

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240177

· 论 著 ·

马齿苋水醇提取物对小鼠溃疡性结肠炎及骨丢失的保护作用及其机制

李 琨^{1,2}, 夏天爽², 范围晴², 关梦瑶², 王迅康¹, 赖立勇¹, 蒋益萍², 辛海量^{2*}, 岳小强^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)第二附属医院中医科, 上海 200003

2. 海军军医大学(第二军医大学)药理学系, 上海 200433

〔摘要〕 目的 探索马齿苋水醇提取物(POHA)对小鼠溃疡性结肠炎(UC)及相关骨量丢失的保护作用。

方法 利用葡聚糖硫酸钠(DSS)构建C57BL/6小鼠UC模型。50只小鼠被随机分为对照组、DSS组、美沙拉秦溶片(MS)组、低POHA组、高POHA组。除对照组自由饮用饮用水外, DSS组、MS组、低POHA组、高POHA组连续8周饮用含DSS的饮用水。第2周起, 对照组和DSS组予生理盐水灌胃, MS组予100 mg/kg的MS溶液灌胃, 低POHA组和高POHA组分别予1 000 mg/kg和2 000 mg/kg的POHA灌胃。每2 d记录体重并统计疾病活动指数(DAI)。第56天计算各组小鼠肠重指数、肝脏指数、脾脏指数, 观察结肠组织学形态变化, 测定血清骨代谢标志物水平, 检测股骨骨微结构参数。结果 与对照组比较, DSS组DAI评分、肠重指数、肝脏指数、脾脏指数均增加(均 $P<0.01$), 结肠组织病理损伤明显, 血清中骨钙素、I型胶原羧基末端肽、抗酒石酸性磷酸酶5b含量均增加($P<0.01$)。DSS组骨丢失明显, 表现为骨密度、相对骨体积、骨小梁数、骨小梁厚度降低, 骨表面积/骨体积和骨小梁分离度升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与DSS组相比, MS组和高POHA组小鼠股骨骨密度、相对骨体积、骨小梁数、骨小梁厚度均增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 骨表面积/骨体积均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 骨小梁分离度均降低但差异无统计学意义(均 $P>0.05$); 低POHA组的上述骨微结构参数与DSS组相比差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。

结论 POHA对DSS诱导的UC以及相关骨丢失具有保护作用, 其机制可能与抑制亢进的骨代谢活动有关。

〔关键词〕 溃疡性结肠炎; 马齿苋; 葡聚糖硫酸钠; 骨丢失

〔引用本文〕 李琨, 夏天爽, 范围晴, 等. 马齿苋水醇提取物对小鼠溃疡性结肠炎及骨丢失的保护作用及其机制[J]. 海军军医大学学报, 2025, 46(6): 710-718. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240177.

Protective effects and mechanism of hydroalcoholic extract of *Portulaca oleracea* L. on ulcerative colitis and bone loss in mice

LI Kun^{1,2}, XIA Tianshuang², FAN Weiqing², GUAN Mengyao², WANG Xunkang¹, LAI Liyong¹, JIANG Yiping², XIN Hailiang^{2*}, YUE Xiaoqiang^{1*}

1. Department of Traditional Chinese Medicine, The Second Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200003, China

2. School of Pharmacy, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

〔Abstract〕 Objective To explore the protective effect of hydroalcoholic extract of *Portulaca oleracea* L. (POHA) on ulcerative colitis (UC) and bone loss in mice. Methods The C57BL/6 mice were treated with dextran sulfate sodium (DSS) to establish UC model. A total of 50 mice were randomly assigned to including control group, DSS group, mesalazine (MS) group, low dose of POHA (POHAL) group, or high dose of POHA (POHAH) group. The control group freely drank drinking water, while the DSS, MS, POHAL and POHAH groups drank drinking water containing DSS for 8 weeks. Since the 2nd week, the control group and DSS group were given normal saline by gavage. The MS group was given MS (100 mg/kg) by gavage. The POHAL group and POHAH group were given POHA (1 000 mg/kg and 2 000 mg/kg) by gavage, respectively. Body weight and disease activity index (DAI) were recorded and calculated every 2 d. On the 56th day, the colon weight index, liver index, and spleen index were calculated, and the histological changes of colon were observed. Serum levels of bone metabolism markers and microstructure parameters of femur were detected. Results Compared with the control group, the DSS group showed significantly increased DAI score, colon weight index, liver index, and spleen index (all $P<0.01$). The DSS group exhibited significant pathological damage in colon tissues and significantly increased serum levels

〔收稿日期〕 2024-03-21 〔接受日期〕 2024-07-01

〔基金项目〕 国家自然科学基金(82174079), 第五批全国中医临床优秀人才研修项目(国中医药人教函[2022]1号). Supported by National Natural Science Foundation of China (82174079) and the Fifth Batch of National Traditional Chinese Medicine Clinical Talent Training Project ([2022] 1).

〔作者简介〕 李 琨, 博士生. E-mail: 17340700008@fudan.edu.cn

*通信作者(Corresponding authors). E-mail: hailiangxin@163.com, yuexiaoqiang@163.com

of osteocalcin, C-terminal peptide of collagen type I, and tartrate-resistant acid phosphatase 5b ($P<0.01$). The bone loss was significant in the DSS group, manifested by markedly decreased bone mineral density (BMD), bone tissue volume to tissue volume ratio (BV/TV), trabecular bone number (Tb.N), and trabecular bone thickness (Tb.Th), and markedly increased bone surface to bone volume ratio (BS/BV) and trabecular bone separation (Tb.Sp) ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the DSS group, the BMD, BV/TV, Tb.N and Tb.Th of the femur in the MS group and POHAH group of mice were all increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), the BS/BV all decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the Tb.Sp all decreased without significant differences (all $P>0.05$). The above bone microstructure parameters in the POHAL group showed no significant differences compared with those in the DSS group (all $P>0.05$). **Conclusion** POHA has protective effect on DSS-induced UC and bone loss, and the mechanism may be related to the inhibition of hyperactive bone metabolism.

