

DL-色氨酸对小鼠急性结肠炎的改善作用

杜梦渊¹, 丁嫚¹, 贺水玲², 李卓玉^{2*}

(1. 山西大学生命科学学院, 山西太原 030006) (2. 山西大学生物技术研究所, 山西太原 030006)

摘要: 为研究 DL-色氨酸 (DL-Tryptophan) 对葡聚糖硫酸钠 (DSS) 诱导的小鼠溃疡性结肠炎 (UC) 的改善作用, 采用超声辅助提取法提取藜麦醇提物, 分离纯化后经成分鉴定发现主要成分为 DL-色氨酸, 用 RAW264.7 巨噬细胞建立炎症模型评估藜麦 DL-色氨酸的抗炎效果, 以野生型 C57BL/6 小鼠为研究对象, 每天以 50 mg/kg 纯品 DL-色氨酸进行灌胃干预, 用 DSS 诱导结肠炎模型, 通过记录小鼠体质量及体表特征变化, 疾病活动指数 (DAI) 评分, 测量结肠长度并进行 HE 染色, 免疫荧光染色, 用酶联法 (ELISA) 检测小鼠结肠组织中肿瘤坏死因子 (TNF- α) 和白细胞介素 1 β (IL-1 β) 的表达水平评估 DL-色氨酸对结肠炎小鼠的改善作用。与模型组相比, DL-色氨酸组 DAI 评分降低了 50.64%, 体质量平均增加了 5.03 g, 结肠长度平均增加了 2.23 cm, 肠杯状细胞数量减少和黏膜损伤均有所改善, 结肠组织中 TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子的表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 肠上皮细胞紧密连接蛋白 Claudin-1、Occludin 和 ZO-1 等蛋白表达得到恢复。综上所述, DL-色氨酸可通过降低炎症因子的分泌, 并使紧密连接蛋白的表达得到恢复, 减少肠道炎症反应来改善 DSS 诱导的小鼠结肠炎。

关键词: 藜麦; DL-色氨酸; 肠道屏障; 结肠炎

文章编号: 1673-9078(2025)11-19-26

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.11.1295

Ameliorative Effect of DL-tryptophan on Acute Colitis in Mice

DU Mengyuan¹, DING Man¹, HE Shuiling², LI Zhuoyu^{2*}

(1. School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

(2. Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: The ameliorative effect of DL-tryptophan on dextran sulphate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis (UC) in mice was investigated. The alcohol extract of quinoa was obtained using the ultrasonic-assisted extraction method, followed by isolation and purification. DL-tryptophan was identified as the primary component through compositional analysis. The anti-inflammatory effect of quinoa DL-tryptophan was assessed using RAW264.7 macrophage cells to establish an inflammation model. Wild-type C57BL/6 mice were used as study subjects and were administered 50 mg/kg of pure DL-tryptophan daily through oral gavage; the anti-inflammatory effect of quinoa DL-tryptophan was then evaluated using the DSS-induced UC model. The ameliorative effects of DL-tryptophan were assessed by monitoring changes in body weight and surface characteristics, assessing Disease Active Index (DAI) scores, measuring colon length, and performing hematoxylin and eosin staining and immunofluorescence staining. The expression of tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin 1 β (IL-1 β) in the colon tissues of the mice were detected using enzyme-linked immunosorbent assay to assess the ameliorative effect of DL-tryptophan on DSS-induced UC mice. Compared with the model group, the DAI score in the DL-tryptophan group decreased by 50.64%, whereas the average body weight and colon length increased by 5.03 g and 2.23 cm, respectively. In addition, the DL-tryptophan group showed decreased number of intestinal cup

引文格式:

杜梦渊, 丁嫚, 贺水玲, 等. DL-色氨酸对小鼠急性结肠炎的改善作用[J]. 现代食品科技, 2025, 41(11): 19-26.

DU Mengyuan, DING Man, HE Shuiling, et al. Ameliorative effect of DL-tryptophan on acute colitis in mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(11): 19-26.

收稿日期: 2024-08-31; 修回日期: 2024-11-01; 接受日期: 2024-11-07

基金项目: 山西省重点研发计划项目 (2022ZDYF121)

作者简介: 杜梦渊 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品功能因子的筛选与机制, E-mail: dmy7768@163.com

通讯作者: 李卓玉 (1964-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品功能因子的筛选与机制, E-mail: lzy@sxu.edu.cn

cells and improved mucosal damage, and the expression levels of TNF- α , IL-1 β and other inflammatory factors in the colon tissue significantly decreased ($P<0.01$). The expression of tight junction proteins claudin-1, occludin, and ZO-1 in intestinal epithelial cells was recovered. In summary, DL-tryptophan ameliorates DSS-induced UC in mice by decreasing the secretion of inflammatory factors and restoring the expression of tight junction proteins, thereby alleviating intestinal inflammatory responses.

Key words: quinoa; DL-tryptophan; intestinal barrier; colitis

藜麦 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 是苋科双子叶植物, 原产于南美洲安第斯山区, 其种子的食用历史悠久, 已长达数千年^[1]。与其他禾本科谷物相比, 藜麦含有更多的蛋白质和均衡分布的必需氨基酸, 类似于牛奶中蛋白质的生物价值^[2,3]。同时它也富含膳食纤维、维生素和矿物质, 尤其是钙、磷、铁和锌的含量上都超过其他谷物, 因此被称为“黄金谷物”^[4,5]。山西藜麦种植面积大, 主要分布在忻州、朔州等地, 忻州市静乐县更是有着“中国藜麦之乡”的称号。已有许多研究表明, 藜麦中丰富的营养成分, 具有多种生物活性, 如藜麦蛋白, 活性肽具有抗炎, 调节肠道菌群的作用^[6,7]; 藜麦多糖具有免疫调节活性和抗肿瘤作用^[8,9]; 藜麦皂苷可以缓解高尿酸症和肾损伤等^[10]。而藜麦中富含多种必需氨基酸, 已有研究报道藜麦中的氨基酸如三甲基甘氨酸(甜菜碱)具有抗炎、抗氧化活性及缓解肝脏疾病的作用^[11,12], 因此藜麦氨基酸具有巨大的研发潜力。

