

本文引用: 高 勇, 李克亚, 王真权, 陈大光, 吕照文, 张晓芳. 复方芩柏汤调控 ERK/JNK 信号通路治疗溃疡性结肠炎的效应及机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(5): 764-770.

## 复方芩柏汤调控 ERK/JNK 信号通路治疗溃疡性结肠炎的效应及机制研究

高 勇<sup>1</sup>, 李克亚<sup>2</sup>, 王真权<sup>2\*</sup>, 陈大光<sup>1</sup>, 吕照文<sup>1</sup>, 张晓芳<sup>1</sup>

1. 宁乡市人民医院, 湖南 长沙 410600; 2. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005

**[摘要]** **目的** 研究复方芩柏汤对细胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)/c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号通路的调控作用, 以及对溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)小鼠血清中炎症因子的影响。**方法** 将 60 只 SPF 级健康雄性 BALB/C 小鼠利用 3% 葡聚糖硫酸(dextran sulfate sodium, DSS)建立 UC 模型, 造模成功后随机分为模型组(以生理盐水灌肠)、美沙拉嗪组(以 0.196 g/kg 美沙拉嗪药液灌肠)、复方芩柏汤组(以 1.092 g/kg 复方芩柏汤颗粒剂药液灌肠), 每组 20 只, 每天保留灌肠 2 次, 连续 3 周。另取 20 只正常饲养小鼠作为空白组。在治疗前和治疗后第 7、14、21 天, 观察小鼠体质量、大便秘性状、便血情况, 并计算疾病活动指数(disease activity index, DAI), 且于给药结束后进行麻醉取血并取结肠组织。采用 HE 染色观察各组小鼠结肠组织病理变化情况; ELISA 法检测各组小鼠血清中炎症因子白细胞介素(interleukin)-22、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )含量变化情况; 采用 Western blot 法检测各组小鼠结肠组织中的 p90 核糖体蛋白 S6 激酶(p90 ribosomal protein S6 kinase, p90RSK)、JNK、磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶(phosphorylated c-Jun N-terminal kinase, p-JNK)、细胞外调节蛋白激酶 1/2(extracellular regulated protein kinases 1/2, ERK 1/2)、磷酸化细胞外调节蛋白激酶 1/2(phospho extracellular regulated protein kinases, p-ERK 1/2)蛋白的表达。**结果** 在治疗的第 7、14、21 天, 美沙拉嗪组、复方芩柏汤组小鼠体质量均明显高于模型组( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), DAI 评分明显低于模型组( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。光镜下, 与模型组相比, 美沙拉嗪组及复方芩柏汤组小鼠结肠组织病理改变呈不同程度的恢复, 炎症浸润减轻。给药结束后, 与空白组比较, 模型组 p90RSK、p-JNK、p-ERK 1/2 蛋白以及 IL-6、TNF- $\alpha$  蛋白表达明显升高( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 美沙拉嗪组和复方芩柏汤组 p90RSK、p-JNK、p-ERK 1/2 蛋白以及 IL-6、TNF- $\alpha$  蛋白表达明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 抗炎因子 IL-22、IL-10 含量明显升高( $P<0.01$ )。**结论** 复方芩柏汤可能通过抑制 ERK/JNK 信号通路, 促进抗炎因子 IL-22、IL-10 的表达, 抑制促炎因子 IL-6、TNF- $\alpha$  的表达, 减少肠道炎症反应, 促进肠上皮细胞增殖, 改善肠黏膜屏障, 促进 UC 小鼠肠道黏膜组织损伤修复。

**[关键词]** 溃疡性结肠炎; 复方芩柏汤; 炎症因子; p90 核糖体蛋白 S6 激酶; c-Jun 氨基末端激酶; 磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶; 细胞外调节蛋白激酶 1/2; 磷酸化细胞外调节蛋白激酶 1/2

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.05.007

## Effects of compound Qinbai Decoction on regulation of ERK/JNK signaling pathway in treating ulcerative colitis and its mechanism

GAO Yong<sup>1</sup>, LI Keya<sup>2</sup>, WANG Zhenquan<sup>2\*</sup>, CHEN Daguang<sup>1</sup>, LYU Zhaowen<sup>1</sup>, ZHANG Xiaofang<sup>1</sup>

1. People's Hospital of Ningxiang City, Changsha, Hunan 410600, China; 2. The Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China

[收稿日期] 2023-06-25

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(S2012J5043); 湖南省中医药管理局项目(2021020); 湖南省中医药管理局一般项目(201786); 长沙市自然科学基金项目(kq2202482); 湖南中医药大学校级科研基金项目(2019XJJ129)。

[通信作者]\* 王真权, 男, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, E-mail: wangzhenquan123456@163.com。

