

4-辛基衣康酸通过激活Nrf2减轻DSS诱导的 溃疡性结肠炎

龚朵云¹ 胡凯² 范克瑞¹ 陈琨¹ 张力¹ 沈宜^{1,3*}

(¹重庆医科大学基础医学院, 病理生理学教研室, 重庆 400016; ²重庆医科大学基础医学院, 组织学与胚胎学教研室, 重庆 400016; ³重庆医科大学实验教学管理中心, 重庆 400016)

摘要 该文主要研究4-辛基衣康酸对葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)诱导的小鼠溃疡性结肠炎的保护效应。C57BL/6实验小鼠分为空白对照组、衣康酸药物对照组、DSS模型组和衣康酸+DSS干预组。每天观察小鼠体质量、便血情况、粪便性状。PAS染色和TUNEL染色观察小鼠肠黏液分泌和肠上皮细胞凋亡情况。Western blot检测核因子E2相关因子2(NF-E2-related factor 2, Nrf2)和醌氧化还原酶1(quinone oxidoreductase 1, NQO1)的表达。结果显示, 与DSS模型组相比, 衣康酸干预处理后, 小鼠的体质量降低、便血、粪便黏稠和结肠缩短等病理损伤情况明显改善; 肠黏膜分泌的黏液增多, 肠上皮细胞凋亡数量减少; 小鼠体内的抗氧化蛋白水平显著升高。从体质量下降、结肠缩短、疾病活动指数评分和肠黏膜损伤等方面进行评价, 证实4-辛基衣康酸可在DSS诱导的结肠炎中发挥保护效应, 其机制可能与Nrf2抗氧化通路上调有关。

关键词 溃疡性结肠炎; 衣康酸; 氧化应激

4-Octyl Itaconate Ameliorates Dextran Sodium Sulphate-Induced Ulcerative Colitis via Nrf2 Activation

GONG Duoyun¹, HU Kai², FAN Kerui¹, CHEN Kun¹, ZHANG Li¹, SHEN Yi^{1,3*}

(¹Department of Pathophysiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;
²Department of Histology and Embryology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;
³Experimental Teaching Management Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The aim of this study was to investigate the effect of 4-octyl itaconate on ulcerative colitis mice induced by DSS (dextran sulfate sodium). C57BL/6 mice were divided into control group, itaconate group, DSS-treated group and itaconate+DSS-treated group. Body mass, hematochezia, fecal characteristics of mice were daily observed. PAS and TUNEL staining were applied to detect the intestinal mucous secretion and cell apoptosis. The expression of Nrf2 (NF-E2-related factor 2) and NQO1 (quinone oxidoreductase 1) were analyzed by Western blot. Compared with DSS mice, the itaconate+DSS-treated group presented evident improvement on body mass loss, hematochezia, fecal characteristics, colon shortening and other pathological injuries; showing more mucus and decreased TUNEL positive cells; and the expression levels of antioxidant protein were significantly increased. The evaluation was based on body mass loss, colon shortening, DAI score and the intestinal mucosal injury. These

收稿日期: 2020-12-05 接受日期: 2021-03-18

国家自然科学基金(批准号: 81871606)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15608313439, E-mail: shenyicq@163.com

Received: December 5, 2020 Accepted: March 18, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81871606)

*Corresponding author. Tel: +86-15608313439, E-mail: shenyicq@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5530>

results demonstrate that 4-octyl itaconate possess positive effect on DSS-induced ulcerative colitis, and the mechanism may be related to the up-regulation of Nrf2 antioxidant pathway.

Keywords ulcerative colitis; itaconate; oxidative stress

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种病因不明的慢性肠道炎症疾病^[1], UC患者的主要临床表现包括腹痛、腹泻和体质量下降等, 其反复发作严重影响患者的生活和工作, 目前仍没有彻底治愈UC的方法^[2]。UC的发病机制与个体遗传易感性、氧化应激、肠道微生物菌群失调、肠黏膜免疫系统功能异常等多因素共同作用密切相关^[3]。其中, 氧化应激被认为是UC发生发展的重要机制之一。有研究发现, UC患者肠黏膜层中大量免疫细胞浸润, 这些免疫细胞与趋化因子以及肠道菌群相互作用产生活性氧(reactive oxygen species, ROS), 对细胞脂质、蛋白质和DNA造成氧化应激性损伤^[4]。研究表明, 氧化应激在UC的发展和恶化中起着关键作用, 调节细胞氧化还原状态的核因子E2相关因子2(NF-E2-related factor 2, Nrf2)是应对氧化应激的关键转录因子, 可诱导多种细胞保护基因的转录, 在许多炎症疾病的发生发展中起到保护作用^[5]。

