

咖啡酸乙酯通过激活 Wnt/ β -Catenin 通路恢复肠上皮紧密连接 缓解小鼠结肠炎

张可妮¹, 张龙涛¹, 章雨¹, 黄菊², 李晴晴¹, 耿志军², 胡建国^{1,2}, 李静^{1,2}

蚌埠医科大学第一附属医院¹检验科,²炎症相关性疾病基础与转化研究安徽省重点实验室,安徽蚌埠 233004

摘要:目的 探讨咖啡酸乙酯(EC)调控肠屏障对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导小鼠结肠炎的作用和机制。方法 将40只SPF级C57BL/6雄性小鼠随机分为对照组、DSS模型组(DSS)及3个不同剂量的EC干预组(5、10、20 mg/kg),共5组,8只/组。通过自由饮用2.5% DSS构建结肠炎模型,造模同时每日灌胃给予相应剂量EC,持续干预7 d。通过体重变化、疾病活动指数(DAI)、结肠长度及组织病理学评分结果,系统评估结肠炎表型;免疫荧光检测紧密连接蛋白ZO-1、Claudin-1的表达与定位;AB-PAS染色评估杯状细胞数量;ELISA、RT-qPCR及免疫组化检测炎症水平;采用网络药理学预测EC调控的关键信号通路并采用Western blotting和信号通路抑制剂分析其作用机制。结果 EC(10 mg/kg)可显著缓解DSS诱导的结肠炎症状;与DSS组相比,EC组体重下降减少,DAI评分降低,结肠长度恢复,结肠组织病理损伤减轻(均 $P<0.05$)。进一步检测发现EC显著下调肠黏膜组织中炎症因子TNF- α 、IL-6的mRNA及蛋白表达,降低肠黏膜MPO阳性水平($P<0.05$);EC对DSS诱导肠屏障损伤亦有显著的改善作用,不仅可恢复杯状细胞数量,还可上调紧密连接蛋白ZO-1/Claudin-1的表达并恢复其细胞膜定位($P<0.05$)。网络药理学筛选出350个EC与炎症性肠病(IBD)的交集基因,KEGG富集分析发现Wnt/ β -catenin及紧密连接为EC的核心作用通路。Western blotting检测结果显示,EC可激活DSS诱导的肠上皮细胞中Wnt/ β -catenin通路,上调WNT3A及 β -catenin表达($P<0.05$);采用Wnt通路抑制剂IWR-1干预可阻断EC对紧密连接蛋白及Wnt/ β -catenin通路上调 and 激活作用。结论 咖啡酸乙酯通过激活Wnt/ β -catenin信号通路,促进肠上皮紧密连接蛋白的表达,改善肠黏膜屏障功能并缓解DSS诱导的小鼠结肠炎,为炎症性肠病的天然化合物干预提供新的候选药物及作用靶点。

关键词:咖啡酸乙酯;炎症性肠病;Wnt/ β -catenin通路;肠上皮紧密连接;肠黏膜屏障;杯状细胞

Ethyl caffeate alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by restoring intestinal epithelial tight junctions via activating the Wnt/ β -Catenin pathway

ZHANG Keni¹, ZHANG Longtao¹, ZHANG Yu¹, HUANG Ju², LI Qingqing¹, GENG Zhijun², HU Jianguo^{1,2}, LI Jing^{1,2}

¹Department of Clinical Laboratory, ²Anhui Key Laboratory of Basic and Translational Research on Inflammatory Related Diseases, First Affiliated Hospital of Bengbu Medical University, Bengbu 233004, China

Abstract: Objective To observe the effect of ethyl caffeate (EC) on intestinal barrier function in mice with dextran sulfate sodium (DSS) -induced murine colitis and explore the possible mechanism. **Methods** Forty male C57BL/6 mice were randomized into control group, DSS model group, and 3 EC groups treated with EC at 5, 10, or 20 mg/kg. Mouse models of colitis were established by treatment with 2.5% DSS for 7 days, and EC treatment was administered daily by gavage. Colitis phenotypes were assessed by changes in body weight, disease activity index (DAI), colon length and histology. Immunofluorescence staining and PAS staining were used to examine the changes in expressions of the tight junction proteins ZO-1 and claudin-1 and goblet cells, respectively. The intestinal levels of inflammatory factors were detected by ELISA, RT-qPCR and immunohistochemistry. Network pharmacology combined with Western blotting and Wnt inhibitor (IWR-1) was used to verify the mechanism of EC for ameliorating colitis. **Results** Treatment with EC at 10 mg/kg significantly alleviated DSS-induced colitis in the mouse models, reduced intestinal pro-inflammatory cytokines and MPO levels, increased goblet cell counts, and restored ZO-1 and claudin-1 expressions and their membrane localization. Network pharmacology identified Wnt/ β -catenin and tight junction pathways as the core targets of EC, which activated the Wnt/ β -catenin pathway by upregulating WNT3A/ β -catenin, and this effect was blocked by treatment with IWR-1. **Conclusion** EC ameliorates DSS-induced colitis in mice by activating Wnt/ β -catenin signaling to restore tight junction protein expressions and localization, thereby improving intestinal barrier function, suggesting the value of EC as a novel candidate for treatment of inflammatory bowel disease.

Keywords: Ethyl Caffeate; inflammatory bowel disease; Wnt/ β -Catenin pathway; intestinal epithelial tight junctions; intestinal mucosal barrier; goblet cells

炎症性肠病(IBD)是一类慢性不可治愈的免疫介

导性疾病,如今已成为全球性健康问题^[1]。近年来,全球IBD发病率呈显著攀升趋势,尤其在发展中国家增速明显,患者不仅面临腹泻、腹痛、便血等严重影响生活质量的症状,还长期承受肠道纤维化、狭窄甚至癌变的远期风险^[2-4]。目前,IBD的发病机制尚未完全阐明,普遍认为与遗传易感性、肠道菌群失调、免疫功能紊乱及肠黏膜屏障损伤密切相关,其中肠黏膜屏障功能紊乱被视为

收稿日期:2026-01-22

基金项目:安徽省临床医学研究转化专项(202427b10020088);炎症相关性疾病基础与转化研究安徽省重点实验室开放课题(YZ2025B04, YZ2025B03);蚌埠医科大学研究生创新计划项目(Byyex25018)

作者简介:张可妮,在读硕士研究生,E-mail: kenizhang0906@163.com

通信作者:李静,副教授,硕士生导师,E-mail: lijingbyfy@bbmu.edu.cn

疾病发生的核心病理基础^[5,6]。

肠黏膜屏障由杯状细胞分泌的黏液层与肠上皮紧密连接(ZO-1、Claudin家族、Occludin等)共同组成,二者功能异常均会导致肠道通透性增加,引发肠道菌群易位和固有层免疫系统过度激活,进而启动炎症因子级联释放,加剧肠道黏膜损伤^[7]。因此,靶向修复肠上皮紧密连接、重建肠黏膜屏障已成为IBD治疗的重要策略^[8,9]。Wnt/ β -catenin信号通路作为调控肠上皮细胞增殖、分化及黏膜稳态的核心通路,在肠黏膜屏障修复中发挥不可替代的作用^[10]。生理状态下,该通路通过促进肠干细胞更新和紧密连接蛋白合成维持肠道上皮完整性;而在IBD病理微环境中,Wnt/ β -catenin通路活性显著降低,导致肠上皮细胞更新障碍、紧密连接蛋白表达紊乱,进一步加重肠道损伤^[11]。激活Wnt/ β -catenin通路可有效修复结肠炎模型的肠黏膜屏障,提示该通路可能是IBD治疗的关键调控节点^[12,13]。

