

张斌,毛宁宁,于亚明,等. PLGA 桑枝多糖纳米粒预防脂多糖诱导小鼠十二指肠炎症的作用[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(7):1350-1358.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2025.07.011

PLGA 桑枝多糖纳米粒预防脂多糖诱导小鼠十二指肠炎症的作用

张斌¹, 毛宁宁², 于亚明², 刘朋¹, 武彩红¹, 陆辉¹

(1.江苏农牧科技职业学院,江苏 泰州 225300; 2.南京农业大学,江苏 南京 210095)

摘要: 为探究聚乳酸-羟基乙酸桑枝多糖(PR)纳米粒对脂多糖(LPS)诱导小鼠十二指肠炎症的预防作用,本研究以60只8周龄ICR小鼠为试验材料,以生理盐水灌胃和腹腔注射为对照(CON),分别进行生理盐水灌胃+LPS腹腔注射(LPS)、地塞米松腹腔注射+LPS腹腔注射(DEX)、聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)桑枝多糖纳米粒灌胃+LPS腹腔注射(PR)、桑枝多糖灌胃+LPS腹腔注射(RMP)、聚乳酸-羟基乙酸灌胃+LPS腹腔注射(PLGA)处理,处理6h后,记录小鼠体重变化,并进行疾病活动指数(DAI)评分,检测血清和十二指肠中炎症因子白介素-1 β (IL-1 β)含量、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量、总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)活性、一氧化氮(NO)含量和丙二醛(MDA)含量,观察肠形态及肠屏障变化,检测黏蛋白2(MUC2)和闭合蛋白(Occludin)mRNA相对表达水平,综合评价PR纳米粒对LPS诱导十二指肠炎症的预防作用。结果显示,与对照(CON)相比,LPS处理小鼠腹泻明显,DAI指数极显著升高,小鼠体重极显著下降;小鼠血清及十二指肠IL-1 β 含量、TNF- α 含量和NO含量极显著升高,血清T-AOC和SOD活性极显著降低,MDA含量极显著升高;小鼠十二指肠形态结构异常,肠绒毛长度和隐窝深度降低,杯状细胞减少;小鼠十二指肠肠道MUC2和Occludin的mRNA相对表达水平极显著降低。与LPS处理相比,PR处理及RMP处理小鼠临床症状明显减轻,肠道组织结构紊乱状况显著改善,炎症细胞因子分泌量降低,血清抗氧化能力提高,肠道MUC2和Occludin mRNA相对表达水平提高,LPS诱导的十二指肠炎症状况明显缓解,且PR纳米粒处理效果优于RMP处理。总之,PLGA桑枝多糖纳米粒对LPS诱导肠炎具有较好的预防作用,可以作为抗肠炎的一种多糖类纳米粒候选药。

关键词: PLGA; 桑枝多糖; 脂多糖(LPS); 十二指肠; 肠炎

中图分类号: S853.74 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2025)07-1350-09

Preventive effects of PLGA Ramulus Mori polysaccharide nanoparticles on lipopolysaccharide-induced duodenal inflammation in mice

ZHANG Bin¹, MAO Ningning², YU Yaming², LIU Peng¹, WU Caihong¹, LU Hui¹

(1. Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China; 2. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to investigate the preventive effect of poly(lactic acid-glycolic acid) Ramulus Mori polysaccharide (PR) nanoparticles on lipopolysaccharide (LPS)-induced duodenal inflammation, 60 eight-week-old ICR mice were used as experimental materials, and normal saline gavage and intraperitoneal injection were used as controls (CON). The mice were treated with normal saline gavage + LPS intraperitoneal injection (LPS), dexamethasone intraperitoneal injection + LPS intraperitoneal injection (DEX), poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) Ramulus Mori polysaccharide nanoparticles gavage + LPS intraperitoneal injection (PR), Ramulus Mori polysaccharide gavage + LPS intraperitoneal injection (RMP), poly(lactic-co-glycolic acid) gavage + LPS intrap-

收稿日期:2024-11-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31702286);2023年江苏省职业院校学生创新创业培育计划项目(GG-2023-0725);泰州市科技支撑计划(农业)项目(TN202119);江苏农牧科技职业学院农牧产业核心技术创新项目(NSF2023ZR01)

作者简介: 张斌(1975-),男,山西大同人,硕士,教授,研究方向为动物疾病防控。(E-mail)binzhang021@126.com

通讯作者: 武彩红,(E-mail)caihongwu616@aliyun.com;陆辉,(E-mail)jsmytg@126.com

eritoneal injection (RMP), poly(lactic-co-glycolic acid) gavage + LPS intrap-

eritoneal injection (PLGA), respectively. After six hours of treatment, the body weight changes of mice were recorded and the disease activity index (DAI) score was performed. The levels of inflammatory factors interleukin- 1β (IL- 1β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), total antioxidant capacity (T-AOC), and superoxide dismutase (SOD) activity, nitric oxide (NO) content and malondialdehyde (MDA) content in serum and duodenum were detected. The changes of intestinal morphology and intestinal barrier were observed, and the mRNA relative expression levels of mucin 2 (MUC2) and occludin were detected to comprehensively evaluate the preventive effect of PR nanoparticles against LPS-induced duodenal inflammation. The results showed that compared with the control (CON), the diarrhea of LPS-treated mice were obvious, the DAI index was extremely significantly increased, and the body weight of mice was extremely significantly decreased. The contents of IL- 1β , TNF- α and NO in serum and duodenum of mice increased extremely significantly, the T-AOC and SOD activity in serum decreased extremely significantly, and the content of MDA increased extremely significantly. The morphological structure of duodenum in mice was abnormal, the length of intestinal villi and the depth of crypt were decreased, and the number of goblet cells was also decreased. The relative mRNA expression levels of MUC2 and Occludin in the duodenum of mice were extremely significantly decreased. Compared with LPS treatment, the clinical symptoms of PR nanoparticle treatment and RMP treatment were significantly alleviated, the intestinal tissue structure disorder was significantly improved, the secretion of inflammatory cytokines was reduced, the antioxidant capacity of the serum was improved, the relative expression levels of intestinal MUC2 and Occludin mRNA were increased, and the duodenal inflammation induced by LPS was alleviated. The effect of PR nanoparticle treatment was better than that of RMP treatment. In conclusion, PLGA Ramulus Mori polysaccharide nanoparticles have a good preventive effect on LPS-induced enteritis and can be used as a candidate drug for anti-enteritis.