[**Key words**] ulcerative colitis; *Portulaca oleracea* L.; dextran sulfate sodium; bone loss

[**Citation**] LI K, XIA T, FAN W, et al. Protective effects and mechanism of hydroalcoholic extract of *Portulaca oleracea* L. on ulcerative colitis and bone loss in mice[J]. Acad J Naval Med Univ, 2025, 46(6): 710-718. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240177.

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 的一种, 其具体病因尚未明确, 特征是肠道的慢性非特异性炎症状态, 病变呈连续性, 可累及直肠、结肠的不同部位^[1]。UC 常伴发一系列肠外病理改变, 其中肌肉骨骼系统的改变最为显著^[2]。骨丢失是 UC 最常见的骨关节损伤表现^[3]。临床上常联用双膦酸盐等抗骨吸收药物治疗 IBD 相关的骨丢失^[4]。但骨丢失的隐性意味着很难确定抗骨吸收药物的最佳介入时机。因此, 迫切需要开发一种可同时改善 UC 患者肠道炎症及其伴发骨丢失的药物。

马齿苋在我国有悠久的历史, 是一种被广泛认可的药食同源植物。实验证明, 马齿苋具有抗炎、抗菌、胃肠保护、维持肠道菌群稳态等药理作用^[5]。中医学认为, 马齿苋具有清热解毒、凉血止血、止痢的功效。研究发现, 以马齿苋为主药的中药组方对 UC 有较好治疗效果^[6]。《本草纲目》记载“筋骨疼痛, 不拘风湿气、杨梅疮及女人月家病, 先用此药 (马齿苋) 止疼”的记载, 提示马齿苋可用于骨关节疾病。马齿苋多糖可缓解氧化应激诱导的斑马鱼骨丢失及成骨细胞损伤, 提示马齿苋具有抗骨质疏松潜力^[7]。然而, 目前尚缺乏马齿苋对 UC 相关骨丢失的研究。

葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 是 UC 动物模型的常见造模药物, 能在诱导小鼠 UC 的同时引起骨丢失, 可用于建立 UC 相关骨丢失动物模型^[8]。本研究拟采用 DSS 构建 UC 小鼠模型, 以探究马齿苋水醇提取物 (hydroalcoholic extract of *Portulaca oleracea* L., POHA) 对 UC 相关骨丢失的影响。

1 材料和方法

1.1 仪器 Micro-CT (Micview V2.1.2 软件, 美国 GE 公司), 超声波清洗器 (DL-1000B, 上海之信仪器有限公司), 电热恒温鼓风干燥箱 (DHG-9240A, 上海一恒仪器有限公司), 十万分之一电子天平 (BT25S, 德国 Sartorius 公司), 酶标仪 (ELx800, 美国 Bio-Tex 公司), 脱水机 (JJ-12J) 及包埋机 (JB-P5) 均为武汉俊杰电子有限公司产品, 病理切片机 (RM2016, 上海徕卡显微系统有限公司), 光学显微镜 (ECLIPSE E100) 及成像系统 (DS-U3) 均为日本 Nikon 公司产品, 循环水式真空泵 (SHB-III, 长沙明杰仪器有限公司), 旋转蒸发仪 (RE-52AA, 上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 药品、试剂及药材 美沙拉秦肠溶片 (mesalazine, MS) (批号 H20171358, 规格为每片 0.5 g) 为德国福克制药股份有限公司产品, DSS (分子量 36 000~50 000, 货号 60316ES60) 为上海翌圣生物科技有限公司产品, 尿粪隐血检测试剂盒 (联苯胺法) (货号 60403ES60) 为上海翌圣生物科技有限公司产品, 骨钙素酶联免疫试剂盒 (货号 ml063317)、I 型胶原羧基末端肽 (C-terminal peptide of collagen type I, CTX-1) 酶联免疫试剂盒 (货号 ml002251)、抗酒石酸酸性磷酸酶 5b (tartrate-resistant acid phosphatase 5b, TRACP-5b) 酶联免疫试剂盒 (货号 ml001944) 均为上海酶联生物科技有限公司产品, 多聚甲醛 (货号 BL-SJ-0523) 为上海博光生物科技有限公司产品, 无水乙醇 (货号 100092683)、二甲苯 (货号 10023418) 均为国药集团化学试剂有限公司产品, H-E 染液套装 (货号 ZC-A0671) 为上海茁彩生物

科技有限公司产品。

马齿苋药材购于海军军医大学第一附属医院（批号 22121302，上海德大堂国药有限公司），经海军军医大学药理学系生药学教研室辛海量教授鉴定为马齿苋科马齿苋属植物马齿苋（*Portulaca oleracea* L.）的干燥地上部分。标本存放于海军军医大学药理学药用植物部植物标本室。

1.3 实验动物 50 只 6 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠（体重 20~25 g）购自杭州子源实验动物科技有限公司〔合格证号：20230731Abzz0105000308；实验动物生产许可证号：SCXK（浙）2019-0004〕。动物分笼饲养于海军军医大学实验动物中心，环境温度（22±0.5）℃，光照、黑暗按照每 12 h 循环，自由进食、饮水。所有研究均符合海军军医大学实验动物伦理和使用护理原则。

1.4 POHA 的制备 马齿苋药材粉碎后过 60 目筛，称取 100 g 过筛后的马齿苋干燥粉末，加入 1 L 体积分数为 50% 的乙醇水溶液浸取 12 h。减压过滤后回收马齿苋粉末及第 1 次滤液，之后再次加入 1 L 体积分数为 50% 的乙醇，室温下以 100% 超声功率提取 1 h。再次减压过滤后合并 2 次滤液，减压浓缩成浓度为 0.5 g/mL 的 POHA 母液，-20 ℃ 保存备用。

