

# 湿生扁蕾总口山酮对NCM460细胞间质转化的影响

柳娜 刘越敏 薄双琴 陈晖 张尚智 景明\*

(甘肃中医药大学, 兰州 730000)

**摘要** 该研究探究了湿生扁蕾总口山酮对人结肠上皮细胞(normal colon mucosa cell, NCM460)间质转化的影响。采用2.5 μg/mL脂多糖(LPS)诱导NCM460细胞14天建立间质转化模型, 分别以湿生扁蕾总口山酮(GPX)及吡菲尼酮(PFD)进行干预, 以免疫荧光(IF)和蛋白免疫印迹技术(WB)以及实时荧光定量转录聚合酶链反应(RT-qPCR)分别检测E-cadherin和Vimentin蛋白和mRNA的表达。结果显示, 与正常对照组相比, 模型对照组细胞中上皮细胞标志物E-cadherin蛋白和mRNA表达明显下调( $P<0.01$ ), 间质细胞标志物Vimentin蛋白和mRNA表达明显上调( $P<0.01$ ), 与模型组相比, E-cadherin的荧光强度与GPX剂量呈正相关, Vimentin荧光强度呈剂量依赖性降低。GPX中、高剂量组E-cadherin蛋白和mRNA表达上调, Vimentin蛋白和mRNA表达下调( $P<0.01$ ), 以高剂量最为明显。研究表明, 湿生扁蕾总口山酮能够有效抑制结肠上皮-间质转化, 这为其进一步研究开发提供理论依据。

**关键词** 湿生扁蕾总口山酮; 溃疡性结肠炎; 结肠上皮-间质转化

## Effect of Xanthonenes from *Gentianopsispaludosa* on Mesenchymal Transformation of NCM460 Cells

LIU Na, LIU Yuemin, BO Shuangqin, CHEN Hui, ZHANG Shangzhi, JING Ming\*

(Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

**Abstract** This study investigated the effects of Xanthonenes from *Gentianopsispaludosa* on human NCM460 (normal colon mucosa cell) interstitial conversion. NCM460 cells were induced with 2.5 μg/mL LPS (lipopolysaccharide) for 14 d to establish interstitial transformation model, and were treated with GPX and PFD respectively. The expression of E-cadherin and Vimentin protein and mRNA were detected by IF (immunofluorescence), WB (Western blot) and RT-qPCR (real-time fluorescence quantitative transcription polymerase chain reaction), respectively. The results showed that compared with normal control group, the epithelial cell marker E-cadherin protein and mRNA in model control group were significantly down-regulated ( $P<0.01$ ), interstitial cell marker Vimentin protein and mRNA were significantly up-regulated ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the fluorescence intensity of E-cadherin was positively correlated with the dose of GPX, while the fluorescence intensity of Vimentin was decreased in a dose-dependent manner. The expression of E-cadherin protein and mRNA was up-regulated and that of Vimentin protein and mRNA was down-regulated in GPX medium and high dose groups ( $P<0.01$ ), most obvious in high dose. The study showed that Xanthonenes from *Gentianopsispaludosa* could effectively inhibit colon EMT (epithelial-mesenchymal transformation), which provided theoretical basis for further research and development.

**Keywords** Xanthonenes from *Gentianopsispaludosa*; ulcerative colitis; colon epithelial-mesenchymal transformation

收稿日期: 2022-05-20

接受日期: 2022-07-25

国家自然科学基金(批准号: 81860788、82160854)和兰州市人才创新创业项目(批准号: 2019-RC-1017)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13919026589, E-mail: 1339512509@qq.com

Received: May 20, 2022

Accepted: July 25, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81860788, 82160854) and Lanzhou Talent Innovation and Entrepreneurship Project (Grant No.2019-RC-1017)

\*Corresponding author. Tel: +86-13919026589, E-mail: 1339512509@qq.com

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种由免疫介导的、特发性的、慢性的、反复发作的炎症性肠道疾病(inflammatory bowel disease, IBD)<sup>[1-2]</sup>。其临床特征为腹泻、常伴有黏膜脓液的直肠出血、腹部绞痛、发烧和直肠急症<sup>[3]</sup>,在世界范围内发病率不断上升且无特异性根治措施,已被世界卫生组织(World Health Organization, WHO)列为难治病之一<sup>[4]</sup>。肠道纤维化是UC最为常见的并发症之一,通常是由肠道炎症和受损组织修复引起的,是一种慢性、进行性过程。其特征是胶原蛋白和其他细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分的过度累积以及伴随着各种来源间质细胞(mesenchymal cell)数量的局部增加。UC及并发症结肠纤维化的发病机制是多因素的,可能与遗传易感性、上皮细胞缺陷、免疫反应失调、环境因素、高龄、腹部胃肠手术以及改变有益菌和致病菌之间的平衡等有关,但具体机理仍不清楚<sup>[5-7]</sup>。研究表明,在UC肠纤维化过程中,结肠上皮细胞-间质化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)发挥了至关重要的作用<sup>[8-9]</sup>。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性菌外膜的主要组成成分,大多数细菌的LPS被证实是一种内毒素<sup>[10]</sup>。有研究表明,LPS在上皮-间质转化的发生发展中是一个关键因素,它可以诱导EMT,并在一些组织和器官中产生细胞外基质,是上皮细胞有效的EMT诱导剂<sup>[10-14]</sup>。

湿生扁蕾 [*Gentianopsis paludosa* (Hook. f.) Ma],为龙胆科扁蕾属一年生草本植物,传统藏药,以全草入药,具有利肝、清热、解毒之功效,主治结膜炎、高血压、痔疮、肝炎、肾炎、消化不良、发烧、流感和腹泻等症<sup>[15]</sup>。吡酮(Xanthone)又名咕吨酮、氧杂蒽酮或苯并色原酮,是一类酚性化合物,具有多样的生物活性<sup>[16-18]</sup>。本课题组前期多项研究表明,该味药材在溃疡性结肠炎、肠纤维化的疾病中作用显著,而吡酮类化合物可能是其主要的有效成分<sup>[15,19-26]</sup>。本研究拟在前期研究工作基础上,通过提取纯化工艺获得湿生扁蕾总口山酮,并建立结肠上皮细胞-间质转化模型,探究湿生扁蕾总口山酮能否抑制细胞EMT的发生发展,为其进一步研究开发提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂

