

网络出版时间： 网络出版地址：

铁皮石斛多糖通过激活 Nrf2/HO-1 通路改善新生小鼠坏死性小肠结肠炎的肠道损伤

王 静^{1,2}, 吴 铭¹, 王 军¹

(¹徐州医科大学附属医院儿科, 徐州 221000; ²徐州市贾汪区人民医院儿科, 徐州 221011)

摘要 **目的** 探究铁皮石斛多糖(DOP)对新生小鼠坏死性小肠结肠炎(NEC)的改善作用并初步分析其可能的分子机制。**方法** 60只7d龄C57BL/6J小鼠分为四组:对照(CTRL)组、坏死性小肠结肠炎(NEC)组、DOP低剂量治疗(DOPL+NEC)组以及DOP高剂量治疗(DOPH+NEC)组。采用低氧、冷刺激、高渗喂养以及腹腔注射脂多糖(LPS)法建立NEC模型,实验结束后取小肠组织。观察小鼠一般情况,并整理分析小鼠体质量;苏木精-伊红(HE)染色观察小肠组织病理改变;免疫组化和Western blot检测小肠组织钙黏蛋白E(E-cadherin)、闭锁蛋白(Occludin)和紧密连接蛋白1(Claudin-1)的表达水平;ELISA检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6和IL-10的表达水平;试剂盒检测乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和还原型谷胱甘肽(GSH)含量;免疫组化和Western blot检测核因子红细胞2相关因子2(Nrf2)和血红素氧合酶1(HO-1)蛋白的表达水平。**结果** 与CTRL组相比,NEC组小鼠体质量下降、HE病理评分增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$);E-cadherin、Occludin和Claudin-1蛋白表达减少($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$);TNF- α 、IL-1 β 、IL-6浓度升高,IL-10浓度降低($P < 0.01$);MDA、LDH含量升高,GSH、SOD含量减少($P < 0.01$);Nrf2、HO-1蛋白表达增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。而DOP干预后,与NEC组相比,小鼠体质量增加、HE评分降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);E-cadherin、Occludin、Claudin-1蛋白表达增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$);TNF- α 、IL-1 β 、IL-6浓度降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),IL-10浓度升高($P < 0.01$);MDA、LDH含量减少,GSH、SOD含量增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);Nrf2、HO-1蛋白表达进一步增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** DOP可以改善NEC小鼠的肠道病理损伤和肠道黏膜屏障功能,降低NEC小鼠氧化应激损伤和肠道炎症,其作用可能与DOP激活Nrf2/HO-1通路有关。

关键词 石斛属;多糖;小肠结肠炎;核因子红细胞2相关因子2;血红素氧合酶1;紧密连接蛋白;氧化应激

中图分类号 R 722.19

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)06-0984-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.06.002

新生儿坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis, NEC)是新生儿期常见的严重胃肠道疾病,其特征是肠黏膜的坏死和炎症^[1],其高发病率和病死率,对患儿健康和家庭经济造成重大影响^[2]。目前NEC的治疗方法包括禁食、胃肠减压、抗生素及手术等,发病机制尚不完全清楚,研究^[3-4]表明炎症反应、肠道屏障功能破坏和肠道氧化应激与NEC的发生、发展密切相关。

铁皮石斛作为一种传统中药材,被广泛应用于保健和治疗多种疾病,其中的多糖成分,具有多种生物学活性和药理作用。已有研究^[5-8]表明,铁皮石斛多糖(dendrobium officinale polysaccharides, DOP)具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、免疫调节、降血糖等功

效,这些特性使得DOP成为一个有潜力的治疗候选物,特别是DOP显示出对溃疡性结肠炎小鼠模型的保护作用^[9],然而DOP对NEC小鼠模型的影响尚未见报道。核因子红细胞2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)是一种关键的转录因子,它在调控细胞的抗氧化应答中起着核心作用,血红素氧合酶1(heme oxygenase-1, HO-1)是一种重要的抗氧化酶, Nrf2/HO-1通路是细胞内重要的抗氧化和抗炎途径,其激活可增强细胞对氧化应激的抵抗力,减少氧化应激损伤^[5]。该研究通过建立NEC动物模型,评估DOP对小肠组织病理变化的影响,并分析肠道紧密连接蛋白、炎症因子、氧化应激指标以及Nrf2/HO-1信号通路的变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物 18只健康成年C57BL/6J小鼠,体质量20~26g,由徐州医科大学实验动物中心提供,饲养条件为室温(20~26℃),光照条件为12h/12

2025-04-18 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81904249)

作者简介:王 静,女,硕士研究生,副主任医师;

王 军,男,教授,主任医师,硕士生导师,通信作者, E-mail:664586331@qq.com

h 明暗交替,动物设施许可证编号:SYXK(苏)2020-0048。雄雌比例 1:2,进行交配繁殖后,孕鼠单独喂养,待产子后,选用 7 d 龄小鼠作为实验对象。本实验已通过徐州医科大学实验动物伦理道德执行委员会审批(编号:202305T022)。

1.2 试剂与仪器 DOP 由上海辉文生物技术股份有限公司提供,采用苯酚硫酸法^[10]测定多糖含量为 89.21%,采用超纯水溶解备用。Nrf2 一抗(兔)、HO-1 一抗(兔)、E-cadherin 一抗(兔)、Claudin-1 一抗(兔)、Occludin 一抗(兔)、 β -actin 一抗(鼠)及对应的二抗、免疫组化试剂盒均购自武汉 Proteintech 公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒购自大连美伦生物技术有限公司;脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)(货号:L2880)购自美国 Sigma 公司;肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)(货号:88-7324)、白细胞介素(interleukin, IL)-1 β (货号:88-7013)、IL-6(货号:88-7064)和 IL-10(货号:88-7105)ELISA 检测试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)(货号:A001-3-1)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)(货号:A003-1-1)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)(货号:A020-2-2)和还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)(货号:A006-2-1)检测试剂盒均购自南京建成科技有限公司;正置荧光显微镜(BX-51)购自日本 Olympus 公司。