1.5 动物模型制备及实验分组 将小鼠随机平均分为对照组、DSS 组、MS 组、低 POHA 组、高 POHA 组。用 DSS 诱导 UC 及骨丢失小鼠模型^[8]，造模共持续 8 周，除对照组小鼠全程自由饮用实验动物饮用水外，DSS 组、MS 组、低 POHA 组、高 POHA 组小鼠在造模的前 2 周饮用含 3%（质量分数）DSS 的饮用水，第 3~8 周饮用含 1.5%（质量分数）DSS 的饮用水。从造模的第 2 周起，对照组和 DSS 组予生理盐水灌胃，MS 组予 100 mg/kg 的 MS 溶液灌胃，低 POHA 组和高 POHA 组分别予 1 000、2 000 mg/kg 的 POHA 灌胃。

1.6 小鼠炎症严重程度评估 每 2 d 更换 1 次饮

用水并观测记录小鼠体重变化、大便性状及粪便隐血情况，以评估疾病活动指数（disease activity index, DAI）。按照文献方法评估炎症严重程度^[9]，DAI 总分 0~4 分为轻度炎症，5~8 分为中度炎症，9~12 分为重度炎症，评分细则见表 1。粪便隐血情况使用尿粪隐血检测试剂盒（联苯胺法）测定：将一定量新鲜收取的粪便均匀涂抹于白瓷板上，依次滴加 1~2 滴试剂 1 与试剂 2 后若立即呈现深蓝色则为强阳性，立即呈现蓝绿色则为阳性，30~60 s 内呈现蓝色则为弱阳性，3 min 内不显色则为阴性。

表 1 DAI 评分标准^[9]

Tab 1 Scoring criteria for DAI ^[9]			
Score	Body weight loss	Stool consistency	Fecal occult blood test
0	None	Well-formed stool	Negative
1	>0%-5%	Loose stool	Weakly positive
2	>5%-10%	Mucous stool	Positive
3	>10%-20%	Mushy stool	Strongly positive
4	>20%	Diarrhoea	Gross blood stool

DAI: Disease activity index.

1.7 组织样本制取 造模第 56 天，小鼠禁食 12 h 后按 50 mg/kg 剂量腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉，取眼眶静脉丛血后采用颈椎脱位法安乐死。将肝、脾分离后用无菌纸巾或吸水纸轻轻地吸去表面的血液、水分和其他污物，称重并记录。取出结肠在生理盐水中放置冲洗，除去残留的粪便后测量结肠重量及长度。选取肛门上方 1 cm 处的一小部分结肠置 4% 多聚甲醛中固定，剩余的结肠部分利用液氮速冻后放置于-80 ℃下贮存备用。

1.8 结肠样本 H-E 染色及组织学变化评分 石蜡切片脱蜡、水洗后进行 H-E 染色，脱水封片，在显微镜下观察，评估组织形态变化。根据文献报道的 DSS 诱导结肠炎评分标准评估疾病严重程度^[10]，评分标准见表 2。

表 2 结肠样本组织学评分标准^[10]

Tab 2 Histological scoring criteria for colon samples ^[10]				
Score	Percent of involvement	Crypt damage	Depth of inflammation	Ulcer
0	None	None	None	None
1	>0%-25%	Basal 1/3 damaged	Mucosal epithelium	1
2	>25%-50%	Basal 2/3 damaged	Mucosal lamina propria	2
3	>50%-75%	Only surface epithelium intact	Submucosa	3
4	>75%	Entire crypt and epithelium lost	Transmural	>3

1.9 血清指标检测 小鼠眼眶静脉血在室温静置2 h后,于4℃、1 000×g离心10 min,留取血清,−80℃保存。血清中骨钙素、CTX-1以及TRACP-5b的含量根据相应ELISA试剂盒说明书的操作步骤测定。

1.10 骨量和骨微结构参数测定 用高分辨率Micro-CT对股骨远端进行扫描,以生长板向上100层作为感兴趣区域以评估骨量和骨微结构。测定参数包括骨密度(bone mineral density, BMD)、相对骨体积(bone tissue volume to tissue volume ratio, BV/TV)、骨表面积/骨体积(bone surface to bone volume ratio, BS/BV)、骨小梁数(trabecular bone number, Tb.N)、骨小梁厚度(trabecular bone thickness, Tb.Th)及骨小梁分离度(trabecular bone separation, Tb.Sp)。

1.11 统计学处理 使用GraphpadPism 9.5软件进行实验数据分析及绘图。计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。符合正态分布且方差齐的计量资料的多组间比较采用单因素方差分析,不符合正态分布或方差不齐

的计量资料或离散变量的多组间比较采用Kruskal-Wallis检验,多重比较采用错误发现率校正法。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 POHA对UC小鼠疾病活动的影响 DSS诱导第1周,对照组DAI评分保持稳定。相较于对照组, DSS组、MS组、低POHA组和高POHA组DAI评分快速升高,表明急性UC诱导成功。第2周,对照组DAI评分仍保持不变, DSS组DAI评分持续增加至7分以上, MS组、低POHA组、高POHA组DAI评分稳定在5~7分。第3~8周,对照组DAI评分均为0分, DSS组DAI评分稳定在7~8分,提示慢性UC诱导成功。相较于DSS组, MS组、低POHA组、高POHA组DAI评分均降低,其中MS组降低最多(图1A)。造模结束时, DSS组DAI评分较对照组增高($P<0.01$), MS组、低POHA组、高POHA组DAI评分均较DSS组降低(均 $P<0.05$,图1B)。

