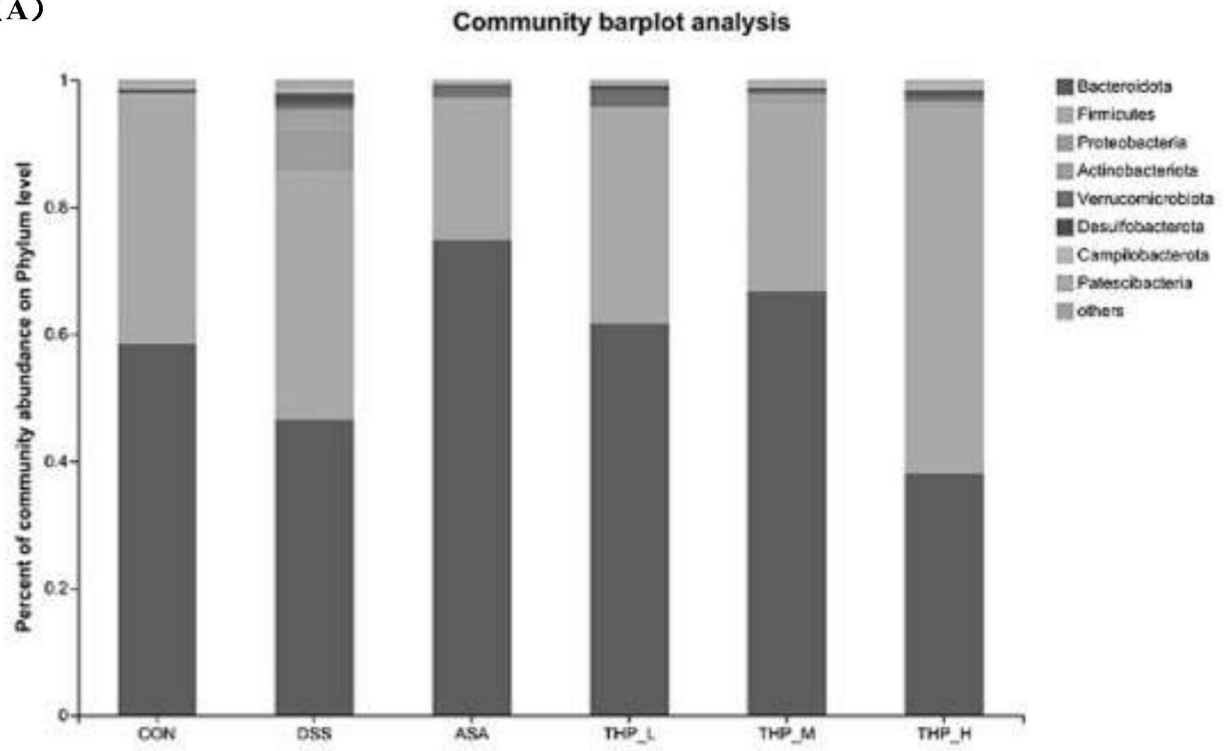


图10

(A)



(B)