IBD的临床治疗以抗TNF- α 单抗、免疫抑制剂等为主,但存在治疗抵抗、不良反应明显及疾病易复发等问题,亟需挖掘兼具抗炎与肠黏膜屏障修复双功能的安全天然活性化合物^[14]。咖啡酸乙酯(EC)已被证实具有明确的抗炎、抗氧化、抗菌及调节黏膜免疫反应等药理活性^[15-19],且可通过抑制MAPK、NF- κ B等炎症通路减轻炎症反应,还能通过调节肠道菌群改善感染^[19-22]。尽管EC已在脓毒症急性肺损伤、创伤性异位骨化等炎症疾病中展现抗炎活性^[21,23],但其在IBD中的应用价值及相关机制尚未见报道。现有研究仅提及EC对石斑鱼黏膜免疫的抑制作用^[19],却未涉及对屏障结构和功能的调控作用。同时,研究提示结构相似的酚类化合物(如槲皮素)可通过激活Wnt/ β -catenin通路修复上皮屏障^[24],但EC能否调控该通路及其在小鼠肠屏障修复中的作用未知。

基于此,本研究结合体内动物实验(DSS诱导小鼠结肠炎模型)、体外细胞模型(DSS诱导的Caco-2细胞)、网络药理学分析,评估EC对DSS诱导的小鼠结肠炎的治疗作用和分子机制,为天然活性化合物干预IBD提供了全新的实验支撑,同时为开发靶向肠黏膜屏障修复的新型精准治疗策略筑牢理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 本研究选取40只SPF级雄性C57BL/6小鼠(江苏集萃药康生物科技股份有限公司)。所用小鼠为6~7周龄,体质量20~25 g。所有动物均在屏障环境中饲养,环境条件严格控制:温度维持在 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 $50\%\pm 5\%$,每日照明设置为12 h:12 h光照与黑暗循环交替。实验前,所有小鼠均经过6 d的环境适应期。本研究所有实验动物操作环节均经蚌埠医科大学

实验动物伦理委员会审批通过(伦动科批字[2025]第398号)。

1.1.2 试剂与仪器

1.1.2.1 基础生物试剂 EC(陶术生物);葡聚糖硫酸钠(DSS,MP Biomedicals);牛血清白蛋白(BSA,Sigma);IWR-1(MCE);RIPA裂解液(李记生物)。

1.1.2.2 试剂盒与检测试剂 苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、AB-PAS染色试剂盒、CCK-8检测试剂以及不含酚红的胰蛋白酶消化液(索莱宝科技);酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(斯达特);TB Green荧光染料(Takara);RNA提取试剂盒(Vazyme);BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天)。

1.1.2.3 培养基与血清 DMEM培养基及胎牛血清(FBS,Gibco)。

1.1.2.4 抗体 紧密连接相关抗体ZO-1、Claudin-1,以及山羊抗兔IgG H&L(FITC)、山羊抗小鼠IgG H&L(Alexa Flour®555)抗体(Abcam);免疫组化抗体MPO、Claudin-1及WNT通路相关抗体WNT3A、 β -catenin抗体(Proteintech);兔抗GAPDH抗体、HRP-偶联的山羊抗兔IgG抗体、HRP-偶联的山羊抗小鼠IgG抗体(ZSGB-BIO)。

1.1.2.5 实验仪器 荧光倒置显微镜(徕卡DMI8)、实时荧光定量PCR仪(QuantStudio DX)、多功能酶标仪(PerkinElmer Ensign)、多色荧光化学发光凝胶成像系统(ChemiDoc MP)、包埋机(徕卡HistoCore Arcadia)、玻片扫描仪(Olympus VS200)、石蜡切片机(HistoCore MULTICUT)。

1.2 实验方法

1.2.1 DSS结肠炎建模与分组设计 本实验采用随机数字表法开展完全随机分组,40只小鼠分为对照组、DSS模型组(DSS组)、EC低剂量组(5 mg/kg)、EC中剂量组(10 mg/kg)、EC高剂量组(20 mg/kg)^[21,23],8只/组。模型构建与药物干预同步进行。造模:DSS组及各EC干预组小鼠,均自由饮用质量体积分数为2.5%的DSS无菌水溶液,每笼每日更换30 mL新鲜配制的溶液,连续干预7 d以构建实验性结肠炎模型。药物干预:造模当日,各EC组于每日8:00~10:00进行灌胃给药,给药体积统一为0.1 mL/只。针对25 g体质量的小鼠,对应给药量分别为0.125、0.25、0.5 mg,药物均溶于100 μL 复合溶剂,溶剂配方为1% DMSO原液与99%生理盐水混合。对照组与DSS组在相同时间点灌胃等体积的该溶剂,全程干预7 d。样本处理:造模结束后,处死小鼠。按如下流程处理:首先测量自肛门至回盲部的结肠全长;沿肠管纵轴剖开后,部分组织置于福尔马林中固定,以供后续组织病理学检测;截取结肠近端1 cm肠段,刮取肠黏膜备用,用于后续分子生物学实验。

1.2.2 肠炎相关症状评估 体质量动态记录:每日上午9时,采用精密电子天平对小鼠体质量(g)进行精准测定并做好记录。DAI评分计算:基于小鼠体质量波动程度、粪便性状特征及消化道出血状况的综合评估,采用(体质量变化系数+粪便性状分值+出血程度分值)/3的计算公式,评分范围设定为0~4分,数值越高表明结肠炎病理表现越严重^[25]。结肠形态检测:实验动物处死后,迅速将完整的结肠样本展开于4℃预冷的标尺平台上,测定从肛门至回盲部的结肠长度,连续测量3次并取平均值作为最终数据。

1.2.3 HE和AB-PAS染色 结肠组织于福尔马林固定48 h后,经TBST缓冲液洗涤去除表面污染物,随后采用改良式“瑞士卷”制作流程处理样本^[26]:分离结肠外层粘着的血管和肠系膜,经PBS溶液冲洗肠腔内壁去除残余物,自结肠近端卷曲肠管并保持黏膜层完整连续,随即移入包埋盒,后续经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后,制作3 μm厚的组织切片,按HE与AB-PAS染色试剂盒操作说明完成染色,封片后镜下评估组织的病理变化,并采用四级评分法(0~4分)对病变程度进行量化评估^[27];AB-PAS染色封片后借助显微镜采集图像,通过计数400倍视野下杯状细胞数量,量化评估肠屏障的损伤情况。

1.2.4 ELISA检测炎症因子蛋白表达水平 结肠组织经充分研磨与裂解后,于12 000 r/min转速下离心15 min,收集上清液并于-20℃保存。后续实验严格遵循ELISA试剂盒操作指南进行。酶标仪检测各孔吸光度 $A_{450\text{nm}}$ 值,定量检测结肠黏膜组织中炎症因子IL-6与TNF-α的蛋白浓度。

1.2.5 RT-qPCR测定炎症介质mRNA转录水平

1.2.5.1 RNA提取与cDNA合成 提取组织和细胞样本的总RNA,测出其浓度后参照试剂盒说明书完成反转录反应,制备cDNA备用。

1.2.5.2 PCR扩增与基因表达分析 使用TB Green Premix Ex Taq II试剂盒,通过实时荧光定量PCR技术,测定结肠组织及细胞样本中IL-6与TNF-α的mRNA转录水平,并检测细胞样本中肠屏障相关指标(ZO-1、Claudin-1)的mRNA表达水平。PCR扩增程序设置为:95℃预变性30 s;95℃变性10 s、60℃退火30 s,重复40个循环。目的基因的表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法进行测定,实验所用引物均由上海生工设计合成(表1)。

1.2.6 免疫组织化学染色检测 取结肠组织石蜡切片,于70℃烘片固定,随后依次进行抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、封闭非特异性结合位点。完成上述处理后,于切片上分别滴加相应一抗(MPO,1:200)及(Claudin-1,1:500),4℃孵育过夜后,室温复温后PBS洗涤3次,5 min/次,滴加辣根过氧化物酶标记的二抗。经DAB显色剂显色后,采用苏木素对细胞核进行复染,复染结束