炎症性肠病 (IBD) 主要包括溃疡性结肠炎 (UC) 和克罗恩病 (CD), 它是一种由免疫介导的, 易复发的非特异性慢性胃肠道疾病, 具有发病率高、病程长、癌变率高等特点^[13,14]。其发病机制十分复杂, 目前尚不清楚。越来越多的研究表明 IBD 是由肠道屏障障碍和过度的炎症反应导致, 与饮食习惯、生活环境、遗传因素、免疫失调、黏膜屏障和肠道菌群异常等多种因素相关^[15,16]。近年来随着社会的发展, 人们的日常饮食及生活习惯也有所改变, UC 的发病率逐步提高, 我国的患者数量也在不断增加, 而目前使用的治疗药物效果不尽如人意且副作用较多^[17], 因此对于溃疡性结肠炎治疗的研究也愈发值得我们关注。

DSS 诱导的小鼠急性和慢性结肠炎模型都是在结肠炎模型中应用十分广泛的, 其病理情况与 UC 最为相似, 且造模简单、易重复, 是最常使用且目前国际公认的研究 UC 的动物模型^[18]。为了探究 DL-色氨酸对 DSS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎的缓解作用, 本研究先用 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞建立炎症模型, 从体外水平验证藜麦 DL-色氨酸的抗炎活性, 并以野生型 C57BL/6 小鼠为研究对象, 用 DSS 诱导结肠炎模型, 通过给与 DL-色氨酸灌胃干预, 观察结肠炎小鼠的体表特征、结肠长度与病理损伤程度, 检测结肠组

织中炎症因子及紧密连接蛋白的表达水平, 从而确定 DL-色氨酸对 UC 的缓解作用, 以期治疗 UC 新药研发提供一定的理论基础与科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物

野生型 C57BL/6 小鼠购于北京 Vital River 公司 (年龄 5 周, 体质量约 21~23 g), 动物许可证号: SCXK (京) 2021-0011。所有小鼠饲养于中国辐射防护研究院 SPF 动物培养室, 培养温度 (25 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 60% $\pm$ 5%, 12 小时明暗交替, 通风良好, 环境卫生清洁, 培养期间所有动物均可自由饮食与饮水。动物实验经山西大学动物实验伦理委员会批准 (批准编号: SXULL2020046)。

1.2 材料与试剂

藜麦, 购于山西忻州静乐县农产品市场; 小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7, 购于 ABM 公司; DMEM 培养基、胎牛血清, 购于武汉 Procell 公司; CCK-8、脂多糖 LPS、DL-色氨酸、青霉素-链霉素-庆大霉素混合溶液、TNF- α 、IL-1 β 等 ELISA 试剂盒, 购于北京 Solarbio 公司; DSS (M.W=36 000~50 000), 购于美国 MP Biomedicals 公司; Claudin-1、Occludin、ZO-1 兔抗, 购于武汉 ABclonal 公司; 其他试剂均为市售分析纯。

1.3 仪器与设备

Explorer, EX124 电子天平, Ahaus 公司; MJ-PB10P343 破壁机, 美的股份有限公司; Heraguard ECO 超净工作台、Varioskan ALF 多功能酶标仪、UltiMate 3000LC, QEXACTIVE HF 高分辨液相色谱质谱联用仪, 美国 Thermo Fisher 公司; Ts2r-FL 荧光倒置显微镜, 日本尼康; CO₂ 细胞培养箱、5804R 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; FastPrep-24 冷冻研磨仪, 美国 MP Biomedicals 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 药物制备

取藜麦种子 100 g, 破碎后过 40 目筛, 与 50% (φ) 乙醇混匀, 料液比为 1:50, 55 $^{\circ}\text{C}$ 超声 (300 W) 20 min,

收集上清,并于11 000 r/min离心10 min,78℃旋蒸,浓缩体积至100 mL左右,再于11 000 r/min离心10 min,将浓缩液于0.22 μm滤膜过滤后经大孔树脂分离纯化,上样量为柱体积的5%,50%体积分数乙醇洗脱,收集400 mL(3个柱体积)并旋蒸浓缩至10~20 mL(图1)。

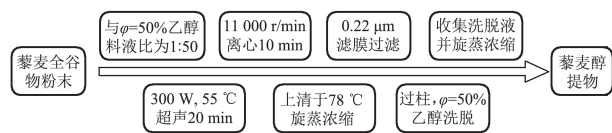


图1 藜麦醇提物提取流程

Fig.1 Extraction process of quinoa alcohol extract

1.4.2 成分鉴定

1.4.2.1 样品提取

离心管中加入3 mm钢珠以及100 mg样品与1 mL 70% (φ) 甲醇,震荡破碎3 min (70 Hz),低温超声(40 kHz) 10 min后于4℃下12 000 r/min离心10 min,取上清液稀释2~100倍,加入10 μL内标(100 μg/mL),过滤后(0.22 μm滤膜)上机检测。

1.4.2.2 代谢物定量分析

相对浓度:可通过样品中代谢物峰面积计算其在样品中相对浓度。计算公式:

$$C = \frac{c \times S_1}{S_2} \times n \quad (1)$$

式中:

C ——各物质相对质量浓度, μg/mL;

c ——内标质量浓度, μg/mL;

S_1 ——代谢物峰面积, mAU·min;

S_2 ——内标峰面积, mAU·min;

n ——稀释倍数 ($n=10$)。

相对百分比:通过样品中代谢物峰面积计算其在样品中相对百分比。(单位:%) 计算公式:

$$D = \frac{S_3}{S_4} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

D ——各物质相对百分比, %;

