

· 论著 ·

## 烟酰胺单核苷酸对小鼠溃疡性结肠炎的作用

张赛龙<sup>1</sup>, 凌期盛<sup>2</sup>, 杨 政<sup>1</sup>, 缪朝玉<sup>1</sup> (1. 海军军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433; 2. 烟台大学药学院, 山东烟台 264005)

**[摘要]** 目的 探究烟酰胺单核苷酸(NMN)对葡聚糖硫酸钠盐(DSS)诱导的溃疡性结肠炎小鼠模型的作用。方法 采用 DSS 诱导溃疡性结肠炎小鼠模型评价 NMN 的作用。应用 DSS 对 C57 小鼠进行造模, 给予 NMN 后观察模型小鼠的生存时间、体重、疾病评分(DAI)、结肠组织长度以及结肠组织切片病理学变化。结果 NMN 对模型小鼠的生存时间、体重、DAI、肠道形态学变化等无显著性改变。结论 NMN 对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠无显著作用。

**[关键词]** 烟酰胺单核苷酸; 溃疡性结肠炎

**[中图分类号]** R574.62; R735.34

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2021)01-0013-04

**[DOI]** 10.12206/j.issn.1006-0111.202006077

## Effect of NMN on DSS induced ulcerative colitis in mice

ZHANG Sailong<sup>1</sup>, LING Qisheng<sup>2</sup>, YANG Zheng<sup>1</sup>, MIAO Chaoyu<sup>1</sup> (1. Department of Pharmacology, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of Nicotinamide mononucleotide (NMN) on ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS) in mice. **Methods** DSS-induced ulcerative colitis mice were used to evaluate the effects of NMN. After NMN administration, the survival time, weight, disease activity index (DAI), colon tissue length and pathological changes of colon tissue slices were observed. **Results** NMN did not cause significant changes in the survival time, weight, DAI, and intestinal morphology of ulcerative colitis mice. **Conclusion** NMN has no significant effect on DSS-induced ulcerative colitis mice.

**[Key words]** nicotinamide mononucleotide; ulcerative colitis

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)是真核细胞中的一种重要的代谢氧化还原辅酶,它在各种生物过程中起关键作用,包括新陈代谢、衰老、细胞死亡、DNA 修复和表达<sup>[1-2]</sup>。NAD 主要有 3 种生物合成途径,在哺乳动物中,补救途径是 NAD 的主要来源并且该途径只有两个步骤(图 1)。NAD 在该途径中的合成速率主要由烟酰胺磷酸核糖基转移酶(Nampt)决定,该步骤首先将烟酰胺(NAM)和 5-磷酸核糖基-1-焦磷酸(PRPP)转化为烟酰胺单核苷酸(NMN)。然后,在第二步中将 NMN 与 ATP 偶联并转化为 NAD<sup>[3]</sup>。直接使用 NMN 可以弥补 NAD 的不足,因此 NMN 可以参与多种疾病的调节,如 2 型糖尿病、肥胖症、心力衰竭、神经再生和炎症等<sup>[4-8]</sup>。

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81802541);上海市科委生物医药领域科技支撑项目(6431901400);国家自然科学基金项目(81373414)

**[作者简介]** 张赛龙,博士,讲师,研究方向:心脑血管药理学,Email: sailongzhang@126.com

**[通信作者]** 缪朝玉,博士,教授,博士生导师,研究方向:心脑血管药理学,Email: cymiao@smmu.edu.cn

溃疡性结肠炎是炎症性肠病的一种。近年来,其病因和发病机制的研究受到广泛关注<sup>[9-11]</sup>。目前治疗溃疡性结肠炎的手段主要是对症治疗,如抗感染药、糖皮质激素和免疫抑制剂等,但这些药物长期使用会带来很多不良反应<sup>[12-13]</sup>。NAD 与多种炎症性疾病有关,如败血症和类风湿性关节炎<sup>[14-15]</sup>。此外,有报道显示,炎症性肠病患者结肠组织和血清中 Nampt 浓度升高,并将 Nampt 作为小儿炎症性肠病严重程度的标志物<sup>[16-17]</sup>。因此,作为 NAD 合成的中间重要产物 NMN,也有可能对炎症性肠病产生一定作用。与此同时,目前有很多含有 NMN 的保健品问世,但是由于 NMN 参与调节的功能非常复杂,并且有研究表明 NMN 可以促进肿瘤的增殖等作用<sup>[18]</sup>,因此,补充 NMN 并不一定对人体都有益。并且, NMN 作为保健品需要长期服用,但对于一些患有如炎症性肠病的慢性病患者,评价其对于患者的安全性极其重要。