衣康酸是一种不饱和羧酸^[6], 由三羧酸循环中的顺乌头酸脱羧生成^[7]。近年研究发现, 脂多糖刺激的RAW264.7巨噬细胞培养上清中衣康酸含量明显升高^[8]。衣康酸含有亲电的 α , β -羧酸, 可通过 α , β -羧酸与KEAP1半胱氨酸残基的巯基(-SH)结合, 发生迈克尔加成反应, 导致KEAP1从KEAP1/Nrf2恒定复合物中解离, 激活Nrf2及下游抗氧化蛋白发挥抗氧化及抗炎作用^[9]。

衣康酸衍生物4-辛基衣康酸(4-octyl itaconate, 4-OI)脂溶性强, 可以较好地被细胞吸收, 进入细胞后被酯解为衣康酸从而发挥作用^[9]。实验中通常使用4-OI代替衣康酸进行实验。已有研究发现, 衣康酸对急性呼吸窘迫综合征、系统性红斑狼疮、慢性肾病等疾病的炎症损伤有明显的抑制作用^[10-12]; 衣康酸对UC的作用及机制尚未见报道, 因此我们通过建立小鼠模型, 对UC的作用及机制进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

C57BL/6野生型健康雄性小鼠32只, 6~8周龄, 体质量20~22 g(购自陆军军医大学第三医院实验动

物中心)。动物实验经重庆医科大学伦理委员会审查批准通过。葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS), 分子量36~50 kDa, 购自美国MP Biomedicals公司; 4-辛基衣康酸购自美国Cayman Chemical公司; TUNEL细胞凋亡检测试剂盒购自瑞士Roche公司; 过碘酸希夫(periodic acid schiff, PAS)染色试剂盒和抗醌氧化还原酶1(quinine oxidoreductase 1, NQO1)兔单克隆抗体购自Abcam公司; 抗Actin鼠单克隆抗体购自北京四柏正生物科技有限公司; 抗Nrf2兔多克隆抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司; HRP标记山羊抗兔IgG抗体购自Cell Signaling Technology公司; HRP标记山羊抗小鼠IgG抗体购自北京博奥森生物技术有限公司; 二甲亚砜、RIPA裂解液、苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)和磷酸化蛋白酶复合抑制剂购自上海碧云天生物技术有限公司; Tris粉剂、氯化钠粉剂和SDS粉剂购自美国GENVIEW公司; 甘氨酸粉剂购自上海damas-beta公司; Tween 20购自德国BioFroxx公司; 超敏化学发光液购自美国advansta公司; BCA蛋白检测试剂盒购自赛默飞世尔科技有限公司; 硝酸纤维素膜购自北京颇尔有限公司; 电泳仪和化学发光图像分析仪购自Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 DSS诱导溃疡性结肠炎小鼠模型构建 C57BL/6小鼠被随机分为4组, 每组8只, 分别为: 空白对照组(Control)、衣康酸药物对照组(Itaconate)、DSS模型组(DSS)、衣康酸+DSS干预组(DSS+Itaconate)。空白对照组和药物组小鼠饮用纯净水9天; 模型组与干预组小鼠分别饮用3.5% DSS水溶液7天, 再更换饮用纯净水2天。药物对照组和干预组小鼠每天腹腔注射4-辛基衣康酸(102.5 mmol/L)共7天; 其他两组小鼠以同样方式腹腔注射对照溶剂。实验结束后, 小鼠被脱臼处死, 从盲肠至肛门处完整取出结肠并测量长度, 随后用0.9%的生理盐水将肠道清洗干净, 剪取1 cm左右长度的肠组织, 在4%多聚甲醛中固定24 h。剩下的组织于-80℃冻存。

1.2.2 疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分 根据小鼠每天的体质量下降百分比、粪便性

表1 DAI评分规则
Table 1 DAI scoring rules

| 评分 Scoring | 体质量下降百分比 Percentage of body mass | 粪便性状 Fecal characteristics | 粪便出血 Fecal bleeding |
|---------------|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 0 | 0 | Normal | Negative |
| 1 | 1%-5% | Soft but still formed | Occult blood positive |
| 2 | 6%-10% | Soft | Slightly bloody stool |
| 3 | 11%-15% | Very soft | Blood traces in stool visible |
| 4 | >15% | Watery diarrhea | Severe bleeding |

状和粪便隐血情况评分, 将三项评分总和的平均值作为小鼠的疾病活动指数。DAI评分规则^[13]如表1所示。

1.2.3 肠组织镜下结构观察 将多聚甲醛固定的结肠组织通过70%、80%、95%、100%浓度乙醇依次脱水, 再浸入二甲苯溶液中透明30 min, 随后将组织放入蜡块中包埋。然后切取4 μm 左右的组织薄片, 用苏木精-伊红(HE)染色, 脱水后封片, 在光学显微镜下观察染色结果。