S_3 ——鉴定代谢物峰面积, mAU·min;

S_4 ——代谢物总的峰面积, mAU·min。

1.4.2.3 色谱-质谱分析

仪器分析平台: LC-MS (Thermo, Ultimate 3000LC, Q Exactive HF);

色谱柱: C18 色谱柱 (Zorbax Eclipse C18 (1.8 μm × 2.1 mm × 100 mm));

色谱分离条件为: 柱温为30℃; 流量0.3 mL/min;

流动相组成 A: 0.1% 体积分数甲酸水溶液, B: 纯乙腈; 进样量为2 μL, 自动进样器温度4℃。

1.4.3 藜麦DL-色氨酸抗炎活性检测

1.4.3.1 藜麦DL-色氨酸对巨噬细胞活力的影响

将RAW264.7细胞复苏后,用DMEM完全培养基(含有10 wt.%胎牛血清及1 wt.%三抗),在37℃、5% (φ) CO₂培养箱培养,1~2 d换液和传代1次。处于对数生长期后,于96孔板中培养(每孔100 μL细胞悬液),细胞密度为每孔5×10³个,细胞贴壁后,除空白对照组与模型组外,每孔依次加入终质量浓度为0.2、0.4、0.6、0.8和1 mg/mL的藜麦DL-色氨酸,每个质量浓度梯度设置5个复孔,处理12 h后,除空白对照组外,每孔加入1 μg/mL的LPS处理24 h诱导炎症模型,24 h后吸去培养基,每孔加入10 μL CCK-8于37℃,5% CO₂细胞培养箱中孵育2 h,用酶标仪测定吸光度值(450 nm),并计算细胞存活率。

1.4.3.2 炎症因子含量测定

细胞处于对数生长期后,于6孔板中培养(每孔2 mL细胞悬液),细胞密度为每孔1×10⁶个,细胞贴壁后,除空白对照组与模型组外,每孔依次加入终质量浓度为0.2、0.4和0.6 mg/mL的藜麦DL-色氨酸,每个质量浓度梯度设置3个复孔,处理12 h后,除空白对照组外,每孔加入1 μg/mL的LPS处理24 h诱导炎症模型,24 h后收集细胞培养液,于4℃,3 500 r/min离心10 min,使用ELISA试剂盒测定炎症因子TNF-α、IL-1β的含量。

1.4.4 动物实验设计

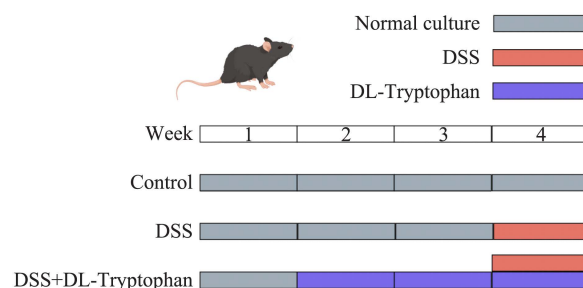


图2 动物实验设计流程

Fig.2 Animal experiment design flow

将小鼠随机进行分组,每组5只,共3组,分别为空白组,模型组,DL-色氨酸组,所有组适应性喂养1周后进行实验。各组处理如下:空白组始终正常饮水;模型组第4周饮用含2.5 wt.% DSS的去离子水7 d诱导结肠炎;DL-色氨酸组每天以50 mg/kg纯品DL-色氨酸进行灌胃干预,正常饮水,连续处理3周,从第4周开始灌胃干预的同时饮用含2.5 wt.% DSS的去离子水7 d诱导结肠炎,在DL-色氨酸进行灌胃干预期间,空白组与模型组也灌胃同等体积的生理盐

水，4 周结束后收集各组小鼠粪便后解剖，测量结肠长度，取远端结肠浸入 4 wt.% 多聚甲醛溶液进行组织固定，收集结肠内容物和组织样本供后续相关指标测定，实验周期共 28 d（图 2）。

1.4.5 小鼠疾病活动指数（DAI）

小鼠疾病活动指数评分是评价造模成功与否的重要依据，根据 Li 等^[19]的方法进行改进，从第 1 天开始，每天观察小鼠的粪便状态以及便血情况，并记录体质量。以这 3 个指标建立评价体系，评分体系见表 1，DAI 值（DAI=(体质量下降评分+直肠出血评分+粪便性状评分)/3）。具体如下：小鼠体质量无下降，粪便中无血迹且粪便黏稠度正常，分值为 0；体质量下降 0.1%~5%，粪便中带有少量血液且粪便松软，分值为 1；体质量下降 5%~10%，粪便中带血且粪便松软，分值为 2；体质量下降超过 10%，所有粪便中大量带血且出现稀便，分值为 3。

表 1 疾病活动指数评分

Table 1 Scores of disease activity index			
分数	失重/%	粪便粘稠度	便血
0	0	正常	正常
1	≤5	松软	少量血液
2	5~10	松散	肉眼便血
3	≥10	稀便	大量便血

1.4.6 小鼠结肠长度测量

实验结束，对小鼠进行麻醉，颈椎脱臼处死后，剖开腹腔取下全段结肠，测量长度并拍照，之后放入 4% 多聚甲醛溶液固定，进行后续实验。

1.4.7 结肠组织炎症因子含量测定

剪取各组小鼠结肠组织，冷冻研磨后离心取上清，用试剂盒检测 TNF-α、IL-1β 的含量。

1.4.8 结肠组织H&E染色

表 2 结肠组织病理学评分标准

Table 2 Colon histopathological scoring system		
分数	结肠上皮组织损伤	炎症细胞浸润
0	无损伤	无浸润
1	少量杯状细胞损伤	隐窝基底周围有浸润
2	大量杯状细胞损伤	黏膜基层有浸润
3	少量腺体损伤	黏膜基层大量浸润且黏膜增厚
4	大量腺体损伤	黏膜下层有浸润