表1 引物序列

Tab.1 Primer sequences for RT-qPCR

Gene name	Gene ID	Primer sequences (5'-3')
IL-6	16193	F:TCTATACCACTTCACAAGTCGGA
		R:GAATTGCCATTGCACAACCTCTTT
TNF-α	21926	F:CAGGCGGTGCCTATGTCTC
		R:CGATCACCCGAAGTTCAGTAG
ZO-1	21872	F:TTCACAGAGCAGCGACAACCT
		R:TCTGCTGGAGTAGGCTACGA
Claudin-1	100771737	F:AAAGCACCGGGCAGATACAA
		R:TCATGCCAATGGTGGACACA
GAPDH	14433	F:TGGCCTTCCGTGTTCTCTAC
		R:GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA

后依次经梯度酒精脱水、二甲苯透明处理,最后用中性树脂进行封片。封片完成后,借助Olympus玻片扫描仪采集组织全视野图像,用于后续病理分析,每组随机选取6张代表性图片,利用ImageJ测量阳性区域。

1.2.7 Caco-2细胞CCK-8检测 Caco-2细胞融合度至70%时,经无酚红胰酶消化并重悬,按 $6 \times 10^4/\text{mL}$ 密度接种于96孔板。待细胞融合度达65%~75%时,移除培养基,PBS洗涤两次。加入含不同浓度EC的培养基100 μL/孔,每组设5个复孔。处理24 h后,加CCK-8溶液,10 μL/孔,37℃孵育1~4 h,测量吸光度 $A_{450\text{nm}}$ 。细胞活力按以下公式计算:细胞活力(%)= $(A_{\text{药物组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

1.2.8 免疫荧光染色检测Caco-2细胞间紧密连接蛋白表达定位

1.2.8.1 细胞爬片制备 胰酶消化对数生长期Caco-2细胞,离心收集后加入DMEM培养基,轻柔吹打制成单细胞悬液后分为3组:对照组、DSS模型组(2% DSS)、EC组(10 μmol/L),无菌镊子夹取细胞爬片放入6孔板(4片/孔),加入2 mL细胞悬液,轻轻摇晃使细胞均匀分布,37℃、5% CO₂培养至细胞密度达90%左右时,按分组加入相应药物干预。

1.2.8.2 染色 造模处理3 d后,弃去培养基,PBS洗涤2次,4%多聚甲醛固定15 min,0.2% Triton X-100通透10 min,5% BSA封闭1 h。滴加一抗(ZO-1,1:200;Claudin-1,1:400),4℃孵育过夜,复温后PBS洗涤3次,加入荧光二抗[山羊抗兔IgG H&L(FITC),1:1000;山羊抗小鼠IgG H&L(Alexa Flour®555),1:1000;DAPI(1 μg/mL)染细胞核],避光孵育后洗涤封片,显微镜观察成像,ImageJ定量荧光强度及定位情况。

1.2.9 网络药理学分析 通过PubChem获取咖啡酸乙酯(Ethyl Caffate)的SMILES分子结构,录入SEA和Super-PRED在线系统预测潜在靶点。SEA仅保留人

类(HUMAN)靶点,按默认阈值($E\text{-value}<1e\text{-}5$)筛选; Super-PRED 设定置信度 >0.6 为筛选标准。经 UniProt 标准化转换并去重,构建药物候选靶标库。检索 GeneCards、CTD 数据库获取“炎症性肠病”(Inflammatory bowel disease)相关基因,汇总去重后建立疾病靶标库。利用 Venny 2.1 比对得到 350 个药物-疾病交集基因,筛选确定关键靶点。将其上传至 STRING 平台,构建蛋白质互作(PPI)网络。借助微生信系统,通过 DAVID 工具进行 KEGG 通路及 GO 功能(生物过程、分子功能、细胞组分)富集分析,实现结果可视化。

1.2.10 Western blotting 检测

1.2.10.1 蛋白提取 结肠组织样本采用含有蛋白酶抑制剂的预冷 RIPA 裂解液进行裂解,13 000 r/min 离心 15 min,收集上清液;细胞样本经 PBS 洗涤 2 次后,使用预冷 RIPA 冰上裂解 30 min,于 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 10 min,获取上清。

1.2.10.2 蛋白处理 通过 BCA 法测定蛋白浓度,加入 5×SDS 上样缓冲液,经 95 °C 加热使蛋白变性,分装后于 -80 °C 保存备用。

1.2.10.3 电泳转膜 依据目标蛋白相分子质量配制适宜浓度的分离胶,在 200 V 电压下,电泳 30 min 分离蛋白;之后将蛋白转移至经甲醇活化的 PVDF 膜上,400 mA 恒定电流转膜 35 min。

1.2.10.4 抗体孵育与检测 5%脱脂奶粉-TBST 室温封闭 60 min,4 °C 孵育一抗(ZO-1,兔源,1:1000;Claudin-1,兔源,1:2000;WNT3A,鼠源,1:500; β -catenin,鼠源,1:5000)及内参 GAPDH(兔源,1:2000)过夜。TBST 洗膜 3 次(5 min/次),加入 HRP 二抗(HRP-偶联的山羊抗小鼠/兔 IgG,1:3000),室温孵育 1 h。ECL 化学发光成像,ImageJ 软件定量条带光密度值。

1.3 统计学分析

本研究采用 SPSS 26.0 分析数据。计量数据以均值±标准差表示,根据分布情况选用 t 检验或方差分析进行组间比较。 $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 EC 干预可减轻 DSS 诱导的小鼠结肠炎症状

经 DSS 诱导后,小鼠呈现体质量降低、稀便及出血等结肠炎症状,证明 DSS 诱导的结肠炎模型构建成功。预实验通过梯度浓度干预筛选发现,EC 干预浓度为 10 mg/kg 时,对结肠炎具有改善作用。在第 7 天,EC-10 组小鼠体质量为 26.34 ± 0.28 g,高于 DSS 组($P<0.05$,图 1A),DAI 评分由 3.63 ± 0.52 降至 2.14 ± 0.35 ($P<0.05$,图 1B),增加药物浓度并不能进一步改善肠炎,因此后续实验确定 10 mg/kg 为 EC 干预剂量。进一步结果显示,EC 干预可逆转 DSS 诱导的结肠缩短($P<0.05$,图 1C、D)。