1.2.4 过碘酸希夫(PAS)糖原染色 将小鼠肠组织石蜡切片放入二甲苯溶液中脱蜡1 h, 脱蜡完全后依次在浓度为100%、90%、80%、70%的乙醇溶液中水化, 用蒸馏水冲洗后擦干水渍。按照说明书步骤, 先滴加适量高碘酸溶液室温放置5 min, 使糖类中的羟基氧化为醛基, 蒸馏水冲洗2 min, 用滤纸吸干组织周围水分。再滴加Schiff溶液室温孵育15 min, 这一步使醛基反应呈紫红色, 随后流水冲洗2 min。加入苏木精染液室温复染, 流水冲洗2 min。再滴加蓝化液室温反应30 s, 用流水迅速冲洗干净。最后滴加Light Green染液室温反应2 min, 蒸馏水冲洗干净。再依次放入分级乙醇溶液中脱水, 二甲苯溶液透明, 中性树胶封片。在显微镜下观察PAS染色, 黏多糖染色后呈现红色。

1.2.5 TUNEL染色 将小鼠肠组织切片放入二甲苯溶液中脱蜡1 h。彻底脱蜡后依次在浓度为100%、90%、80%、70%的乙醇溶液中水化, 自来水冲洗。滴加蛋白酶K溶液室温孵育30 min, PBS清洗5 min, 重复3次。滴加1% Triton-X-100的枸橼酸钠溶液, 以增加细胞膜的通透性, 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应4 min后, PBS清洗5 min。加入3%过氧化氢甲醇溶液室温放置20 min, 再次用PBS洗涤5 min, 重复3次。使用TUNEL检测试剂盒, 按照说明书, 先滴加TUNEL反应液2 μL (A液:B液为1:9)覆盖组织, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育60 min, 然后PBS

清洗5 min, 重复3次。再加入20 μL POD溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min, 最后滴入DAB工作液(1 mL DAB底物液加入1滴DAB浓缩液, 混合均匀), 显色后用自来水充分水洗终止反应。苏木精复染, 切片烘干后逐级乙醇脱水, 中性树胶封片。在显微镜下观察染色结果, TUNEL阳性细胞被染为深褐色, 根据TUNEL阳性细胞比例可量化为凋亡指数^[14]。

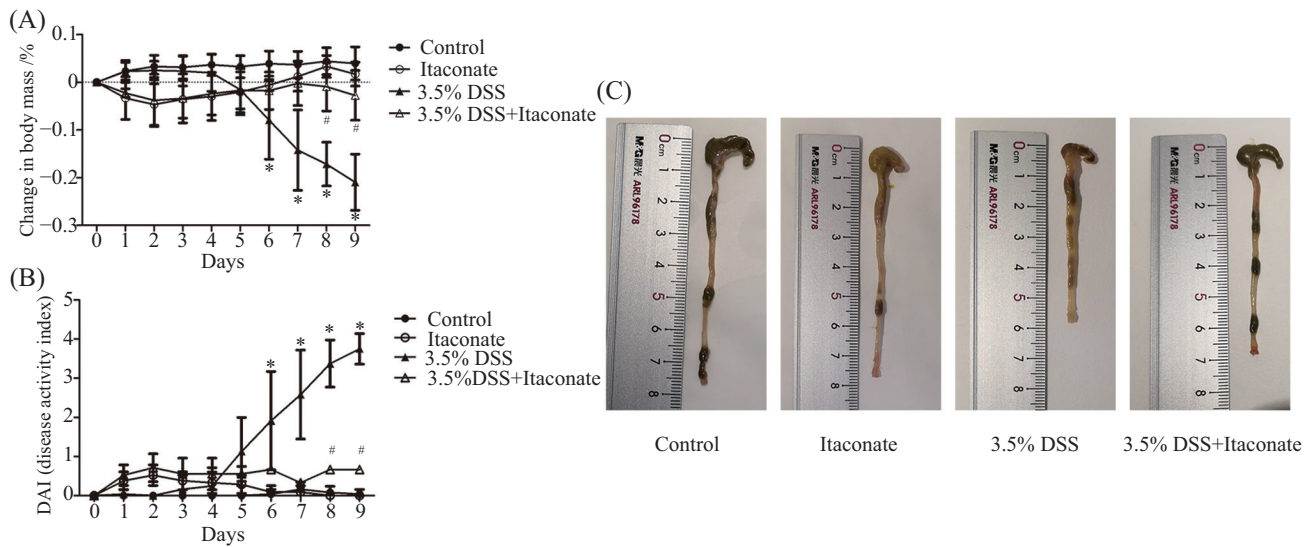
1.2.6 Western blot 加入RIPA裂解液、PMSF和磷酸化蛋白酶抑制剂进行肠组织匀浆, 离心速度为10 000 r/min, 低温离心后吸取上清液根据BCA说明书测定蛋白浓度, 确定上样体积。先通过电泳分离蛋白, 再通过电转将蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 随后用脱脂奶粉室温封闭条带2 h。分别加入Nrf2抗体(1:1 000)和NQO1抗体(1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。TBST洗涤, 加入由HRP标记的山羊抗兔IgG抗体(1:2 000)和山羊抗鼠IgG抗体(1:2 000), 室温孵育2 h, 然后用TBST洗膜, 滴加发光显影试剂, 显影分析。利用Image Lab软件检测蛋白灰度值, 蛋白相对定量水平=目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值。