本研究主要考察 NMN 对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠模型的作用。以评价 NMN 作为保健品是否适用于患有溃疡性结肠炎的患者。

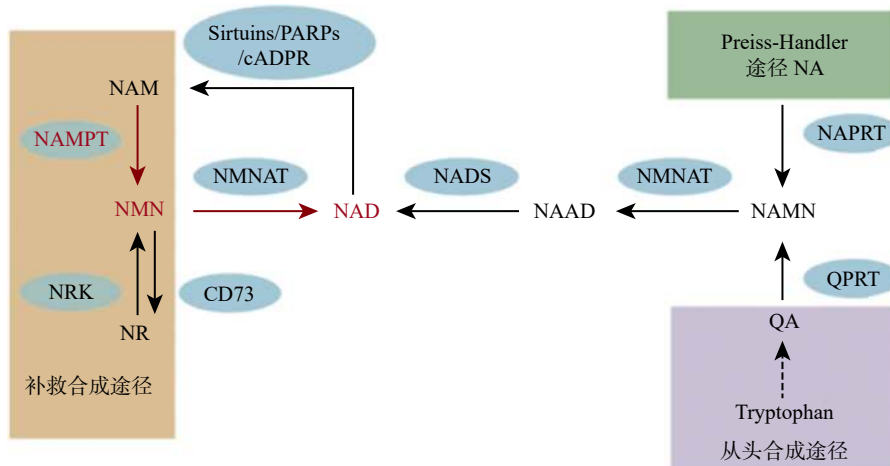


图 1 哺乳动物细胞中 NAD 的生物合成途径<sup>[4-8]</sup>

## 1 材料与方法

### 1.1 DSS 诱导肠炎模型的制备

雄性 C57 小鼠(8 周龄,上海西普尔-必凯实验动物有限公司),放于实验室适应 2 周后进行造模。按照之前的方法进行模型制备<sup>[19]</sup>,将 DSS(美国 MP 公司,分子量为 36 000~50 000)溶于水中,至终浓度为 3%,让小鼠自由饮用。

### 1.2 分组及给药情况

将 NMN[音美医药科技(上海)有限公司]溶于生理盐水中,制备不同浓度的 NMN 溶液,将雄性 C57 小鼠分为 6 组,分别为生理盐水对照组,3、10、30、100、300 mg/kg NMN 的不同剂量组。按照容积 0.1 ml/10 g,通过灌胃(ig)和腹腔注射(ip)两种方式,从第 1 天开始给药,每天 1 次,直至实验观察结束。

### 1.3 疾病评分(DAI)

按照之前的评分标准进行评分<sup>[19]</sup>,对体重下降程度、大便性状、血便情况分别进行评分,而后进行加和,计算总分数。具体评分标准见表 1。

表 1 疾病评分

| 评分 | 体重下降(%) | 大便性状 | 血便情况 |
|----|---------|------|------|
| 0  | 无       | 正常   | 无    |
| 1  | 1~5     | —    | —    |
| 2  | 5~10    | 半稀便  | 潜血   |
| 3  | 10~15   | —    | —    |
| 4  | ≥15     | 稀便   | 肉眼血便 |

注:“—”表示无此项评分。

### 1.4 形态学检测及组织学染色

小鼠处死后,取整个结肠部位,测量长度进行

比较。而后将结肠下段部位组织用 4% 多聚甲醛固定 24 h,然后包埋在石蜡中。准备厚度为 4 μm 的切片,按照之前的实验方法,进行 HE 染色<sup>[19]</sup>。

### 1.5 统计分析

本实验指标均为定量数据,数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示。两两比较采用 *t*-test 法进行,采用 GraphPad Prism 7 统计软件进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 NMN 对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎模型小鼠生存时间的影响

为了确定实验的最佳观察时间,首先对小鼠的生存曲线进行测定。将 100 和 300 mg/kg 的 NMN 通过灌胃的给药方式,检测 3%DSS 诱导的溃疡性结肠炎模型小鼠生存时间(图 2),在给药第 9 天时,300 mg/kg 组中有 2 只小鼠死亡,生理盐水对照组和 100 mg/kg 组在第 10 天出现小鼠死亡。第 17 天时,300 mg/kg 组小鼠全部死亡,而在第 20 天