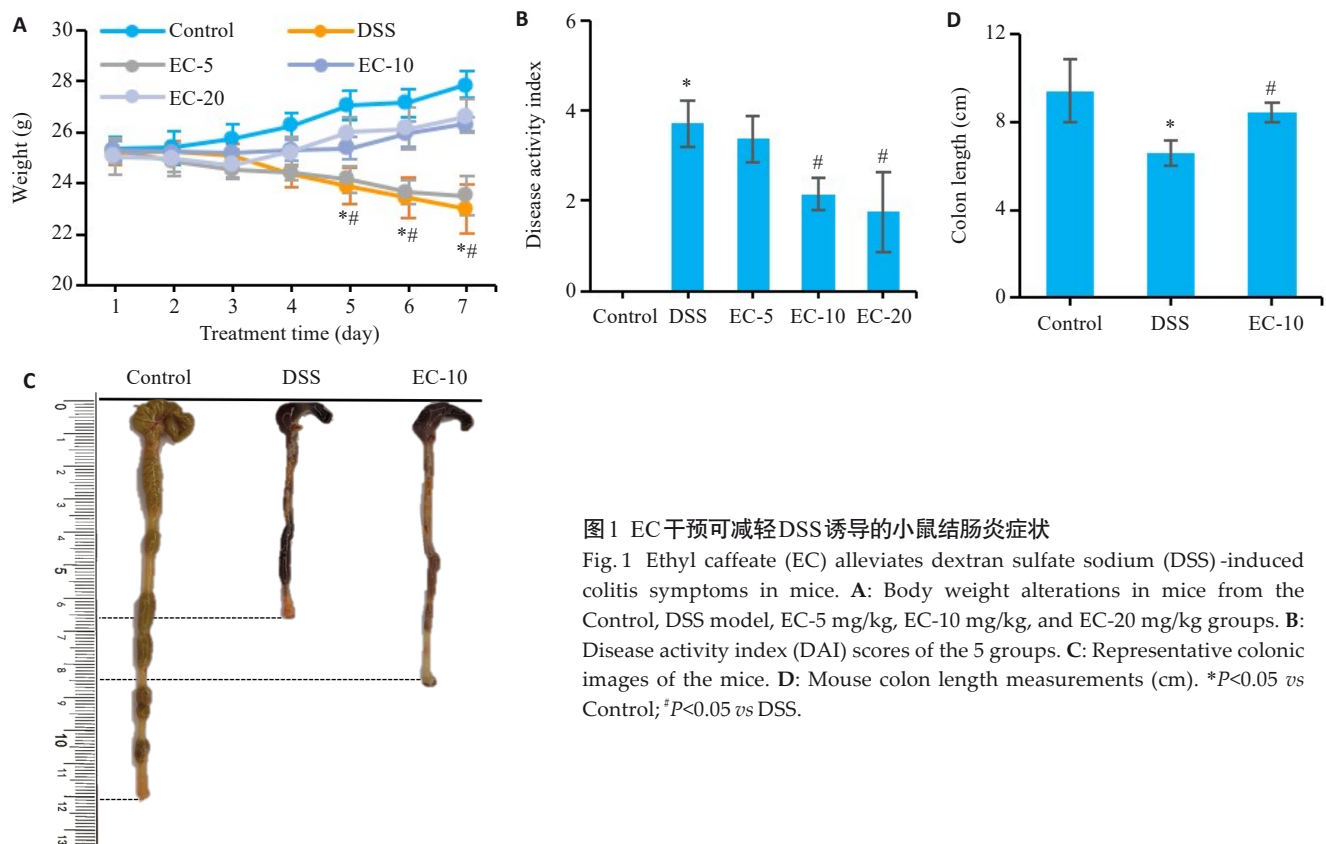


图1 EC干预可减轻DSS诱导的小鼠结肠炎症状

Fig.1 Ethyl caffeate (EC) alleviates dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis symptoms in mice. A: Body weight alterations in mice from the Control, DSS model, EC-5 mg/kg, EC-10 mg/kg, and EC-20 mg/kg groups. B: Disease activity index (DAI) scores of the 5 groups. C: Representative colonic images of the mice. D: Mouse colon length measurements (cm). * $P<0.05$ vs Control; [#] $P<0.05$ vs DSS.

2.2 EC减轻结肠组织病理损伤并抑制炎症水平

小鼠结肠组织经HE染色及炎症程度评分显示,EC干预能够减轻DSS诱导的结肠黏膜炎症细胞浸润,且有效降低结肠组织炎症评分($P<0.05$,图2A)。免疫组化染色结合平均光密度值定量分析显示,DSS组肠黏膜组

织中MPO表达水平升高($P<0.05$,图2B),EC干预可有效抑制MPO的水平。RT-qPCR与ELISA检测结果显示,DSS组结肠黏膜促炎因子(TNF- α 、IL-6)的mRNA及蛋白水平均升高($P<0.05$,图2C、D),经EC干预后,表达量均下调($P<0.05$,图2C、D)。

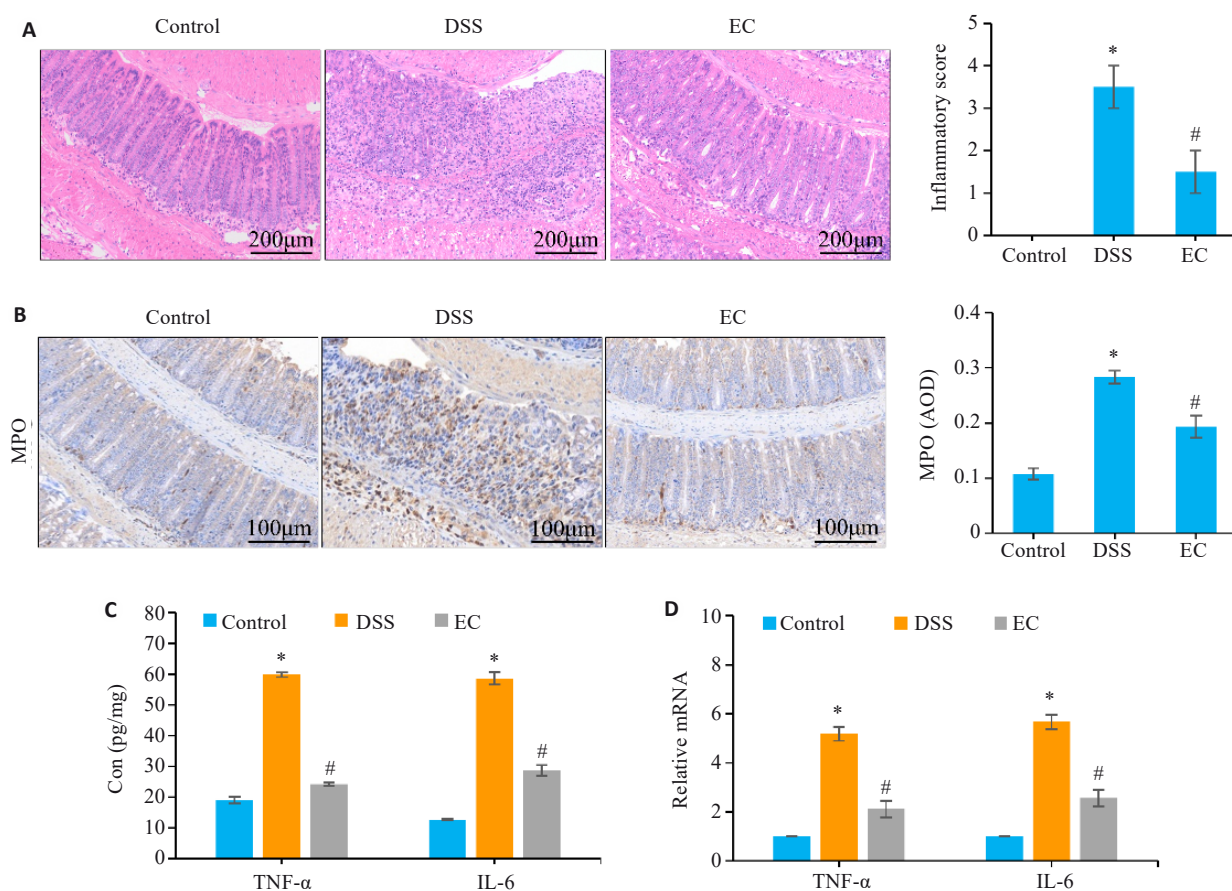


图2 EC减轻结肠组织病理损伤并抑制炎症水平

Fig. 2 EC attenuates colonic pathology and inflammation in mice with DSS-induced colitis. **A:** Histological analysis and inflammation scoring of mouse colons using HE staining. **B:** MPO immunohistochemistry and the average optical density (AOD) in the 3 groups. **C:** TNF- α and IL-6 protein concentrations in colonic mucosa quantified using ELISA. **D:** Relative mRNA expression of TNF- α and IL-6 in colonic mucosa measured by RT-qPCR. * $P<0.05$ vs Control; # $P<0.05$ vs DSS.