Key words: PLGA; Ramulus Mori polysaccharide; lipopolysaccharide (LPS); duodenum; enteritis

革兰氏阴性菌主要通过侵袭肠道黏膜、产生毒素,进而引起动物肠道炎症,造成动物出现腹泻、免疫力下降、营养不良等症状,严重者甚至死亡,是引发肠炎的重要病原菌^[1-2]。脂多糖(LPS)是革兰氏阴性菌感染时释放到宿主动物体内的主要毒性因子。LPS可介导免疫反应,引发肠道炎症^[3-4]。腹腔注射LPS可有效诱导小鼠(或其他动物)模型发生肠道炎症反应,该过程不仅可以模拟革兰氏阴性菌入侵肠道固有层后造成的肠炎,同时还可模拟由于机体自身免疫调节紊乱导致的免疫应激造成的炎症反应^[5]。因此,腹腔注射LPS是模拟动物肠炎的理想造模方法。

桑枝多糖作为桑枝的主要有效活性成分,具有调控免疫、抗炎、抗肿瘤及保护肾脏等多种活性功能^[6]。但桑枝多糖是一种非淀粉类多糖,在动物体内的吸收利用率较低。为提高桑枝多糖在动物体内的吸收利用效率,使用纳米粒载药是一种有效策略。近年来,聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)因其优异的生物相容性、可降解性及缓释性能,成为药物递送系统的常用载体,广泛用于小分子药物、核酸及天然活性成分的包载^[7-8]。使用PLGA作为药物载体包载桑枝多糖构建新型口服药剂,不仅可以解决桑枝多糖在体内吸收利用率差和生物活性低等问题,还可以提高桑枝多糖在体内靶向性,增强其疗效^[9]。PLGA封装桑枝多糖可提高桑枝多糖在动物肠道中

的吸收效率,延长桑枝多糖在肠道的滞留时间,并借助肠道黏膜对PLGA的黏附性促进桑枝多糖在肠道病灶部位的富集^[10-11]。PLGA封装桑枝多糖还可显著提升桑枝多糖的生物利用度和抗炎效果,有效抑制促炎因子并调节免疫细胞功能,展现其作为新型抗炎纳米药物的治疗潜力^[12]。PLGA与桑枝多糖联合策略为天然多糖的高效利用和疾病防治提供了新思路,但其在临床上的应用尚需进一步的药效学 and 安全性评估。

本研究通过腹腔注射LPS建立小鼠肠炎模型,采用PLGA桑枝多糖(PR)纳米粒预防性灌胃的措施,根据小鼠的疾病活动指数(DAI)、病理生理学分析及肠道蛋白表达水平等指标评估PR纳米粒对LPS诱导的小鼠肠炎的缓解作用及预防机制,为PR纳米粒缓解肠炎的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

96.5%桑枝多糖购自杨凌慈缘生物技术有限公司,批号CY200704;相对分子量18 000的聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA,乳酸与羟基乙酸按摩尔比3:1配制)购自济南岱罡生物科技有限公司,批号2020061709;泊洛沙姆188购自上海源叶生物科技有限公司,批号S30691;LPS(批号S1732)、NO检测

试剂盒(批号 S0021S)购自碧云天生物技术有限公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(BH0001)、过碘酸-希夫(PAS)染色试剂盒(BH0003)购自武汉博尔夫生物技术有限公司;白细胞介素-1 β (IL-1 β)(EK201B)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)(EK282)ELISA 检测试剂盒购自杭州联科生物技术股份有限公司;总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒(A015-2-1)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)测定试剂盒(A001-3-2)、丙二醛(MDA)含量测定试剂盒(A003-1-2)购自南京建成生物工程研究所;RT-qPCR 试剂盒(AUQ-01)购自北京全式金生物技术股份有限公司。其余试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

ATPIO-3000D 超声波细胞破碎仪购自南京先欧仪器制造有限公司;LR4000 旋转蒸发仪购自德国海道尔夫公司;BioMate 3S 分光光度计和 NanoDrop ND-1000 分光光度计购自美国赛默飞公司;Hydro2000Mu 型粒径分析仪和 ZETA SIZER Nano-ZS90 激光粒度分析仪购自英国马尔文公司;85-1 型磁力搅拌器购自上海志威电器有限公司;TDL-880-2B 型离心机购自上海安亭科学仪器厂;UV-2450 紫外可见分光光度计购自日本岛津公司。

1.3 PLGA 桑枝多糖(PR)纳米粒的制备

参照文献[12]的方法制备 PR 纳米粒。称取 50 mg 桑枝多糖溶解于 1 mL 超纯水中,充分溶解;量取 100 μ L 桑枝多糖溶液,加入含有 50 mg PLGA 的 1.25 mL 二氯甲烷中;冰浴条件下,利用超声探头超声处理 1 min,以生成稳定的初乳;将获得的稳定初乳注入含有 88 mg 丙二醇嵌段聚醚(F68)的 10 mL 超纯水中,冰浴条件下超声 5 min,以形成复乳;室温条件下利用磁力搅拌的方式搅拌复乳,至复乳中的二氯甲烷完全挥发,得到稳定的乳液,冻干后即得 PR 纳米粒。

1.4 动物分组与试验设计

60 只购自扬州大学比较医学研究院的 8 周龄 ICR 小鼠[(28 \pm 2) g]适应性喂养 7 d 后,称重并随机分为 6 组,每组 8~12 只,分别进行生理盐水、0.18 mg/mL 地塞米松(DEX)、1.8 mg/mL PLGA 桑枝多糖(PR)、1.8 mg/mL 桑枝多糖(RMP)、1.8 mg/mL PLGA(PLGA)灌胃处理。其中,2 组为生理盐水灌胃。每天灌胃 1 次,灌胃量均为 0.5 mL,连续 7 d。第 8 d 称量小鼠体重,记为 W1。称重后,2 个生理