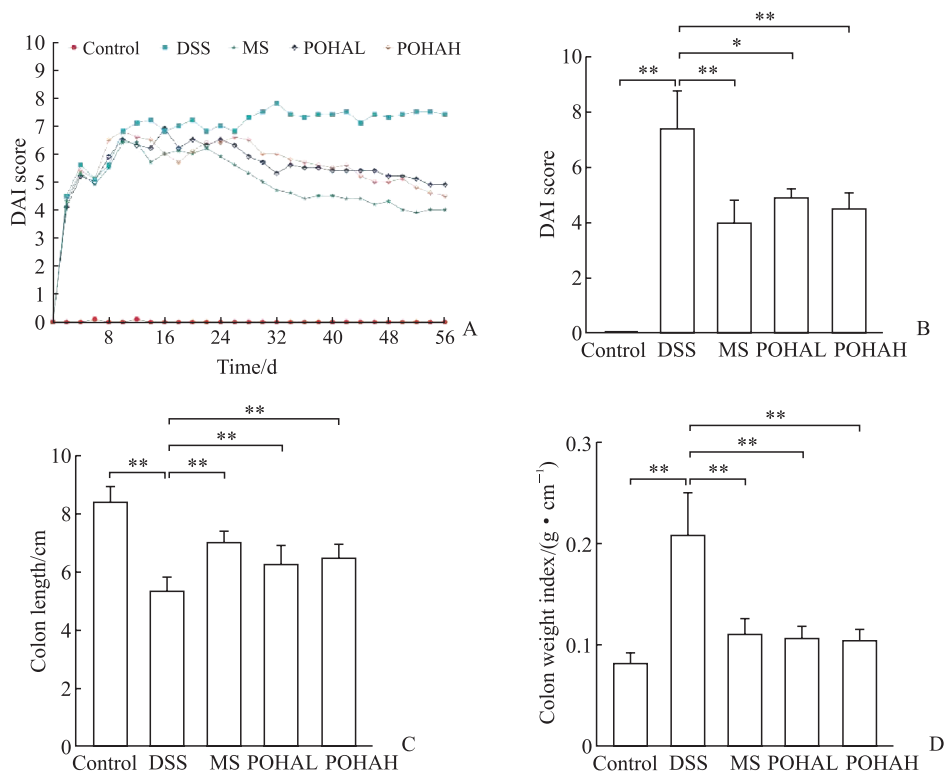


图1 POHA减弱DSS诱导UC小鼠的疾病活动

Fig 1 POHA attenuated disease activity of DSS-induced UC mice

A: Changes in DAI score over time during 8 weeks; B: DAI score at the end of modeling; C: Colon length; D: Colon weight index (colon weight index=colon weight/colon length). $n=10$, $\bar{x} \pm s$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$. POHA: Hydroalcoholic extract of *Portulaca oleracea* L.; DSS: Dextran sulfate sodium; UC: Ulcerative colitis; DAI: Disease activity index; MS: Mesalazine; POHAL: Low-dose (1 000 mg/kg) of POHA; POHAH: High-dose (2 000 mg/kg) of POHA.

与对照组相比, DSS 组结肠长度缩短 ($P < 0.01$, 图 1C)、肠重指数增加 ($P < 0.01$, 图 1D)。与 DSS 组相比, MS 组、低 POHA 组、高 POHA 组结肠长度均增加 (均 $P < 0.01$, 图 1C)、肠重指数均降低 (均 $P < 0.01$, 图 1D)。DAI 评分和肠重指数均说明, POHA 和 MS 有效降低了小鼠 UC 疾病活动的严重程度。

2.2 POHA 对 UC 小鼠结肠组织病理形态的影响 H-E 染色结果显示, 对照组结肠组织细胞结构完整明晰, 未见溃疡, 肠腺排列规则, 含有丰富的杯状细胞, 无炎症细胞浸润 (图 2A)。DSS 组结肠黏膜层的细胞组织出现不完整和脱落现象, 伴有多处浅表溃疡和大面积隐窝缺失, 黏膜层中有大

量炎症细胞浸润 (图 2B)。MS 组结肠黏膜层偶尔出现细胞脱落, 但无浅表溃疡, 隐窝排列有序, 周围仅有少量炎症细胞浸润 (图 2C)。低 POHA 组、高 POHA 组结肠黏膜上皮细胞恢复, 腺体排列整齐, 杯状细胞无明显缺失 (图 2D、2E), 与 MS 组相比无明显区别。与对照组 [(3.10±2.23) 分] 相比, DSS 组结肠组织学评分 [(12.9±1.79) 分] 增高 ($P < 0.01$); 与 DSS 组相比, MS 组 [(4.80±1.40) 分]、低 POHA 组 [(5.60±0.84) 分]、高 POHA 组 [(5.10±1.60) 分] 结肠组织学评分均降低 (均 $P < 0.01$)。结肠 H-E 染色和组织学评分结果均表明, POHA 和 MS 有效减轻了 DSS 导致的结肠黏膜破坏与炎症细胞浸润。

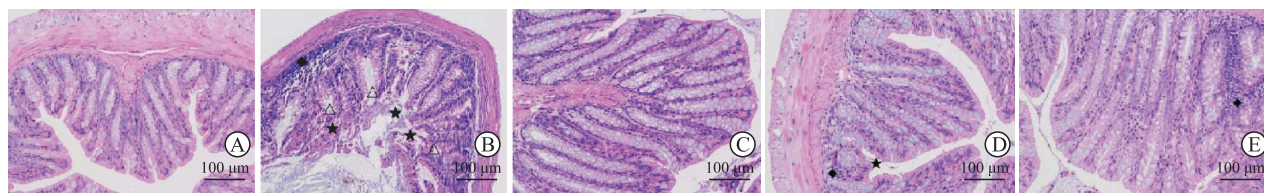


图 2 POHA 减轻 DSS 诱导的 UC 小鼠的结肠组织学损伤

Fig 2 POHA reduced colon histological injury in DSS-induced UC mice

Representative images of hematoxylin-eosin staining of colon tissues from control group (A), DSS group (B), MS group (C), POHAL group (D), and POHAH group (E). ★: Ulcer; △: Crypt absence; ◆: Inflammatory infiltration. POHA: Hydroalcoholic extract of *Portulaca oleracea* L.; DSS: Dextran sulfate sodium; UC: Ulcerative colitis; MS: Mesalazine; POHAL: Low-dose (1 000 mg/kg) of POHA; POHAH: High-dose (2 000 mg/kg) of POHA.

