

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2020.05.005

# 大蒜素对 BALB/c 小鼠溃疡性结肠炎的影响及其作用机制\*

徐兴华 郭汶慧 王凯悦 任公卿 陈彤 王建礼<sup>△</sup>  
(济宁医学院基础医学院, 济宁 272067)

**摘要** **目的** 探讨大蒜素对小鼠溃疡性结肠炎(UC)的治疗作用及其相关作用机制。**方法** BALB/c 小鼠 60 只,雌雄各半,随机分为 3 组:正常组、模型组和大蒜素组,每组 20 只。正常组小鼠自由饮用蒸馏水,其余组小鼠自由饮用 5% 葡聚糖硫酸钠(DSS)溶液建立 UC 模型,建模开始即按分组灌胃给药,空白组和模型组给予生理盐水,大蒜素组给予等量大蒜素溶液( $2\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),给药期间观察小鼠体征变化,进行疾病活动指数(DAI)评估,连续 7d,眼球取血后处死小鼠,采集结肠组织进行病理学检查。ELISA 法测定小鼠血清样本中 TNF- $\alpha$  水平;髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性检测试剂盒测定小鼠结肠组织中 MPO 活性。**结果** 与模型组相比,大蒜素组小鼠结肠长度较长,DAI 分数较低( $P < 0.025$ );血清中 TNF- $\alpha$  含量降低( $P < 0.025$ );结肠组织中 MPO 活性也明显下降( $P < 0.025$ )。**结论** 大蒜素对 UC 小鼠有治疗作用,其可能通过抑制 TNF- $\alpha$  释放,下调促炎因子 MPO 活性,从而阻断炎症的放大效应,达到治疗效果。

**关键词** 大蒜素;溃疡性结肠炎;TNF- $\alpha$ ;髓过氧化物酶

中图分类号:R574.1 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2020)10-326-04

## The effect of allicin on ulcerative colitis in BALB / c and its mechanism

XU Xinghua, GUO Wenhui, WANG Kaiyue, REN Gongqing, CHEN tong, FU Junjie, WANG Jianli<sup>△</sup>  
(Basic Medical College of Jining Medical University, Jining 272067, China)

**Abstract: Objective** To investigate the therapeutic effect of allicin on ulcerative colitis (UC) in mice and its mechanism. **Methods** 60 BALB/c mice were randomized into 3 groups: Normal, model and allicin group, 20 in each group. Except the normal group, the mice in other groups drank 5% dextran sodium sulfate (DSS) aqueous solution freely to establish UC model. From the beginning of modeling, the mice in model group were given allicin solution ( $2\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). The normal and model group were given the same amount of normal saline once a day for 7 consecutive days. The changes of physical signs of mice were observed, disease activity index (DAI) was evaluated, and the colon tissues of mice were examined by microscopy. The content of TNF- $\alpha$  in serum samples of mice was measured by ELISA, and the activity of MPO in colon tissues of mice was detected by MPO kit. **Results** Compared with the model group, the colon length of the allicin group was longer, the DAI score was lower ( $P < 0.05$ ), the serum TNF- $\alpha$  content was lower ( $P < 0.05$ ), and the activity of MPO in colon tissue was also significantly lower ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Allicin has therapeutic effect on UC mice. It may block the amplification effects of inflammation by inhibiting the release of TNF- $\alpha$  and down-regulating the activity of pro-inflammatory factor MPO.