吡非尼酮(pifenidone, S290702)购于美国Selleck公司;RPMI-1640培养基(AF32246309)、PBS(AF29526788)

购于美国HyClone公司;脂多糖(LPS, 408Z033)购于北京索莱宝科技有限公司;Anti-E-cadherin抗体(40860)购于美国SouthernBiotech公司;Vimentin抗体(GTX43173)购于美国GeneTex公司;TRIeasy<sup>TM</sup>总RNA提取试剂(10606ES60)、Hifair<sup>®</sup> II 1st Strand cDNA Synthesis Super-Mix for qPCR(11123ES60)、Hieff<sup>®</sup> qPCR SYBR Green Master Mix(11203ES08)、CCK-8(cell counting kit-8, C1905401)、胎牛血清(FBS, 504050519)购于翌圣生物科技(上海)股份有限公司。

### 1.2 湿生扁蕾总口山酮的制备

湿生扁蕾药材采自甘肃省定西市漳县大草滩,经甘肃中医药大学定西校区中药鉴定教研室张尚智教授鉴定为龙胆科扁蕾属一年生草本植物湿生扁蕾,取其干燥全草,粉碎过筛,称取药末500 g,加8倍量的95%乙醇浸泡过夜,加热回流提取2 h,放冷后过滤,药渣再加8倍量的95%乙醇加热回流提取2 h,放冷后过滤。合并两次滤液,再经减压回收乙醇后浓缩为生药浓度1.5 g/mL浸膏。浸膏加入适量去离子水制备成混悬液,分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇逐级萃取,并将各级性部位减压浓缩为浸膏。将乙酸乙酯部位浸膏上DM130大孔树脂纯化,得到纯度为 $\geq 51\%$ 的湿生扁蕾吡酮粉末,密封,低温保存,备用<sup>[27]</sup>。

### 1.3 NCM460细胞培养及EMT模型建立

NCM460细胞系购自北京北纳创联生物技术有限公司。在DMEM高糖培养基中加入10% FBS配制完全培养基,将细胞混悬液加入完全培养基中,于37℃、5% CO<sub>2</sub>的恒温加湿环境中培养。取对数生长期的人正常结肠上皮细胞NCM460,将其分为6组:正常对照组,模型组对照组,湿生扁蕾总口山酮低、中、高剂量(50、100、200 μg/mL)组,阳性对照组(吡非尼酮200 μg/mL),除正常对照组外,其余各组均以LPS(2.5 μg/mL)持续处理细胞NCM460 14天以诱导EMT进程,模型建立成功之后给予不同浓度湿生扁蕾总口山酮,48 h后检测相关指标。

### 1.4 湿生扁蕾总口山酮及吡非尼酮溶液配制

称取湿生扁蕾总口山酮粉末100 mg,溶于0.25 mL DMSO中,用0.22 μm的无菌滤器过滤后,取10 μL用完全培养基稀释成0.4 mg/mL,依据实验需求,稀释成所需浓度。称取吡非尼酮粉末15 mg,溶于0.05 mL DMSO中,吸取10 μL用完全培养基稀释成0.3 mg/mL,用0.22 μm的无菌滤器过滤,再依次稀释到实验所需

浓度。

吡非尼酮(pirfenidone)是一种合成小分子化合物,已被多个国家和地区批准用于治疗特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, PFD)。此外,其还具有广谱抗纤维化活性<sup>[28-29]</sup>,故本实验所用阳性对照药选择吡非尼酮。

## 1.5 检测方法及指标

1.5.1 CCK-8法检测细胞活力 取对数生长期NCM460细胞,以 $5 \times 10^4$ 个/mL的密度接种于96孔板。每孔体积100  $\mu$ L,置于5% CO<sub>2</sub>、37 °C恒温箱中培养,待细胞贴壁完全后,各孔加入各100  $\mu$ L终浓度为25、50、100、200、300、400  $\mu$ g/mL的湿生扁蕾总口山酮和10、25、50、100、200、250、300  $\mu$ g/mL的吡非尼酮药液,每个浓度设6复孔,继续培养24 h、48 h、72 h。由于湿生扁蕾总口山酮呈黄色,对D值的测定有一定的影响,故培养至一定时间后,吸掉湿生扁蕾总口山酮药液,各孔加入100  $\mu$ L新鲜的完全培养基,再向各孔中加入10  $\mu$ L CCK-8,37 °C孵育2 h,用酶标仪在450 nm波长下检测各组细胞的D值。

1.5.2 免疫荧光检测NCM460细胞表面E-钙黏蛋白(E-cadherin)和波形蛋白(Vimentin)表达情况 15 mm激光共聚焦小皿中接种NCM460细胞,细胞密度为 $3 \times 10^4$ 个/mL,置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>恒温培养箱中培养12 h后,细胞刺激及给药同1.5.1项,每孔设3复孔。药物干预结束后封闭液室温封闭2 h,洗涤液静置洗涤10 min、重复3次,E-cadherin、Vimentin两种抗体分别按照1:400、1:500的比例稀释后于4 °C孵育细胞过夜,洗涤液静置洗涤10 min,重复3次,二抗按照1:1 000的比例稀释后,室温孵育细胞1 h,洗涤液静置洗涤10 min,重复3次,封片剂封片,激光共聚焦显微镜检测EMT标志物E-cadherin和Vimentin的表达情况,模型构建成功后给予药物干预,48 h后,同法检测E-cadherin和Vimentin的表达情况。