2.3 POHA 对 UC 小鼠肝、脾的影响 相较于对照组, DSS 组小鼠肝脏指数和脾脏指数均增加 (均 $P < 0.01$, 图 3A、3B), 肝脏和脾脏体积均增大 (图 3C、3D)。相较于 DSS 组, MS 组、低 POHA 组、高 POHA 组小鼠肝脏指数和脾脏指数均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 图 3A、3B), 肝脏和脾脏体积均减小 (图 3C、3D), 表明 POHA 和 MS 减轻了 DSS 引起的系统性炎症。

2.4 POHA 对 UC 小鼠血清中骨钙素、CTX-1 及 TRACP-5b 含量的影响 相较于对照组, DSS 组小鼠血清骨钙素、CTX-1 及 TRACP-5b 水平均增加 (均 $P < 0.01$)。相较于 DSS 组, MS 组和高 POHA 组小鼠血清骨钙素、CTX-1 及 TRACP-5b 水平均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 低 POHA 组小鼠血清骨钙素、CTX-1 水平均降低 (均 $P < 0.01$), TRACP-5b 水平降低但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 4。

2.5 POHA 对 UC 小鼠股骨骨量和骨微结构的影响 与对照组相比, DSS 组小鼠股骨 BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th 均降低 (均 $P < 0.01$), BS/BV、Tb.Sp 均升高 (均 $P < 0.01$, 图 5A)。与 DSS 组相比, MS 组和高 POHA 组小鼠股骨 BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th 均增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), BS/BV 降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); MS 组、低 POHA 组、高 POHA 组 Tb.Sp 水平与 DSS 组相比差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$, 图 5A)。与对照组相比, DSS 组股骨骨质明显空洞, 骨小梁的数量和面积减少 (图 5B)。MS 和高剂量 POHA 均可改善骨小梁的骨微结构, 低剂量 POHA 对缓解 DSS 诱导的骨丢失有一定效果, 但不显著 (图 5B)。

3 讨论

DAI 评分是评估结肠炎症严重程度的指标, 其数值增加提示肠道炎症加剧。长期存在的肠黏膜慢

性炎症可促进间质纤维化, 导致结肠长度缩短、重量增加、肠壁增厚。因此, 结肠长度和重量的变化可作为判断 UC 严重程度的依据。UC 小鼠结肠黏膜呈连续弥漫性活动性炎症的病理表现, 可通过观察病理变化评估 UC 严重程度。UC 的病理生理过程包

括不受控制的慢性系统性炎症反应, 肝脏指数和脾脏指数可用于评估小鼠系统性炎症水平。本研究结果显示 POHA 灌胃给药有效缓解了 DSS 诱导的小鼠结肠长度缩短、结肠黏膜破坏及局部炎症反应、肝脏肿大和脾脏肿大, 证明 POHA 具有抗 UC 作用。

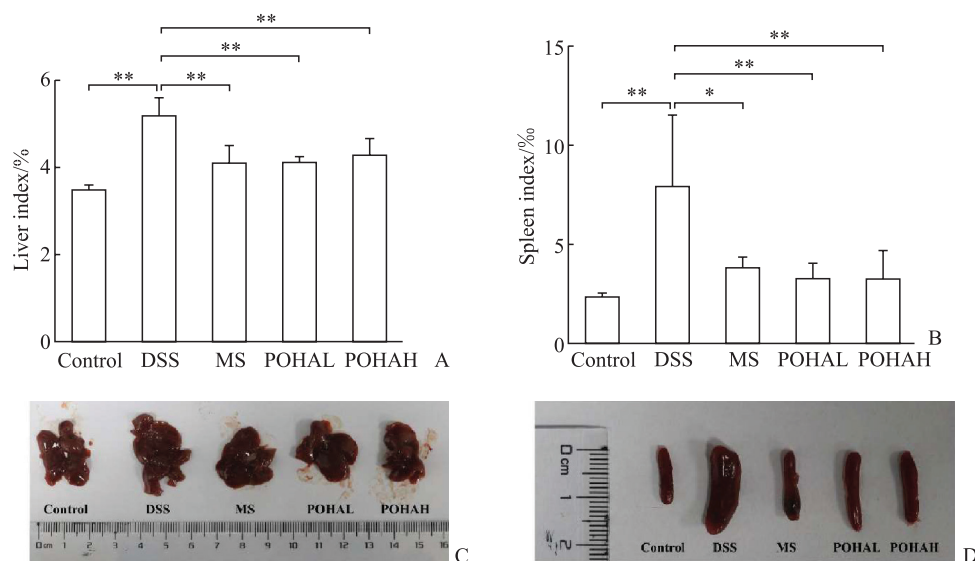


图 3 POHA 对 DSS 诱导的 UC 小鼠肝脏指数、脾脏指数、肝脏体积、脾脏体积的影响

Fig 3 Effects of POHA on liver index, spleen index, liver volume, and spleen volume in DSS-induced UC mice

A: Liver index (liver index=liver weight/body weight $\times$ 100%). B: Spleen index (spleen index=spleen weight/body weight $\times$ 1 000%). $n=10$, $\bar{x}\pm s$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$. C: Representative images of liver. D: Representative images of spleen. POHA: Hydroalcoholic extract of *Portulaca oleracea* L.; DSS: Dextran sulfate sodium; UC: Ulcerative colitis; MS: Mesalazine; POHAL: Low-dose (1 000 mg/kg) of POHA; POHAH: High-dose (2 000 mg/kg) of POHA.