1.3 实验分组 清洁级 7 d 龄 C57BL/6J 新生小鼠,体质量 3~5 g,随机分为 4 组:①对照(CTRL)组:母鼠身边喂养;②坏死性小肠结肠炎(NEC)组:给予低氧、冷刺激、高渗奶灌胃和腹腔注射 LPS 建立 NEC 模型;③DOP 低剂量治疗(DOPL + NEC)组:建立 NEC 模型同时给予低剂量 DOP 处理;④DOP 高剂量治疗(DOPH + NEC)组:建立 NEC 模型同时给予高剂量 DOP 处理。每组 15 只。

1.4 动物模型制备 通过比较和改进国内、外常用的 NEC 动物模型建立方法,采用 7 d 龄 C57BL/6J 小鼠制作 NEC 模型^[11-12]。CTRL 组小鼠在母鼠身边常规喂养,不予任何处理,其余组做如下处理:①新生小鼠暴露在低氧室中,以 1~2 L/min 的速度输入含 5% 氧气、95% 氮气的混合气体,持续 10 min,2 次/d。②暴露于寒冷(4℃)中 10 min,2 次/d。③低氧后,动物在 2 min 内接受 NEC 配方奶粉(高渗奶)[Esbilac 美国倍酷(PetAg)新生幼犬专用奶粉 4 g + Karihome 配方羊奶粉 6 g + 超纯水 20 ml,混匀]喂养,40~50 ml/kg 灌胃,4 次/d。④造模第 2 天腹

腔注射 LPS 5 mg/kg(稀释成 0.1 ml/只),仅 1 次。

⑤ NEC 组小鼠不做给药处理,DOPL + NEC 组、DOPH + NEC 组分别给予 DOP 200、400 mg/kg 灌胃处理,1 次/d[本实验参考 2020 年版《中华人民共和国药典》记载的成人铁皮石斛用量为 6~12 g/d, DOP 含量不低于 25%,换算出小鼠 DOP(多糖含量 89.21%)等效用量:以成人平均体质量 70 kg,成人和小鼠体表面积换算比 1:9.1 进行换算,公式为:6 g/70 kg $\times$ 9.1 $\times$ 25%/89.21% $\approx$ 0.22 g/kg,因此小鼠安全剂量范围为 220~440 mg/kg,结合前人研究^[6-7],最终确定 DOP 实验剂量为 200 mg/kg 和 400 mg/kg]。以上操作连续 3 d。72 h 后处死小鼠,取回盲部至十二指肠处小肠组织。

1.5 实验方法

1.5.1 标本制备 各组新生小鼠造模结束后,取靠近回盲瓣处约 2 cm 的小肠组织,固定于 4% 多聚甲醛中,置于 4℃ 冰箱过夜。每只小鼠自小肠远端称取余下新鲜小肠组织约 100 mg,置于匀浆管中并加入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解蛋白,匀浆结束后,将液体转移至新的 EP 管中,4℃、12 000 r/min 离心 10 min。取上清液,使用二喹啉甲酸法测定蛋白浓度,上清液和剩余小肠组织均放入 -80℃ 冰箱保存备用。

1.5.2 HE 染色 取 1.5.1 中制备的多聚甲醛中肠组织常规固定、脱水、石蜡包埋,切片常规脱蜡、复水,进行 HE 染色,于光学显微镜下观察各组小鼠肠组织病理学变化,并参照 Nadler 法^[13]采用双盲法进行病理评分。评分标准如下:0 分,肠道绒毛及上皮完整,组织结构正常;1 分,轻微黏膜下或固有层肿胀分离;2 分,中度黏膜下和(或)固有层分离,黏膜下和(或)肌层水肿;3 分,重度黏膜下和(或)固有层分离,黏膜下和(或)肌层水肿,局部绒毛脱落;4 分,肠绒毛消失伴肠坏死。病理评分 ≥ 2 分者视为 NEC 发病,造模成功。

1.5.3 免疫组化 取 1.5.2 中石蜡组织,制作石蜡切片,脱蜡至水,放入预热的枸橼酸盐缓冲液中抗原修复,冷却。取 3% 过氧化氢覆盖组织,室温避光孵育 10 min,5% 牛血清白蛋白室温封闭 30 min,孵育一抗,湿盒内 4℃ 孵育过夜。第 2 天室温孵育二抗,1 h, DAB 显色,苏木精染色细胞核,脱水、封片,显微镜镜检,图像采集分析。

1.5.4 Western blot 实验 取出 1.5.1 蛋白样品,通过 12.5% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳分离,然后转移至聚偏二氟乙烯

(PVDF)膜,封闭,孵育一抗 Nrf2 (1 : 5 000)、HO-1 (1 : 1 000)、E-cadherin、Claudin-1、Occludin (1 : 1 000)、 β -actin (1 : 10 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,洗膜,室温孵育二抗 (0.5 : 5 000) 1 h,洗膜,增强型化学发光 (ECL) 液发光,使用凝胶成像系统拍照、储存图片, Image J 软件分析相对灰度值,以 β -actin 为内参标 化相关蛋白表达量。