1.5.3 免疫印迹检测NCM460细胞表面E-cadherin和Vimentin 细胞刺激及给药过程同1.5.2项。收集细胞,RIPA裂解液提取总蛋白,核蛋白提取试剂提取核蛋白。采用BCA法对蛋白进行浓度定量。十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳,每孔上样量为50  $\mu$ g,电泳、转膜、封闭。然后按照1:1 000的比例分别稀释E-cadherin和Vimentin两种一抗,4 °C孵育细胞过夜。洗膜后按照1:2 000的稀释比例加入二抗室温孵育2 h。洗去二抗后,加入曝光液进行曝

光,并运用凝胶成像系统对免疫印迹进行成像。ImageJ软件分析条带的灰度值,以目的蛋白/内参蛋白计算蛋白表达量。

1.5.4 RT-qPCR检测NCM460细胞表面E-cadherin和Vimentin mRNA表达 细胞刺激及给药过程同1.5.2,运用TRIzol试剂提取各组细胞内的RNA,并鉴定RNA纯度。PCR引物由北京博迈德生物技术有限公司设计合成。运用Hifair II 1st Strand cDNA Synthesis Super Mix试剂盒,按照说明书,将RNA逆转录成cDNA,运用后续的qPCR检测。反应条件如下:95 °C预变性2 min;95 °C变性5 s,60 °C退火60 s,60 °C延伸15 s,40个循环。以GAPDH为内参,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算mRNA的相对表达量。引物序列为:E-cadherin上游5'-ACG TAT ACC CTG GTG GTT CA-3',下游5'-AAA TCC AAG CCC GTG GTG G-3';Vimentin上游5'-TCC GCA CAT TCG AGC AAA GA-3',下游5'-AAC TTA CAG CTG GGC CAT CG-3'。

## 1.6 统计学分析

采用统计软件SPSS Statistics 21.0进行分析,组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义,采用Graphpad Prism 9.0绘图软件进行绘图。

## 2 结果

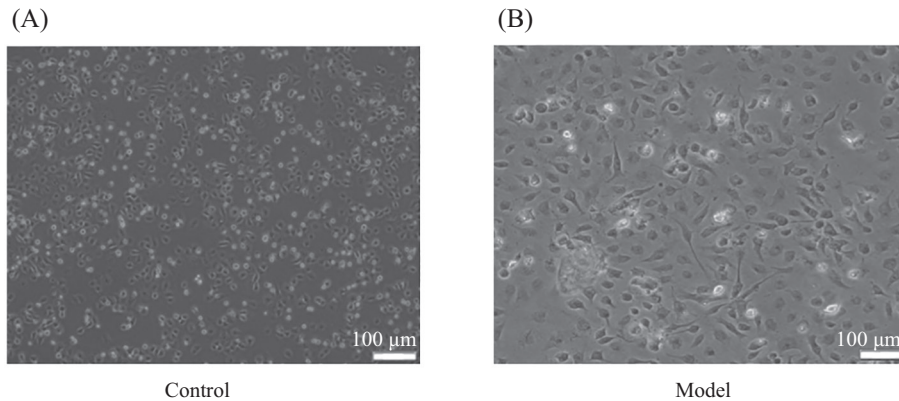
### 2.1 LPS诱导NC460细胞建立EMT模型

2.1.1 EMT前后细胞形态变化 如图1所示,用2.5  $\mu$ g/mL LPS处理后14天后,将细胞置于显微镜下观察发现:人正常上皮细胞NCM460呈不规则形状(梭形、三角形、卵圆形等),边界清晰,形态均匀;LPS诱导细胞发生上皮-间质转化后,细胞边界清晰,呈纺锤形生长。

2.1.2 EMT前后E-cadherin和Vimentin的荧光表达 免疫荧光观察2.5  $\mu$ g/mL LPS诱导EMT模型中上皮表型标志物E-cadherin和间质标志物Vimentin的荧光强度变化,结果显示E-cadherin的荧光强度明显减弱,Vimentin的荧光强度明显增强(图2)。

### 2.2 湿生扁蕾总口山酮及吡非尼酮对NCM460细胞活力的影响

与正常对照组相比,0.1% DMSO溶剂组细胞存活率无差异( $P > 0.05$ ),说明0.1% DMSO溶剂对NCM460细胞无明显毒性;与0.1% DMSO溶剂组相比,25、50、100、200  $\mu$ g/mL湿生扁蕾总口山酮作



A: 造模前细胞形态; B: 造模后细胞形态。

A: cell morphology before modeling; B: cell morphology after modeling.

图1 LPS诱导EMT模型前后细胞形态变化

Fig.1 Changes of cell morphology before and after LPS-induced EMT model

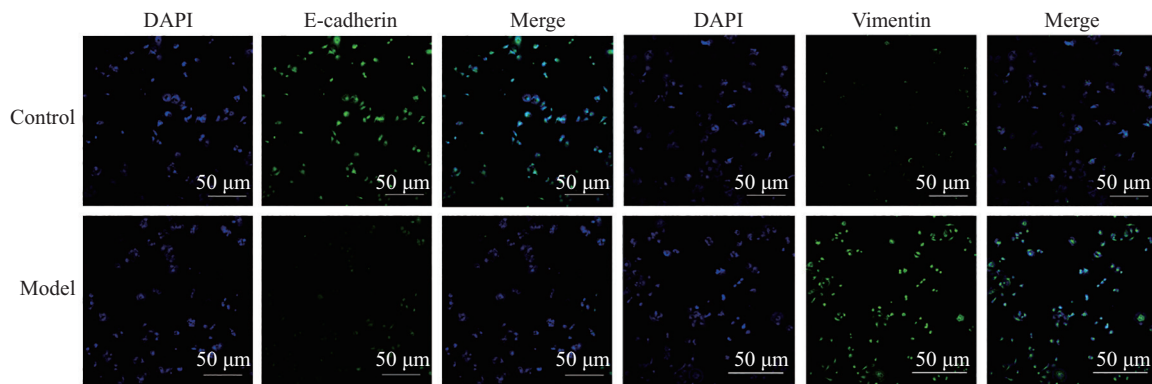


图2 LPS诱导EMT模型前后E-cadherin和Vimentin的表达

Fig.2 Expression of E-cadherin and Vimentin before and after LPS-induced EMT model