**[Abstract] Objective** To study the regulatory effects of compound Qinbai Decoction (QBD) on the extracellular regulated protein kinases (ERK)/c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway, as well as its effects on inflammatory factors in the serum of mice with ulcerative colitis (UC). **Methods** Sixty SPF grade healthy male BALB/C mice were used to establish a UC model using 3% dextran sulfate sodium (DSS). After successful modeling, they were randomized into model group (enema with normal saline), mesalazine group (enema with 0.196 g/kg mesalazine solution), and compound QBD group (enema with 1.092 g/kg compound Qinbai Granule), with 20 mice in each group. The enema was administered twice a day for 3 consecutive weeks. An additional 20 normally fed mice were used as blank group. Before treatment and on the 7th, 14th, and 21st day after treatment, the body mass, stool characteristics, and bloody stool situation of the mice were observed, and the disease activity index (DAI) was calculated. The mice were anesthetized for blood and colon tissue collection after completion of administration. HE staining was used to observe the pathological changes of colon tissues in each group of mice; ELISA method was applied to check changes in the content of inflammatory factors such as interleukin-22, IL-6, IL-10, and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in mice serum in each group; Western blot was employed to examine the expressions of p90 Ribosomal protein S6 kinase (p90 RSK), JNK, phosphorylated c-Jun N-terminal kinase (p-JNK), extracellular regulated protein kinases 1/2 (ERK 1/2), and phospho extracellular regulated protein kinases 1/2 (p-ERK 1/2) in the colon tissue of mice in each group. **Results** On the 7th, 14th, and 21st day of treatment, the body mass of mice in the mesalazine and compound QBD groups were significantly higher than those in the model group ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and the DAI score was significantly lower than that in model group ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Under the light microscope, compared with the model group, the pathological changes in the colon tissue of mice in the mesalazine and the compound QBD groups showed varying degrees of recovery, with reduced inflammation infiltration. After administration, compared with the blank group, the model group showed a significant increase in the protein expressions of p90RSK, p-JNK, p-ERK 1/2, as well as IL-6 and TNF- $\alpha$  ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the mesalazine and the QBD groups showed a significant decrease in the protein expressions of p90RSK, p-JNK, p-ERK 1/2, as well as IL-6 and TNF- $\alpha$  ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), while the content of anti-inflammatory factors IL-22 and IL-10 significantly increased ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Compound QBD may promote the expressions of anti-inflammatory factors IL-22 and IL-10 and inhibit the expressions of proinflammatory factors IL-6 and TNF- $\alpha$ , reduce intestinal inflammatory response, promote intestinal epithelial cell proliferation, improve intestinal mucosal barrier, and promote the repair of intestinal mucosal tissue damage in UC mice by inhibiting the ERK/JNK signaling pathway.

**[Keywords]** ulcerative colitis; compound Qinbai Decoction; inflammatory factor; p90 Ribosomal protein S6 Kinase; c-Jun N-terminal kinase; phosphorylated c-Jun N-terminal kinase; extracellular regulated protein kinases 1/2; phospho extracellular regulated protein kinases 1/2

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种慢性非特异性肠道炎症性疾病, 可累及结直肠黏膜及黏膜下层, 亦可遍及整段结肠, 临床主要表现为持续性或反复发作的腹痛腹泻、黏液脓血便等, 其发病原因不明, 可能与感染、免疫、遗传、环境及精神心理等因素有关<sup>[1-2]</sup>。临床治疗 UC 主要以 5-氨基水杨酸、糖皮质激素、免疫抑制剂、生物制剂、小分子制剂、粪菌移植等药物为主, 具有抗炎、保护肠道黏膜屏障、调节肠道菌群、改善肠道微环境等作用<sup>[3-4]</sup>。

中医学将 UC 归属于“痢疾”“肠癖”“滞下”等范畴, 病机与湿热瘀滞、气血失和密切相关。中药通过调节免疫炎症反应、减轻氧化应激、改善肠黏膜屏障等, 在控制 UC 进展和缓解临床症状方面逐渐显示出独特优势<sup>[5]</sup>。复方芩柏汤具有清热利湿、行气止

痛、活血化瘀的功效, 经过长期临床观察和大量实验研究, 复方芩柏汤的疗效得到进一步肯定<sup>[6-10]</sup>。本研究旨在探究复方芩柏汤对细胞外信号调节激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK)/c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 信号通路的调控作用, 以及对 UC 小鼠血清中炎症因子白细胞介素 (interleukin, IL)-22、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 的影响, 为复方芩柏汤治疗 UC 的有效性和科学性提供更深层次的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

健康雄性 BALB/C 小鼠 80 只, 体质量 (25.03±

0.57) g,均购自湖北贝恩特生物科技有限公司,许可证号:SCXK(鄂)2021-0027。饲养条件:12 h/12 h明暗交替,室温 23~25 °C,湿度 40%~60%,噪声≤60 dB,适应性喂养 1 周后开始造模。本实验符合动物实验伦理要求,伦理审查批准编号为:IACUC(准)-BNT-2023-003。