盐水灌胃处理组小鼠分别进行 0.5 mL 生理盐水腹腔注射(CON)和 0.5 mL 0.6 mg/mL LPS 腹腔注射(LPS),其他灌胃处理小鼠统一进行 0.5 mL 0.6 mg/mL LPS 腹腔注射。注射后 6 h 对所有小鼠进行称重,记为 W2,同时记录各组小鼠的临床表现和粪便情况。称重并记录后,采集各处理小鼠眼球血液,分离血清后置于-20 $^{\circ}$ C 备用;处死小鼠,采集各处理小鼠十二指肠,一部分于-20 $^{\circ}$ C 冻存,用于炎症因子检测;另一部分置于 4% 多聚甲醛固定液中固定,用于制作组织切片。

1.5 肠炎疾病活动指数评分

参照文献[13]的方法进行各处理小鼠疾病活动指数(Disease activity index,DAI)评分。评分内容包括体重减轻评分、粪便状态评分和粪便隐血评分。其中,体重无减轻,计 0 分,体重减轻 0.1%~5.0%、5.1%~10.0%、10.1%~15.0%、15.1%及以上分别计 1 分、2 分、3 分、4 分;粪便正常颗粒状,计 0 分,粪便稍松软、中度松软、不成形、水样分别计 1 分、2 分、3 分、4 分。粪便隐血阴性,计 0 分,粪便隐血弱阳性、阳性、强阳性、肉眼可见分别计 1 分、2 分、3 分、4 分。3 者相加即为 DAI 评分结果。

1.6 十二指肠组织病理学检测

十二指肠组织经 4% 多聚甲醛固定液固定后,用石蜡包埋,制作 5 μ m 厚切片,进行苏木精-伊红(Hematoxylin-eosin,HE)及过碘酸雪夫氏(Periodic acid-Schiff,PAS)染色,采用 TS-100 倒置显微镜(日本尼康公司产品)进行十二指肠组织病理学观察,并根据结肠水肿程度、损伤程度及隐窝脓肿程度进行组织病理学评分和计算。

1.7 小鼠十二指肠肠道组织及血清炎症因子检测

将冻存的十二指肠组织取出,迅速切下约 0.1 g 组织并称重,加入 500 μ L 1% 苯甲基磺酰氟(PMSF)溶液,充分研磨至无肉眼可见沉淀。收集液体,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液于-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。采集小鼠血液,3 000 r/min 离心 10 min,收集上清液于-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。用 ELISA 法检测冰箱保存的十二指肠组织上清液中 TNF- α 质量浓度、IL-1 β 质量浓度、NO 浓度及血清上清液中 TNF- α 质量浓度、IL-1 β 质量浓度。

1.8 小鼠血清氧化应激水平检测

参照超氧化物歧化酶(SOD)、总抗氧化能力(T-AOC)、丙二醛(MDA)试剂盒说明书,采用 Multi-

skan FC 多功能酶标仪[赛默飞世尔(上海)仪器有限公司产品]检测小鼠血清抗氧化应激水平。

1.9 小鼠十二指肠紧密连接蛋白表达水平检测

取 50 mg 十二指肠组织,加入 1 mL Trizol 试剂研磨完全,离心取上清液;加入 200 μ L 三氯甲烷,快速振荡 15 s 混匀,室温静置 5 min,12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min;将上层水相转移至微量离心管(德国 Eppendorf 公司产品),加入等体积异丙醇,-20 $^{\circ}$ C 静置 2 h;再次离心 15 min,弃上清后加 1 mL 75%乙醇,温和振荡悬浮沉淀,8 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,洗涤 2 次,弃上清,室温干燥后加入 100 μ L 焦碳酸二乙酯(Diethyl pyrocarbonate, DEPC)水解得到小鼠十二指肠 RNA。取少量 RNA 样品用 Nano-Drop ND-1000 分光光度计检测 RNA 浓度和纯度。参照 RNA 反转录试剂盒 HiScript[®] II RT SuperMix(南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品)说明书进行反转录。将反转录得到的 cDNA 样品稀释 5 倍,然后,参照 qPCR 试剂盒 ChanmQTM SYBR[®] qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物股份有限公

司产品)说明书进行加样,检测黏蛋白 2(MUC2)和闭合蛋白(Occludin)的 mRNA 表达水平。

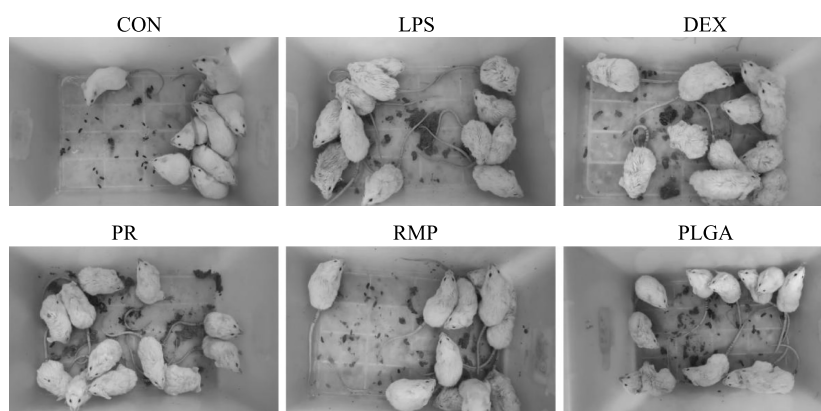
1.10 数据统计与分析

利用 SPSS 18.0 进行处理间差异显著性分析,在 0.05、0.01 和 0.001 水平上分析处理间的差异显著性。利用 GraphPad Prism 9.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 不同处理对小鼠临床表现及腹泻的影响

不同处理小鼠临床表现及腹泻情况如图 1 所示。从图中可以看出,CON 处理小鼠粪便成形且湿度适中,小鼠反应敏捷,背毛光泽,活动状态正常。与 CON 处理相比,LPS 处理小鼠腹泻症状明显,粪便增多且多呈稀糊状,多数小鼠背腰弓起,背毛蓬乱,反应迟钝。与 LPS 处理相比,DEX、PR、RMP 处理小鼠腹泻程度较轻,可观察到部分成形的粪便,粪便量较少,小鼠背毛比 LPS 处理平顺光滑,反应敏捷,呈弓背状小鼠数量减少。PLGA 处理小鼠腹泻减轻,但其粪便仍然呈稀糊状。