2.3 EC改善DSS诱导小鼠肠屏障损伤

小鼠结肠组织AB-PAS染色显示,与对照组比较,DSS组小鼠肠黏膜内的杯状细胞数量降低;而在EC干预后,该细胞数量较DSS组明显回升($P<0.05$,图3A)。免疫组化结果显示,与对照组相比,DSS组小鼠结肠组织中Claudin-1的阳性表达信号显著减弱,且其在肠上皮细胞间的定位由规则的连续线性分布转变为不规则的散在或斑块状分布,紧密连接结构的连续性被破坏;经EC处理后,Claudin-1的表达水平明显回升,蛋白定位紊乱状态得到改善,重新呈现出细胞间连续线性的分布模式,紧密连接结构的完整性得以恢复($P<0.05$,图3B)。

2.4 EC上调肠黏膜紧密连接分子表达

通过Western blotting检测显示,紧密连接关键分

子Claudin-1、ZO-1在DSS组表达下调,经EC干预后,两类蛋白表达水平回升,且接近对照组水平($P<0.05$,图4A)。RT-qPCR结果同样显示,EC干预可促进肠黏膜组织中Claudin-1、ZO-1 mRNA表达水平上调($P<0.05$,图4B)。

2.5 网络药理学筛选

为分析EC改善肠屏障的作用机制,取EC与炎症性肠病(IBD)的交集基因350个(Venny图;图5A),将其导入STRING数据库构建蛋白质互作网络(PPI,图5B)。KEGG及GO功能富集分析结果表明,EC调控IBD的作用可能与Wnt/ β -catenin通路及紧密连接通路密切相关(图5C、D)。

2.6 EC对Caco-2细胞无明显毒性

为明确EC作用的分子机制,以Caco-2细胞为体

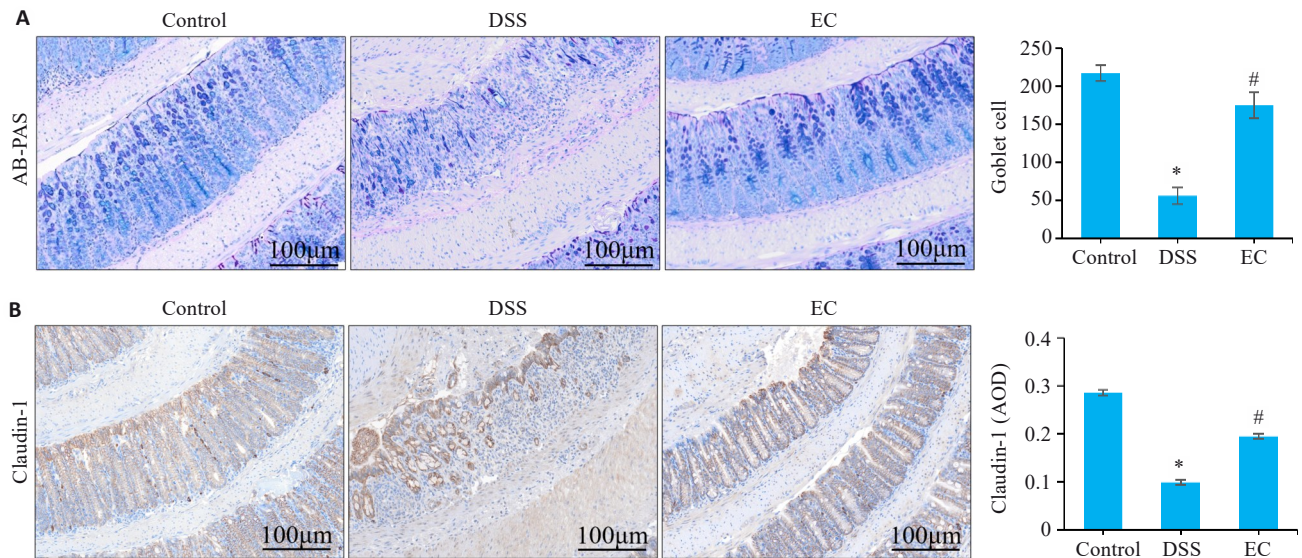


图3 EC改善DSS诱导小鼠肠屏障损伤

Fig.3 EC improves DSS-induced intestinal barrier dysfunction. **A:** AB-PAS staining of mouse colon and goblet cell counts. **B:** Claudin-1 expression (immunohistochemical staining) and the average optical density (AOD). * $P<0.05$ vs Control; # $P<0.05$ vs DSS.

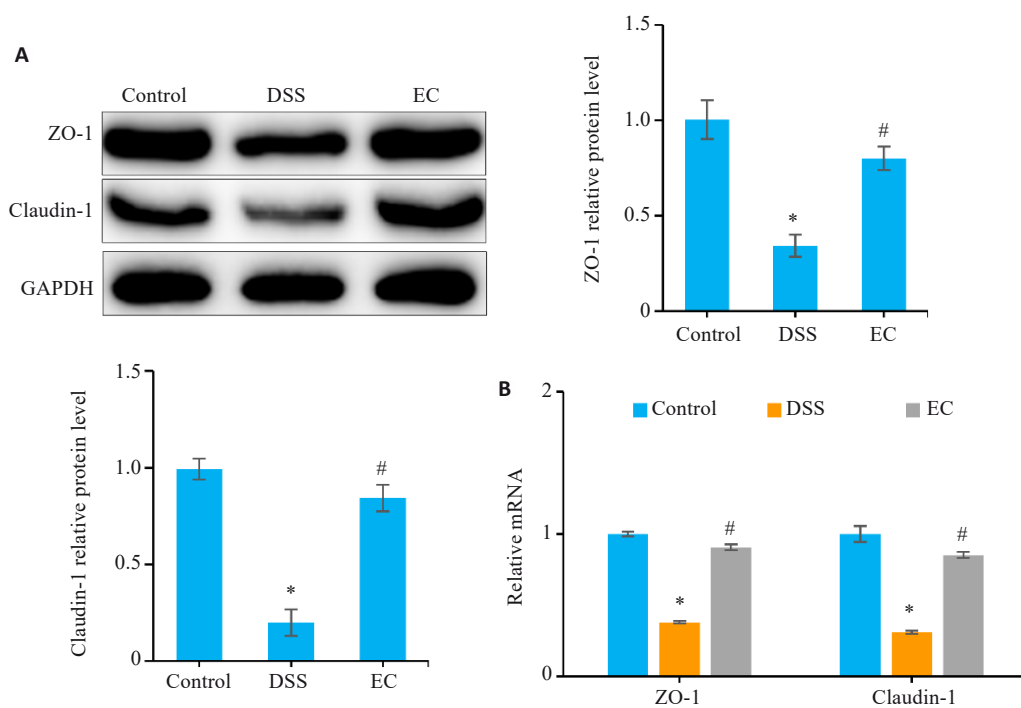


图4 EC上调肠黏膜紧密连接分子表达

Fig.4 EC upregulates expression of intestinal mucosal tight junction proteins. **A:** Western blotting of ZO-1 and claudin-1 expression in colonic mucosal tissues. **B:** Relative mRNA expression levels of ZO-1 and claudin-1 in colonic mucosa determined by RT-qPCR. * $P<0.05$ vs Control; # $P<0.05$ vs DSS.

外研究对象,首先采用CCK-8法证明EC对细胞的毒性,结果显示,EC ≤ 20 $\mu\text{mol/L}$ 时,Caco-2细胞存活率均 $\geq 95\%$,与对照组无显著差异($P>0.05$,图6),提示其无明显细胞毒性。

2.7 EC改善DSS诱导的Caco-2细胞屏障结构紊乱

体外实验中,RT-qPCR结果显示,与DSS组相比,EC组(10 $\mu\text{mol/L}$)Claudin-1和ZO-1的mRNA水平均

升高($P<0.05$,图7A)。Western blotting结果同样显示,EC干预后,Claudin-1和ZO-1的蛋白表达水平回升($P<0.05$,图7B)。免疫荧光结果显示,对照组细胞间Claudin-1(绿色)、ZO-1(红色)连续定位于细胞膜上,荧光信号强且分布均匀,DSS干预后Claudin-1和ZO-1的细胞膜定位紊乱,荧光信号强度降低,而EC干预后,二者细胞膜定位恢复连续分布,荧光强度回升