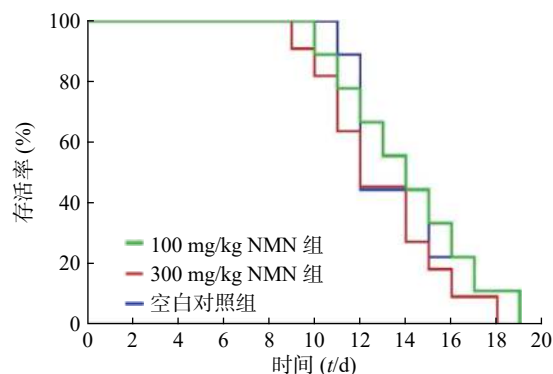


图 2 NMN 对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠生存曲线的影响  
(每组  $n=10$ )

蓝色曲线:空白对照组;红色曲线:300 mg/kg NMN 组;  
绿色曲线:100 mg/kg NMN 组

时,生理盐水对照组和 100 mg/kg 组全部死亡。3 组生存曲线之间并无统计学差异。由于在给药第 9 天时,有小鼠出现死亡,因此我们将后面实验的观察时间设定为 8 d。

## 2.2 NMN 不同给药方式对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎模型小鼠体重和 DAI 的影响

为了考察不同给药方式对小鼠的影响,我们分

别通过灌胃和腹腔注射两种给药方式,观察 NMN 对于小鼠体重和 DAI 的影响,如图 3 所示,灌胃和腹腔注射两种给药方式对溃疡性结肠炎模型小鼠体重和 DAI 分数的影响无显著性差异,二者都在第 5 天时表现出体重下降并出现稀便情况。因此,为了更真实的模拟人用药环境,我们在后续实验中均采用灌胃的给药方式。

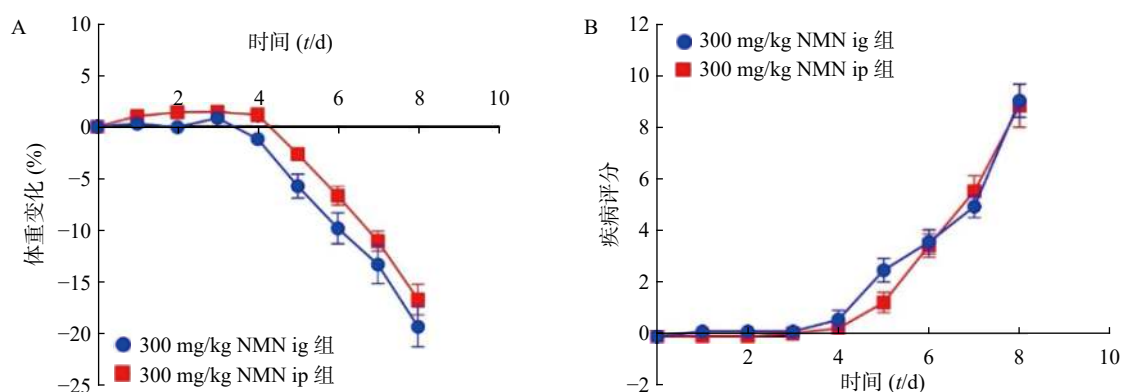


图 3 NMN 不同给药方式对于 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠体重和 DAI 影响

A.体重变化曲线;B.DAI 评分曲线;每组  $n=10$

## 2.3 NMN 对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎模型小鼠结肠长度与形态的影响

为了进一步考察不同浓度 NMN 对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎模型小鼠的影响,我们应用了不同浓度的 NMN 通过灌胃给药的方式,分别对小鼠的体重和 DAI 进行了检测。结果显示(图 4A、4B),不同浓度的 NMN 对小鼠的体重和 DAI 的影响,与对照组相比均无显著性差异。为了更进一步确认,我们又对结肠长度和结肠形态进行了检测,结果显示(图 4C、4D),300 mg/kg 的 NMN 与对照组相比,肠道长度和免疫组化切片结果并无显著性差异。

## 3 讨论

本研究测定了不同剂量的 NMN 对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠的体重、DAI 评分、结肠长度和肠道形态的影响,即 NMN 对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠并无显著作用。

NMN 作为 NAD 的前体,其功能目前认为是通过 NAD 来体现的,NNM 和 NAD 的代谢是紧密联系的。NAD 在人体内有 3 条生化途径: Preiss-Handler 途径、从头合成途径和补救合成途径(图 1)<sup>[20]</sup>。Preiss-Handler 途径从 NA 开始,经过 NAPRT 催化变成 NAMN,经过 NMNAT 的催化,变成 NAAD,然后再被 NAD 合成酶 NADS 催化成 NAD<sup>[21]</sup>。从头合成途径首先是从食物中摄取的色氨酸开始,经