1.5.5 ELISA 实验 取各组小鼠肠组织,按照 ELISA 试剂盒说明书方法进行匀浆、收集上清液,并检测 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 和 IL-10 的浓度。

1.5.6 试剂盒检测 取出部分 -80 $^{\circ}\text{C}$ 存储的肠组织,按照南京建成试剂盒相关说明书进行标本制备,并检测 SOD、MDA、LDH 及 GSH 含量,对结果进行统计分析。

1.6 统计学处理 使用 SPSS 22.0 对数据进行统计学分析。采用 GraphPad Prism 8.0 进行作图。本研究所涉及数据以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),两组间比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠基本情况和体质量的变化 CTRL 组小鼠生长正常,体质量稳定增加;NEC 组小鼠出现大小便失禁、便血、腹泻、体质量下降、主动活动减少甚至抽搐、死亡等症状;而 DOPL + NEC 组小鼠有轻微血便、腹泻症状,无抽搐,体质量略有增加;DOPH + NEC 组小鼠无大小便失禁,无便血,腹泻较 NEC 组明显减轻,体质量较 DOPL + NEC 组进一步增加。各组小鼠体质量变化情况见图 1。第 1 天,各组小鼠体质量间无显著性差异 ($F = 0.1395, P > 0.05$)。第 2 天和第 3 天,各组小鼠体质量间呈现显著差异 ($F = 4.521, 28.74, P < 0.05$);与 CTRL 组比较,NEC 组小鼠体质量下降明显,呈现负增长 ($P < 0.01$);与 NEC 组比较,DOPL + NEC 组小鼠体质量增加 ($P < 0.05$),DOPH + NEC 组小鼠体质量增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.2 各组小鼠肠组织 HE 染色结果 CTRL 组小鼠肠组织绒毛及上皮完整,肠黏膜结构清晰,黏膜层、黏膜下层、黏膜固有层无断裂分离,组织结构正常 (0 分);NEC 组绒毛大量坏死、脱落甚至消失,绒毛短粗水肿,黏膜层、黏膜下层和固有层肿胀分离,肌层出现变薄甚至断裂情况 (4 分);DOPL + NEC 组部分绒毛轻度水肿、脱落,局部肌层变薄,较 NEC 组

减轻 (3 分);DOPH + NEC 组绒毛轻度水肿,腺体排列相对整齐,黏膜层、黏膜下层及固有层未见明显肿胀现象,绒毛高耸 (1 分) (图 2A)。对各组肠组织 HE 染色结果进行双盲病理评分统计,差异有统计学意义 ($F = 11.80, P < 0.001$) (图 2B)。

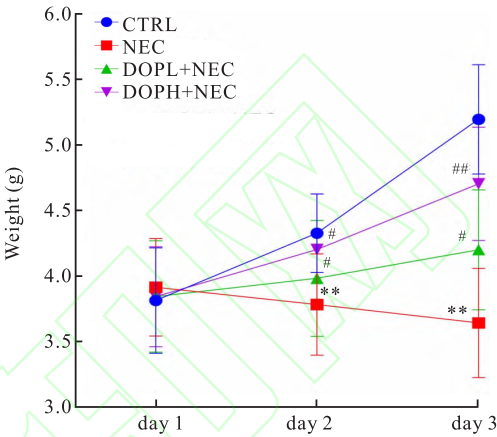


图 1 各组小鼠体质量变化情况

Fig.1 Changes in body weight of mice in each group

*** $P < 0.01$ vs CTRL group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs NEC group.

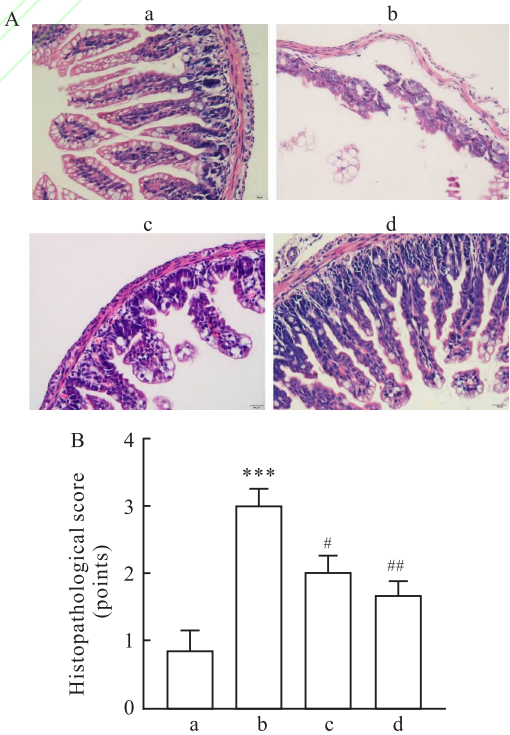


图 2 各组小鼠肠组织病理学改变

Fig.2 Histopathological changes in the intestinal tissues of mice in each group

A: HE staining of mouse intestinal tissue sections $\times 400$; B: Histopathological scoring of intestinal tissue in mice; a: CTRL group; b: NEC group; c: DOPL + NEC group; d: DOPH + NEC group; *** $P < 0.001$ vs CTRL group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs NEC group.