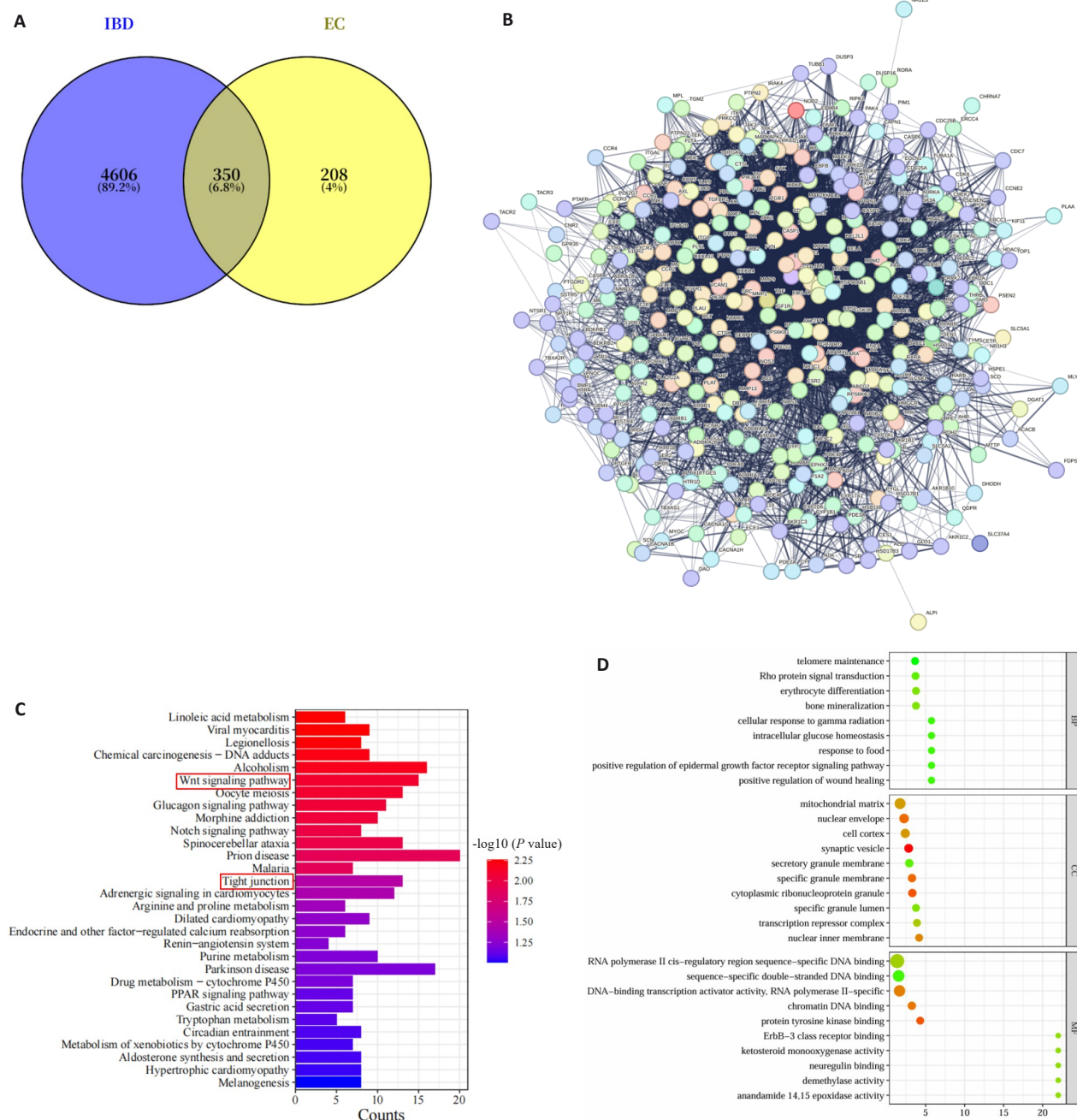


图5 网络药理学筛选

Fig.5 Network pharmacology of EC. A: Venn map. B: PPI network C: KEGG pathway enrichment. D: GO functional annotation (BP, CC, MF).

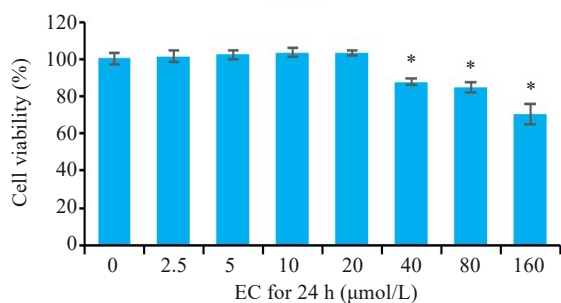


图6 EC对Caco-2细胞无明显毒性

Fig.6 EC exhibits no obvious cytotoxicity in Caco-2 cells.

* $P < 0.05$ vs EC=0 μmol/L.

($P < 0.05$, 图7C)。

2.8 EC可激活Wnt/β-catenin通路

DSS干预可抑制WNT3A和β-catenin的蛋白表达, 经EC干预后, WNT3A、β-catenin的表达升高($P < 0.05$, 图8)。

2.9 EC修复肠上皮屏障的效应依赖Wnt/β-catenin通路

Western blotting 检测结果显示, IWR-1干预后, WNT3A、β-catenin的蛋白表达水平下降。与DSS+EC组相比, DSS+EC+IWR-1组的紧密连接蛋白ZO-1、Claudin-1表达均下调($P < 0.05$, 图9)。