过一系列体内生化反应生成喹啉酸(QA),而后经过(QPRT 催化生成 NAMN 进入 Preiss-Handler 途径<sup>[22]</sup>。补救合成途径从 NAM 开始,然后经过 NAMPT 催化后,变成 NMN, NMN 同样通过 NMNAT 酶的催化转变成 NAD,而后 NAD 在经过 3 个消耗途径 NAD 依赖的去乙酰化酶(Sirtuins)、多聚 ADP 核糖聚合酶(PARPs)、环腺苷二磷酸核糖(cADPR)合酶后变成烟酰胺完成循环<sup>[2]</sup>。NAD 的含量在这 3 条途径下保持平衡,补救合成途径是人体 NAD 的主要来源,该过程中的 NAMPT 是这个循环的限制步骤<sup>[23]</sup>。

NMN 作为 NAD 合成的重要中间产物,存在于多种类型的细胞中,并参与了不同的生物学过程。NMN 可防止由 NAD 分解代谢酶而引起的 NAD 耗竭。目前报道的 NMN 大部分作用对人体都是有益的,但是随着研究的深入,NAD 的增加也能够加重某些疾病的发展,如炎症和肿瘤<sup>[18, 24-25]</sup>。近期有研究表明,在克罗恩结肠炎和溃疡性结肠炎患者的结肠组织中,血浆 Nampt 和 mRNA 水平均显著升高<sup>[16]</sup>。更有研究表明,Nampt 的特异性抑制剂 FK866,改善了 DSS 诱导的溃疡性结肠炎模型小鼠症状,并抑制了小鼠中与炎症相关的肿瘤发生。由于 Nampt 是 NMN 的重要合成生物酶,因此,我们怀疑 NMN 可能也会加重 DSS 诱导的溃疡性结肠炎模型小鼠症状。基于此,我们首先检测了

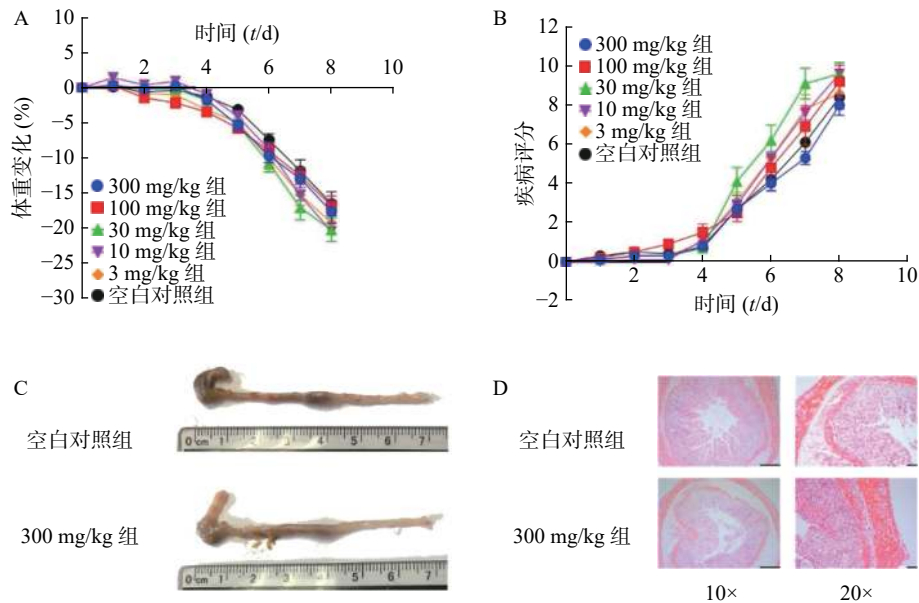


图 4 不同浓度的 NMN 对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎模型小鼠的作用

A. 体重变化曲线; B. DAI 评分曲线; C. 结肠长度测量代表图; D. 结肠横切面免疫组化图(HE 染色); bar = 200  $\mu$ m 黑色曲线: 空白对照组( $n = 20$ ); 橘黄色曲线: 3 mg/kg NMN 组( $n = 10$ ); 紫色曲线: 10 mg/kg NMN 组( $n = 10$ ); 绿色曲线: 30 mg/kg NMN 组( $n = 10$ ); 红色曲线: 100 mg/kg NMN 组( $n = 10$ ); 蓝色曲线: 300 mg/kg NMN 组( $n = 20$ )