2.3 各组小鼠肠组织 E-cadherin、Occludin、Claudin-1 蛋白表达水平

采用免疫组化方法来检测各组小鼠肠组织中 E-cadherin、Occludin 和 Claudin-1 蛋白的表达情况,阳性表达呈棕色甚至棕褐色(图 3A),对上述结果进行定量分析,各组小鼠间上述蛋白表达呈现显著差异($F = 149.90、13.22、7.18, P < 0.01$)。光学显微镜下可见,与 CTRL 组相比,NEC 组 E-cadherin、Occludin 和 Claudin-1 蛋白的表达均减少($P < 0.01$);与 NEC 组相比,DOPL + NEC 组及 DOPH + NEC 组这 3 种蛋白的表达均有所增加($P < 0.05$)(图 3B)。用 Western blot 方法检测了各组小鼠肠组织中 E-cadherin、Occludin 和 Claudin-1 的蛋白表达水平(图 3C),差异均有统计学意义($F =$

27.27、111.4、11.58, $P < 0.01$)。与 CTRL 组相比, NEC 组小鼠肠组织中这 3 种蛋白的表达明显减少 ($LSD-t = 8.31、14.46、4.37, P < 0.01$ 或 $P < 0.001$);而 DOP 干预后,与 NEC 组比较,DOPH + NEC 组上述 3 种蛋白的表达增加 ($LSD-t = 6.45、5.40、3.47, P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)(图 3D)。

2.4 各组小鼠肠组织中炎症因子 ELISA 检测结果

与 CTRL 组相比,NEC 组小鼠肠组织中 IL-1 β 、TNF- α 以及 IL-6 浓度升高,IL-10 浓度下降 ($P < 0.01$);与 NEC 组相比,DOPL + NEC 组和 DOPH + NEC 组小鼠肠组织中 IL-1 β 、TNF- α 及 IL-6 浓度下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),IL-10 浓度升高 ($P < 0.01$),DOPH + NEC 组的上述炎症因子表达水平变

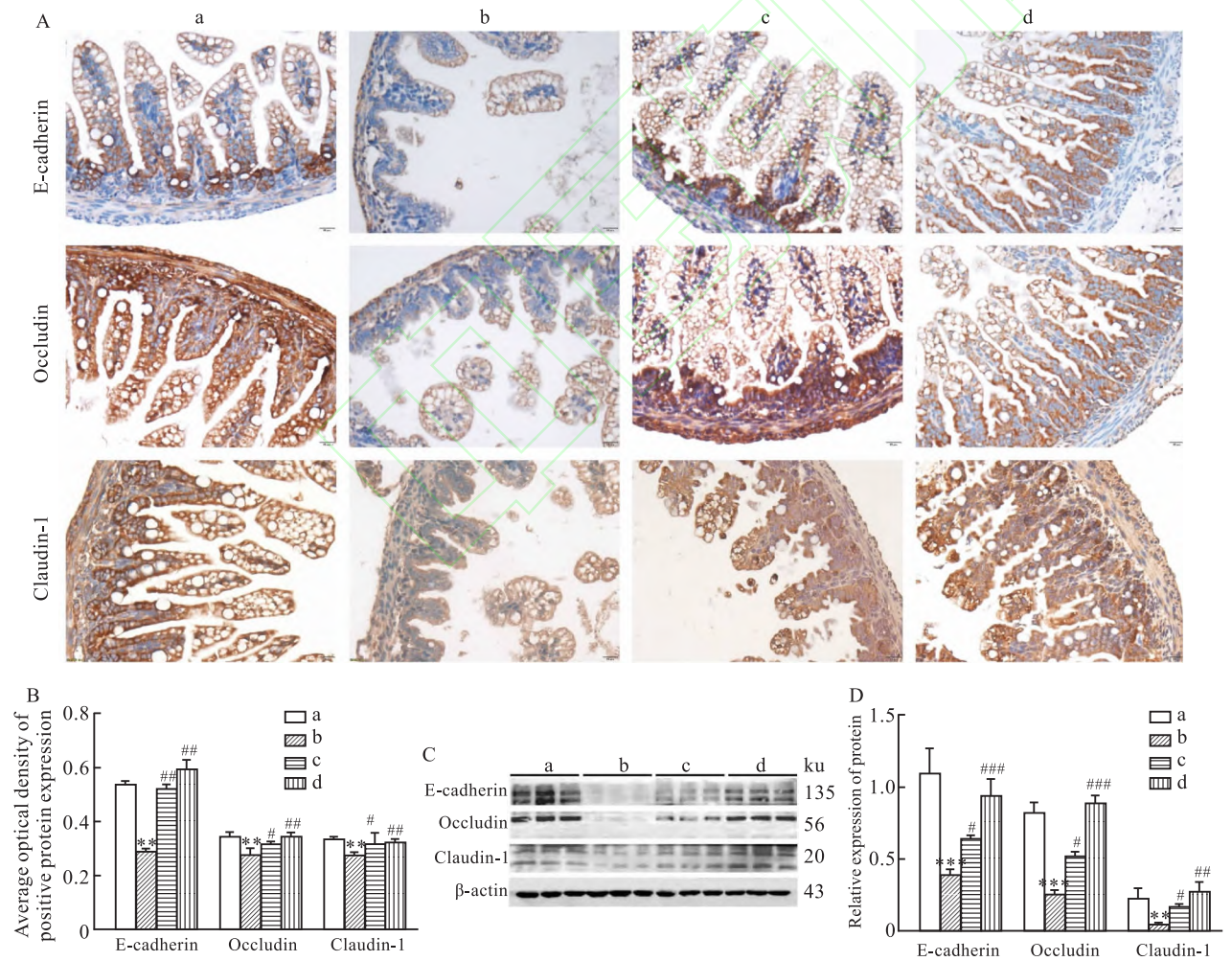


图 3 各组小鼠肠组织 E-cadherin、Occludin、Claudin-1 蛋白表达情况

Fig. 3 The expression of E-cadherin, Occludin and Claudin-1 proteins in intestinal tissues of mice in each group

A: Immunohistochemical staining of E-cadherin Occludin and Claudin-1 proteins in intestinal tissues of mice in each group $\times 400$; B: Statistical analysis of immunohistochemical staining results of E-cadherin Occludin and Claudin-1 proteins in each group; C: Western blot results; D: Comparison of the relative expression of E-cadherin Occludin and Claudin-1 proteins in each group; a: CTRL group; b: NEC group; c: DOPL + NEC group; d: DOPH + NEC group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs CTRL group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs NEC group.