用NCM460细胞24、48 h后, 存活率均无明显差异 ( $P>0.05$ ), 提示在该范围内毒性较小; 而湿生扁蕾总口山酮300、400  $\mu\text{g/mL}$  可明显降低NCM460细胞存活率 ( $P<0.05$ ) (图3)。因此, 25、50、100、200  $\mu\text{g/mL}$  湿生扁蕾总口山酮为细胞给药的安全浓度范围, 后续实验选择50、100、200  $\mu\text{g/mL}$  三个浓度作为中高低剂量组开展研究。

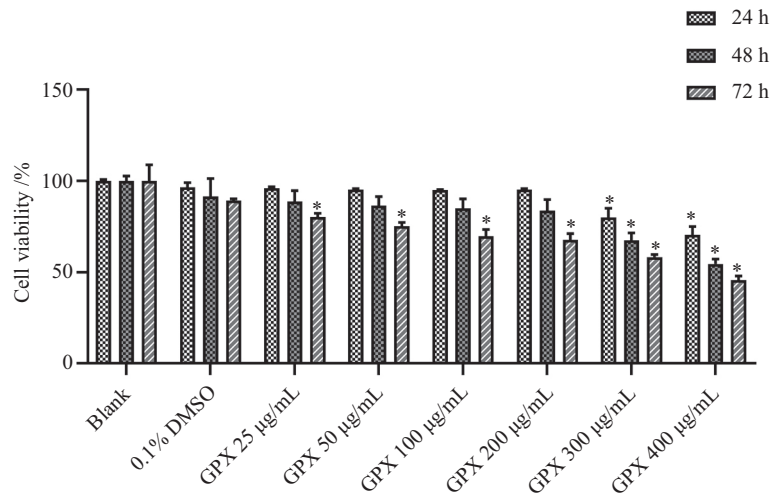
与0.1% DMSO溶剂组相比, 10、25、50  $\mu\text{g/mL}$  吡菲尼酮作用NCM460细胞24、48、72 h后, 细胞存活率均无明显差异 ( $P>0.05$ ); 100、200  $\mu\text{g/mL}$  吡菲尼酮作用NCM460细胞24、48 h后, 其存活率均无明显差异 ( $P>0.05$ ), 而250、300  $\mu\text{g/mL}$  吡菲尼酮可明显降低细胞存活率 ( $P<0.05$ ) (图4)。因此, 后续实验以25、50、100、200  $\mu\text{g/mL}$  吡菲尼酮为细胞给药的安全浓度范围, 后续实验以200  $\mu\text{g/mL}$  吡菲尼酮作为阳性对照。

### 2.3 湿生扁蕾总口山酮对NCM460细胞形态的影响

用不同浓度(25、50、100、200  $\mu\text{g/mL}$ ) 湿生扁蕾总口山酮处理NCM460细胞48 h后, 于显微镜下观察发现: 人正常上皮细胞NCM460呈不规则形状(梭形、三角形、卵圆形等), 形态均匀, 集落样贴壁生长; LPS诱导细胞发生上皮-间质转化后, 细胞边界清晰, 均匀一致, 呈纺锤形生长; 加入不同剂量湿生扁蕾总口山酮干预48 h后, 低剂量组细胞形态变化不明显, 中剂量组可见部分细胞收缩变小呈短梭形, 高剂量组细胞形态收缩变小, 部分细胞逐渐与正常细胞相似(图5)。

### 2.4 湿生扁蕾总口山酮对NCM460细胞EMT标志物蛋白表达的影响

与正常对照组相比, 模型组的上皮细胞标志E-cadherin蛋白表达明显下调 ( $P<0.01$ ), 间质细胞标志物Vimentin表达明显上调 ( $P<0.01$ )。与模型组相比,

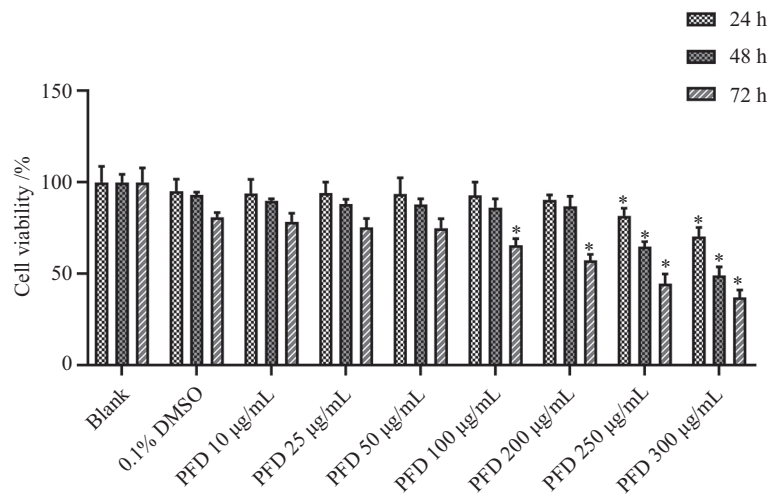


\* $P < 0.05$ , 与0.1% DMSO溶剂组相比较。

\* $P < 0.05$  compared with 0.1% DMSO solvent group.

图3 不同浓度湿生扁蓿总口山酮对NCM460细胞存活率的影响

Fig.3 Effects of different concentrations of GPX on the survival rate of NCM460 cells



\* $P < 0.05$ , 与0.1% DMSO溶剂组相比较。

\* $P < 0.05$  compared with 0.1% DMSO solvent group.