## 1.2 药物

复方芩柏汤由湖南中医药大学第二附属医院自制复方芩柏颗粒剂 12 g 于 200 mL 无菌水溶解稀释而成。复方芩柏颗粒剂(批号:湘药制备字 Z2021044 4000),药物组成:黄芩 12 g,黄柏 12 g,秦艽 10 g,当归 10 g,桃仁 10 g,防风 10 g,苍术 10 g,槟榔 10 g,泽泻 10 g,制大黄 10 g,延胡索 10 g。成人灌肠用药剂量为 12 g/d,按成人体质量 70 kg,实验小鼠体质量为 18~40 g,参经常用实验小鼠与人的体表面积比值表计算,每只小鼠每天给药剂量为 2.184 g(即小鼠给药量为 1.092 g/kg),故每只小鼠灌肠药量为 0.13 mL/d。美沙拉嗪缓释颗粒剂(规格 500 mg/袋,批号:国药准字 H20143164,上海爱的发制药集团)成人用药量为 2 g/d,溶于 40 mL 蒸馏水中制成溶液(50 mg/mL),同样参经常用实验动物与人的体表面积比值表计算,每只小鼠每天给药剂量为 0.391 g(即小鼠给药量为 0.196 g/kg),故每只小鼠灌肠药量为 7.8 mL/d。均放入 4 °C 冰箱保存备用。

## 1.3 主要试剂

葡聚糖硫酸(dextran sulfate sodium, DSS)(中国上海翊圣生物科技有限公司,批号:60316ES60);三溴乙醇(tribromoethanol, TBE)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:T161626);苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)(上海碧云天生物技术有限公司,批号:ST506);链霉亲和素标记山羊抗小鼠 IgG、链霉亲和素标记山羊抗兔 IgG、p90 核糖体蛋白 S6 激酶(p90 ribosomal protein S6 kinase, p90RSK)抗体、JNK 抗体、磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶(phosphorylated c-Jun N-terminal kinase, p-JNK)抗体、GAPDH 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:SA00001-1、SA00001-2、80108-1-RR、66210-1-IG、80024-1-RR、60004-1-IG);ERK 抗体、磷酸化细胞外调节蛋白激酶(phospho extracellular regulated protein kinases, p-ERK)抗体(美国 Cell Signaling Technology,批号:4695T、4370T);BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P0010、P0013B);特超敏 ECL

化学发光液(赛默飞世尔科技公司,批号:NCI5079);HE 染色液(中国医药集团有限公司,批号:71014544);苏木精染液(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号:H9627);四甲基二乙胺(tetramethylethylenediamine, TEMED)(美国 Amresco 公司,批号:Amresc00761);蛋白 marker(14~120 kDa)(北京全氏金生物技术有限公司,批号:DM111);蛋白 marker(10~250 kDa)(加拿大 Fermentas 公司,批号:26619-1);小鼠 IL-22 ELISA 试剂盒、小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒、小鼠 IL-10 ELISA 试剂盒、小鼠 TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号:E-EL-M2446、E-EL-M0044、E-EL-M0046、E-EL-M3063)。

## 1.4 主要仪器

Mini-Proten Tetra System 电泳系统(型号:PP1152,北京六一仪器厂);石蜡切片机(型号:RM 2016,德国 Leica 公司);多功能酶标仪(型号:m $\mu$ ISKANMK3,赛默飞世尔科技公司);高速冷冻离心机(型号:Neofuge 15R,Heal Force 公司);凝胶成像系统(型号:ChemiDoc™XRS+,美国 Bio-Rad Laboratories 公司)。

## 1.5 造模方法

采用 3% DSS 建立 UC 小鼠模型<sup>[11-13]</sup>。小鼠适应性喂养 1 周后,禁食禁水 24 h,用无菌水配制浓度为 3% 的 DSS 溶液,放入饮水瓶中自由饮用,持续 7 d,建立 DSS 结肠炎小鼠模型。按照 Cooper 评分系统<sup>[14]</sup>根据小鼠体质量、大便性状、便血情况评定小鼠结肠组织疾病活动指数(disease activity index, DAI),以 DAI 升高及小鼠结肠病理性改变视为造模成功。

## 1.6 分组与干预方法

DSS 结肠炎造模 24 h 后进行药物干预。实验分为空白组( $n=20$ )和造模组( $n=60$ ),造模组再随机分为 3 组:模型组、美沙拉嗪组、复方芩柏汤组。模型组予生理盐水灌肠;美沙拉嗪组予以美沙拉嗪药液 0.196 g/kg 灌肠;复方芩柏汤组予以复方芩柏颗粒剂药液 1.092 g/kg 灌肠。每天 2 次,持续干预 3 周。