化较 DOPL + NEC 组更明显 ($P < 0.01$)。见表 1。

2.5 各组小鼠肠组织 LDH、MDA、SOD、GSH 检测结果 各组间 LDH、MDA、SOD 及 GSH 含量存在差异 ($F = 66.84, 86.94, 38.25, 206.5, P < 0.01$)。与 CTRL 组相比, NEC 组肠组织中 LDH、MDA 含量升高 ($P < 0.01$), SOD、GSH 活性降低 ($P < 0.01$); 与 NEC 组相比, DOPL + NEC 组和 DOPH + NEC 组肠组织中 LDH、MDA 含量降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), SOD、GSH 活性升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且 DOPH + NEC 组比 DOPL + NEC 组更加明显。见表 2。

2.6 各组小鼠肠组织中 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平 采用免疫组化方法来检测各组小鼠肠组织中 Nrf2、HO-1 蛋白的表达情况, 阳性表达呈棕色甚至棕褐色 (图 4A), 统计分析显示, 各组小鼠间 Nrf2、HO-1 蛋白表达呈现显著差异 ($F = 22.73, 28.03, P < 0.001$), 与 CTRL 组相比, NEC 组小鼠 Nrf2、HO-1 蛋白阳性表达增加 ($LSD-t = 2.94, 4.76, P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 而 DOP 治疗后, 与 NEC 组相比, DOPH + NEC 组上述蛋白表达进一步增加 ($LSD-t = 4.14, 3.51, P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (图 4B)。采用 Western blot 法检测小鼠肠组织中 Nrf2、HO-1 蛋白的表达水平 ($F = 39.42, 43.97, P < 0.001$) (图 4C), 与 CTRL 组相比, NEC 组小鼠上述蛋白表达增加 ($LSD-t = 3.13, 3.32, P < 0.05$); 与 NEC 组相比, DOPH + NEC

组 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平进一步升高 ($LSD-t = 6.99, 7.59, P < 0.01$) (图 4D)。

3 讨论

NEC 是新生儿期的一种严重威胁患儿生命的疾病, 临床上以腹胀、便血、呕吐、腹泻为主要临床表现, 严重者可发生休克及多系统器官功能衰竭。目前国内 NEC 的病死率为 10% ~ 50%, 存活患儿可能留有短肠综合征、肠狭窄以及神经系统发育异常等综合征^[2,14]。所以寻找有效的保护措施和治疗方法对于改善 NEC 的预后至关重要。目前认为此病是多因素综合作用的结果, 包括早产、感染、炎症、缺血、损伤、免疫因素、喂养不当以及呼吸衰竭等^[1], 这些因素相互作用, 导致肠道黏膜屏障功能受损, 氧化应激损伤增加, 产生大量活性氧。活性氧是生物有氧代谢过程中的一种天然副产物, 在细胞信号转导和体内氧化平衡中具有重要作用, 在某些因素刺激下, 活性氧急剧增多, 通过细胞氧化应激影响一系列信号转导途径引起炎症反应^[15]。

铁皮石斛作为一种传统的中药材, 被广泛用于治疗胃肠道疾病, 在 2010 年版及 2020 年版《中华人民共和国药典》中对其“功能与主治”描述为: 益胃生津, 滋阴清热。多糖是铁皮石斛中重要的活性成分, 具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、降血糖、免疫调节和神经元保护等多种潜在功能。如 DOP 可通过激活

表 1 各组小鼠肠组织中炎症因子表达水平 (pg/ml, $n = 6, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 The expression of inflammatory cytokines in intestinal tissues of mice in each group (pg/ml, $n = 6, \bar{x} \pm s$)

Groups	IL-1β	TNF-α	IL-6	IL-10
CTRL	14.82 ± 1.09	14.97 ± 0.72	8.46 ± 0.43	133.40 ± 8.69
NEC	29.86 ± 1.57**	22.40 ± 1.11**	11.37 ± 0.62**	74.28 ± 7.89**
DOPL + NEC	21.15 ± 1.44##	20.50 ± 1.32#	10.11 ± 0.81#	96.49 ± 4.79##
DOPH + NEC	17.57 ± 0.89##	16.90 ± 1.17##	9.43 ± 0.74##	119.50 ± 10.96##
F value	156.50	56.20	19.84	57.80
P value	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

** $P < 0.01$ vs CTRL group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs NEC group.

表 2 各组小鼠肠组织中 LDH、MDA、SOD、GSH 表达水平 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Tab.2 The expression levels of LDH, MDA, SOD, and GSH in intestinal tissues of mice in each group ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Groups	LDH (U/g prot)	MDA (nmol/mg prot)	SOD (U/mg prot)	GSH (μmol/g prot)
CTRL	10.49 ± 2.08	0.75 ± 0.22	54.52 ± 3.87	69.48 ± 3.98
NEC	39.59 ± 5.68**	5.25 ± 0.98**	35.77 ± 3.44**	9.88 ± 1.91**
DOPL + NEC	31.73 ± 4.96#	4.24 ± 0.46#	41.12 ± 2.91#	47.46 ± 6.23##
DOPH + NEC	13.52 ± 3.15##	1.18 ± 0.36##	49.25 ± 2.88##	63.99 ± 5.05##
F value	66.84	86.94	38.25	206.50
P value	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