1.2.7 统计学分析 采用GraphPad Prism 5软件进行统计学处理, 数据用平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 采用单因素方差和独立样本 t 检验分析数据。 $P<0.05$ 表示有显著差异, 具有统计学意义。

2 结果

2.1 4-OI对DSS诱导结肠炎小鼠症状的影响

在衣康酸药物对照组中, 注射衣康酸前期小鼠体质量稍有下降, 后期小鼠体质量逐渐恢复; 在实验过程中, DSS处理组小鼠出现活动度降低、毛发紊乱等表现, 并随着实验时间推移, 小鼠的体质量发生明显下降; 在衣康酸的干预作用下DSS处理小鼠的体质量由前期下降逐步转为后期平稳上升, 最终体质量下降的幅度较低(图1A)($P<0.05$)。实验过程中



A: 以初始体质量为基准, 计算各组小鼠的体质量下降百分比; B: 计算各组小鼠DAI评分; C: 小鼠结肠长度比较。* $P < 0.05$, 与Control组相比; # $P < 0.05$, 与DSS模型组相比。

A: the percentage of body mass loss was calculated based on initial body mass of mice; B: the DAI scoring of mice was calculated; C: comparison of colon lengths, * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs DSS-treated group.

图1 衣康酸对DSS诱导的小鼠结肠炎的影响

Fig.1 Effect of itaconate on DSS-induced colitis mice

DSS处理组小鼠逐渐出现腹泻和便血; 衣康酸干预后小鼠腹泻和便血情况得到改善, DAI评分明显低于DSS组(图1B)($P < 0.05$)。比较各组小鼠结肠长度, DSS处理组小鼠结肠变细, 缩短明显; 在衣康酸干预后, DSS处理小鼠结肠缩短程度降低(图1C)。以上结果表明, 衣康酸可以显著改善DSS诱导的结肠炎。

2.2 4-OI对DSS诱导结肠炎小鼠结肠组织形态的影响

苏木素-伊红染色结果见图2, 可见对照组小鼠肠道结构完整, 无明显炎性细胞浸润, 隐窝排列紧密, 结构形状完好; DSS处理组小鼠肠壁增厚, 肠黏膜下层水肿, 隐窝结构消失, 炎性细胞浸润, 符合结肠炎的病理组织学特征。DSS处理小鼠经衣康酸干预后肠道结构改善, 炎性细胞数量减少, 可见清晰的隐窝结构。说明衣康酸对DSS诱导结肠炎小鼠的结肠组织具有保护效应。

2.3 4-OI对DSS诱导结肠炎小鼠肠黏膜功能的影响

在PAS染色的肠组织中, 对照组小鼠肠腔中由杯状细胞分泌的黏多糖着色为红色, 含量丰富且分布均匀; DSS处理小鼠肠道中黏多糖含量减少; 相比之下, DSS处理小鼠经衣康酸干预后肠腔内黏多糖着色显著增多(图3)。PAS染色证实, 衣康酸对DSS诱导结肠炎小鼠肠黏膜黏液的分泌具有显著的改善作用。

2.4 4-OI对DSS诱导结肠炎小鼠肠上皮凋亡的影响

在TUNEL染色结果(图4A)中, 观察结肠组织上皮细胞的凋亡情况。对照组小鼠中存在少量的生理性凋亡细胞; DSS处理组小鼠肠上皮中, TUNEL阳性细胞数显著增加, 在肠黏膜固有层和黏膜下层均有分布; DSS小鼠经衣康酸干预后TUNEL阳性细胞明显减少(图4B)($P < 0.05$)。表明衣康酸可以减少DSS诱导的结肠炎小鼠中肠上皮细胞的凋亡。

2.5 4-OI对DSS诱导结肠炎小鼠肠黏膜中抗氧化蛋白表达的影响

Nrf2和NQO1是抗氧化通路的关键蛋白。Western blot结果(图5A)显示, 与对照组相比, DSS处理组小鼠结肠组织中Nrf2和NQO1表达降低; 与DSS组相比, DSS处理小鼠经衣康酸干预后, Nrf2和NQO1的含量显著增加(图5B)($P < 0.05$)。这些数据表明, 衣康酸可能通过激活抗氧化蛋白在DSS诱导的小鼠UC中发挥保护作用。

3 讨论

UC是一种以慢性炎症为特征的消化道疾病, 反复发作影响患者身心健康, 甚至可能转变为结直肠癌^[15]。虽然目前临床治疗药物主要包括皮质类固醇、氨基水杨酸酯、抗生素和免疫抑制剂等, 但仍需要一种安全、耐受性好、能长期缓解疾病的治疗方法。