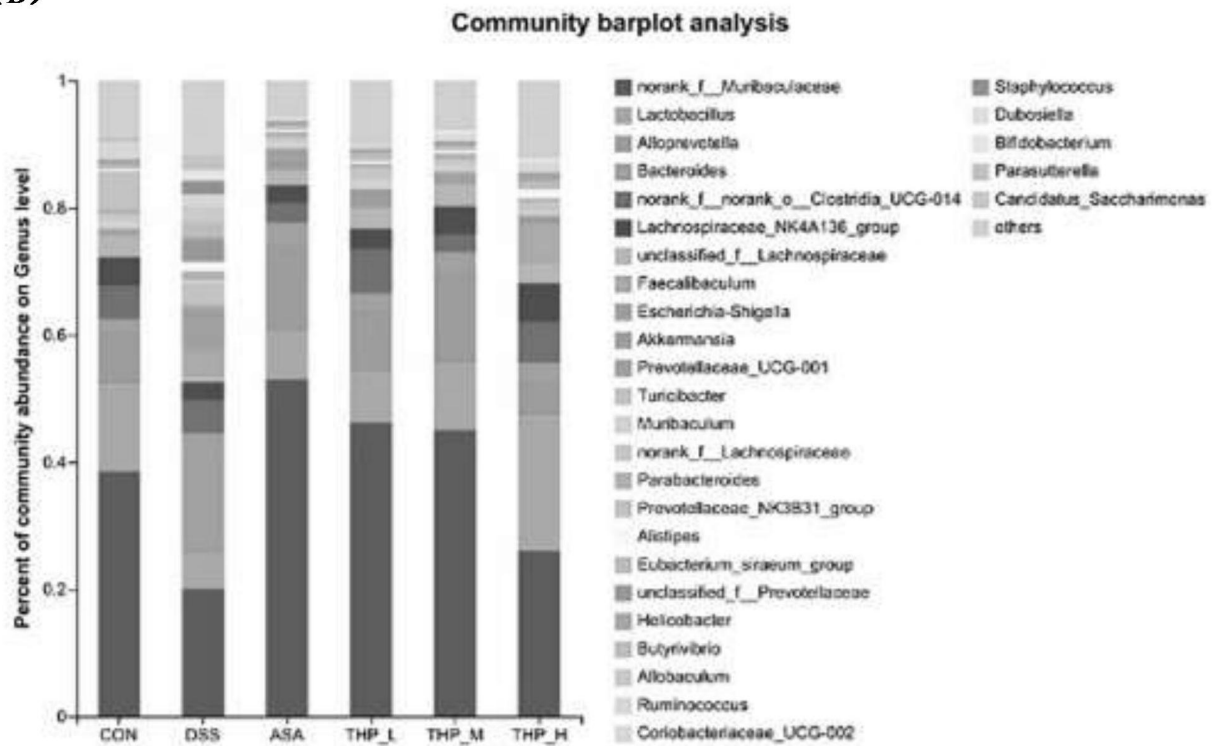


图11

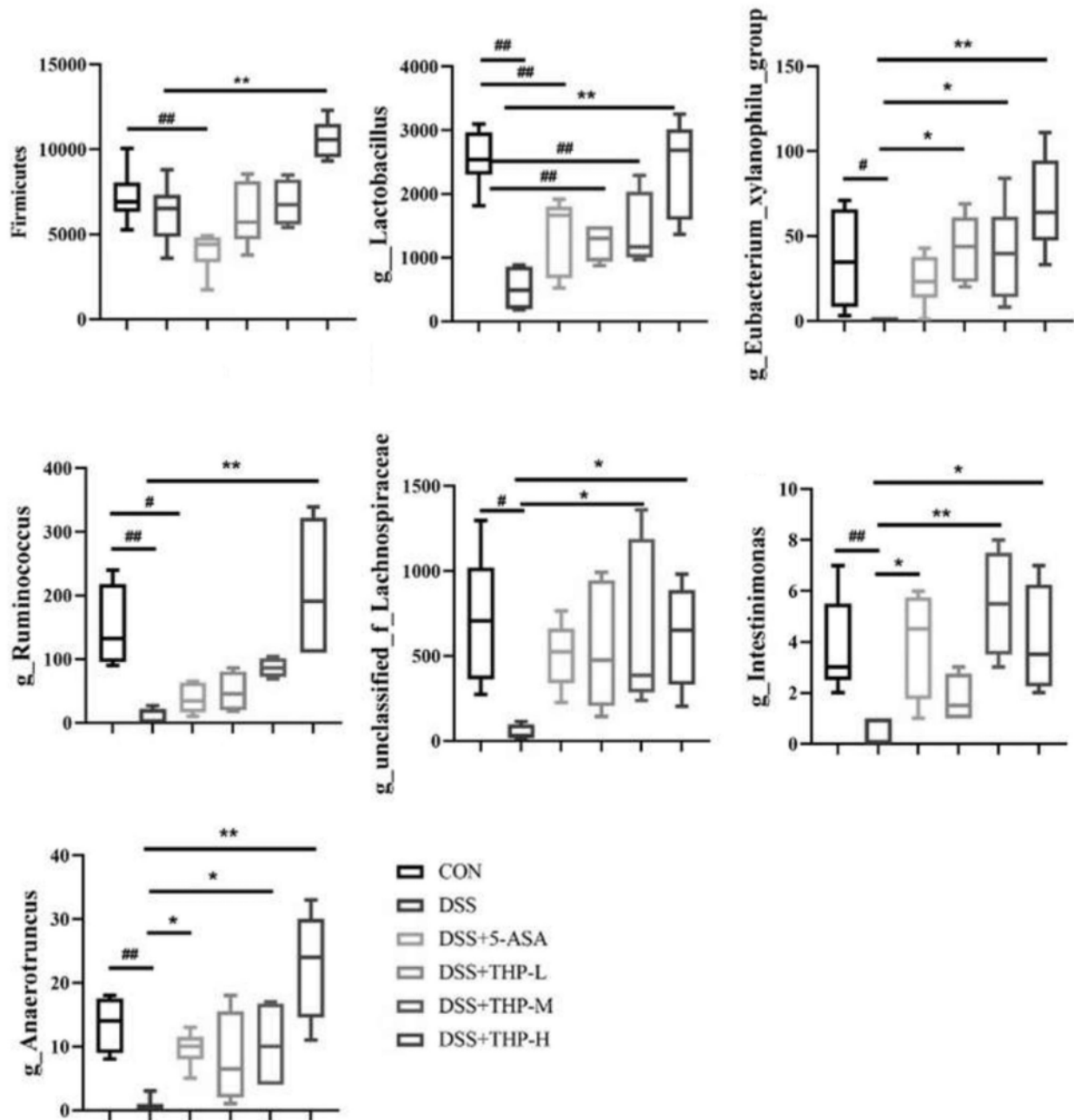