**Keywords:** Allicin; Ulcerative colitis; TNF- $\alpha$ ; MPO

\* [基金项目] 山东省高等学校国家级大学生创新创业训练计划项目(201810443017); 济宁医学院大学生创新训练计划项目(cx2018021)

<sup>△</sup>[通信作者] 王建礼, E-mail: wangjianli2019@163.com,

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一类病因不明的非特异性胃肠道慢性炎症性疾病, 临床主要表现为腹痛、腹泻和黏液脓血便, 病程迁延, 反复发作, 较难治愈, 严重影响患者的生活质量<sup>[1]</sup>, 该病在我国发病率呈升高趋势<sup>[2]</sup>。肠道感染和炎症破坏肠黏膜屏障功能, 引起肠黏膜通透性发生改变, 肠腔内各种抗原暴露于黏膜固有层免疫系统, 引起促炎因子表达及释放增加, 抗炎因子水平下降, 使肠道炎症损伤进一步加重<sup>[3]</sup>。目前, UC 的主要治疗药物为抗炎药、皮质类固醇以及免疫调节药物等, 但长期使用可引起严重不良反应<sup>[4]</sup>。

大蒜素是一种天然含硫化合物, 具有多种生物学功效, 如抗菌、抗氧化应激、并具有调节免疫等作用<sup>[5-6]</sup>。大蒜素可减少小鼠炎症组织内 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 NF- $\kappa$ B 的表达, 使 SOD、GSH-Px 活性减弱, 从而发挥抗炎镇痛作用<sup>[7]</sup>。本文将探讨大蒜素对葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎 BALB/c 小鼠的治疗作用及其可能机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 动物与分组** 健康 SPF 级 BALB/c 小鼠 60 只, 雌雄各半, 体重 20~25g, 随机分为 3 组, 分别为正常组、DSS 模型组、大蒜素组 (2g · L<sup>-1</sup>), 每组 20 只。习服 1 周后, 进行实验。将动物饲养在 25℃~27℃ 室温中, 12h 光照、12h 黑暗交替循环。所有实验动物均遵守国家实验动物饲养管理条例和使用指南。

**1.1.2 药品与试剂** 大蒜素胶囊, 购自江苏正大清江制药公司; 葡聚糖硫酸钠 (MW 36000-50000) 购自大连美仑生物技术有限公司; 小鼠肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) ELISA 试剂盒购自上海通蔚生物科技有限公司 (货号: TW78293-2); 髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 检测试剂盒购自上海研谨生物技术有限公司。

**1.1.3 仪器** Z306 高速离心机购自德国 HERMLE; CUT 4062 手动旋转式病理切片机购自德国 SLEE 公司; MR-96A 酶标仪购自深圳迈瑞生物医疗电子股份公司。

### 1.2 方 法

**1.2.1 模型的制备** 正常组小鼠自由饮用蒸馏

水, 其余各组自由饮用 5% DSS 溶液, 连续 7d, 诱导 UC 模型。造模 1d 开始灌胃给药, 大蒜素组于造模 1d 予大蒜素, 剂量 0.02ml/g 体重, 连续给药 7d。

**1.2.2 各小组小鼠疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评估**<sup>[8]</sup> 每日给药前, 测量小鼠体重, 观察小鼠的精神、活动状态以及大便情况。评估各组小鼠 DAI。DAI = (体重下降分数 + 腹泻分数 + 便血分数) / 3。

**1.2.3 病理学检测** 末次给药后, 小鼠禁食 24h, 1.5% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 眼眶取血, 3000r · min<sup>-1</sup>, 离心 15min, 取血清, -20℃ 冰箱保存。取血后, 脱臼处死小鼠, 采集小鼠直肠至盲肠末端结肠组织, 测量长度, 纵向剪开肠腔, 预冷生理盐水清洗, 中性甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 5 $\mu$ m 厚, 连续切片, HE 染色。

**1.2.4 小鼠血清中 TNF- $\alpha$  水平测定** 取冷冻保存的小鼠血清, 室温溶解, 按照 TNF- $\alpha$  ELISA 检测试剂盒使用说明进行操作。

**1.2.5 各组小鼠结肠组织中 MPO 活性检测** 取小鼠结肠组织 50mg, 加入 PBS 匀浆, 10min; 将组织匀浆液反复冻融 (-80℃/37℃), 3 次; 4℃, 3000r · min<sup>-1</sup>, 离心 20min, 取上清液, 严格按 MPO 测定试剂盒说明书进行操作, 检测小鼠结肠组织 MPO 活性。