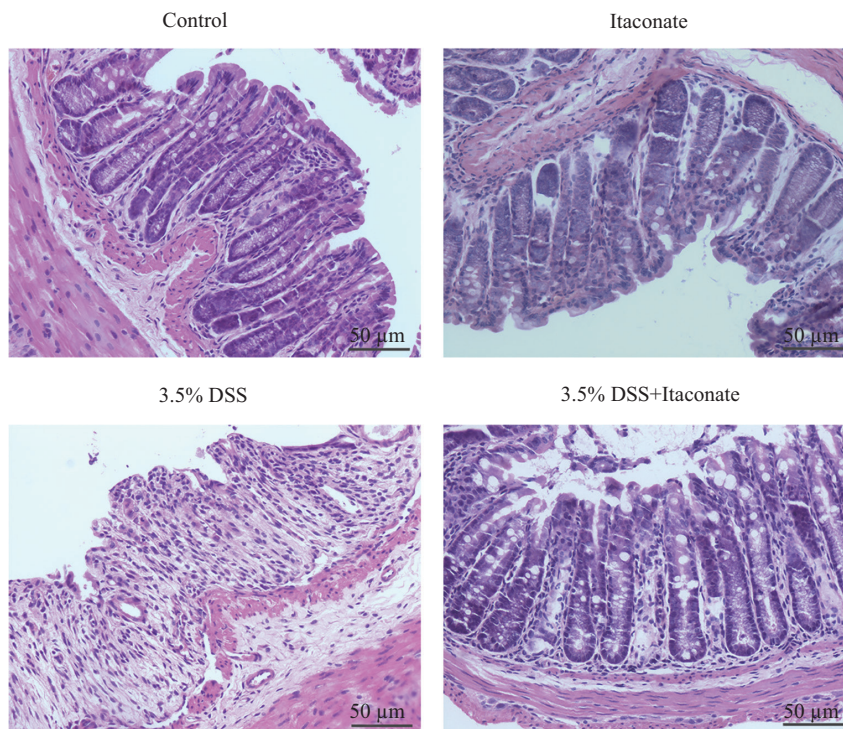


图2 衣康酸对DSS处理小鼠结肠组织病理学的影响
 Fig.2 Effect of itaconate on colonic histopathology in DSS-induced colitis mice

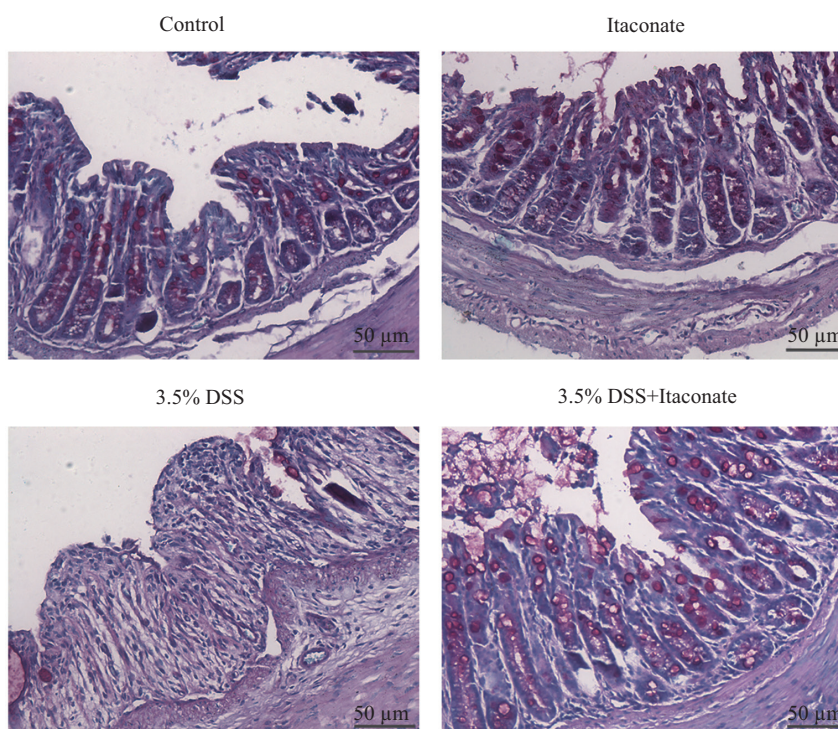
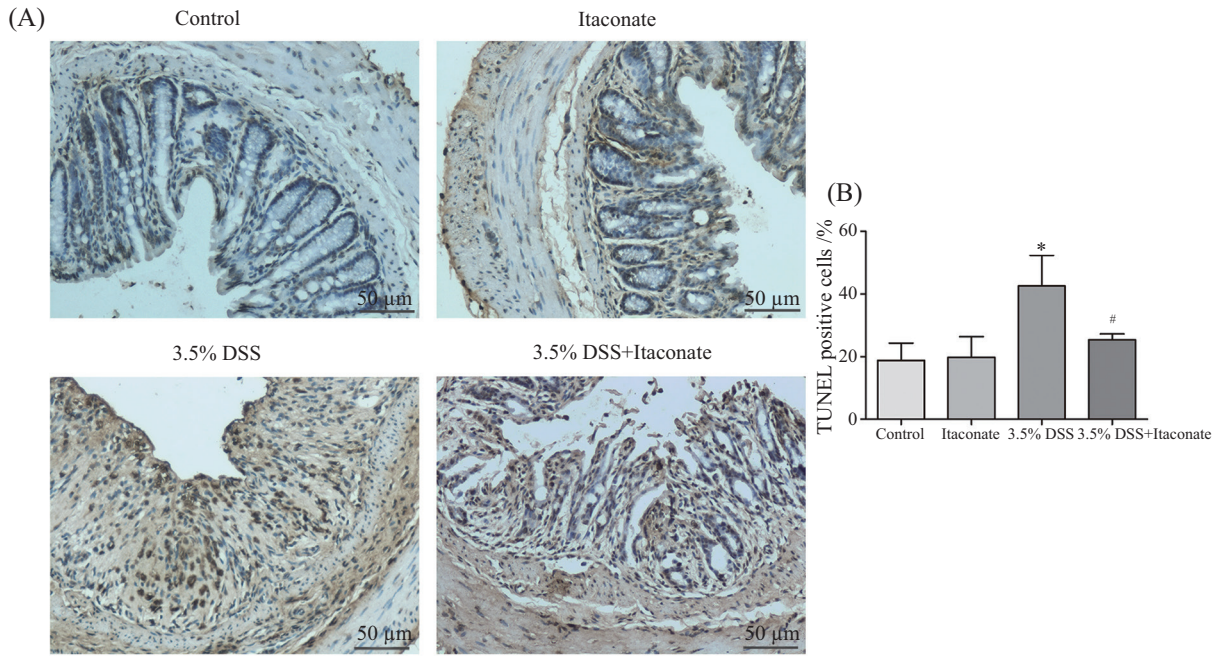