CON:灌胃 0.5 mL 生理盐水 7 d+腹腔注射 0.5 mL 生理盐水; LPS:灌胃 0.5 mL 生理盐水 7 d+腹腔注射 0.5 mL 0.6 mg/mL 脂多糖(LPS); DEX:腹腔注射 0.5 mL 0.18 mg/mL 地塞米松 7 d+腹腔注射 0.5 mL 0.6 mg/mL LPS; PR:灌胃 0.5 mL 1.8 mg/mL 聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)桑枝多糖 7 d+腹腔注射 0.5 mL 0.6 mg/mL LPS; RMP:灌胃 0.5 mL 1.8 mg/mL 桑枝多糖 7 d+腹腔注射 0.5 mL 0.6 mg/mL LPS; PLGA:灌胃 0.5 mL 1.8 mg/mL PLGA 7 d+腹腔注射 0.5 mL 0.6 mg/mL LPS。

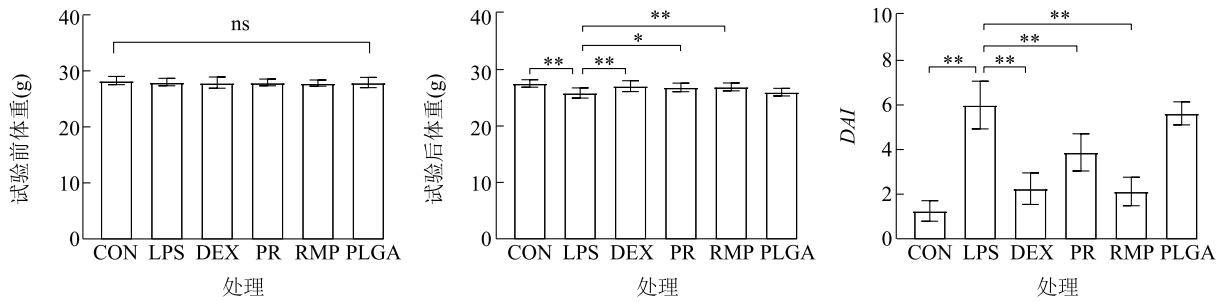
图 1 不同处理小鼠临床表现和腹泻程度

Fig.1 Clinical manifestations and degree of diarrhea of mice in each group

2.2 不同处理对小鼠体重和疾病活动指数(DAI)的影响

不同处理对小鼠体重及 DAI 的影响如图 2 所示。LPS 注射前各处理小鼠体重无显著性差异(图 2A)。如图 2B、图 2C 所示,LPS 注射 6 h,LPS 处理小鼠体重极显著低于 CON,DAI 极显著

升高。DEX、PR、RMP 处理小鼠体重显著或极显著高于 LPS 处理,分别比 LPS 处理增加 6.7%、5.0%、3.3%;DEX、PR、RMP 处理小鼠 DAI 极显著低于 LPS 处理。PR 处理与 DEX 处理小鼠体重和 DAI 无显著差异,说明这 2 个处理的预防效果一致。



CON、LPS、DEX、PR、RMP、PLGA 见图 1 注。*、** 分别表示处理间差异显著 ($P < 0.05$) 和差异极显著 ($P < 0.01$), ns 表示差异不显著。