用 4 wt.% 多聚甲醛溶液对远端结肠样本进行过夜固定后，使用梯度乙醇脱水，二甲苯透明，石蜡包埋后切片（5 mm），经苏木精-伊红染色，用倒置显微镜观察结肠损伤情况，并对 Erben 等^[20]的方法改进后进行组织病理学评分，评分体系见表 2，结肠组织病

理学评分 = 结肠上皮组织损伤评分 + 炎症浸润评分。

1.4.9 结肠组织免疫荧光染色

将小鼠石蜡切片进行脱蜡和复水后，在柠檬酸钠缓冲液（pH 值 6.0）中修复抗原，用 5% 牛血清中封闭 30 min 阻断非特异性结合点，用 Claudin-1、Occludin 和 ZO-1 抗体在 4 ℃ 下孵育过夜，洗涤后二抗孵育 50 min，再次洗涤，并用 DAB 显色液显色，然后再用苏木素复染。经不同体积分数乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封片，用倒置显微镜观察。

1.4.10 统计学方法

使用 GraphPad Prism 9 和 SPSS 26.0 对试验数据进行分析，使用 Image J 进行灰度分析。数据以平均值 ± 标准差（Mean ± SD）表示，采用单因素方差（One-Way ANOVA）或独立样本 *t* 检验（Student's *t* test）进行差异显著性检验，当 *P* < 0.05 时，则被认为差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 藜麦醇提物的成分鉴定

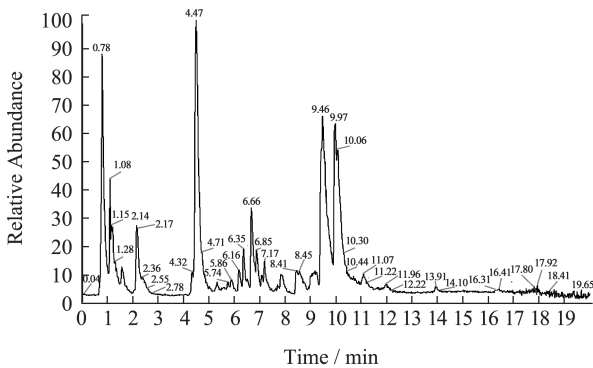


图 3 全谱样本离子流图

Fig.3 Full spectrum sample ion flow diagram

表 3 全谱鉴定结果统计表（主要成分）

Table 3 Statistical table of full spectrum identification results			
主要成分	CAS 号	出峰时间 /min	各物质质量百分比/%
DL-色氨酸	54-12-6	4.48	10.09
槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷	22688-79-5	6.67	3.42
甜菜碱	107-43-7	0.78	2.84

将藜麦醇提物进行气相质谱全谱分析鉴定，样本总离子流（TIC）图如图 3 所示，样本代谢物定性结果信息（正离子模式）如表 3 所示。结果显示其主要成分为 DL-色氨酸，质量百分比为 10.09%，先前的研究已经表明 DL-色氨酸具有抗炎以及抗肿瘤的作用^[21]，但 DL-色氨酸的抗结肠炎效应仍需进一步评价。

2.2 藜麦DL-色氨酸对巨噬细胞RAW264.7活力的影响

为了探究藜麦 DL-色氨酸对巨噬细胞 RAW264.7 的活力的影响,用 LPS 脂多糖诱导 RAW264.7 巨噬细胞建立炎症模型^[22],先用不同质量浓度的藜麦 DL-色氨酸(0.2、0.4、0.6、0.8 和 1 mg/mL)处理小鼠巨噬细胞 RAW264.7 12 h,然后使用 LPS 建立炎症模型处理 24 h 后,采用 CCK-8 法检测细胞存活率。结果显示(图 4),0.2、0.4、0.6 mg/mL 的藜麦 DL-色氨酸对巨噬细胞 RAW264.7 无细胞毒性,因此分别使用 0.2、0.4 和 0.6 mg/mL 藜麦 DL-色氨酸进行后续实验。

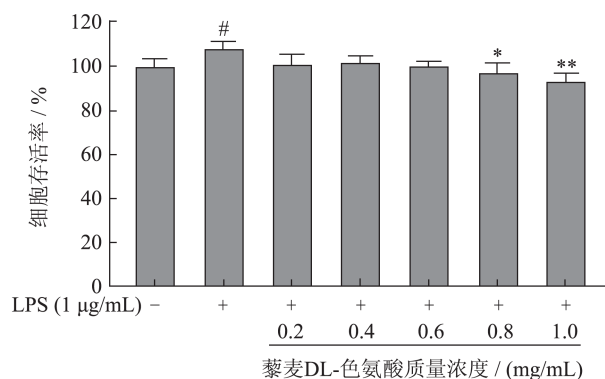


图 4 藜麦 DL-色氨酸对巨噬细胞 RAW264.7 细胞活力的影响

Fig.4 Effects of quinoa DL-tryptophan on the viability of macrophage RAW264.7 cells

注: # 是指与空白组相比, [#] $P < 0.05$; * 是指与模型组相比, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

2.3 藜麦DL-色氨酸抑制巨噬细胞RAW264.7炎症介质的表达

为了探究藜麦 DL-色氨酸的抗炎活性,选择质量浓度分别为 0.2、0.4 和 0.6 mg/mL 的藜麦 DL-色氨酸处理小鼠巨噬细胞 RAW264.7 12 h 后,用 LPS 诱导巨噬细胞建立炎症模型。结果显示(图 5),藜麦 DL-色氨酸可以明显抑制巨噬细胞中 TNF- α 、IL-1 β 的表达,且具有浓度依赖性,以上结果表明藜麦 DL-色氨酸可以显著抑制巨噬细胞炎症状态下炎症介质的表达。