图3 衣康酸对DSS处理小鼠肠黏液的影响
 Fig.3 Effect of itaconate on intestinal mucus in DSS-induced colitis mice

DSS是一种水溶性、带负电荷的硫酸化多糖。有研究认为, DSS可激活肠道巨噬细胞, 使溶酶体酶释放并作用于结肠上皮细胞, 从而破坏肠黏膜。也有研

究指出, DSS进入肠上皮后可与肠道内的中链脂肪酸结合, 形成囊泡进入胞质, 通过三磷酸肌醇-二酰甘油途径使紧密连接蛋白重新分布, 造成肠黏膜损

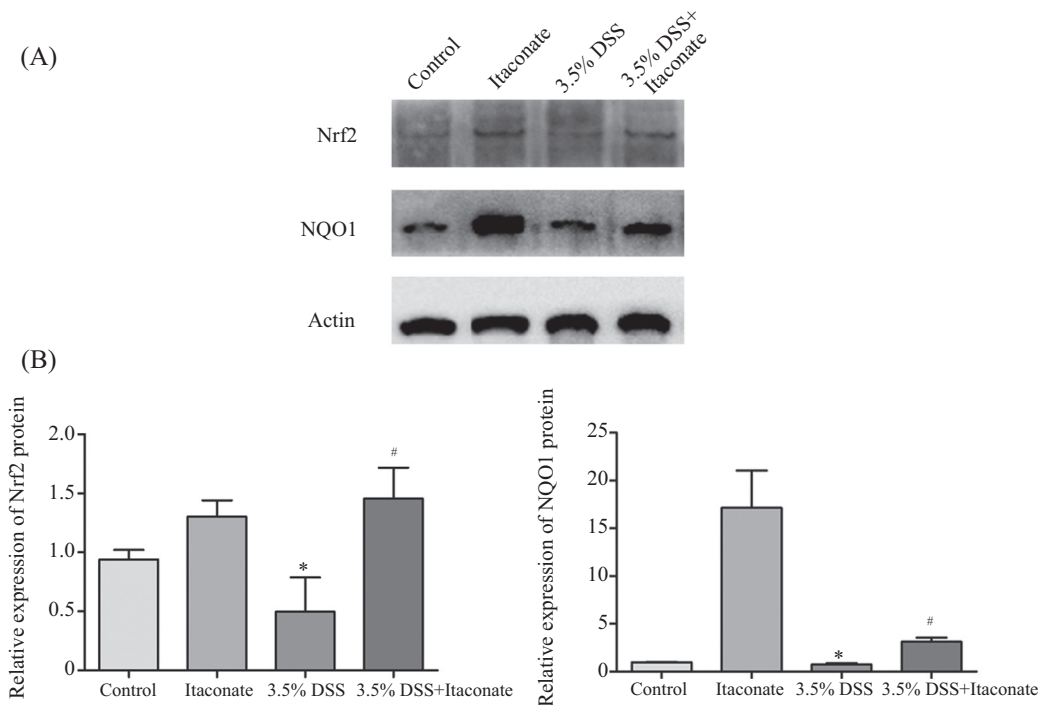


A: 各组小鼠结肠组织TUNEL染色显微镜代表图片; B: 肠上皮细胞凋亡指数。* $P < 0.05$, 与Control组相比, # $P < 0.05$, 与DSS模型组相比。

A: representative TUNEL-stained intestinal sections in each group; B: the apoptotic index of intestinal epithelial cell. * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs DSS-treated group.

图4 衣康酸对DSS处理小鼠肠上皮细胞凋亡的影响

Fig.4 Effect of itaconate on apoptosis of intestinal epithelial in DSS-induced colitis mice



A: Western blot检测肠组织中Nrf2和NQO1蛋白含量; B: Nrf2和NQO1蛋白的相对定量表达, * $P < 0.05$, 与Control组相比, # $P < 0.05$, 与DSS模型组相比。

A: the expression of Nrf2 and NQO1 protein were measured by Western blot; B: relative expression of Nrf2 and NQO1 protein, * $P < 0.05$ vs Control group, # $P < 0.05$ vs DSS-treated group.

图5 衣康酸对结肠炎小鼠肠组织中Nrf2和NQO1蛋白表达的影响