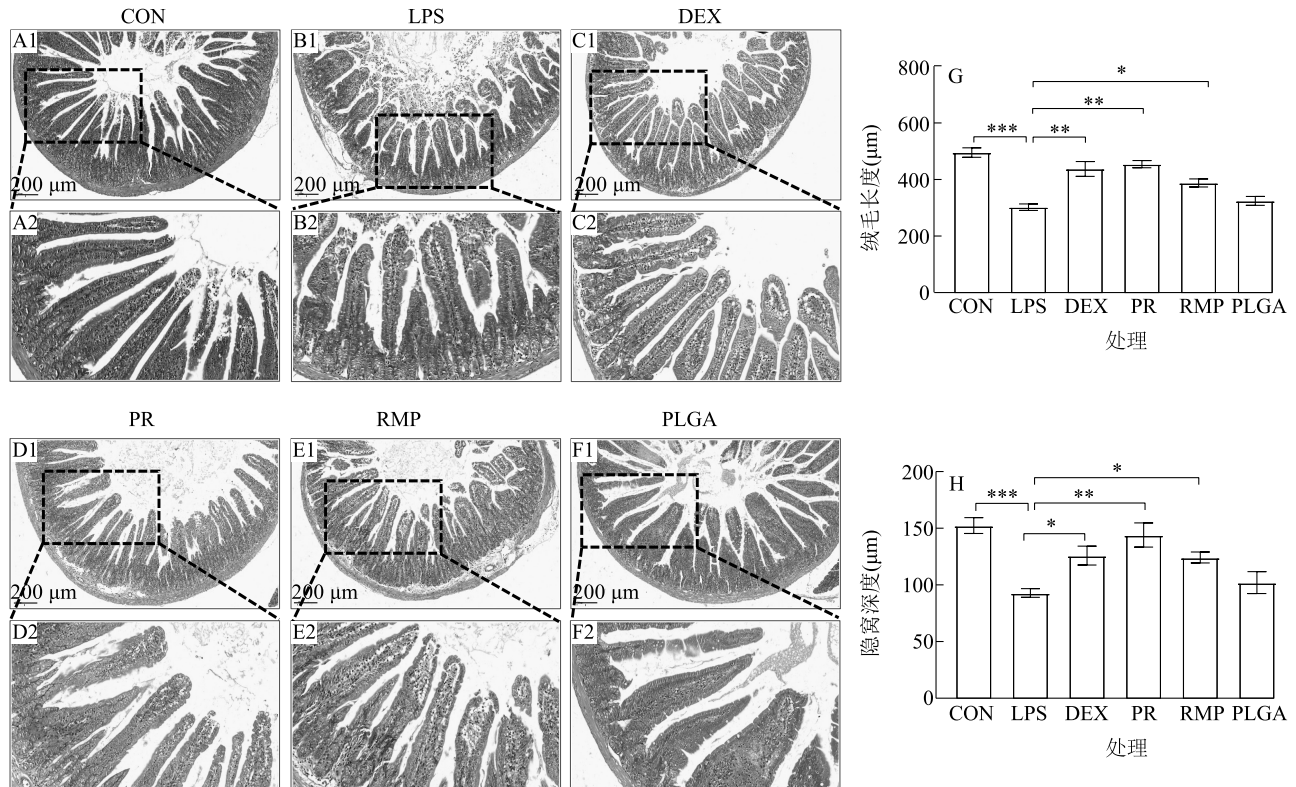
图 2 不同处理小鼠体重和疾病活动指数 (DAI) 变化

Fig.2 Changes in body weight and disease activity index (DAI) of mice with different treatments

2.3 不同处理对小鼠十二指肠形态的影响

不同处理小鼠十二指肠形态如图 3 所示。从图中可以看出,对照 (CON) 小鼠十二指肠黏膜绒毛密集且排列整齐,形态结构正常 (图 3A1 和图 3A2); LPS 处理十二指肠出现明显损伤,肠绒毛断裂与脱落、隐窝结构破坏,炎性细胞浸润 (图 3B1 和图 3B2); DEX、RMP 处理十二指肠形态趋于完整 (图 3C1、图 3C2、图 3E1、图 3E2); PR 处理小鼠十二指肠黏膜层结构完整,肠绒毛整齐排列,未见绒毛脱

落,炎性细胞浸润减少 (图 3D1、图 3D2); PLGA 处理小鼠十二指肠损伤明显 (图 3F1 和图 3F2)。由图 3G、图 3H 可以看出,LPS 处理小鼠绒毛长度和隐窝深度均极显著低于 CON; DEX 处理、PR 处理、RMP 处理小鼠十二指肠绒毛长度显著或极显著高于 LPS 处理; DEX 处理、PR 处理、RMP 处理小鼠十二指肠隐窝深度显著或极显著高于 LPS 处理,其中,PR 处理与 LPS 处理的隐窝深度差异极显著。上述结果表明,PR 可缓解 LPS 诱导的小鼠十二指肠损伤。



CON、LPS、DEX、PR、RMP、PLGA 见图 1 注。*、**、*** 分别表示处理在 0.05、0.01、0.001 水平上差异显著。

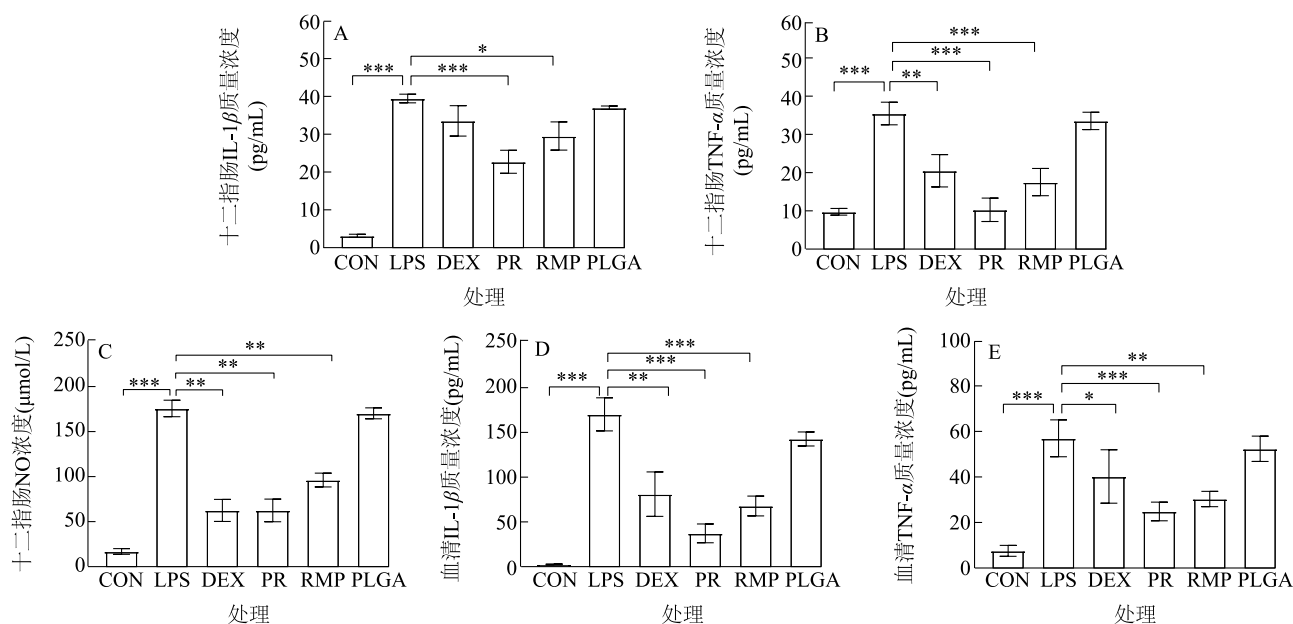
图 3 不同处理小鼠十二指肠形态学特征

Fig.3 Morphological characteristics of duodenum in mice with different treatments

2.4 不同处理对小鼠十二指肠和血清炎症因子的影响

不同处理对小鼠十二指肠和血清中炎症因子的影响如图 4 所示。从图中可以看出,与 CON 相比,LPS 处理小鼠十二指肠和血清中 IL-1 β 质量浓度和 TNF- α 质量浓度均极显著升高,十二指肠中 NO 浓度亦极显著上升,说明 LPS 能诱导小鼠十二指肠炎症;DEX、PR、RMP 处理十二指肠中 TNF- α 质量浓

度和 NO 浓度及血清中 IL-1 β 质量浓度与 TNF- α 质量浓度显著或极显著低于 LPS 处理,PR、RMP 处理十二指肠中 IL-1 β 质量浓度亦显著或极显著低于 LPS 处理。上述结果说明,RMP 处理可降低机体炎症因子含量,经 PLGA 包封后的 RMP 可进一步降低十二指肠及血清中炎症因子水平,发挥明显的抗炎作用。