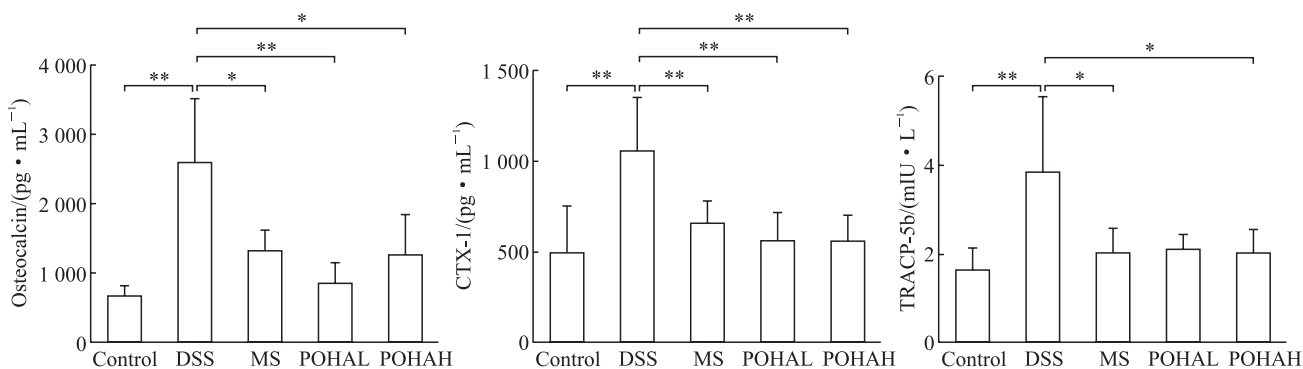


图 4 POHA 对 DSS 诱导的 UC 小鼠血清骨钙素、CTX-1、TRACP-5b 水平的影响

Fig 4 Effects of POHA on serum levels of osteocalcin, CTX-1, and TRACP-5b in DSS-induced UC mice

$n=10$, $\bar{x}\pm s$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$. POHA: Hydroalcoholic extract of *Portulaca oleracea* L.; DSS: Dextran sulfate sodium; UC: Ulcerative colitis; MS: Mesalazine; POHAL: Low-dose (1 000 mg/kg) of POHA; POHAH: High-dose (2 000 mg/kg) of POHA; CTX-1: C-terminal peptide of collagen type I; TRACP-5b: Tartrate-resistant acid phosphatase.

目前, UC 被认为是多种致病因素相互作用的共同结果, 主要包括环境、遗传、肠道微环境和免疫因素等, 其中肠道免疫系统紊乱所致肠黏膜持续性慢性炎症是其重要特征^[1]。研究证明, 马齿苋具

有抗炎、抗菌、免疫调节、胃肠保护及调节肠道菌群等多种药理活性^[5], 提示其可通过多种药理机制对 UC 发挥作用。

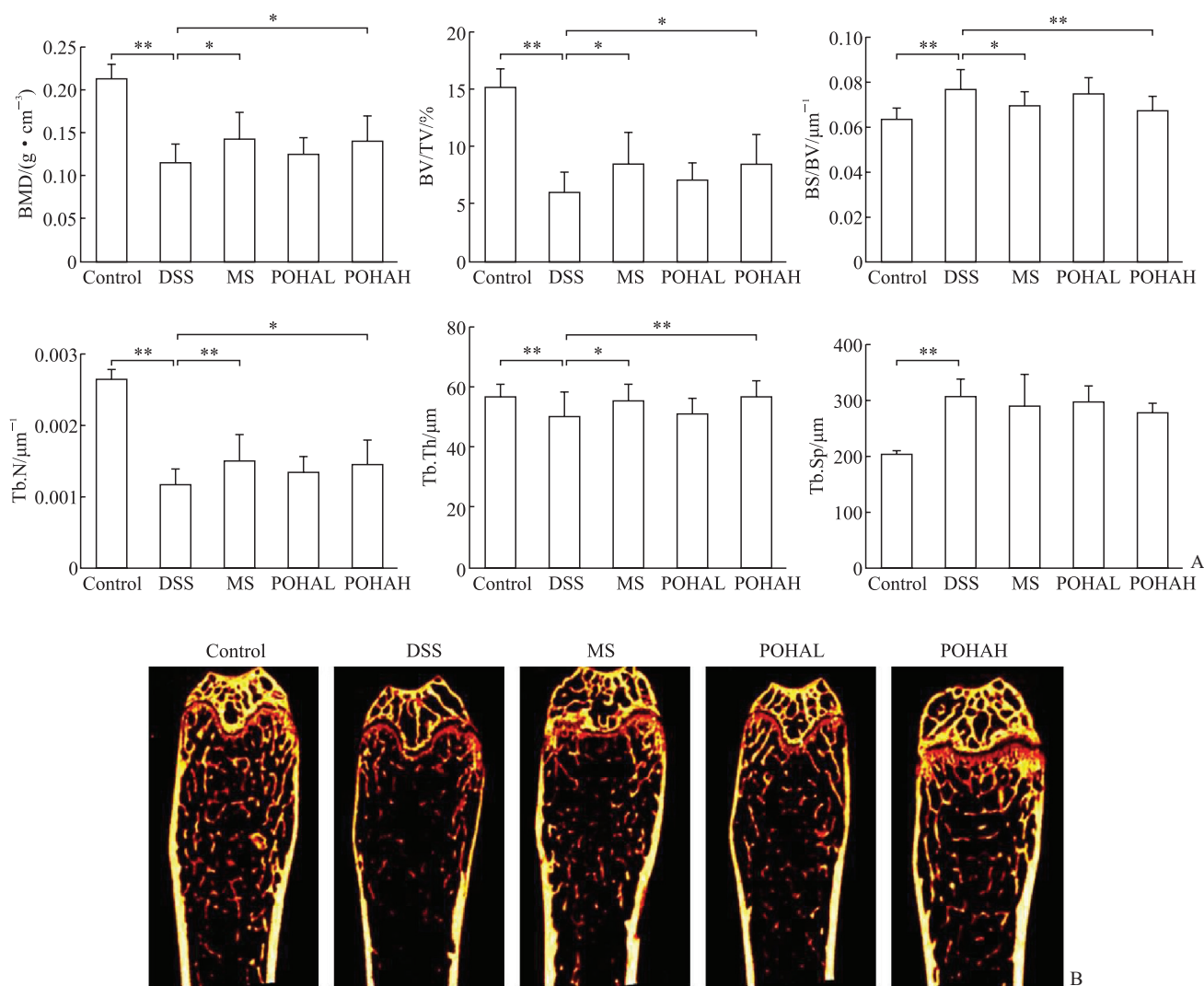


图 5 POHA 对 DSS 诱导的 UC 小鼠股骨骨量和骨微结构的影响

Fig 5 Effects of POHA on femoral mass and microstructure parameters in DSS-induced UC mice

A: Quantitative analysis of bone microstructure parameters. $n=10$, $x \pm s$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$. B: Representative micro-CT reconstruction images of femurs. POHA: Hydroalcoholic extract of *Portulaca oleracea* L.; DSS: Dextran sulfate sodium; UC: Ulcerative colitis; MS: Mesalazine; POHAL: Low-dose (1 000 mg/kg) of POHA; POHAH: High-dose (2 000 mg/kg) of POHA; BMD: Bone mineral density; BV/TV: Bone tissue volume to tissue volume ratio; BS/BV: Bone surface to bone volume ratio; Tb.N: Trabecular bone number; Tb.Th: Trabecular bone thickness; Tb.Sp: Trabecular bone separation.