图4 不同浓度吡非尼酮对NCM460细胞存活率的影响

Fig.4 Effects of different concentrations of PFD on the survival rate of NCM460 cell

TXG中、高剂量组可使E-cadherin蛋白表达上调, Vimentin表达下调( $P < 0.01$ ), 以高剂量最为明显。PFD明显上调E-cadherin蛋白的表达水平, 下调Vimentin蛋白表达水平( $P < 0.01$ ), 说明GPX能抑制LPS体外诱导NCM460细胞的EMT(图6)。通过免疫荧光法检测NCM460细胞中E-cadherin、Vimentin的表达, 评价不同浓度湿生扁蓿总口山酮对EMT的影响, 结果显示与模型组相比, 当湿生扁蓿总口山酮浓度分别为50、100、200  $\mu\text{g/mL}$ 时, E-cadherin的荧光强度呈剂量依赖性增强, 但仍弱于正常对照组, Vimentin的荧光不同程度降低, 尤以200  $\mu\text{g/mL}$ 最为明显。200  $\mu\text{g/mL}$

的吡非尼酮作用于模型细胞时, E-cadherin的荧光强度均有所增强, 而Vimentin的荧光强度均减弱(图7)。

## 2.5 湿生扁蓿总口山酮对NCM460细胞EMT标志物mRNA水平的影响

由图8可知, 与对照组相比, 模型组的上皮细胞标志物E-cadherin mRNA表达明显下调( $P < 0.01$ ), 间质细胞标志物Vimentin表达明显上调( $P < 0.01$ ), 自噬标志物LC3的mRNA表达明显上调( $P < 0.01$ )。与模型组相比, GPX中、高剂量组E-cadherin mRNA表达上调, Vimentin表达下调( $P < 0.01$ )。PFD的E-cadherin mRNA表达上调, Vimentin表达下调( $P < 0.01$ ), 这说明

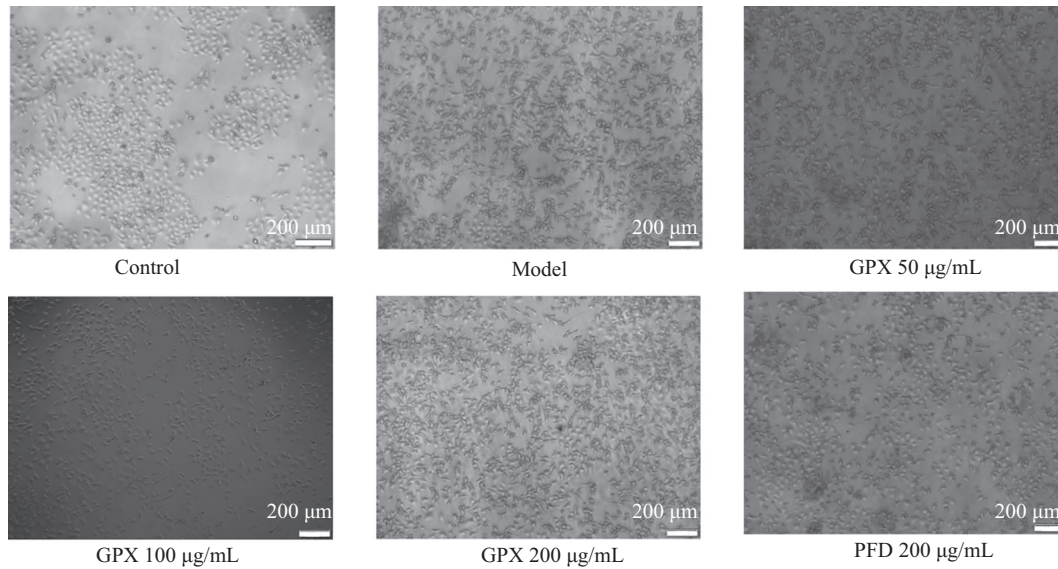
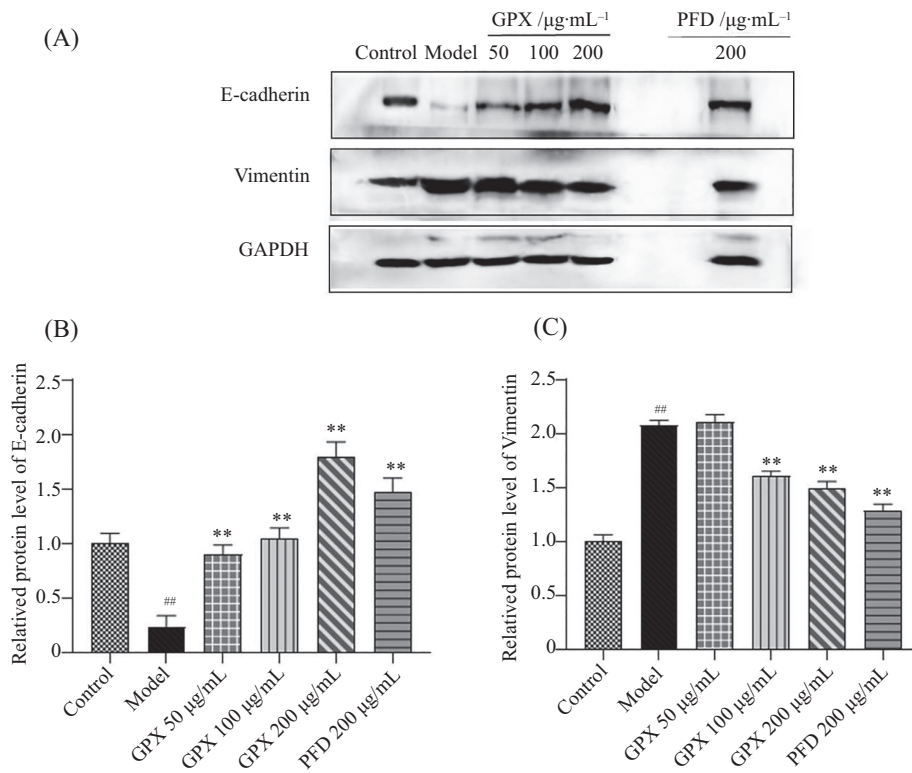