** $P < 0.01$ vs CTRL group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs NEC group.

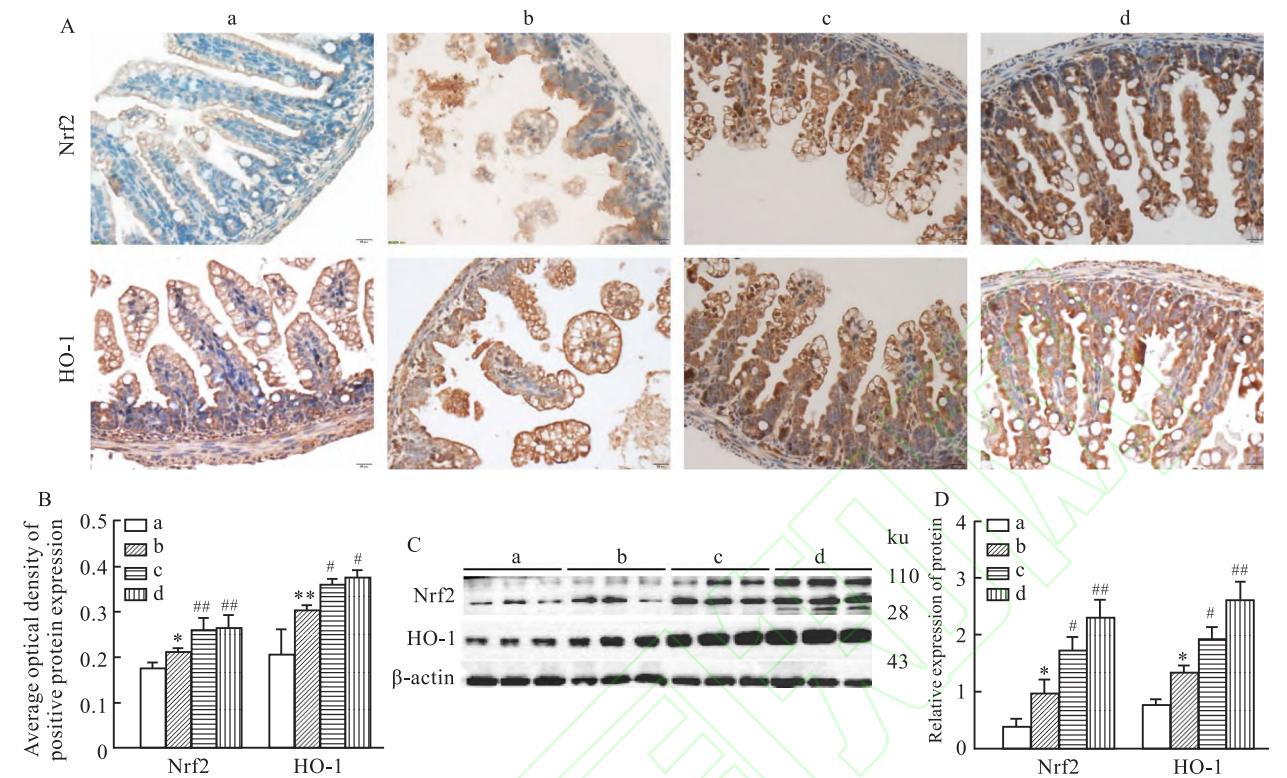


图4 各组小鼠肠组织中 Nrf2、HO-1 蛋白表达情况

Fig. 4 The expression of Nrf2 and HO-1 proteins in intestinal tissues of mice in each group

A: Immunohistochemical staining of Nrf2 and HO-1 proteins in intestinal tissues of mice in each group $\times 400$; B: Statistical analysis of immunohistochemical staining results of Nrf2 and HO-1 proteins in each group; C: Western blot results; D: Comparison of the relative expression of Nrf2 and HO-1 proteins in each group; a: CTRL group; b: NEC group; c: DOPL + NEC group; d: DOPH + NEC group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs CTRL group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs NEC group.

Nrf2/HO-1 通路恢复成骨细胞和脂肪细胞分化过程中氧化应激引起的损伤^[16];DOP 可通过上调 Nrf2/HO-1 通路的表达,抑制星形胶质细胞和小胶质细胞的激活,减轻学习记忆障碍小鼠模型的氧化应激和神经炎症,改善小鼠的认知障碍^[5];DOP 还可以通过显著上调紧密连接蛋白 Claudin-1、Occludin 的基因表达,并通过 LPS/TLR4/TRIF/NF- κ B 轴减少肠道炎症和氧化应激,增强肠道黏膜屏障功能^[17]等。

本研究中 DOP 显示出对 NEC 小鼠模型的显著改善作用。与 NEC 组相比,经 DOP 治疗的小鼠体重增加、症状减轻以及肠道病理损伤程度降低;肠道病理损伤程度的降低直接反映了 DOP 对肠道组织结构保护作用。E-cadherin、Occludin、Claudin-1 蛋白主要在上皮细胞膜上表达,形成完整的膜蛋白,在细胞间黏附以及抵御有害物质入侵方面发挥关键作用,对于维持肠道黏膜屏障的完整性至关重要。通过免疫组化和 Western blot 实验发现,DOP 治疗组小鼠上述蛋白的表达较 NEC 组显著增加,这无疑