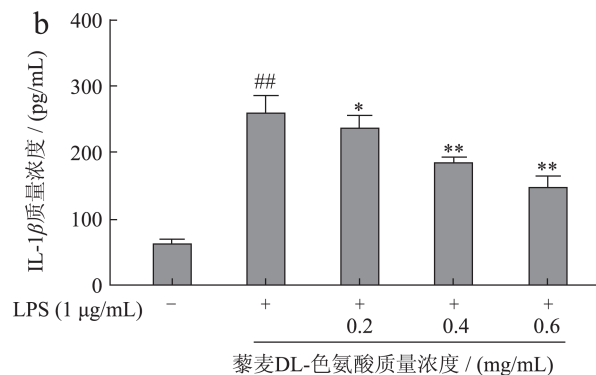
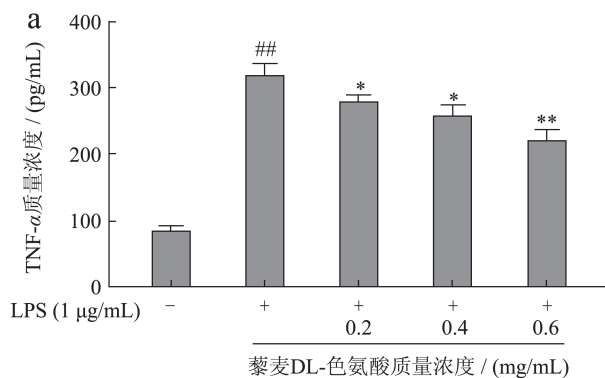


图 5 藜麦 DL-色氨酸对巨噬细胞 RAW264.7 细胞炎症介质的影响

Fig.5 Effects of quinoa DL-tryptophan on inflammatory mediators in macrophage RAW264.7 cells

注: # 是指与空白组相比, ^{##} $P < 0.01$; * 是指与模型组相比, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

2.4 DL-色氨酸提高了DSS诱导的结肠炎小鼠的DAI评分

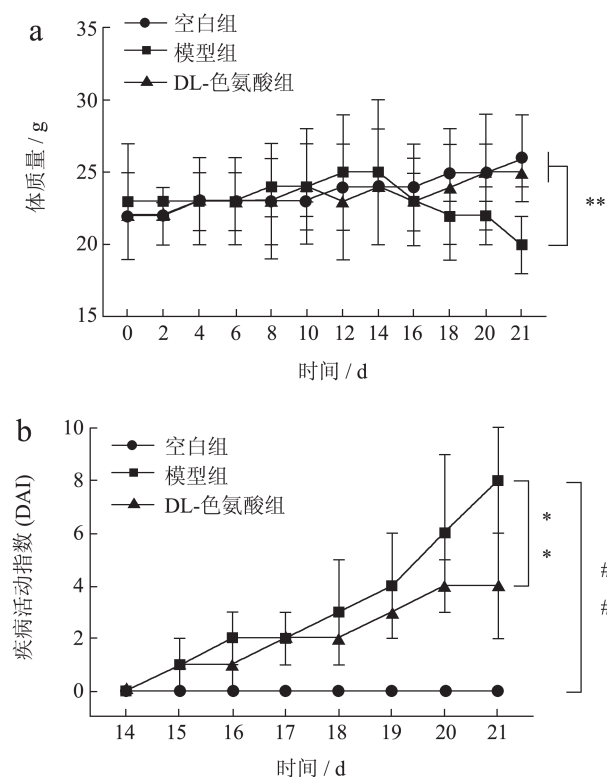


图 6 实验小鼠的 DAI 评分及体质量变化

Fig.6 Changes of DAI score and body weight of experimental mice

注: a: 小鼠体质量变化统计图; b: 小鼠疾病活动指数评分变化统计图。# 是指与空白组相比, ^{##} $P < 0.01$; * 是指与模型组相比, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

为了探究 DL-色氨酸对结肠炎小鼠疾病活动指数评分的影响,对所有小鼠进行疾病活动指数评分。在

实验记录中发现,空白组小鼠体毛光滑,饮食、活动及粪便状态正常,肛门处无异常,精神状态良好;模型组小鼠在DSS处理4 d后,体质量开始明显下降,体毛干枯无光泽,进食减少,动作迟缓懒动,且大多成堆蜷缩,粪便松散,伴有稀便、血便,肛周有血且精神萎靡不振,造模结束后,模型组小鼠平均体质量下降了6.93 g,DAI评分显著提高;与模型组相比,DL-色氨酸处理组小鼠体质量未出现明显下降,同时,进食与行动能力均有所改善,粪便成形,稀便、血便现象明显减少,肛周血块缩小,DAI指数降低了50.64%,体质量平均增加了5.03 g。结果显示,DL-色氨酸能够缓解DSS引起的小鼠体质量下降并改善便血情况和粪便状态,显著降低DAI评分(图6)。

2.5 DL-色氨酸增加了DSS诱导的结肠炎小鼠的结肠长度

为了探究DL-色氨酸对结肠炎小鼠结肠长度的影响,收集各组小鼠的结肠进行对比。结果表明,DSS诱导小鼠结肠炎后会造结肠长度缩短,这是评估结肠炎严重程度的指标之一。与对照组相比,模型组小鼠的结肠平均长度缩短了3.62 cm,经DL-色氨酸处理后,与模型组相比小鼠结肠平均长度增加了2.23 cm。结果显示,DL-色氨酸明显抑制了DSS引起的小鼠结肠缩短(图7)。