图5 GPX对细胞形态的影响  
Fig.5 The effect of GPX on cell morphology



A: Western blot检测E-cadherin、Vimentin蛋白表达水平; B: E-cadherin蛋白表达水平统计图; C: Vimentin蛋白表达水平统计图; <sup>##</sup>*P*<0.01, 与对照相比, <sup>\*\*</sup>*P*<0.01, 与LPS组相比。

A: the expression levels of E-cadherin and Vimentin were detected by Western blot; B: E-cadherin protein expression level statistics chart; C: Vimentin protein expression level statistics chart. <sup>##</sup>*P*<0.01 compared with Control group, <sup>\*\*</sup>*P*<0.01 compared with LPS group.

图6 湿生扁蓿总口山酮对NCM460中E-cadherin和Vimentin蛋白表达的影响  
Fig.6 The effect of GPX on the expression of E-cadherin and Vimentin in NCM460

在基因表达层面GPX对结肠上皮细胞EMT的影响与其对结肠上皮细胞相关蛋白表达的干预效应相同。

### 3 讨论

UC及其肠纤维化是世界难治病之一, 治疗困难。首先是病因不明, 其次是现有的治疗药物只能

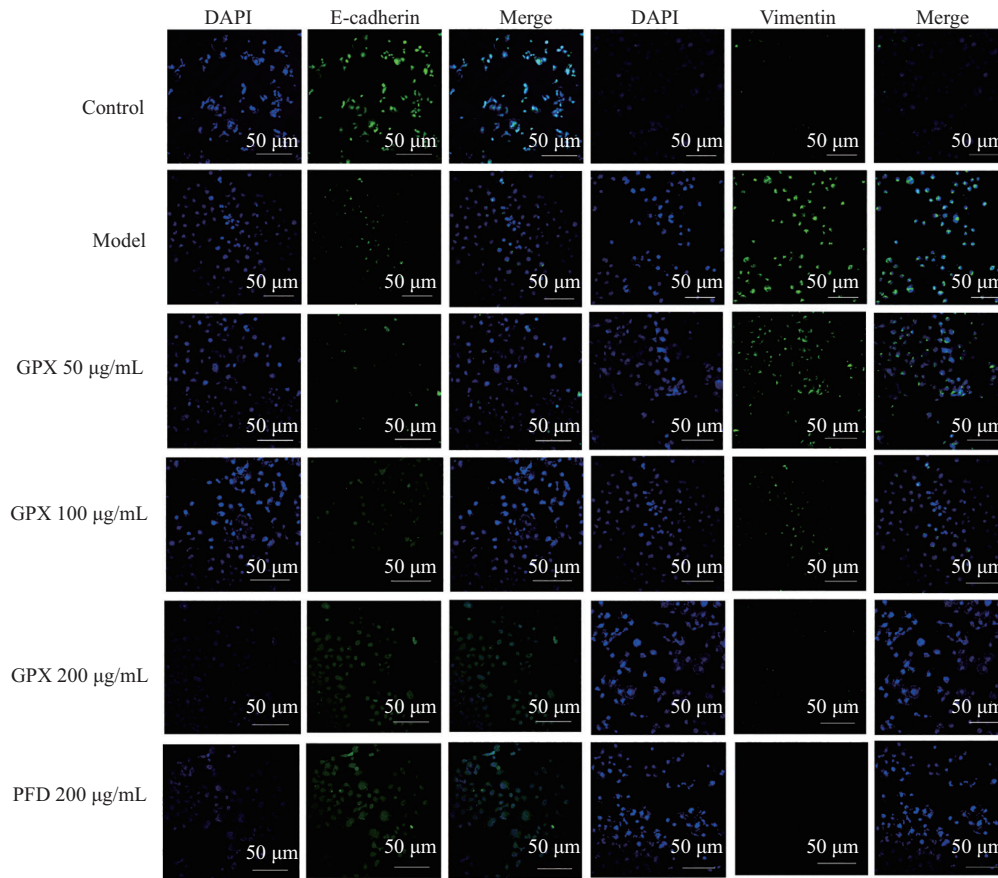
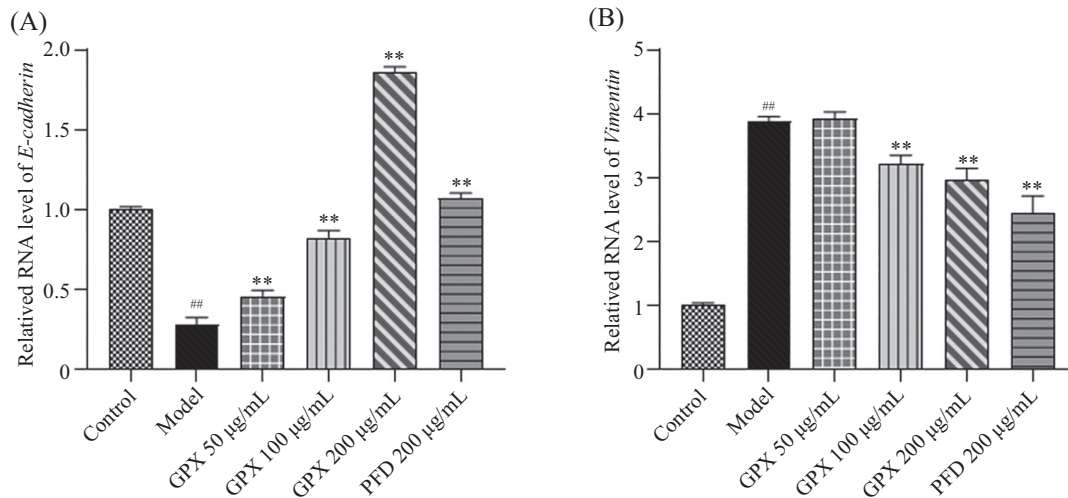


图7 湿生扁蓿总口山酮对NCM460中E-cadherin和Vimentin的表达的影响

Fig.7 The effect of GPX on the expression of E-cadherin and Vimentin in NCM460



A: *E-cadherin* mRNA表达水平; B: *Vimentin* mRNA表达水平; <sup>#</sup> $P < 0.01$ , 与对照相比, <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , 与LPS组相比。

A: *E-cadherin* mRNA expression level; B: *Vimentin* mRNA expression level; <sup>#</sup> $P < 0.01$  compared with Control group, <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  compared with LPS group.