与既往研究结果^[8]一致, 本研究结果显示 DSS 不仅有效诱发了小鼠 UC, 还引起了明显的股骨骨微结构的变化和骨量丢失。高剂量 POHA (2 000 mg/kg) 缓解了 DSS 诱导的骨量丢失及骨微结构破坏。研究发现, 马齿苋的部分植物化学成分如槲皮素^[11]和山奈酚^[12]具有抗骨丢失作用。此外, 马齿苋水提物在体内可抑制脂多糖诱导的骨丢失, 在体外可通过抑制蛋白激酶 B/糖原合成酶激酶 3 β -原癌基因 c-Fos-活化 T 细胞核因子 1 信号通路抑制破骨细胞发育和骨吸收能力^[13]。符芸华^[7]在马齿苋中提取出一种含有甘露糖的酸性杂多糖,

其于体外可通过调节核因子 E2 相关因子 2- Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 途径保护成骨细胞免受氧化损伤, 于斑马鱼胚胎体内可降低由 H₂O₂ 诱导的氧化应激水平。有研究基于网络药理学及分子对接的方法, 初步揭示了马齿苋抗骨质疏松症的分子机制与破骨细胞分化信号通路、甲状腺激素信号通路以及 Toll 样受体信号通路有关^[14]。然而, 尚无研究探索马齿苋干预 UC 相关骨丢失的作用机制。

早期研究认为, UC 相关骨丢失的病理生理机制与骨形成抑制相关^[15]。UC 小鼠骨髓炎症微环境可导致骨髓间充质干细胞的增殖能力降低, 成

骨分化受阻,成脂分化能力增强^[8]。此外,长期的炎症反应会破坏肠道黏膜屏障,进而影响维生素D等营养素的吸收和代谢,导致骨代谢失衡^[16]。结肠局部炎症释放的诸多细胞因子进入骨髓微环境,导致骨吸收增加,亦可能是骨丢失的原因之一^[17]。有研究发现DSS诱导的UC小鼠伴随有不同程度的骨丢失,且血清中TNF- α 是显著升高的细胞因子之一^[18]。早期研究指出,炎症相关细胞因子能刺激破骨细胞的形成,且破骨细胞及其前体对TNF- α 极为敏感,后者能够调节破骨细胞的分化及其功能^[19]。TNF- α 与核因子 κ B受体激活剂配体(receptor activator of nuclear factor κ B ligand, RANKL)共同作用在促进巨噬细胞向破骨细胞分化方面比单独使用RANKL更为有效^[20]。在RANKL存在的前提下,微量的TNF- α 即可启动巨噬细胞破骨分化,这一过程与骨髓中促破骨细胞因子的增加以及特定群体CD11b^{-lo}Ly6C^{hi}破骨细胞前体的分化有关^[18]。

骨钙素、CTX-1和TRACP-5b是骨代谢标志物,其血清含量可间接反映生物体内骨代谢情况。本研究中,DSS组血清骨钙素、CTX-1、TRACP-5b水平相较于对照组均上升,提示DSS同时提高了骨形成和骨吸收活性。然而,有研究通过钙黄绿素双标实验证明,相较于对照组,DSS诱导UC小鼠的骨形成活性受到抑制^[8]。一项临床研究发现,相较于对照样本,IBD患者血清中骨吸收指标I型胶原吡啶交联终肽含量增加,而骨形成指标I型胶原羧基末端前体肽以及骨钙素水平变化并无统计学意义^[21]。以上冲突的研究结果提示,在UC背景下血清骨代谢指标可能无法反映骨代谢的真实情况。另一种解释是,DSS直接诱发了亢进的骨吸收活动,后者可能继发性地激活了骨形成过程,导致血清中骨钙素水平的增加。高剂量POHA在有效缓解DSS诱导的骨微结构改变以及骨量丢失的同时降低了血清中骨代谢标志物水平,提示POHA可能通过抑制亢进的骨代谢活动发挥抗骨丢失作用。

现有治疗策略推荐使用MS等抗UC药物的同时加用双膦酸盐,以预防UC相关骨质疏松^[22]。Meta分析结果显示,双膦酸盐治疗能改善IBD患者的BMD且耐受性良好,并降低了椎骨骨折的发生风险^[23]。一项随机对照试验中,利塞膦酸盐治疗后IBD患者腰椎骨BMD仅增加了0.8%,与安慰剂组之间差异无统计学意义^[24]。同时,长期服

用双膦酸盐对发育中的骨骼以及育龄期妇女的潜在不良影响使得双膦酸盐在IBD中成为一种不太理想的治疗选择^[4]。另一项研究中,经过12个月阿仑膦酸盐治疗的UC患者腰椎BMD增加4.1%,差异有统计学意义,但获益似乎不足以抵消长期服用双膦酸盐对身体的损害^[25]。并且,以双膦酸盐代表的抗骨质疏松药物需要在合适的时机介入UC治疗,而骨质疏松发生的隐秘性常导致临床上无法判断加用双膦酸盐药物的时机。因此,抗UC药物联用抗骨丢失药物的治疗策略存在介入时间难把握、增加BMD效果不明显、长期服用存在不良反应等问题。本实验结果显示,马齿苋在发挥抗UC作用的同时,能够有效抵抗骨丢失。其多重治疗效应为UC患者预防继发性骨折提供了新的治疗选择。作为一种药食两用的中草药,马齿苋在人体内的安全性较高,未来有必要进一步验证其临床疗效。

[参考文献]