### 1.3 统 计 学 方 法

本实验中采用 SPSS22.0 软件进行统计学分析, 所用数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用方差分析, 进一步两两比较采用 Dunnett-t 检验,  $P < 0.025$  被认为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 小 鼠 一 般 情 况

在给药期间, 正常组小鼠精神状态良好, 饮食、活动正常, 皮毛有光泽, 大便正常。模型组小鼠在给药第 3 天进食量减少, 并出现体重减轻、皮毛枯燥、精神不振现象, 第 4 天肛周出现大便粘附、血便, 第 5 天和第 6 天各有 1 只小鼠死亡。模型组 DAI 评分明显高于正常组 ( $P < 0.025$ ), 大蒜素组小鼠一般情况优于模型组, 个别小鼠出现腹泻、大便不成形, 体重减轻, 无小鼠死亡, DAI 评分明显低于模型组 ( $P < 0.025$ )。见图 1。

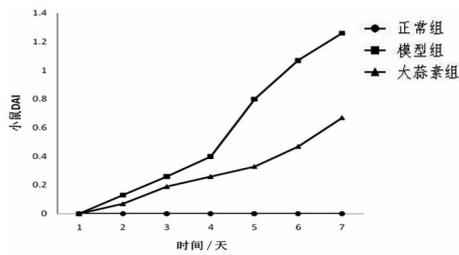
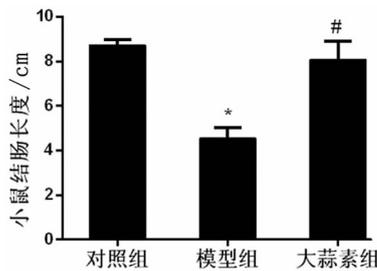


图 1 大蒜素对 UC BALB/c 小鼠 DAI 的影响

### 2.2 病理学检查结果

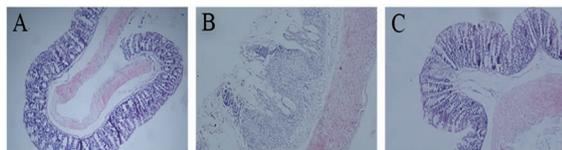
模型组小鼠结肠长度[(4.54±0.49)cm]显著性低于正常组[(8.72±0.26)cm]和大蒜素组[(8.08±0.83)cm]( $P<0.025$ ),大蒜素组小鼠结肠长度与正常组相比不存在显著性差异( $P>0.05$ )。见图 2。



注:模型组 vs 正常组, \* $P<0.025$ ;大蒜素组 vs 模型组, # $P<0.025$

图 2 大蒜素对 UC BALB/c 小鼠结肠长度的影响

与正常小鼠结肠组织相比,模型组小鼠结肠组织粘膜层表面不规则,局部坏死、脱落,粘膜层缺损,腺体结构破坏,杯状细胞减少,粘膜固有层内可见肉芽组织和新生毛细血管形成,粘膜下层充血、水肿,大量中性粒细胞和淋巴细胞浸润。与模型组相比,大蒜素组小鼠结肠粘膜层和肌层炎症性病变较模型组明显减轻,肠壁结构较完整,隐窝可见,肌层较完整,未见新生组织,仍有部分炎性细胞浸润。见图 3。



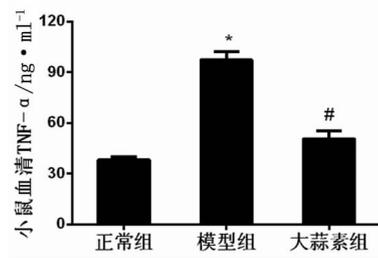
注:A. 正常组;B. 模型组;C. 大蒜素组

图 3 大蒜素对 UC BALB/c 小鼠结肠损伤的影响(×100)