图8 湿生扁蓿总口山酮对NCM460中E-cadherin和Vimentin mRNA表达的影响

Fig.8 Effects of GPX on *E-cadherin* and *Vimentin* mRNA expression in NCM460

缓解UC肠纤维化症状,却不能逆转其发病进程,且随着用药时间的推移易产生耐药性和各种副作用,所以进一步阐明其发病机制和开发新药就成为应对

UC肠纤维化的当务之急。包括藏医药在内的中国民族医药具有一套独立而完整的医学体系,在预防和治疗各种疾病特别是疑难杂症方面有独特的功

效, 所以从民族医药入手, 发现和开发新的抗UC肠纤维化药物就成为有效途径之一。湿生扁蕾是一味传统藏药, 常被用来治疗消化系统疾病。本课题组致力于研究该味药材在消化系统疾病中的治疗作用, 为本实验的研究提供了一定的理论依据和科学指导。

EMT是指在某些病理、生理及环境等因素作用下, 上皮细胞失去细胞极性及其细胞间连接, 且上皮细胞标志物如E-钙黏蛋白、细胞角蛋白(cytokeratin, CK)、紧密连接蛋白(zonula occluden-1, ZO-1)逐渐消失, 而间质细胞标志物如波形蛋白、成纤维细胞特异蛋白1(fibroblast specific protein 1, FSP1)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)等逐渐增多的过程<sup>[30]</sup>。目前, 大量研究已证实EMT是在炎症性肠病发病进程中的关键因素。抑制EMT有望成为治疗炎症性肠病相关纤维化的新途径<sup>[31]</sup>。本研究初步选择E-cadherin和Vimentin作为重要评价指标, 发现湿生扁蕾总口山酮能够有效上调上皮细胞标志E-cadherin的表达, 下调间质转化标志物Vimentin的表达。故初步研究表明, 其具有抗结肠上皮细胞-间质转化的作用, 这为本课题后期深入研究湿生扁蕾总口山酮治疗结肠上皮-间质转化诱发的炎症性肠病提供理论依据。

### 参考文献 (References)

- [1] ABDELMEGID A M, ABDO F K, AHMED F E, et al. Therapeutic effect of gold nanoparticles on DSS-induced ulcerative colitis in mice with reference to interleukin-17 expression [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 10176.
- [2] BINABAJ M M, ASGHARZADEH F, AVAN A, et al. EW-7197 prevents ulcerative colitis-associated fibrosis and inflammation [J]. *Cell Physiol*, 2019, 234(7): 11654-61.
- [3] JOHNSON L A, AMY L, KAY S, et al. Intestinal fibrosis is reduced by early elimination of inflammation in a mouse model of IBD: impact of a "Top-Down" approach to intestinal fibrosis in mice [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2012, 18: 460-71.
- [4] 王燕琴. 炎症性肠病发病机制研究新进展[J]. 世界最新医学信息文摘(WANG Y Q. New progress in the research on the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. *World Latest Medical Information Digest*), 2018, 18(58): 76.
- [5] GORDONIO, AGRAWAL N, GPIDBLUM J R, et al. Fibrosis in ulcerative colitis: mechanisms, features, and consequences of a neglected problem [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2014, 20(11): 2198-206.
- [6] 姚君, 王立生, 王建尧, 等. 白藜芦醇对溃疡性结肠炎小鼠肠黏膜细胞因子表达的影响[J]. 中药新药与临床药理(YAO J, WANG L S, WANG J R, et al. Effects of resveratrol on the expression of cytokines in intestinal mucosa of mice with ulcerative colitis [J]. *New Chinese Medicine and Clinical Pharmacology*), 2010, 21(3): 4.
- [7] BRYUN J D, MEIJRE S L, WILDENBREG M E, et al. Development of fibrosis in acute and longstanding ulcerative colitis [J]. *J Crohns Colitis*, 2015, 9(11): 966.
- [8] LIN L, WANG D, QU S, et al. miR-370-3p alleviates ulcerative colitis-related colorectal cancer in mice through inhibiting the inflammatory response and epithelial-mesenchymal transition [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 1127-41.
- [9] LIN L, YAN S, WANG D, et al. Celastrol ameliorates ulcerative colitis-related colorectal cancer in mice via suppressing inflammatory responses and epithelial-mesenchymal transition [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 6: 320.
- [10] SHI S, ZHANG Y, WEN W, et al. Molecular mechanisms of melatonin in the reversal of LPS-induced EMT in peritoneal mesothelial cells [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(5): 4342-8.
- [11] LI H, LI Y, LIU D, et al. LPS promotes epithelial-mesenchymal transition and activation of TLR4/JNK signaling [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(10): 10429-35.
- [12] ZHAO L, YANG R, CHEN L, et al. LPS-induced epithelial-mesenchymal transition of intrahepatic biliary epithelial cells [J]. *J Surg Res*, 2011, 171(2): 819-25.
- [13] TANG S F, JIANG X H, WU L, et al. Toll-like receptor 4 shRNA attenuates lipopolysaccharide-induced epithelial-mesenchymal transition of intrahepatic biliary epithelial cells in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107: 1210-7.
- [14] LIU J Y, ZENG L L, ZHAO Y L, et al. Selenium suppresses lipopolysaccharide-induced fibrosis in peritoneal mesothelial cells through inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2014, 161: 202-9.
- [15] 景明, 景威栋, 张尚智, 等. 藏药湿生扁蕾研究[M]. 甘肃: 甘肃科学技术出版社, 2017.
- [16] YEUNG M F, LAU C B, CHAN R C, et al. Search for antimicrobial constituents from a Tibetan medicinal plant, *Gentianopsis paludosa* [J]. *Phytother Res*, 2009, 23(1): 123-5.
- [17] DING L, LIU B, QI L L, et al. Anti-proliferation, cell cycle arrest and apoptosis induced by a natural xanthone from *Gentianopsis paludosa* Ma, in human promyelocytic leukemia cell line HL-60 cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2009, 23(3): 408-17.
- [18] DING L, LIU B, ZHANG S D, et al. Cytotoxicity, apoptosis-inducing effects and structure-activity relationships of four natural xanthones from *Gentianopsis paludosa* Ma in HepG2 and HL-60 cells [J]. *Nat Prod Res*, 2011, 25(7): 669-83.
- [19] 柳娜, 张旭东, 赵慧巧, 等. 湿生扁蕾山酮对UC肠纤维化大鼠肠上皮细胞间质转化的影响[J]. 药学研究(LIU N, ZHANG X D, ZHAO H Q, et al. Effects of Xanthones from *Gentianopsis paludosa* on the mesenchymal transition of intestinal epithelial cells in UC rats with intestinal fibrosis [J]. *Pharmacy Research*), 2018, 37(1): 8.
- [20] 卢年华, 赵慧巧, 刘雪枫, 等. 基于qRT-RNA技术筛选藏药湿生扁蕾抗溃疡性结肠炎肠纤维化活性成分的研究[J]. 药学研究(LU N H, ZHAO H Q, LIU X F, et al. Screening of anti-ulcerative colitis and intestinal fibrosis active ingredients of Tibetan medicine *Gentianopsis paludosa* based on qRT-RNA technology [J]. *Pharmaceutical Research*), 2016, 35(11): 628.
- [21] 景明, 刘喜平, 陈晖, 等. 藏药湿生扁蕾提取物对实验性大鼠溃疡性结肠炎肠纤维化的影响[J]. 中国民族医药杂志(JING M, LIU X P, CHEN H, et al. Effects of *Gentianopsis paludosa* extract