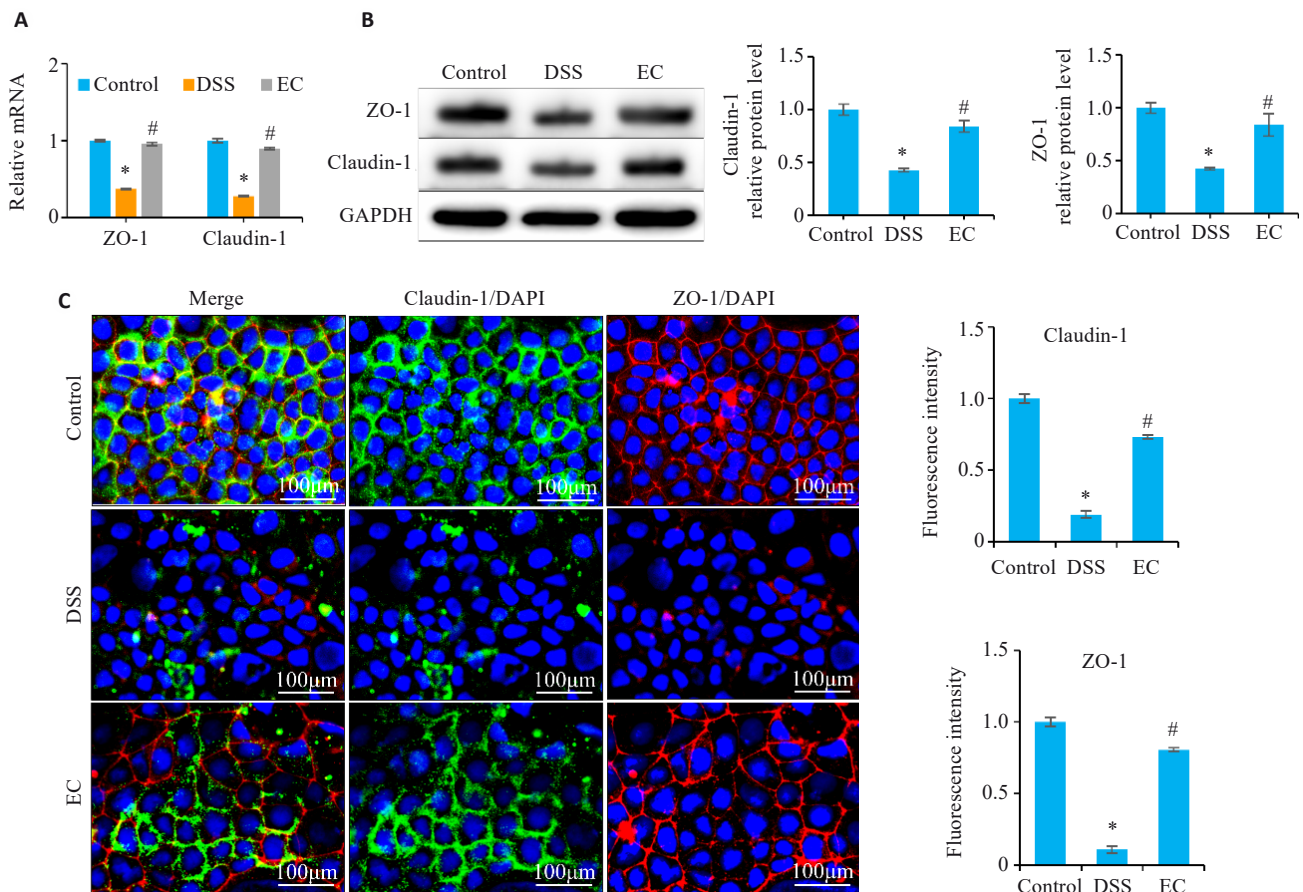


图7 EC改善DSS诱导的Caco-2细胞屏障结构紊乱

Fig.7 EC improves DSS-induced barrier structure disorder in Caco-2 cells. A: Relative mRNA expression levels of ZO-1 and claudin-1 in Caco-2 cells detected by RT-qPCR. B: Western blotting of ZO-1 and claudin-1 protein expressions in Caco-2 cells. C: Immunofluorescence staining of ZO-1 (red) and claudin-1 (green) localization and fluorescence intensity in Caco-2 cells. * $P < 0.05$ vs Control; # $P < 0.05$ vs DSS.

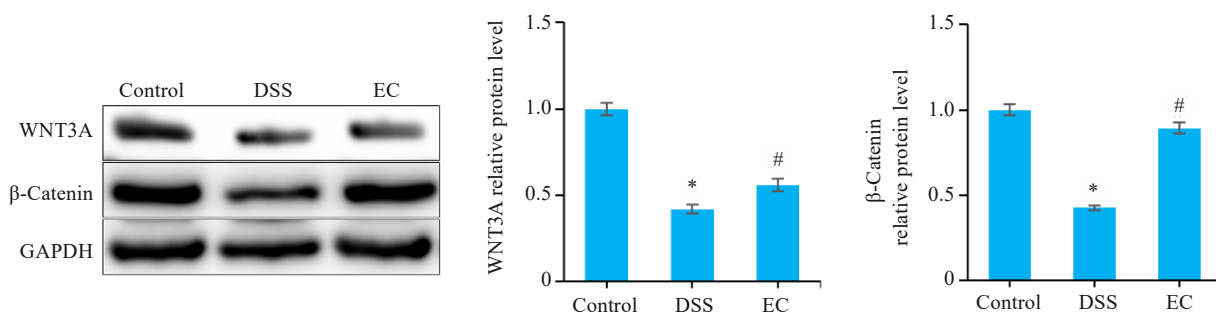


图8 EC可激活Wnt/β-catenin通路

Fig.8 EC activates the Wnt/β-catenin signaling pathway in DSS-induced Caco-2 cells. * $P < 0.05$ vs Control; # $P < 0.05$ vs DSS.

3 讨论

IBD的核心是肠黏膜屏障受损与炎症反应失衡,现有药物虽能暂时缓解症状,但耐药、不良反应及复发等问题突出^[14]。修复肠黏膜屏障、调控紧密连接蛋白表达,已被证实是改善IBD病理进程关键治疗方向^[28]。而兼具抗炎与屏障修复双重功能的天然植物活性化合物,凭借多靶点、低毒性的优势,成为当前IBD治疗研究的重点^[29]。基于此,本研究聚焦天然酚类化合物EC,探究其对IBD的治疗作用及机制,为天然化合物干预IBD补

充新的实验依据。

EC是广泛存在于牵牛子、鬼针草等天然植物中的多酚类活性成分^[15, 16],其抗炎潜力已得到研究证实,例如可通过抑制MAPK、NF-κB等信号通路发挥抗炎效应^[17, 22]。既往文献报道酚类化合物具有强大的抗炎与抗氧化特性,在慢性炎症疾病治疗研究中展现出广泛应用潜力^[30],本课题组此前研究亦发现,酚类单体Sotetsuflavone可通过调控JNK及MAPK信号通路、抑制M1巨噬细胞介导的炎症反应,从而对克罗恩病样结

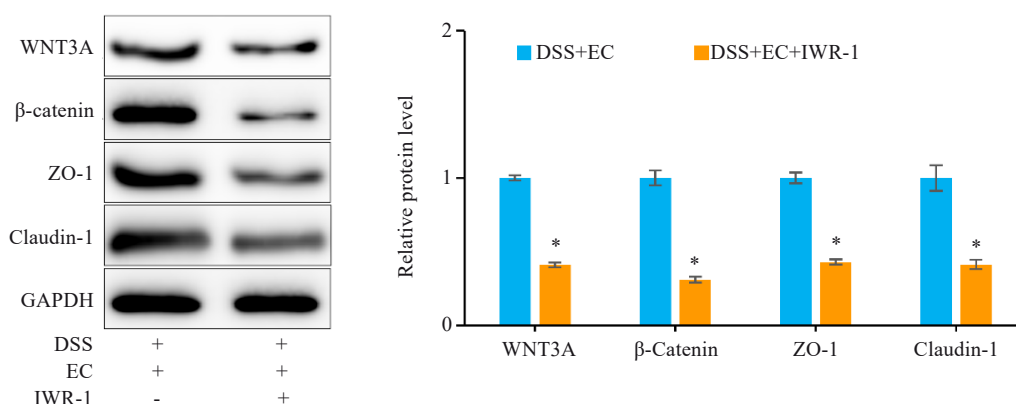


图9 EC修复肠上皮屏障的效应依赖Wnt/β-catenin通路

Fig.9 EC depend on the Wnt/β-catenin pathway to promote repair of intestinal epithelial barrier function. * $P < 0.05$ vs DSS+EC.

肠炎发挥保护效应^[31],进一步证明了多酚类化合物在肠道炎症干预中的应用价值。然而,EC的抗炎活性在IBD中的应用及对肠道炎症的调控作用未见报道。本研究在DSS诱导的小鼠结肠炎模型中证实,EC(10 mg/kg)可显著改善疾病表型,缓解体质量下降、DAI升高及结肠缩短,减轻结肠黏膜病理损伤。其抗炎作用与多酚类化合物共性机制一致,既能抑制肠道炎症反应,又能下调促炎因子与MPO表达。

肠黏膜屏障作为分隔肠道菌群与宿主免疫系统的关键防线,其完整性破坏是IBD发生和发展的关键病理环节,紧密连接蛋白的表达和细胞间连接断裂,会直接导致肠道通透性升高,屏障结构和功能紊乱,进而诱发菌群易位与炎症反应放大^[32-34]。既往研究仅发现EC在其他疾病中可抑制黏膜炎症^[19],并未涉及对肠道屏障结构与功能的调控,本研究明确EC的肠屏障修复作用。在酚类化合物中,槲皮素、姜黄素等已被证实可通过调控紧密连接蛋白表达改善肠屏障功能^[35,36],而本研究发现EC同样具备这一功能:EC通过上调关键紧密连接蛋白ZO-1、Claudin-1表达、修复两类蛋白的膜定位紊乱;同时显著升高ZO-1、Claudin-1转录水平,恢复杯状细胞数量,实现肠黏膜屏障修复。这一发现丰富了酚类化合物的生物学功能谱,提示EC可能通过“炎症抑制-屏障修复”的协同作用发挥IBD治疗效应,凸显了天然化合物的多效性优势。

本研究通过网络药理学与体外验证相结合的方式,阐明EC修复肠黏膜屏障的分子机制依赖Wnt/β-catenin信号通路的激活。Wnt/β-catenin通路作为调控肠上皮细胞增殖、分化及黏膜稳态的核心通路,其活性下降是IBD肠屏障损伤的关键分子机制,生理状态下,该通路通过促进肠干细胞更新和紧密连接蛋白合成维持肠道上皮完整性,而IBD病理微环境中通路活性受抑,导致肠上皮更新障碍和屏障功能紊乱^[11]。已有研究证实,