Fig.5 Effect of itaconate on the expression of Nrf2 and NQO1 protein in intestinal tissues of DSS-induced colitis mice

伤^[16]。DSS诱导的UC模型是目前大家公认的经典结肠炎实验研究模型,其诱导的结肠炎病理改变和症状与临床UC患者十分相似^[17]。

衣康酸是巨噬细胞内的代谢产物,它连接了细胞代谢、氧化应激和免疫反应,通过多种机制发挥其抗炎作用^[18]。其机制主要是衣康酸通过迈克尔加成反应与Nrf2通路中Kelch样ECH-相关蛋白1(Kelch-like ECH-associated protein 1, KEAP1)的半胱氨酸残基结合。正常情况下,KEAP1是Nrf2的抑制因子,可将Nrf2与Cul3-E3泛素连接酶复合物结合,使Nrf2泛素化并被降解。衣康酸使Nrf2从KEAP1/Nrf2复合物中解离,转位进入胞核并激活下游抗氧化蛋白发挥抗炎效应^[9]。

在我们的实验中,DSS模型组小鼠出现体质量减轻、粪便黏稠以及便血等表现;在组织形态上,DSS组小鼠结肠整体萎缩、结肠长度缩短、肠道内出现水样粪便;镜下观察到肠组织黏膜下层水肿、黏膜层隐窝丢失以及大量炎性细胞浸润,出现典型结肠炎表现和病理改变。DSS组小鼠经衣康酸干预后,小鼠疾病症状减轻,体质量恢复、腹泻和便血情况有所缓解,DAI评分降低,结肠长度缩短减少;镜下观察发现,肠组织结构相对完整、炎性细胞浸润减少。上述结果表明,衣康酸能减轻DSS诱导的结肠炎。

肠黏液的正常分泌是保障肠黏膜完整的重要基础^[19]。其中由杯状细胞合成并分泌的高分子糖蛋白黏液层能保护肠黏膜免受病原微生物和毒素的侵袭^[20]。在DSS诱导的UC中,结肠黏液层发生改变,黏液凝胶厚度减少^[21],导致细菌与肠上皮组织接触,细菌和趋化因子等大分子物质进一步渗透,从而刺激黏膜中水分和电解质的分泌,引起腹泻的发生^[22]。在黏液层减少的情况下,肠上皮细胞受到细菌毒素的入侵,并在多种死亡程序的共同作用下加速凋亡^[23]。在我们的研究中观察到DSS诱导结肠炎小鼠肠组织中PAS着色的黏多糖减少,肠上皮TUNEL阳性细胞增多。DSS处理小鼠经衣康酸干预后,小鼠肠组织中PAS着色的黏多糖增加,肠上皮TUNEL阳性细胞减少,说明小鼠肠黏液含量增多,肠上皮细胞凋亡减少。上述结果进一步证实,衣康酸可减轻DSS诱导的UC小鼠的肠黏膜损伤。