CON、LPS、DEX、PR、RMP、PLGA 见图 1 注。IL-1 β : 白细胞介素 1 β ; TNF- α : 肿瘤坏死因子- α 。*、**、*** 分别表示处理间在 0.05、0.01、0.001 水平上差异显著。

图 4 不同处理小鼠十二指肠和血清炎症因子变化

Fig.4 Changes of inflammatory factors in duodenum and serum of mice with different treatments

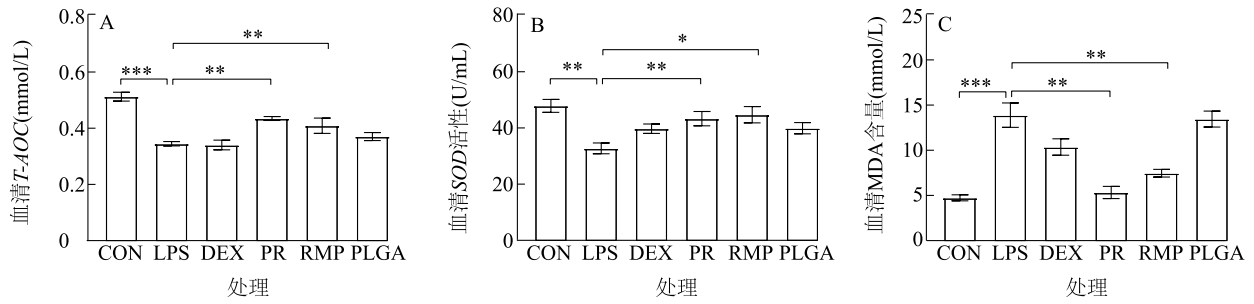
2.5 不同处理对小鼠血清氧化应激指标的影响

不同处理小鼠血清氧化应激指标的变化如图 5 所示。与 CON 相比,LPS 处理小鼠血清中 T-AOC 和 SOD 活性极显著降低,而 MDA 含量极显著增加,说明 LPS 能诱导小鼠机体氧化应激的发生。与 LPS 处理相比,PR 处理和 RMP 处理 T-AOC 和 SOD 活性显著或极显著增加,MDA 含量极显著降低,而 DEX 处理 T-AOC、SOD 活性及 MDA 含量与 LPS 处理均无显著差异。上述结果表明,RMP 处理和 PR 处理均可发挥抗氧化作用,防止机体氧化应激,其中 PR 处理效果更好。

2.6 不同处理对小鼠十二指肠肠道屏障功能的影响

杯状细胞可分泌黏蛋白以阻止病原微生物

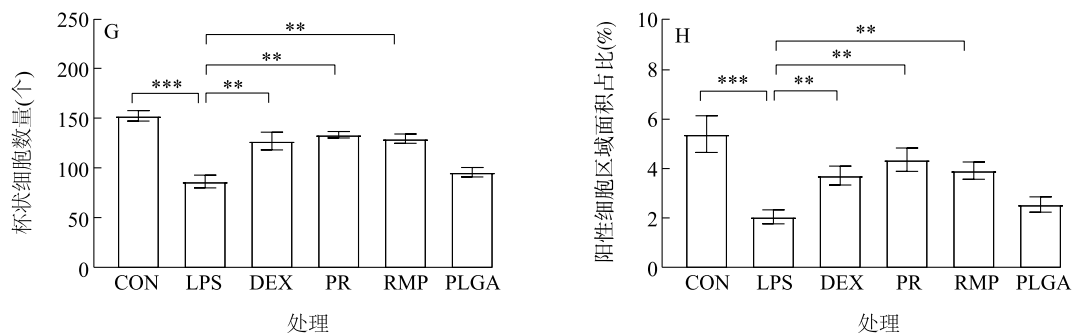
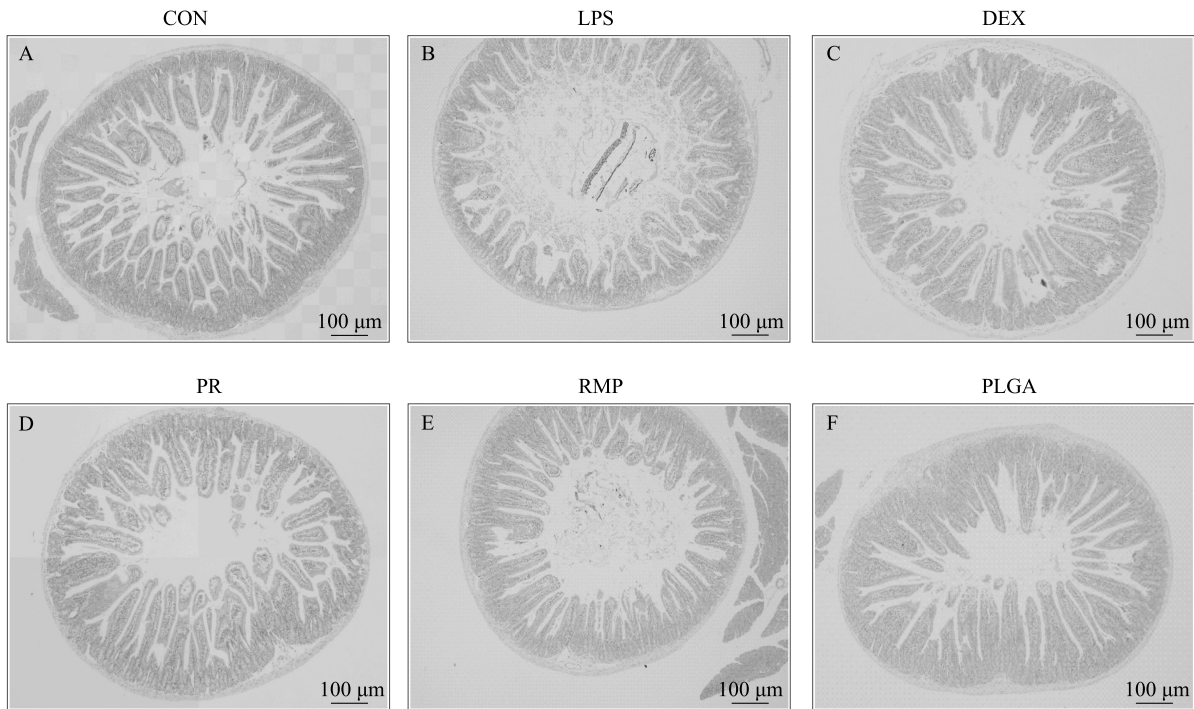
侵入肠道,杯状细胞的富集说明肠屏障功能完整。不同处理小鼠十二指肠 PAS 染色结果如图 6 所示。十二指肠中杯状细胞阳性区域经 PAS 染色后呈紫红色,CON 处理小鼠肠道黏膜上皮层可见大量杯状细胞,且排列整齐(图 6A);LPS 处理肠道黏膜层结构被破坏(图 6B),杯状细胞数量和阳性细胞区域面积占比均极显著低于 CON 处理,表明 LPS 处理能诱导十二指肠的肠道屏障功能损伤。DEX、PR、RMP 处理黏膜上皮层杯状细胞数量和阳性细胞区域面积占比均极显著高于 LPS 处理,说明 DEX、PR、RMP 处理可减轻 LPS 诱导的十二指肠肠道屏障功能的损伤,其中 PR 处理的预防效果最好。