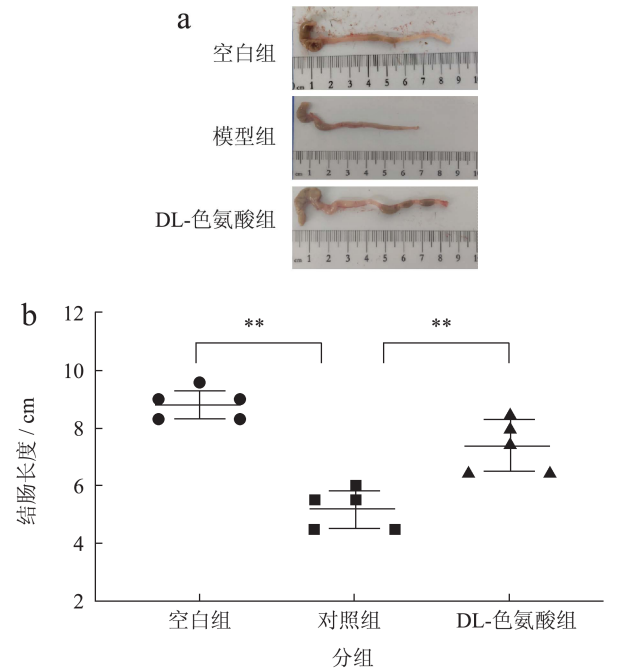


图7 小鼠结肠长度
Fig.7 Colon length of mice

注: a 为各组小鼠结肠代表图, b 为小鼠结肠长度统计图。
** $P < 0.01$ 。

2.6 DL-色氨酸改善了DSS诱导的结肠炎小鼠的结肠形态

DSS 可导致结肠上皮细胞异常凋亡,破坏肠道屏障,引发并加重肠道炎症^[23]。为了探究DL-色氨酸对结肠炎小鼠结肠形态的影响,将收集到的结肠组织进行切片染色。结果显示,对照组的小鼠结肠上皮完整杯状细胞的数量正常,肠腺整齐排列,隐窝结构正常,黏膜下层未出现水肿现象;与对照组相比,DSS组小鼠结肠上皮细胞出现多处脱落与破损,隐窝结构缺失,完整杯状细胞数量也明显减少,肠腺体伴有萎缩现象,黏膜下层发生水肿,并被炎症细胞浸润;而DL-色氨酸处理组小鼠此类病理特征程度明显降低,同时组织病理学评分方面也表现出明显的下降趋势($P < 0.01$)。以上结果表明DL-色氨酸对DSS诱导的结肠炎小鼠的结肠损伤具有明显的改善效果(图8)。

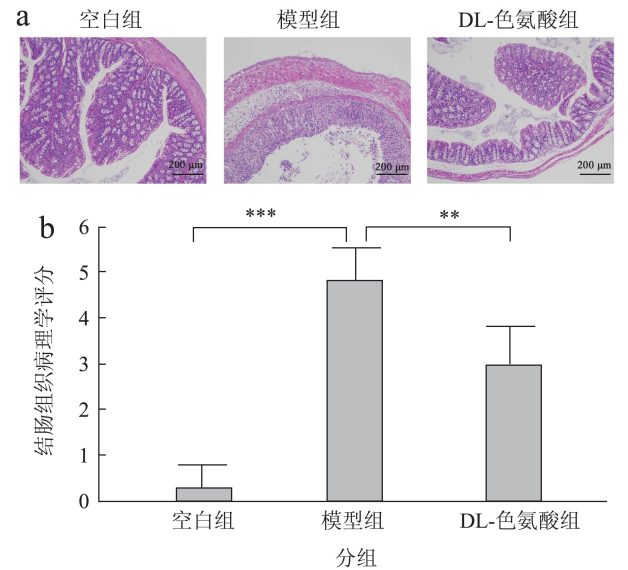


图8 小鼠结肠 H&E 染色

Fig.8 H&E staining of mouse colon

注: a 为小鼠结肠组织 H&E 染色图(放大 100 ×), b 为小鼠结肠组织病理学评分统计图。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

2.7 DL-色氨酸降低了DSS诱导的结肠炎小鼠的结肠炎症水平

炎症因子分泌过多是结肠炎的重要标志之一^[24], $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ 作为关键的促炎因子,在炎症反应中发挥着重要作用, $\text{TNF-}\alpha$ 是机体参与免疫应答和调节炎症反应的核心细胞因子,可促进炎症介质的表达并诱导肠道上皮细胞凋亡,过度释放 $\text{IL-1}\beta$ 则会导致炎症细胞浸润黏膜层,从而加重炎症反应^[25]。为了探究DL-色氨酸对结肠炎小鼠结肠炎症水平的影响,将收集到的结肠组织冷冻研磨为匀浆后进行炎症因子含

量的检测。结果显示,炎症因子在对照组中的表达水平较低,经 DSS 诱导处理后,小鼠结肠中的两种炎症因子表达水平均显著升高 ($P<0.01$),在通过 DL-色氨酸处理后,炎症因子表达水平明显有所下降 ($P<0.01$) (图 9),以上结果表明 DL-色氨酸处理可显著降低结肠炎小鼠的结肠炎症水平,从而发挥抗炎作用。