不同剂量的 NMN 对模型小鼠的生存曲线的影响, 发现与对照组相比, NMN 并不会显著改变模型小鼠的生存时间。而后我们发现不同给药方式也不能显著改变小鼠溃疡性结肠炎的状态。最后我们又检测不同浓度的 NMN 对于肠炎小鼠的影响, 发现 300 mg/kg 剂量以下的 NMN, 对于模型小鼠的体重、DAI 评分、结肠组织均不能引起显著性改变。因此, NMN 对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠并无影响。

综上, NMN 具有广泛的人体生物调节作用, 目前市面上出现了很多含有 NMN 的保健品。虽然我们的研究表明 NMN 对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎模型小鼠无明显毒副作用, 但是对于 NMN 的副作用仍需继续考察, 特别是对于长期使用 NMN 的人群来说, 充分考察其安全性尤为重要。

#### 【参考文献】

- [1] RAJMAN L, CHWALEK K, SINCLAIR D A. Therapeutic potential of NAD-boosting molecules: the in vivo evidence[J]. *Cell Metab*, 2018, 27(3): 529-547.
- [2] OKABE K, YAKU K, TOBE K, et al. Implications of altered NAD metabolism in metabolic disorders[J]. *J Biomed Sci*, 2019, 26(1): 34.
- [3] PODDAR S K, SIFAT A E, HAQUE S, et al. Nicotinamide mononucleotide: exploration of diverse therapeutic applications of a potential molecule[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(1): E34.
- [4] REVOLLO J R, KÖRNER A, MILLS K F, et al. Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme[J]. *Cell Metab*, 2007, 6(5): 363-375.
- [5] JUKARAINEN S, HEINONEN S, RÄMÖ J T, et al. Obesity is associated with low NAD(+)/SIRT pathway expression in adipose tissue of BMI-discordant monozygotic twins[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016, 101(1): 275-283.
- [6] LEE C F, CHAVEZ J D, GARCIA-MENENDEZ L, et al. Normalization of NAD+ redox balance as a therapy for heart failure[J]. *Circulation*, 2016, 134(12): 883-894.
- [7] ZHAO Y, GUAN Y F, ZHOU X M, et al. Regenerative neurogenesis after ischemic stroke promoted by nicotinamide phosphoribosyltransferase-nicotinamide adenine dinucleotide cascade[J]. *Stroke*, 2015, 46(7): 1966-1974.
- [8] LI C, ZHOU Y N, RYCHAHOU P, et al. SIRT2 contributes to the regulation of intestinal cell proliferation and differentiation[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2020, 10(1): 43-57.
- [9] GHOSH S, DAPERNO M. Topical therapy in ulcerative colitis: always a bridesmaid but never a bride?[J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(4): 701-704.
- [10] ORDÁS I, ECKMANN L, TALAMINI M, et al. Ulcerative colitis[J]. *Lancet*, 2012, 380(9853): 1606-1619.
- [11] YAN Y X, SHAO M J, QI Q, et al. Artemisinin analogue SM934 ameliorates DSS-induced mouse ulcerative colitis via suppressing neutrophils and macrophages[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(10): 1633-1644.
- [12] FORD A C, MOAYYEDI P, HANAUER S B. Ulcerative colitis[J]. *BMJ*, 2013, 346: f432.
- [13] MOWAT C, COLE A, WINDSOR A, et al. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults[J]. *Gut*, 2011, 60(5): 571-607.

(下转第 22 页)