CON、LPS、DEX、PR、RMP、PLGA 见图 1 注。T-AOC:总抗氧化能力;SOD:超氧化物歧化酶;MDA:丙二醛。*、**、*** 分别表示处理间在 0.05、0.01、0.001 水平上差异显著。

图 5 不同处理小鼠血清氧化应激指标变化

Fig.5 Changes of mouse serum oxidative stress indices with different treatments



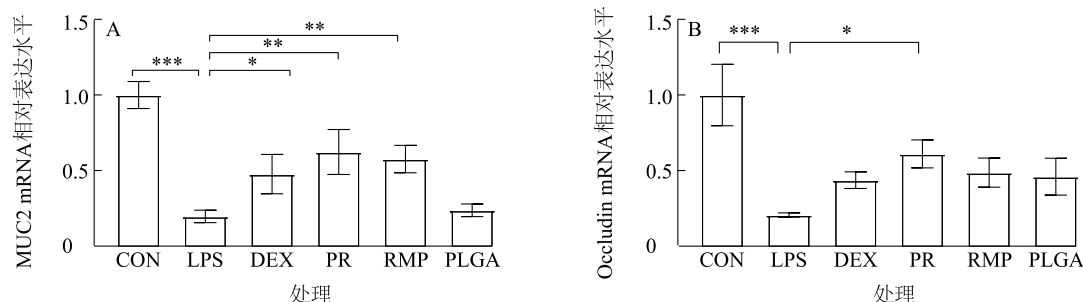
CON、LPS、DEX、PR、RMP、PLGA 见图 1 注。*、**、*** 分别表示处理间在 0.01、0.001 水平上差异显著。

图 6 不同处理小鼠十二指肠 PAS 染色结果

Fig.6 Results of PAS staining of duodenum in mice with different treatments

2.7 不同处理对小鼠十二指肠黏蛋白及紧密连接蛋白表达水平的影响

不同处理小鼠十二指肠黏蛋白 MUC2 及紧密连接蛋白 Occludin 的 mRNA 相对表达水平如图 7 所示。LPS 处理黏蛋白 2 (Mucin 2, MUC2) 和闭合蛋白 (Occludin, OCLN) 的 mRNA 相对表达水平极显著



CON、LPS、DEX、PR、RMP、PLGA 见图 1 注。*、**、*** 分别表示处理间在 0.05、0.01、0.001 水平上差异显著。

图 7 不同处理小鼠十二指肠 MUC2 蛋白和 Occludin 蛋白的 mRNA 相对表达水平

Fig.7 Relative mRNA expression levels of MUC2 protein and Occludin protein in duodenum of mice with different treatments

3 讨论

桑枝多糖是从桑树枝干中提取的一种多糖类化合物,主要由葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖等单糖组成,具有抗氧化、抗炎、降血糖、降血脂、增强免疫力等作用^[14]。作为一种大分子多糖,桑枝多糖经口服给药后的生物利用率通常较低,且易受到肠道内酶的影响而分解,因此摄入的多糖仅有少部分可被机体吸收利用,影响其药效。药物递送系统通过改善药物溶解度和稳定性,可提高药物生物利用率。PLGA 纳米粒是一种生物可降解的共聚物和重要的药物递送载体系统,具有良好的生物相容性和可降解性,因而被广泛应用于药物递送领域^[7-8]。Morelli 等^[10]研究证实,PLGA 纳米粒可负载桑枝多糖,所制备的 PR 纳米粒在体外 LPS 诱导的巨噬细胞炎症模型中表现出良好的抗炎作用。基于 PR 纳米粒的抗炎作用,本研究采用溶剂挥发法制备获得 PR 纳米粒,并利用 LPS 构建小鼠十二指肠炎症模型,研究发现 LPS 诱导的小鼠出现明显的弓背、体重下降、腹泻等症状,DAI 显著升高,这符合肠炎模型的临床表现;PR 纳米粒预处理可减轻 LPS 所致的小鼠体重降低和 DAI 升高,改善腹泻症状,说明 PR 纳米粒具有预防十二指肠炎症作用。

LPS 是一种具有强烈炎性刺激作用的物质,可

低于 CON,说明 LPS 处理破坏了肠道黏膜屏障;DEX、PR、RMP 处理十二指肠 MUC2 的 mRNA 相对表达水平显著或极显著高于 LPS 处理。PR 处理 Occludin 的 mRNA 相对表达水平总体上高于 DEX、RMP、PLGA 处理,表明 PR 处理能更有效地预防 LPS 诱导的肠屏障损伤。