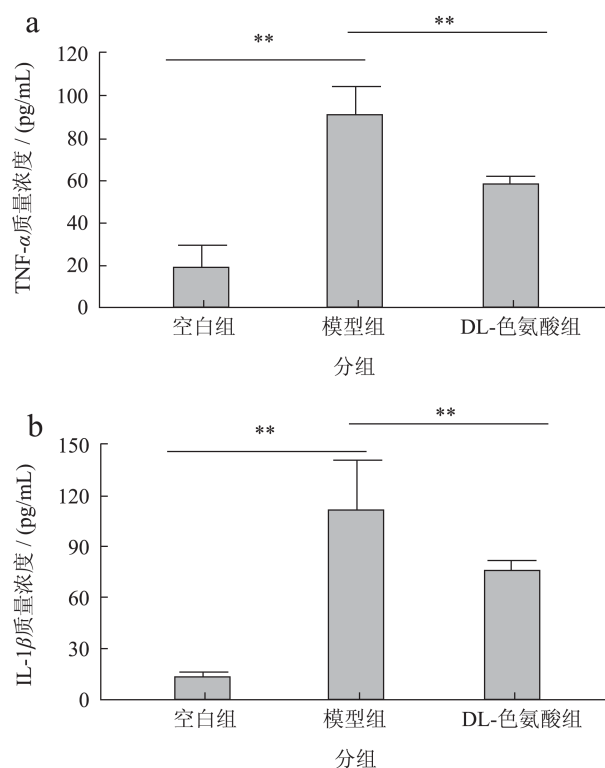


图 9 小鼠结肠炎症因子表达水平

Fig.9 Expression levels of colon inflammatory factors in mice

注: ** $P<0.01$ 。

2.8 DL-色氨酸增加了DSS诱导的结肠炎小鼠的肠上皮紧密连接

据相关研究显示,上皮屏障功能受损可以被认为是肠道炎症发生的早期事件之一,肠上皮是肠道黏膜屏障的重要组成部分,是由无数上皮细胞组成的单层结构^[26,27]。紧密连接是肠上皮细胞间最为重要的连接结构,由跨膜蛋白 Claudins、Occludin 和胞内蛋白 ZO 家族、丝状肌动蛋白等共同组成。跨膜蛋白在细胞外连接相邻的两个细胞,并与胞内蛋白连接固定,起到封闭的作用^[28,29]。细胞间的紧密连接结构只允许水和无机盐等小分子物质通过,能够阻止微生物和大分子毒性物质的进入,起到重要的屏障作用^[30]。为了探究 DL-色氨酸对结肠炎小鼠结肠上皮紧密连接结构的影响,将收集到的结肠组织进行免疫荧光染色。结果显示 (图 10),空白组小鼠的结肠上皮细胞间三种蛋白

都均匀分布,且染色较深;与空白组相比,模型组中阳性细胞标记数量明显减少,染色明显变浅,阳性细胞占比显著降低,说明造模后小鼠肠上皮细胞间的紧密连接蛋白数量显著减少,肠道屏障受损;在 DL-色氨酸处理组中,DL-色氨酸干预后明显提高了阳性细胞标记数量,阳性染色较深且均匀分布于肠上皮细胞之间,显著提高了阳性细胞百分率,Yang 等^[31]在谷糠多酚通过重塑肠道微生物群改善 DSS 诱导的结肠炎中也发现了此类现象,说明 DL-色氨酸能够改善造模引起的紧密连接蛋白数量的减少。

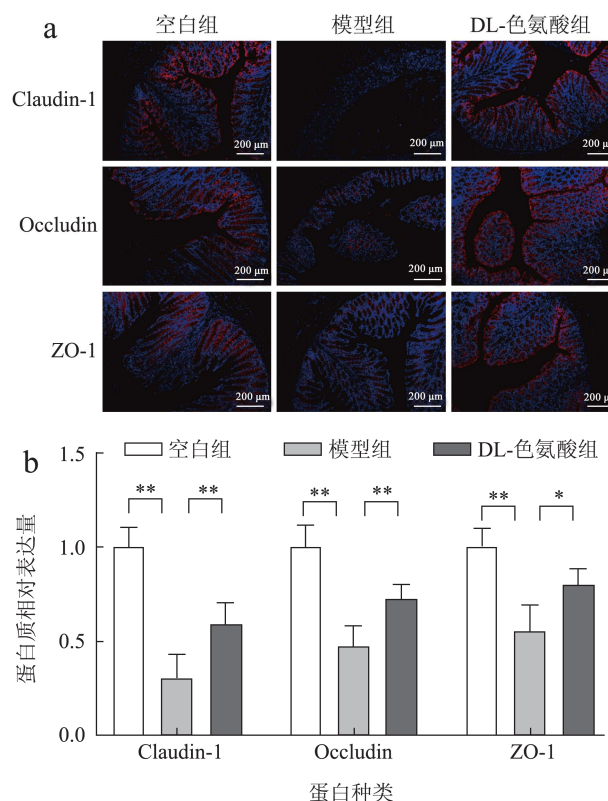


图 10 小鼠结肠上皮细胞免疫荧光

Fig.10 Immunofluorescence of colonic epithelial cells in mice

注: a 为小鼠结肠组织中 Claudin-1、Occludin 和 ZO-1 三种紧密连接蛋白免疫荧光图, b 为蛋白相对表达水平统计图 (以空白组为参照进行归一化处理)。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

3 结论

UC 作为一种世界性的慢性肠道疾病,每年都对数百万人的日常生活造成了很大的困扰。本研究在细胞及动物水平探究了 DL-色氨酸的抗炎活性,从小鼠体重及体貌特征变化、DAI 评分、结肠长度与结肠组织病理学、炎症因子和紧密连接蛋白的表达水平等方面,对 DL-色氨酸缓解结肠炎的效果进行了进一步评价,发现在 DL-色氨酸处理组中,结肠炎小鼠的体质量下降程度得到减缓,便血情况和粪便状态也得

到改善, DAI 评分也显著下降, 结肠长度明显增加, TNF- α 和 IL-1 β 的表达显著降低, 通过对小鼠结肠中三种主要紧密连接蛋白的表达量进行分析, 发现包括膜内蛋白 ZO-1 和两种跨膜蛋白 Claudin-1、Occludin 的表达较模型组有显著上调。因此, DL-色氨酸可能是通过抑制炎症因子的分泌, 从而改善结肠炎小鼠的结肠病理损伤, 并使紧密连接蛋白表达得到恢复, 来修复细胞间紧密连接结构, 从而有效缓解结肠炎症。虽然 DL-色氨酸缓解结肠炎的具体作用机制还需进一步的研究与证实, 但 DL-色氨酸潜在的药用价值, 为治疗结肠炎提供了一定的理论基础。