- on intestinal fibrosis in experimental rats with ulcerative colitis [J]. Chinese Journal of Ethnic Medicine, 2011, 17(12): 43.
- [22] 景明, 罗永皎, 陈正君, 等. 藏药湿生扁蕾对三硝基苯磺酸诱导的大鼠溃疡性结肠炎模型的影响[J]. 时珍国医国药(JING M, LUO Y J, CHEN Z J, et al. The effect of Tibetan medicine *Gentianopsispaludosa* on trinitrobenzenesulfonic acid-induced rat ulcerative colitis model [J]. Shizhen Traditional Chinese Medicine), 2011, 22(2): 351.
- [23] 景明, 罗永皎, 陈正君, 等. 藏药湿生扁蕾提取物治疗小鼠溃疡性结肠炎的研究[J]. 中国实验方剂学杂志(JING M, LUO Y J, CHEN Z J, et al. Study on the treatment of ulcerative colitis in mice by the extract of Tibetan medicine *Gentianopsispaludosa* [J]. Chinese Journal of Experimental Formulas), 2011, 17(2): 113.
- [24] 王雅莉, 刘雪枫, 张艳霞, 等. 湿生扁蕾对溃疡性结肠炎肠纤维化大鼠结构及转化生长因子 $\beta$ 表达的影响[J]. 中国临床药理学杂志(WANG Y L, LIU X F, ZHANG Y X, et al. Effects of *Gentianopsispaludosa* on the structure and expression of transforming growth factor  $\beta$  in rats with ulcerative colitis and intestinal fibrosis [J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology), 2018(8): 972.
- [25] 赵慧巧, 卢年华, 张旭东, 等. 湿生扁蕾对结肠癌微环境中HMSCs恶性增殖以及CD34、CD90的影响[J]. 中药药理与临床(ZHAO H Q, LU N H, ZHANG X D, et al. Effects of *Gentianopsispaludosa* on the malignant proliferation of HMSCs and CD34 and CD90 in colon cancer microenvironment), 2018, 34(3): 125-8.
- [26] ZHAO H Q, LU N H, ZHANG X D, et al. 1-Hydroxy-3,7,8-trimethoxyxanthone suppresses the malignant proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells in colon cancer microenvironment [J]. Int J Pharmacol, 2019, 15(2): 156-65.
- [27] 寇亮, 刘越敏, 柳娜, 等. 大孔吸附树脂分离纯化湿生扁蕾总呋酮[J]. 中药新药与临床药理(KOU L, LIU Y M, LIU N, et al. Separation and purification of total ketones from *Gentianopsispaludosa* by macroporous adsorption resin [J]. New Chinese Medicine and Clinical Pharmacology), 2022, 33(4): 522.
- [28] 陈钰清, 闫永吉, 仇美华, 等. 吡非尼酮抗纤维化作用的研究进展[J]. 临床药物治疗杂志(CHEN Y Q, YAN Y J, QIU M H, et al. Research progress on the anti-fibrotic effect of pirfenidone [J]. Journal of Clinical Drug Therapy), 2016, 14(5): 1.
- [29] AIMO A, CERBAI E, BARTOLUCCI G, et al. Pirfenidone is a cardioprotective drug: mechanisms of action and preclinical evidence [J]. Pharmacol Res, 2020, 155: 104694.
- [30] TSUCHIDA T, FEIEDMAN S L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14(7): 397-411.
- [31] YU L, CHEN Y, TOOZ S A. Autophagy pathway: cellular and molecular mechanisms [J]. Autophagy, 2018, 14(2): 207-15.