图12

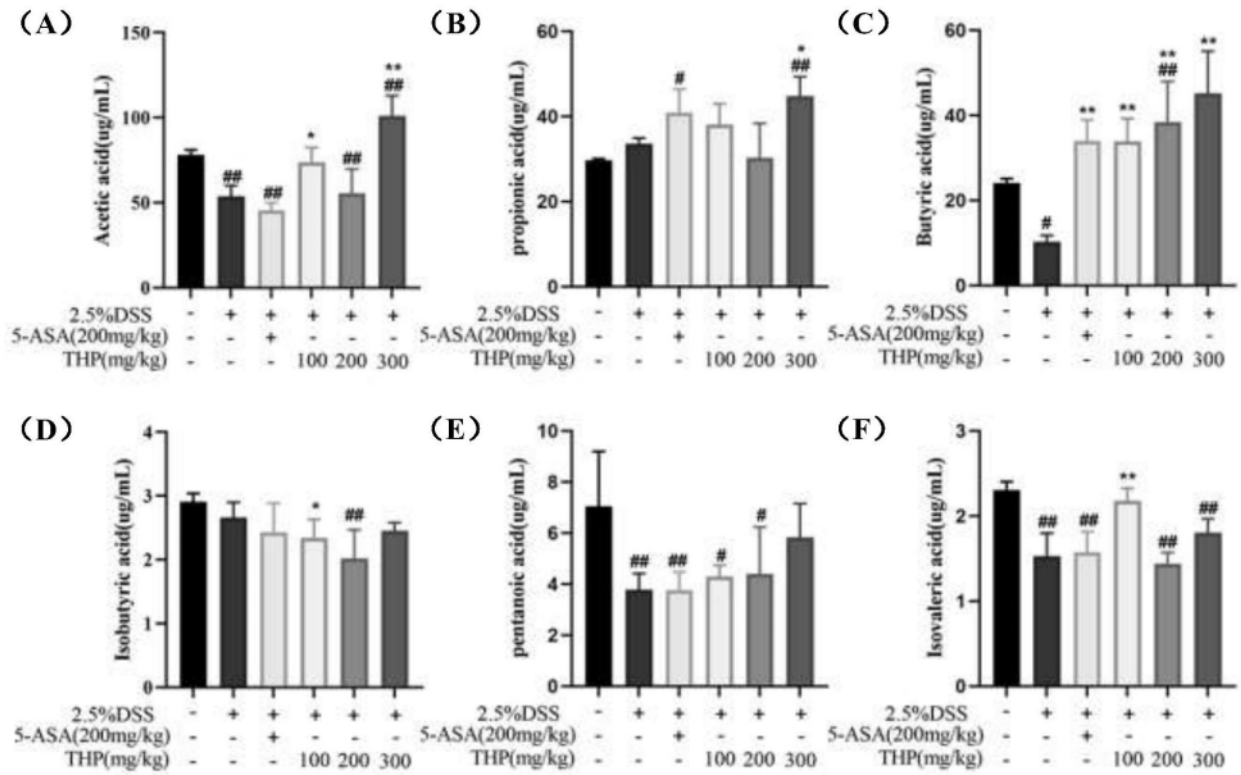


图13