有助于增强肠道黏膜屏障功能,减少炎症介质和病原体的渗透,从而减轻 NEC 的病理损伤。此结果与先前的研究^[17]一致。此外,DOP 还显示出明显的抗炎作用,ELISA 结果显示,与 NEC 组相比,DOP 治疗组小鼠肠组织中的炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 浓度降低,而抗炎因子 IL-10 浓度升高,这表明 DOP 能够调节肠道炎症反应,维持炎症因子的平衡,这可能是通过抑制促炎因子的产生和促进抗炎因子的释放实现的。同时,DOP 还显著减轻了 NEC 小鼠的氧化应激损伤,氧化应激指标 MDA、LDH 含量降低,而抗氧化应激指标 GSH、SOD 含量增加,表明 DOP 能够维持氧化应激平衡,保护肠道细胞免受氧化应激损伤。Nrf2 作为细胞抗氧化应激的关键调控因子,通过调控下游抗氧化基因的表达,增加细胞内抗氧化物质的含量,从而对抗氧化应激反应。Nrf2/HO-1 通路的激活可以增强细胞的抗氧化能力,有助于清除自由基,减少氧化损伤,维持体内氧化应激平衡状态^[5]。本研究中,NEC 组 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水

平较 CTRL 组略有增加,说明机体在应激状态下,试图通过激活 Nrf2/HO-1 通路抵抗氧化应激损伤,然而 NEC 引起的氧化应激损伤可能超过了机体原有的激活 Nrf2/HO-1 通路对抗氧化应激的能力,导致氧化应激和炎症反应加剧;而 DOP 治疗组小鼠 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平较 NEC 组进一步升高,同时氧化应激损伤和炎症反应减轻,说明 DOP 激活 Nrf2/HO-1 通路可能是调节 NEC 小鼠氧化应激损伤和炎症反应的分子机制之一。此外,DOP 对 NEC 的保护作用还可能涉及多条信号通路的作用。

综上所述,本研究结果表明 DOP 可以改善 NEC 小鼠肠道黏膜屏障功能,对 NEC 有明显的改善作用,其机制可能与激活 Nrf2/HO-1 通路减轻氧化应激和肠道炎症有关,此发现为 NEC 的治疗提供了新的思路,并为未来的研究和临床应用奠定了一定的基础。尽管本研究探讨了 DOP 通过激活 Nrf2/HO-1 的机制来改善小鼠 NEC 的能力,提供了 DOP 对 NEC 具有潜在治疗作用的证据,但仍存在一些局限性。首先,本研究主要关注了 DOP 对 NEC 的短期影响,长期治疗的效果和可能的副作用尚不清楚,而且仅在动物模型中进行了验证,其在人类患者中的效果和安全性仍需进一步研究。其次,对其分子机制的研究不够深入,未来应进一步探索 DOP 激活 Nrf2/HO-1 通路的调控机制,以及可能存在的其他信号通路的协同作用。

参考文献

- [1] Gomart A, Vallée A, Lecarpentier Y. Necrotizing enterocolitis: lps/TLR4-induced crosstalk between canonical TGF- β /wnt/ β -catenin pathways and PPAR γ [J]. Front Pediatr, 2021, 9: 713344. doi:10.3389/fped.2021.713344.
- [2] 程舒鹏,陈名武,潘家华.足月儿坏死性小肠结肠炎危险因素分析[J].安徽医科大学学报,2022,57(9):1486-9. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.027.
- [2] Cheng S P, Chen M W, Pan J H. Analysis on risk factors for necrotizing enterocolitis in term infant [J]. Acta Univ Med Anhui, 2022, 57(9): 1486-9. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.027.
- [3] Tao J, Mao J, Yang J, et al. Effects of oropharyngeal administration of colostrum on the incidence of necrotizing enterocolitis, late-onset sepsis, and death in preterm infants: a meta-analysis of RCTs [J]. Eur J Clin Nutr, 2020, 74: 1122-31. doi:10.1038/s41430-019-0552-4.
- [4] Dai L, Jie S, Bi S, et al. Angiopoietin-2 silence alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation, barrier dysfunction and endoplasmic reticulum stress of intestinal epithelial cells by blocking Notch signaling pathway [J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 8116-24. doi:10.1080/21655979.2021.1985341.
- [5] Liang J, Wu Y, Yuan H, et al. Dendrobium officinale polysaccharides attenuate learning and memory disabilities via anti-oxidant and anti-inflammatory actions [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 126: 414-26. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.230.
- [6] Zhao Y, Lu X, Huang H, et al. Dendrobium officinale polysaccharide converts M2 into M1 subtype macrophage polarization via the STAT6/PPAR- α and JAGGED1/NOTCH1 signaling pathways to inhibit gastric cancer [J]. Molecules, 2023, 28(20): 7062. doi:10.3390/molecules28207062.
- [7] Liu Y, Yang L, Zhang Y, et al. Dendrobium officinale polysaccharide ameliorates diabetic hepatic glucose metabolism via glucagon-mediated signaling pathways and modifying liver-glycogen structure [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 248: 112308. doi:10.1016/j.jep.2019.112308.
- [8] Niu W, Chen X, Xu R, et al. Polysaccharides from natural resources exhibit great potential in the treatment of ulcerative colitis: a review [J]. Carbohydr Polym, 2021, 254: 117189. doi:10.1016/j.carbpol.2020.117189.
- [9] Liang J, Chen S, Chen J, et al. Therapeutic roles of polysaccharides from dendrobium officinale on colitis and its underlying mechanisms [J]. Carbohydr Polym, 2018, 185: 159-68. doi:10.1016/j.carbpol.2018.01.013.
- [10] He L, Yan X, Liang J, et al. Comparison of different extraction methods for polysaccharides from dendrobium officinale stem [J]. Carbohydr Polym, 2018, 198: 101-8. doi:10.1016/j.carbpol.2018.06.073.
- [11] Ma F, Hao H, Gao X, et al. Melatonin ameliorates necrotizing enterocolitis by preventing Th17/Treg imbalance through activation of the AMPK/SIRT1 pathway [J]. Theranostics, 2020, 10(17): 7730-46. doi:10.7150/thno.45862.
- [12] Gopalakrishna K P, Macadangdang B R, Rogers M B, et al. Maternal IgA protects against the development of necrotizing enterocolitis in preterm infants [J]. Nat Med, 2019, 25: 1110-5. doi:10.1038/s41591-019-0480-9.
- [13] Nadler E P, Dickinson E, Knisely A, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and interleukin-12 in experimental necrotizing enterocolitis [J]. J Surg Res, 2000, 92(1): 71-7. doi:10.1006/jsre.2000.5877.
- [14] Mackay C A, Rath C, Rao S, et al. Plant-derived substances for prevention of necrotizing enterocolitis: a systematic review of animal studies [J]. Nutrients, 2024, 16(6): 832. doi:10.3390/nu16060832.
- [15] Liu M, Wang Y, Li S, et al. Attenuates reactive oxygen species: induced pyroptosis via activation of the Nrf2/HO-1 signal pathway in models of trigeminal neuralgia [J]. Sci Rep, 2023, 13: 18111. doi:10.1038/s41598-023-44013-w.
- [16] Peng H, Yang M, Guo Q, et al. Dendrobium officinale polysaccharides regulate age-related lineage commitment between osteogenic and adipogenic differentiation [J]. Cell Prolif, 2019, 52(4): e12624. doi:10.1111/cpr.12624.
- [17] Chen X, Chen C, Fu X. Dendrobium officinale polysaccharide al-