### 2.3 大蒜素对小鼠血清 TNF-α 水平的影响

模型组小鼠血清中 TNF-α 水平[(97.4±4.8)ng·ml<sup>-1</sup>]明显高于正常组[(38.28±1.9)ng·ml<sup>-1</sup>]( $P<0.025$ );大蒜素组小鼠血清中 TNF-α 水

平[(42.8±3.2)ng·ml<sup>-1</sup>]明显低于模型组( $P<0.025$ ),与正常组相比无显著性差异。见图 4。

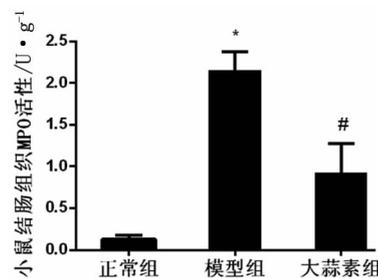


注:模型组 vs 正常组, \* $P<0.025$ ;模型组 vs 大蒜素组, # $P<0.025$

图 4 大蒜素对 UC BALB/c 小鼠血清 TNF-α 的影响

### 2.4 大蒜素对小鼠结肠组织 MPO 活性的影响

模型组小鼠结肠组织 MPO 活性[(2.15±0.21)U·g<sup>-1</sup>]明显高于正常组[(0.13±0.05)U·g<sup>-1</sup>]( $P<0.025$ );大蒜素组小鼠结肠组织 MPO 的活性[(0.93±0.33)U·g<sup>-1</sup>]明显低于模型组( $P<0.025$ )。



注:模型组 vs 正常组, \* $P<0.025$ ;大蒜素组 vs 模型组, # $P<0.025$

图 5 大蒜素对 UC BALB/c 小鼠结肠组织 MPO 活性的影响

## 3 讨论

近年来,UC 已成为人类最常见的炎症性肠道疾病,其发病率在世界范围内呈现逐渐上升的趋势,但目前仍无根治方法。长期慢性肠道炎症可引起基因不稳定、细胞增殖并逃避凋亡,最终可能引起癌变<sup>[9]</sup>,因此,UC 的预防和治疗日益引起人们的重视。UC 的发病机制尚不明确,可能与机体出现异常免疫反应相关。肠道黏膜内促炎因子和抗炎因子之间平衡失调,使炎症反应进一步加强,从而引起肠道组织损伤<sup>[3]</sup>。目前常用的治疗药物可引起严重不良反应,限制了其使用。

UC 患者肠道中 MPO 表达量增加,可作为肠上皮隐窝内和肠粘膜层内中性粒细胞聚集、浸润引起结肠上皮损伤的重要标志<sup>[10]</sup>。使用大蒜素治疗可降低小鼠体内 MPO 浓度,并使其活性降低<sup>[11]</sup>。本

研究中,模型组小鼠结肠组织中 MPO 浓度明显高于正常组,说明使用 DSS 成功诱导小鼠溃疡性结肠炎模型。与模型组相比,大蒜素组 MPO 浓度明显降低,这与其 DAI 评估结果和结肠组织病理学观察结果一致。大蒜素处理组小鼠结肠组织中 MPO 活性明显降低,表明大蒜素可减轻中性粒细胞聚集,减轻结肠组织内炎症反应程度,从而减轻肠道炎症反应的发生和进一步进展。UC 发生、发展过程中产生大量炎症细胞因子,其中, TNF- $\alpha$  是 UC 发生发展的关键物质之一,也是近年来该领域研究的热点<sup>[12]</sup>。目前认为, TNF- $\alpha$  主要通过自分泌和旁分泌途径发挥局部炎症细胞活化与趋化作用<sup>[13]</sup>。有研究发现, UC 患者血清 TNF- $\alpha$  浓度是健康体检者的 380 倍<sup>[14]</sup>, TNF- $\alpha$  可激活内皮细胞 NF- $\kappa$ B 信号通路,活化的 NF- $\kappa$ B 进入细胞核参与多种促炎因子的产生,增强其对单核细胞的趋化、粘附作用,进一步加重炎症反应,在促进炎症产生中起重要作用<sup>[15]</sup>。本研究中, DSS 诱导的 UC 小鼠体内 TNF- $\alpha$  明显增高,而经大蒜素灌胃后,可显著降低 UC 小鼠体内 TNF- $\alpha$  浓度水平。表明大蒜素可减轻 UC 小鼠结肠的炎症反应,进而改善其病变程度。大蒜素来源广泛,成本低,毒副作用小,有望成为一种新型抗 UC 药物。