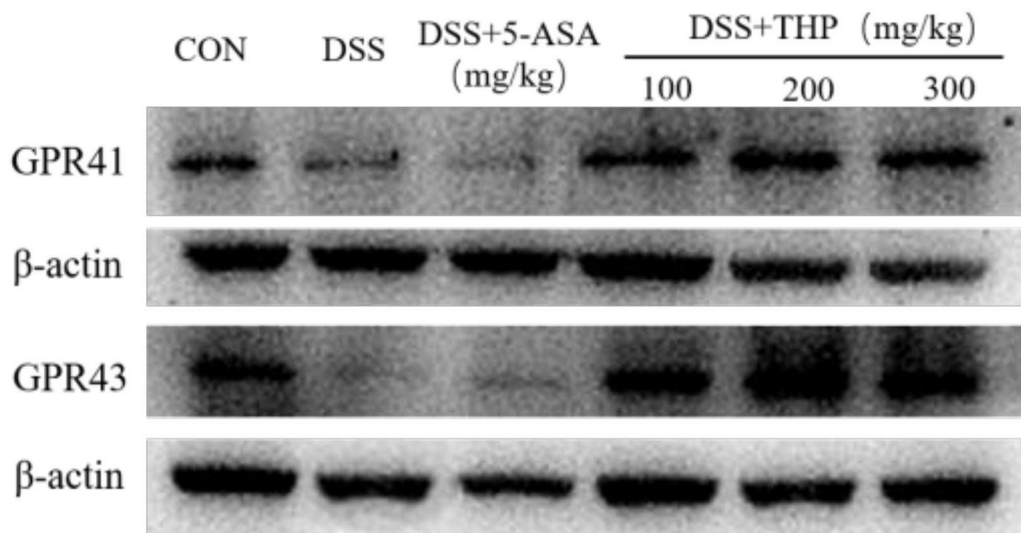


图14

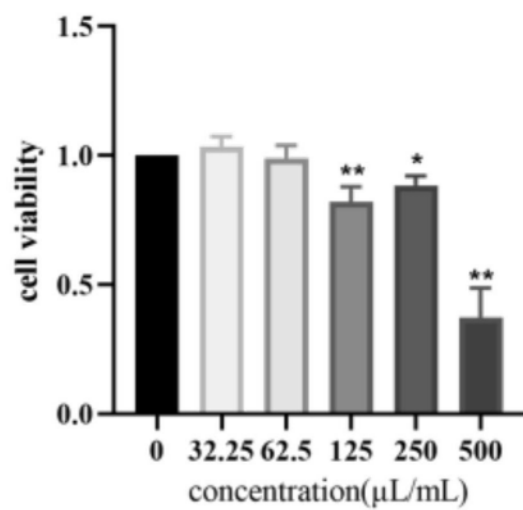