18β-甘草次酸、槲皮素等天然化合物可通过激活该通路修复肠屏障^[10,24],而本研究发现EC可通过上调WNT3A、β-catenin表达激活通路,进而促进紧密连接蛋白的合成与功能定位。

综上所述,本研究证实EC可通过激活Wnt/β-catenin信号通路,实现抗炎与肠黏膜屏障修复的双重效应,进而缓解DSS诱导的小鼠结肠炎。该研究明确了EC作为IBD天然候选药物的应用价值,为IBD精准治疗提供了新的靶点与实验依据,也为酚类化合物的多效性应用提供了重要参考。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2015, 12(12): 720-7.
- [2] Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. Nature, 2007, 448(7152): 427-34.
- [3] McLemore LJ. Inflammatory bowel disease[J]. Radiol Technol, 2007, 78(4): 291-305;quiz306-8.
- [4] Sairenji T, Collins KL, Evans DV. An update on inflammatory bowel disease[J]. Prim Care Clin Off Pract, 2017, 44(4): 673-92.
- [5] Geremia A, Biancheri P, Allan P, et al. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease[J]. Autoimmun Rev, 2014, 13(1): 3-10.
- [6] Graham DB, Xavier RJ. Pathway paradigms revealed from the genetics of inflammatory bowel disease[J]. Nature, 2020, 578(7796): 527-39.
- [7] Söderholm JD, Olaison G, Peterson KH, et al. Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease[J]. Gut, 2002, 50(3): 307-13.
- [8] Martel J, Chang SH, Ko YF, et al. Gut barrier disruption and chronic disease[J]. Trends Endocrinol Metab, 2022, 33(4): 247-65.
- [9] Li LL, Cheng R, Wu YS, et al. Diagnosis and management of inflammatory bowel disease[J]. J Evid Based Med, 2024, 17(2): 409-33.

- [10] Peng X, Zhong R, Dong S, et al. 18 β -Glycyrrhetic acid from *Glycyrrhiza Uralensis* protects colonic epithelium in ulcerative colitis by activating Wnt/ β -catenin pathway to restore tight junction [J]. *Phytomedicine*, 2025, 143: 156830.
- [11] Degirmenci B, Valenta T, Dimitrieva S, et al. GLI1-expressing mesenchymal cells form the essential Wnt-secreting niche for colon stem cells [J]. *Nature*, 2018, 558(7710): 449-53.
- [12] Kuo WT, Zuo L, Odenwald MA, et al. The tight junction protein ZO-1 is dispensable for barrier function but critical for effective mucosal repair [J]. *Gastroenterology*, 2021, 161(6): 1924-39.
- [13] Chen C, Lin XH, Xie YM, et al. Shengjiang Xiexin Decoction ameliorates DSS-induced ulcerative colitis *via* activating Wnt/ β -catenin signaling to enhance epithelium renovation and modulating intestinal flora [J]. *Phytomedicine*, 2025, 139: 156456.
- [14] Zheng MY, Han R, Yuan YL, et al. The role of *Akkermansia muciniphila* in inflammatory bowel disease: Current knowledge and perspectives [J]. *Front Immunol*, 2023, 13: 1089600.
- [15] 高中良, 张丽英, 李梦青, 等. 牵牛子中咖啡酸和咖啡酸乙酯的提取研究 [J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(7): 3049-50.
- [16] Chiang YM, Chuang DY, Wang SY, et al. Metabolite profiling and chemopreventive bioactivity of plant extracts from *Bidens pilosa* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 95(2/3): 409-19.
- [17] Chiang YM, Lo CP, Chen YP, et al. Ethyl caffeate suppresses NF- κ B activation and its downstream inflammatory mediators, iNOS, COX-2, and PGE₂ in vitro or in mouse skin [J]. *Br J Pharmacol*, 2005, 146(3): 352-63.
- [18] 廖余琼, 张妮, 刘翰飞, 等. 黔产硬毛夏枯草中1个新的松香烷型二萜化合物及其抗神经炎活性研究 [J]. *中草药*, 2025, 56(16): 5723-30.
- [19] Widodo A, Huang HT, Dewi NR, et al. Ethyl caffeate modulates systemic and mucosal immune responses, growth performance, and disease resistance against *Vibrio parahaemolyticus* in hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2025, 158: 110163.
- [20] Nguyen PT, Nakamura Y, Tran NQV, et al. Ethyl caffeate can inhibit aryl hydrocarbon receptor (AhR) signaling and AhR-mediated potentiation of mast cell activation [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(12): 9997.
- [21] Wang H, Song DZ, Wei LH, et al. Ethyl caffeate inhibits macrophage polarization *via* SIRT1/NF- κ B to attenuate traumatic heterotopic ossification in mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 161: 114508.
- [22] Shen JN, Xu LX, Shan L, et al. Neuroprotection of (+)-2-(1-hydroxyl-4-oxocyclohexyl) ethyl caffeate against hydrogen peroxide and lipopolysaccharide induced injury *via* modulating arachidonic acid network and p38-MAPK signaling [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2015, 12(9): 892-902.
- [23] Huang YL, Li G, Li D, et al. Ethyl caffeate alleviates inflammatory response and promotes recovery in septic-acute lung injury *via* the TNF- α /NF- κ B/MMP9 Axis [J]. *Phytomedicine*, 2025, 141: 156700.
- [24] Mi YH, Zhong L, Lu SJ, et al. Quercetin promotes cutaneous wound healing in mice through Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 290: 115066.
- [25] Murthy SN, Cooper HS, Shim H, et al. Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin [J]. *Dig Dis Sci*, 1993, 38(9): 1722-34.
- [26] 张敏, 刘生宝, 张诺, 等. 改进型“瑞士卷”法在小鼠肠道组织切片中的应用 [J]. *中华病理学杂志*, 2024, 53(4): 393-7.
- [27] Schultz M, Tonkonogy SL, Sellon RK, et al. IL-2-deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation [J]. *Am J Physiol*, 1999, 276(6): G1461-72.
- [28] Xu CX, Huang XL, Deng ZC, et al. *Dendrobium Officinale*-derived carbon dots nanozymes alleviate colitis by orchestrating intestinal mucus-epithelium-immune barriers [J]. *Adv Sci*, 2025, 12(44): e12567.
- [29] Ye M, Fan MH, Zhao Y, et al. Low molecular weight *Astragalus membranaceus* polysaccharides alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice [J]. *Carbohydr Polym*, 2025, 367: 124050.
- [30] Le DD, Dang T, Truong V, et al. Integrative discovery through network pharmacology and molecular docking approaches of phenolic compounds isolated from *Torreya nucifera* to treat rheumatoid arthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(23): 11629.
- [31] Ge ST, Yang YT, Zuo LG, et al. Sotetsuflavone ameliorates Crohn's disease-like colitis by inhibiting M1 macrophage-induced intestinal barrier damage *via* JNK and MAPK signalling [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 940: 175464.
- [32] Oka A, Sartor RB. Microbial-based and microbial-targeted therapies for inflammatory bowel diseases [J]. *Dig Dis Sci*, 2020, 65(3): 757-88.
- [33] Li JW, Niu CX, Ai HH, et al. TSP50 attenuates DSS-induced colitis by regulating TGF- β signaling mediated maintenance of intestinal mucosal barrier integrity [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(11): 2305893.
- [34] Bland J. The gut mucosal firewall and functional medicine [J]. *Integr Med*, 2016, 15(4): 19-22.
- [35] Wei QZ, Jiang HX, Zeng J, et al. Quercetin protected the gut barrier in ulcerative colitis by activating aryl hydrocarbon receptor [J]. *Phytomedicine*, 2025, 140: 156633.
- [36] Liang J, Dai WG, Liu CH, et al. Gingerenone a attenuates ulcerative colitis *via* targeting IL-17RA to inhibit inflammation and restore intestinal barrier function [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(28): 2400206.

(编辑:经媛)