- 体的影响[J]. *现代实用医学*, 2019(8): 1005-1007.
- [2] 许超, 张方, 吴倩, 等. 青风藤汤联合甲氨蝶呤对类风湿关节炎患者滤泡辅助性T细胞及白介素-21的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2017(7): 781-784.
- [3] 张永立, 欧阳桂林, 肖涟波. 青藤碱治疗类风湿关节炎作用机制研究进展[J]. *中西医结合学报*, 2009, 7(8): 775-779.
- [4] TAO W Y, XU X, WANG X, et al. Network pharmacology-based prediction of the active ingredients and potential targets of Chinese herbal *Radix Curcumae* formula for application to cardiovascular disease[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 145(1): 1-10.
- [5] XU X, ZHANG W X, HUANG C, et al. A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(6): 6964-6982.
- [6] 胡亚洁, 赵晓锦, 宋咏梅, 等. 基于网络药理学的中药复方研究探讨[J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(6): 1400-1402.
- [7] 张雨, 李恒, 李克宁, 等. 复方中药网络药理学研究进展[J]. *中成药*, 2018, 40(7): 1584-1588.
- [8] LING C Q. Traditional Chinese medicine is a resource for drug discovery against 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2)[J]. *J Integr Med*, 2020, 18(2): 87-88.
- [9] ZHANG D H, WU K L, ZHANG X, et al. In silico screening of Chinese herbal medicines with the potential to directly inhibit 2019 novel coronavirus[J]. *J Integr Med*, 2020, 18(2): 152-158.
- [10] 任建敏. 食物中植物甾醇生理活性及药理作用研究进展[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(22): 389-393.
- [11] KRIPA K G, CHAMUNDEESWARI D, THANKA J, et al. Modulation of inflammatory markers by the ethanolic extract of *Leucas aspera* in adjuvant arthritis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 134(3): 1024-1027.
- [12] 蔡强, 向莹, 岳涛. 基于网路药理学方法预测青风藤药理机制[J]. *现代中医药*, 2019, 39(2): 108-112.
- [13] 周淑媛, 施铮, 刘峥, 等. 左旋千金藤啶碱增加离体大鼠心肌收缩力的作用[J]. *中药药理与临床*, 2009, 25(2): 23-26.
- [14] NISHIKAWA M, MYOUI A, TOMITA T, et al. Prevention of the onset and progression of collagen-induced arthritis in rats by the potent p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor FR167653[J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(9): 2670-2681.
- [15] XU M M, LIU S F, WAN R J, et al. Combined treatment with sinomenine and acupuncture on collagen-induced arthritis through the NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(6): 8770-8776.
- [收稿日期] 2020-04-26 [修回日期] 2020-07-15  
[本文编辑] 李睿旻

## (上接第 16 页)

- [14] JIA S H, LI Y, PARODO J, et al. Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical Sepsis[J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(9): 1318-1327.
- [15] MEIER F M, FROMMER K W, PETERS M A, et al. Visfatin/pre-B-cell colony-enhancing factor (PBEF), a proinflammatory and cell motility-changing factor in rheumatoid arthritis[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(34): 28378-28385.
- [16] MOSCHEN A R, KASER A, ENRICH B, et al. Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties[J]. *J Immunol*, 2007, 178(3): 1748-1758.
- [17] STARR A E, DEEKE S A, NING Z B, et al. Proteomic analysis of ascending colon biopsies from a paediatric inflammatory bowel disease inception cohort identifies protein biomarkers that differentiate Crohn's disease from UC[J]. *Gut*, 2017, 66(9): 1573-1583.
- [18] XU T Y, ZHANG S L, DONG G Q, et al. Discovery and characterization of novel small-molecule inhibitors targeting nicotinamide phosphoribosyltransferase[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 10043.
- [19] ZHANG S L, LI Z Y, WANG D S, et al. Aggravated ulcerative colitis caused by intestinal Metrn1 deficiency is associated with reduced autophagy in epithelial cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(6): 763-770.
- [20] VERDIN E. NAD<sup>+</sup> in aging, metabolism, and neurodegeneration[J]. *Science*, 2015, 350(6265): 1208-1213.
- [21] PREISS J, HANDLER P. Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. I. Identification of intermediates[J]. *J Biol Chem*, 1958, 233(2): 488-492.
- [22] DE FIGUEIREDO L F, GOSSMANN T I, ZIEGLER M, et al. Pathway analysis of NAD<sup>+</sup> metabolism[J]. *Biochem J*, 2011, 439(2): 341-348.
- [23] FREDERICK D W, LORO E, LIU L, et al. Loss of NAD homeostasis leads to progressive and reversible degeneration of skeletal muscle[J]. *Cell Metab*, 2016, 24(2): 269-282.
- [24] MOSCHEN A R, GERNER R, SCHROLL A, et al. A key role for Pre-B cell colony-enhancing factor in experimental hepatitis[J]. *Hepatology*, 2011, 54(2): 675-686.
- [25] HASMANN M, SCHEMAINDA I. FK866, a highly specific noncompetitive inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase, represents a novel mechanism for induction of tumor cell apoptosis[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(21): 7436-7442.
- [收稿日期] 2020-06-19 [修回日期] 2020-09-02  
[本文编辑] 李睿旻