参考文献

- [1] NOWAK V, DU J, CHARRONDIERE UR. Assessment of the nutritional composition of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) [J]. Food Chemistry, 2016, 193: 47-54.
- [2] VEGA GA, MIRANDA M, VERGARA J, et al. Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), an ancient Andean grain: a review [J]. Journal of The Science of Food and Agriculture, 2010, 90(15): 2541-2547.
- [3] PEREIRA E, ENCINA ZC, BARROS L, et al. Chemical and nutritional characterization of *Chenopodium quinoa* Willd (*quinoa*) grains: A good alternative to nutritious food [J]. Food Chemistry, 2019, 280: 110-114.
- [4] FILHO AM, PIROZI MR, BORGES JT, et al. Quinoa: Nutritional, functional, and antinutritional aspects [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57(8): 1618-1630.
- [5] PATHAN S, SIDDIQUI RA. Nutritional Composition and Bioactive Components in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Greens: A Review [J]. Nutrients, 2022, 14(3): 558.
- [6] GUO H, HAO Y, YANG X, et al. Exploration on bioactive properties of quinoa protein hydrolysate and peptides: a review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(16): 2896-2909.
- [7] DAKHILI S, ABDOLALIZADEH L, HOSSEINI SM, et al. Quinoa protein: Composition, structure and functional properties [J]. Food Chemistry, 2019, 299: 125-161.
- [8] TAN M, ZHAO Q, ZHAO B, et al. Physicochemical properties, structural characterization and biological activities of polysaccharides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 193(B): 1635-1644.
- [9] HU Y, ZHANG J, ZOU L, et al. Chemical characterization, antioxidant, immune-regulating and anticancer activities of a novel bioactive polysaccharide from *Chenopodium quinoa* seeds [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 99: 622-629.
- [10] LIN X, ZHOU Q, ZHOU L, et al. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) bran saponins alleviate hyperuricemia and inhibit renal injury by regulating the PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway and uric acid transport [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(17): 6635-6649.
- [11] DOBRIJEVIC D, PASTOR K, NASTIC N, et al. Betaine as a functional ingredient: metabolism, health-promoting attributes, food sources, applications and analysis methods [J]. Molecules, 2023, 28(12): 4824.
- [12] ZHAO G, HE F, WU C, et al. Betaine in inflammation: mechanistic aspects and applications [J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9: 1070.
- [13] ORDAS I, ECKMANN L, TALAMINI M, et al. Ulcerative colitis [J]. Lancet, 2012, 380(9853): 1606-1619.
- [14] SEGAL J P, LEBLANC J F, HART A L. Ulcerative colitis: an update [J]. Journal of Clinical Medicine, 2021, 21(2): 135-139.
- [15] DU L, HA C. Epidemiology and pathogenesis of ulcerative colitis [J]. Gastroenterology Clinics of North America, 2020, 49(4): 643-654.
- [16] VOELKER R. What Is Ulcerative Colitis? [J]. The Journal of the American Medical Association, 2024, 331(8): 716.
- [17] LE BERRE C, HONAP S, PEYRIN-BIROULET L. Ulcerative colitis [J]. Lancet, 2023, 402(10401): 571-584.
- [18] PARANG B, BARRETT CW, WILLIAMS CS. AOM/DSS model of colitis-associated cancer [J]. Methods in Molecular Biology, 2016, 1422: 297-307.
- [19] LI Y, ZHANG Y, TUO Y, et al. Quinoa protein and its hydrolysate ameliorated DSS-induced colitis in mice by modulating intestinal microbiota and inhibiting inflammatory response [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 253(8): 127588.
- [20] ERBEN U, LODDENKEMPER C, DOERFEL K, et al. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models [J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2014, 7(8): 4557-4576.
- [21] MADAN BR, KHANNA NK. Anti-inflammatory activity of L-tryptophan and DL-tryptophan [J]. Indian Journal of Medical Research, 1978, 68: 708-713.
- [22] HAN S, GAO H, CHEN S, et al. Procyanidin A1 alleviates inflammatory response induced by LPS through NF- κ B, MAPK, and Nrf2/HO-1 Pathways in RAW264.7 cells [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 15087.
- [23] WANG Y, JI X, YAN M, et al. Protective effect and mechanism of polysaccharide from *Dictyophora indusiata* on dextran sodium sulfate-induced colitis in C57BL/6 mice [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 140: 973-984.
- [24] NEURATH MF. Cytokines in inflammatory bowel disease [J]. Nature Reviews Immunology, 2014, 14(5): 329-342.
- [25] NAKASE H, SATO N, MIZUNO N, et al. The influence of cytokines on the complex pathology of ulcerative colitis [J]. Autoimmunity Reviews, 2022, 21(3): 103017.
- [26] MINTON K. Intestinal barrier protection [J]. Nature Reviews Immunology, 2022, 22(3): 144-145.
- [27] BUCKLEY A, TURNER JR. Cell biology of tight junction barrier regulation and mucosal disease [J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2018, 10(1): 29314.
- [28] BARMEYER C, FROMM M, SCHULZKE JD, et al. Active and passive involvement of claudins in the pathophysiology of intestinal inflammatory diseases [J]. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 2017, 469(1): 15-26.
- [29] AHMAD R, KUMAR B, THAPA I, et al. Loss of claudin-3 expression increases colitis risk by promoting Gut Dysbiosis [J]. Gut Microbes, 2023, 15(2): 2282789.
- [30] KUO WT, ODENWALD MA, TURNER JR, et al. Tight junction proteins occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2022, 1514(1): 21-33.
- [31] YANG R, SHAN S, AN N, et al. Polyphenols from foxtail millet bran ameliorate DSS-induced colitis by remodeling gut microbiome [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 1030744.