- [1] 中华中医药学会脾胃病分会. 溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识意见(2017)[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(8): 3585-3589.
- [2] SHETH T, PITCHUMONI C S, DAS K M. Musculoskeletal manifestations in inflammatory bowel disease: a revisit in search of immunopathophysiological mechanisms[J]. J Clin Gastroenterol, 2014, 48(4): 308-317. DOI: 10.1097/mcg.000000000000067.
- [3] BJARNASON I, MACPHERSON A, MACKINTOSH C, et al. Reduced bone density in patients with inflammatory bowel disease[J]. Gut, 1997, 40(2): 228-233. DOI: 10.1136/gut.40.2.228.
- [4] BERNSTEIN C N, TARGOWNIK L E, LESLIE W D. What is the role for bisphosphonates in IBD?[J]. Gut, 2014, 63(9): 1369-1370. DOI: 10.1136/gutjnl-2013-306141.
- [5] LI K, XIA T, JIANG Y, et al. A review on ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology and potential uses of *Portulaca oleracea* L.[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 319: 117211. DOI: 10.1016/j.jep.2023.117211.
- [6] 张云娥, 刘瑶. 白头翁汤加味配合柳氮磺吡啶肠溶片治疗溃疡性结肠炎38例[J]. 陕西中医, 2014, 35(1): 5-6. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7369.2014.01.002.
- [7] 符芸华. 马齿苋多糖抗骨质疏松作用机制的代谢组学研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2023. DOI: 10.26980/d.cnki.gcczc.2023.000660.
- [8] GUO J, WANG F, HU Y, et al. Exosome-based bone-targeting drug delivery alleviates impaired osteoblastic bone formation and bone loss in inflammatory bowel

- diseases[J]. *Cell Rep Med*, 2023, 4(1): 100881. DOI: 10.1016/j.xcrm.2022.100881.
- [9] ALAVALA S, SANGARAJU R, NALBAN N, et al. Stevioside, a diterpenoid glycoside, shows anti-inflammatory property against dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis in mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 855: 192-201. DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.05.015.
- [10] LI J, REN S, LI M, et al. Paoniflorin protects against dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice through inhibition of inflammation and eosinophil infiltration[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 97: 107667. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107667.
- [11] LIANG W, LUO Z, GE S, et al. Oral administration of quercetin inhibits bone loss in rat model of diabetic osteopenia[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 670(1): 317-324. DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.08.014.
- [12] SHARMA A R, NAM J S. Kaempferol stimulates WNT/ β -catenin signaling pathway to induce differentiation of osteoblasts[J]. *J Nutr Biochem*, 2019, 74: 108228. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2019.108228.
- [13] KIM J Y, OH H M, KWAK S C, et al. Purslane suppresses osteoclast differentiation and bone resorbing activity via inhibition of Akt/GSK3 β -c-Fos-NFATc1 signaling *in vitro* and prevents lipopolysaccharide-induced bone loss *in vivo*[J]. *Biol Pharm Bull*, 2015, 38(1): 66-74. DOI: 10.1248/bpb.b14-00567.
- [14] 买买提明·努尔买买提, 吉米丽汗·司马依, 古丽娜孜·肉孜, 等. 基于分子对接及网络药理学初探马齿苋抗骨质疏松症“多成分-多靶点”的分子机制[J]. *西北药学杂志*, 2021, 36(2): 206-214. DOI: 10.3969/j.issn.1004-2407.2021.02.008.
- [15] LIN C L, MONIZ C, CHAMBERS T J, et al. Colitis causes bone loss in rats through suppression of bone formation[J]. *Gastroenterology*, 1996, 111(5): 1263-1271. DOI: 10.1053/gast.1996.v111.pm8898640.
- [16] LESLIE W D, MILLER N, ROGALA L, et al. Vitamin D status and bone density in recently diagnosed inflammatory bowel disease: the Manitoba IBD Cohort Study[J]. *Am J Gastroenterol*, 2008, 103(6): 1451-1459. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2007.01753.x.
- [17] AGRAWAL M, ARORA S, LI J, et al. Bone, inflammation, and inflammatory bowel disease[J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2011, 9(4): 251-257. DOI: 10.1007/s11914-011-0077-9.
- [18] PEEK C T, FORD C A, EICHELBERGER K R, et al. Intestinal inflammation promotes MDL-1⁺ osteoclast precursor expansion to trigger osteoclastogenesis and bone loss[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2022, 14(4): 731-750. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2022.07.002.
- [19] WEI S, KITAURA H, ZHOU P, et al. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(2): 282-290. DOI: 10.1172/jci23394.
- [20] LAM J, TAKESHITA S, BARKER J E, et al. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand[J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(12): 1481-1488. DOI: 10.1172/jci11176.
- [21] SILVENNOINEN J, RISTELI L, KARTTUNEN T, et al. Increased degradation of type I collagen in patients with inflammatory bowel disease[J]. *Gut*, 1996, 38(2): 223-228. DOI: 10.1136/gut.38.2.223.
- [22] HUMPHREY M B, RUSSELL L, DANILA M I, et al. 2022 American College of Rheumatology guideline for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2023, 75(12): 2088-2102. DOI: 10.1002/art.42646.
- [23] MELEK J, SAKURABA A. Efficacy and safety of medical therapy for low bone mineral density in patients with inflammatory bowel disease: a meta-analysis and systematic review[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2014, 12(1): 32-44.e5. DOI: 10.1016/j.cgh.2013.08.024.
- [24] KRIEL M H, TOBIAS J H, CREED T J, et al. Use of risedronate to prevent bone loss following a single course of glucocorticoids: findings from a proof-of-concept study in inflammatory bowel disease[J]. *Osteoporos Int*, 2010, 21(3): 507-513. DOI: 10.1007/s00198-009-0960-8.
- [25] KITAZAKI S, MITSUYAMA K, MASUDA J, et al. Clinical trial: comparison of alendronate and alfacalcidol in glucocorticoid-associated osteoporosis in patients with ulcerative colitis[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2009, 29(4): 424-430. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2008.03899.x.

[本文编辑] 尹 茶