leviates type 2 diabetes mellitus by restoring gut microbiota and re-pairing intestinal barrier *via* the LPS/TLR4/TRIF/NF- κ B axis

[J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(31): 11929–40. doi:10.1021/acs.jafc.3c02429.

Dendrobium officinale polysaccharides ameliorate intestinal injury in neonatal mice with necrotizing enterocolitis by activating Nrf2/HO-1 pathway

Wang Jing^{1,2}, Wu Ming¹, Wang Jun¹

(¹*Dept of Pediatrics, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000;*

²*Dept of Pediatrics, The People's Hospital of Jiawang District of Xuzhou City, Xuzhou 221011*)

Abstract Objective To explore the effect of dendrobium officinale polysaccharides (DOP) on necrotizing enterocolitis (NEC) in neonatal mice and to preliminarily explore the potential molecular mechanisms. **Methods** Seven-day-old C57BL/6J mice were randomly divided into four groups: control (CTRL) group, necrotizing enterocolitis (NEC) group, low-dose DOP treatment (DOPL + NEC) group and high-dose DOP treatment (DOPH + NEC) group. The NEC model was established by hypoxia, cold stimulation, hypertonic feeding and intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS). At the end of the experiment, the small intestine tissues were collected. The general condition of the mice was observed, and body weight was recorded. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe pathological changes in the small intestine tissues. The expression levels of E-cadherin, Occludin and Claudin-1 were detected by immunohistochemistry and Western blot. The concentrations of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-6 and IL-10 were measured by ELISA. The levels of lactate dehydrogenase (LDH), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) were detected using commercial kits. The expression levels of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) proteins were detected by immunohistochemistry and Western blot. **Results** Compared with the CTRL group, the NEC group exhibited decreased body weight and increased HE pathological scores ($P < 0.01$ or $P < 0.001$). The protein expression levels of E-cadherin, Occludin and Claudin-1 were reduced ($P < 0.01$ or $P < 0.001$). The concentrations of TNF- α , IL-1 β and IL-6 increased, while the concentration of IL-10 decreased ($P < 0.01$). The levels of MDA and LDH increased, while the levels of GSH and SOD decreased ($P < 0.01$). The protein expression levels of Nrf2 and HO-1 increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In contrast, DOP intervention groups showed increased body weight and decreased HE scores ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The protein expression levels of E-cadherin, Occludin and Claudin-1 increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$ or $P < 0.01$). The concentrations of TNF- α , IL-1 β and IL-6 decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the concentration of IL-10 increased ($P < 0.01$). The levels of MDA and LDH decreased, while the levels of GSH and SOD increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The protein expression levels of Nrf2 and HO-1 further increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** DOP can ameliorate the pathological damage of necrotizing enterocolitis and enhance the intestinal mucosal barrier function in NEC mice. Additionally, it can also reduce oxidative stress injury and intestinal inflammation in NEC mice. The mechanism may be associated with the activation of the Nrf2/HO-1 pathway by DOP.

Key words dendrobium; polysaccharides; enterocolitis; nuclear factor erythroid 2-related factor 2; heme oxygenase-1; tight junction protein; oxidative stress

Fund program National Natural Science Foundation of China (No. 81904249)

Corresponding author Wang Jun, E-mail: 664586331@qq.com