图15

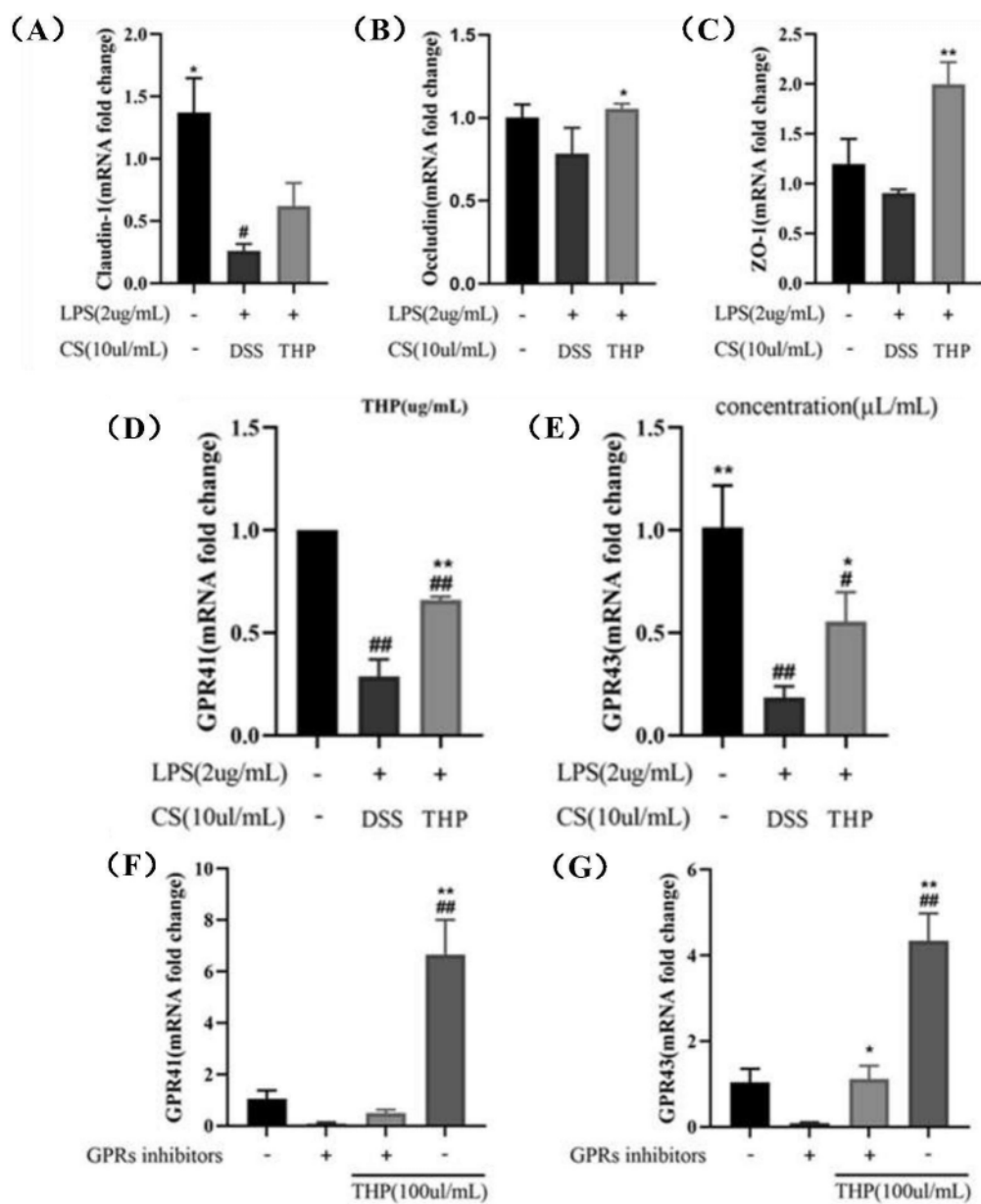


图16