肠道内氧化应激失调是UC的主要致病机制之一,Nrf2是抗氧化的关键转录因子,可激活NQO1等

多种抗氧化酶的表达^[24]。研究发现,衣康酸可通过激活Nrf2使抗氧化酶表达增多,抑制肺部炎症损伤以及肾脏纤维化发展^[10,13]。在我们的实验中,DSS处理小鼠经衣康酸干预后肠组织中Nrf2蛋白显著上调,其下游的抗氧化酶NQO1表达增加。NQO1能催化醌和多种化合物还原,并阻止醌单电子体还原为氧自由基及ROS^[25]。因而,衣康酸可能通过激活Nrf2和NQO1蛋白减轻肠黏膜层中的氧化应激,从而缓解DSS诱导UC小鼠中的肠黏膜损伤。

综上所述,我们的研究表明衣康酸对DSS诱导的小鼠结肠炎具有显著的保护作用。其机制可能与衣康酸激活Nrf2抗氧化通路,减轻DSS诱导的氧化应激有关,提示衣康酸可能在UC的防治中具有潜在价值。然而,结肠炎发生发展过程中有无衣康酸代谢异常、衣康酸与结肠炎临床样本间有无关联性 etc 还需进一步的研究。

参考文献 (References)

- [1] ZHANG Y Z, LI Y Y. Inflammatory bowel disease: pathogenesis [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(1): 91-9.
- [2] SHEN B. Step-up vs top-down therapy for Crohn's disease: medicine vs surgery [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(12): 693-5.
- [3] KUGATHASAN S, FIOCCHI C. Progress in basic inflammatory bowel disease research [J]. *Semin Pediatr Surg*, 2007, 16(3): 146-53.
- [4] ZHU H, LI Y R. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2012, 237(5): 474-80.
- [5] HAYES J D, DINKOVA-KOSTOVA A T. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism [J]. *Trends Biochem Sci*, 2014, 39(4): 199-218.
- [6] HOOFTMAN A, O'NEILL L A J. The immunomodulatory potential of the metabolite itaconate [J]. *Trends Immunol*, 2019, 40(8): 687-98.
- [7] MICHELUCCI A, CORDES T, GHELFI J, et al. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(19): 7820-5.
- [8] STRELKO C L, LU W, DUFORT F J, et al. Itaconic acid is a mammalian metabolite induced during macrophage activation [J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(41): 16386-9.
- [9] MILLS E L, RYAN D G, PRAG H A, et al. Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1 [J]. *Nature*, 2018, 556(7699): 113-7.
- [10] OLAGNIER D, FARAHANI E, THYRSTED J, et al. SARS-CoV2-mediated suppression of NRF2-signaling reveals potent antiviral and anti-inflammatory activity of 4-octyl-itaconate and dimethyl fumarate [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4938.
- [11] TANG C, WANG X H, XIE Y Y, et al. 4-Octyl itaconate activates

- Nrf2 signaling to inhibit pro-inflammatory cytokine production in peripheral blood mononuclear cells of systemic lupus erythematosus patients [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(2): 979-90.
- [12] TIAN F, WANG Z, HE J, et al. 4-Octyl itaconate protects against renal fibrosis via inhibiting TGF- β /Smad pathway, autophagy and reducing generation of reactive oxygen species [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 873: 172989.
- [13] WIRTZ S, POPP V, KINDERMANN M, et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation [J]. *Nat Protoc*, 2017, 12(7): 1295-309.
- [14] WU X, REN J, CHEN G, et al. Systemic blockade of P2X7 receptor protects against sepsis-induced intestinal barrier disruption [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4364.
- [15] PANDURANGAN A K, ESA N M. Signal transducer and activator of transcription 3-a promising target in colitis-associated cancer [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(2): 551-60.
- [16] LAROUH H, INGERSOLL S A, LIU H C, et al. Dextran sodium sulfate (dss) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e32084.
- [17] RANDHAWA P K, SINGH K, SINGH N, et al. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2014, 18(4): 279-88.
- [18] O'NEILL L A J, ARTYOMOV M N. Itaconate: the poster child of metabolic reprogramming in macrophage function [J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19(5): 273-81.
- [19] SODERHOLM A T, PEDICORD V A. Intestinal epithelial cells: at the interface of the microbiota and mucosal immunity [J]. *Immunology*, 2019, 158(4): 267-80.
- [20] JOHANSSON M E V, SJÖVALL H, HANSSON G C. The gastrointestinal mucus system in health and disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10(6): 352-61.
- [21] PETERSSON J, SCHREIBER O, HANSSON G C, et al. Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011, 300(2): 327-33.
- [22] BINDER H J. Mechanisms of diarrhea in inflammatory bowel diseases [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1165(2): 285-93.
- [23] PATANKAR J V, BECKER C. Cell death in the gut epithelium and implications for chronic inflammation [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(9): 543-56.
- [24] NITURE S K, KHATRI R, JAISWAL A K. Regulation of Nrf2-an update [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 1(66): 36-44.
- [25] LEWIS A M, OUGH M, HINKHOUSE M M, et al. Targeting NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) in pancreatic cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2017, 56(7): 1825-34.