激活肠道黏膜炎性细胞,如单核细胞和巨噬细胞,并促使其释放 IL-1 β 和 TNF- α 等炎性细胞因子,进而引发炎症^[15]。McGarry 等^[16]的研究结果表明,炎性介质可促进组织中过氧化物和氧自由基集聚,过多的氧自由基又可攻击细胞,诱导氧化应激,进一步介导炎性介质释放,从而导致炎症反应恶性循环。本研究结果显示,与 CON 相比,LPS 组小鼠血清和十二指肠中 IL-1 β 质量浓度、TNF- α 质量浓度及十二指肠中 NO 浓度极显著升高,T-AOC 含量和 SOD 活性极显著降低,MDA 含量极显著升高;PR 纳米粒预处理可降低 LPS 诱导的炎性细胞因子含量,提升血清总抗氧化水平和 SOD 活性,降低血清的 MDA 含量,这可能是 PR 纳米粒缓解十二指肠炎症的主要途径。

Vancamelbeke 等^[17]研究发现,肠道持续处于炎性细胞浸润的状态可导致肠通透性增加,进一步破坏肠道形态和屏障功能。肠屏障功能的完整性对阻止病原微生物入侵、预防肠道感染至关重要。肠屏障主要包括黏液屏障和机械屏障。MUC2 是杯状细胞的主要分泌物,与杯状细胞共同构成肠道黏液屏障,是抵御病原微生物入侵的首要防线;以 Occludin 蛋白为主的紧密连接蛋白构成了肠道机械屏障,通过连接肠道上皮细胞,形成紧密连接,防止有害物质通过细胞间隙进入肠道黏膜^[18-19]。He 等^[20]的研究

结果表明,LPS 处理可降低十二指肠肠绒毛长度和隐窝深度,减少杯状细胞数量,并下调紧密连接蛋白表达量,从而导致肠屏障功能受损。本研究结果同样表明,经 LPS 处理后,小鼠十二指肠肠绒毛长度和隐窝深度降低,杯状细胞数量极显著降低,且 MUC2 蛋白和 Occludin 蛋白的 mRNA 相对表达水平均极显著低于对照(CON);PR 和 RMP 预处理均可减轻 LPS 引起的肠屏障功能损伤,其中 PR 处理的预防效果更好。

4 结论

PR 纳米粒可通过降低炎性细胞因子分泌量和减少氧化应激发生,从而保护十二指肠屏障功能,进而缓解肠炎症状。PR 纳米粒可作为一种有效药物预防和缓解 LPS 所致的肠道炎症。

参考文献:

- [1] 王浩,景麟稀,肖金龙,等.产耶尔森杆菌素大肠杆菌诱导小鼠十二指肠炎症的研究[J].中国畜牧兽医,2023,50(11):4693-4702.
- [2] FAN H N, ZHU P, ZHANG J, et al. Mucosal microbiome dysbiosis associated with duodenum bulb inflammation [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2021, 150: 104711.
- [3] 刘颖,田旭,冯晓梦,等.黄芪多糖对肠炎雏鸡小肠黏膜损伤的保护作用[J].中国畜牧兽医,2023,50(1):76-85.
- [4] 李慧,刘宇飞,李金龙,等.蒲公英和板蓝根对 LPS 诱导的小鼠肠黏膜屏障损伤的调理机制研究[J].中国预防兽医学报,2023,45(8):859-863,876.
- [5] DONG N, LI X R, XUE C Y, et al. *Astragalus* polysaccharides alleviates LPS-induced inflammation via the NF- κ B/MAPK signaling pathway [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2020, 235(7/8): 5525-5540.
- [6] YU W S, CHEN H, XIANG Z H, et al. Preparation of polysaccharides from *Ramulus mori*, and their antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial activities [J]. *Molecules*, 2019, 24(5): 856.
- [7] 李秀峥,白富栋,孙启梅,等.乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)制备方法研究进展[J].当代化工,2024,53(3):676-679,686.
- [8] 王晓芳,符乐,张盼盼,等. PLGA 纳米粒及其在生物医学领域的应用潜力 [J]. 中国畜牧兽医, 2024, 51(1): 33-41.
- [9] FENG Z A, PENG S, WU Z Y, et al. *Ramulus mori* polysaccharide-loaded PLGA nanoparticles and their anti-inflammatory effects *in vivo* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 182: 2024-2036.
- [10] MORELLI L, GIMONDI S, SEVIERI M, et al. Monitoring the fate of orally administered PLGA nanoformulation for local delivery of therapeutic drugs [J]. *Pharmaceutics*, 2019, 11(12): 658.
- [11] KAMALY N, YAMEEN B, WU J, et al. Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release [J]. *Chemical Reviews*, 2016, 116(4): 2602-2663.
- [12] FENG Z A, JIAO L N, WU Z Y, et al. A novel nanomedicine ameliorates acute inflammatory bowel disease by regulating macrophages and T-cells [J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2021, 18(9): 3484-3495.
- [13] 张莉,胡卫东,杜林,等.人参皂苷 Rg1、Re 对脂多糖诱导的肠道屏障损伤的保护作用 [J]. 中国兽医学报, 2024, 44(3): 527-535, 557.
- [14] CHEN Y J, JIANG X, XIE H Q, et al. Structural characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Ramulus Mori* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 190: 232-239.
- [15] CIESIĘLSKA A, MATYJEK M, KWIATKOWSKA K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2021, 78(4): 1233-1261.
- [16] MCGARRY T, BINIECKA M, VEALE D J, et al. Hypoxia, oxidative stress and inflammation [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2018, 125: 15-24.
- [17] VANCAMELBEKE M, VERMEIRE S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease [J]. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 2017, 11(9): 821-834.
- [18] 余晶仪,郝小燕,龙敏,等. *MUC₂* 基因表达对益生菌调节肠屏障作用的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(2): 197-201.
- [19] 王莉芬,何伟,王懿凡.紧密连接蛋白 Occludin 表达与小鼠肠屏障功能障碍和炎性出血的关系 [J]. 临床和实验医学杂志, 2021, 20(18): 1908-1912.
- [20] HE Y J, LI Z, XU T, et al. Polystyrene nanoplastics deteriorate LPS-modulated duodenal permeability and inflammation in mice via ROS driven-NF- κ B/NLRP3 pathway [J]. *Chemosphere*, 2022, 307: 135662.

(责任编辑:石春林)