参考文献:

[1] Marafini I, Sedda S, Dinallo V. Inflammatory cytokines: from discoveries to therapies in IBD [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2019, 19(11): 1207-1217.

[2] Yang H, Li Y, Wu W, et al. The incidence of inflammatory bowel disease in Northern China: a prospective population based study [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101296. DOI: 10.1371/journal.pone.0101296.

[3] Salim SY, Soderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2011, 17(1): 362-381. DOI: 10.1002/ibd.21403.

[4] Gupta RA, Motiwala M N, Mahajan UN, et al. Protective effect of *Sesbania grandiflora* on acetic acid induced ulcerative colitis in mice by inhibition of TNF- $\alpha$  and IL 6 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 219: 222-232. DOI: 10.1016/j.jep.2018.02.043.

[5] 王建平, 宋焱峰, 景玉宏, 等. 大蒜素对小鼠胃肠运动

及血清中胃动素、生长激素释放肽的影响 [J]. *中国药房*, 2015, 26(7): 950-952.

[6] Chan JY, Tsu Hi, Chung IY, et al. Allicin protects rat cardiomyoblasts (H9c2 cells) from hydrogen peroxide-induced oxidative injury through inhibiting the generation of intra cellular reactive oxygen species [J]. *Int J Food Sci Nutr*, 2014, 65(7): 868-873. DOI: 10.3109/09637486.2014.925428.

[7] 任亮, 任翔, 刘金宝, 等. 大蒜素对模型小鼠的抗炎性痛作用及机制研究 [J]. *中国药房*, 2018, 29(18): 2479-2483.

[8] Jeon Y D, Bang K S, Shin M K, et al. Regulatory effects of glycyrrhizae radix extract on DSS induced ulcerative colitis [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16(1): 459. DOI: 10.1002/ibd.21403.

[9] Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer [J]. *Mutat Res*, 2008, 659(1-2): 15-30. DOI: 10.1016/j.mrrev.2008.03.002.

[10] Li RY, Chen YY, Shi MJ, et al. Gegen Qinlian decoction alleviates experimental colitis via suppressing TLR4/NF- $\kappa$ B signaling and enhancing antioxidant effect [J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(10): 1012-1020. DOI: 10.1016/j.phymed.2016.06.010.

[11] Zhang L, Wang E, Chen F, et al. Potential protective effects of oral administration of allicin on acrylamide induced toxicity in male mice [J]. *Food Funct*, 2013, 4(8): 1229-36. DOI: 10.1039/c3fo60057b.

[12] Araki A, Nara H, Rahman M, et al. Role of interleukin 21 isoform in dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis [J]. *Cytokine*, 2013, 62(2): 262-271. DOI: 10.1016/j.cyto.2013.03.006.

[13] 张欣, 李泓, 杨嫣华, 等. 炎症性肠病患者血清 TNF- $\alpha$ 、IL-35 水平变化及其临床意义 [J]. *内科急危重杂志*, 2017, 23(5): 400-402.

[14] Xiao B, Laroui H, Ayyadurai S, et al. Mannosylated bioreducible nanoparticle-mediated macrophage specific TNF- $\alpha$  RNA interference for IBD therapy [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(30): 7471-82. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.06.008.

[15] 江颖娟, 蒋作锋, 吴小兰, 等. 槲皮素对 TNF- $\alpha$  诱导内皮细胞炎症因子表达的影响, *新医学* [J], 2017, 48(10): 697-700.

(收稿日期 2020-07-09)

(本文编辑:石俊强)