## 1.7 动物取材

给药结束后第 2 天取材,按 400 mg/kg TBE 腹腔注射麻醉小鼠后,眼球采血,2 000 r/min(离心半径 8.5 cm)离心 5 min 后,取上层血清,置于-80 °C 保存备用。暴露腹腔,取距肛门 1 cm 与盲肠袋间的结肠段,观察结肠形态并拍照统计长度,置于预冷的 1×PBS 中快速清洗 1~2 遍,分成两份:一份放于 4% 多聚甲醛中,完全浸泡结肠组织,固定包埋,切片,用于观察结肠组织病理学变化;另一部分迅速投入液氮中,后转入-80 °C 冰箱保存。

### 1.8 结肠组织病理学评分标准

于治疗前和治疗后 7、14、21 天观察小鼠体质量变化,进食、活动及粪便情况,按照 Cooper 评分系统<sup>[4]</sup>根据小鼠体质量、大便性状、便血情况(每个项目根据症状严重程度依次计 0~4 分,得分越高,症状越严重)评定小鼠结肠组织 DAI,DAI=(体质量指数分数+大便性状分数+便血情况分数)/3。详见表 1。

表 1 结肠组织病理学评分标准

体质量下降率	大便黏稠度	大便出血	得分/分
体质量不变	正常	正常	0
1%~5%	—	—	1
6%~10%	松散	隐血阳性	2
11%~15%	—	—	3
>16%	稀便	显性出血	4

注:DAI 综合评分介于 0~4 分之间,0 分代表正常,4 分代表炎症最大活动度。

### 1.9 HE 染色观察结肠组织形态

将取出的新鲜结肠组织置于 4%多聚甲醛中,完全浸泡结肠组织,固定包埋,切片,HE 染色,镜下观察拍照。

### 1.10 ELISA 法测定各组小鼠血清中 IL-22、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 含量

实验开始前,收集的血清样本及各试剂均置于室温平衡;试剂或样品配制时,均需充分混匀,并尽量避免起泡。分别设空白孔、标准孔、待测样品孔,空白孔加样品稀释液 100  $\mu$ L,余孔分别加标准品或待测样品 100  $\mu$ L。给酶标板覆膜,37  $^{\circ}$ C 孵育 90 min。弃去液体,每孔加生物素化抗体工作液 100  $\mu$ L(临用前 20 min 内配制,避光放置),加上覆膜,37  $^{\circ}$ C 温育 60 min。弃去液体,洗板 3 次,每次浸泡 30 s,大约 350  $\mu$ L/孔,甩干并在吸水纸上轻拍,将孔内液体拍干。每孔加酶结合物工作液 100  $\mu$ L(临用前 20 min 内配制,避光放置),加上覆膜,37  $^{\circ}$ C 温育 30 min。弃去孔内液体,甩干,洗板 5 次。每孔加 TMB 90  $\mu$ L,酶标板加上覆膜,37  $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min。每孔加终止液 50  $\mu$ L 终止反应,此时蓝色立转黄色。立即用酶标仪在 450 nm 波长处测量各孔的光密度(optical density, OD)值。

### 1.11 Western blot 法检测结肠组织中 p90RSK、JNK、p-JNK、ERK 1/2、p-ERK 1/2 蛋白表达水平

取 100 mg 结肠组织,加入含有磁珠的研磨管中,在研磨管中加入含有蛋白酶抑制剂与磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液,使其与组织充分混合,放置于匀浆仪上进行匀浆,此过程在冰上操作。裂解完成

后 4  $^{\circ}$ C,12 000 r/min(离心半径 8.5 cm)离心 5 min,取上清液,BCA 法蛋白定量。取 25  $\mu$ g 总蛋白进行电泳分离,5%浓缩胶 80 V,10%分离胶 120 V,然后湿转 90 min,电流 200 mA,5%脱脂牛奶/TBST 室温摇床封闭 1 h,孵育一抗 p90RSK(1:1 000)、JNK(1:1 000)、p-JNK(1:1 000)、ERK(1:2 000)、p-ERK(1:1 000),4  $^{\circ}$ C 冰箱过夜。次日室温复温 20~30 min, TBST 洗 10 min $\times$ 3 次,孵育辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000),室温摇床孵育 1 h, TBST 洗 10 min $\times$ 3 次,加入 ECL 化学发光试剂显色,凝胶成像系统发光成像。用 Image J 软件分析各条带灰度值,进行相对定量分析,统计各组与内参 GAPDH 灰度值的比值。

### 1.12 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计软件进行分析。实验数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,组间数据比较采用方差分析,用 LSD 法(方差齐)或 Dunnett's T3(方差不齐)作组间多重比较。均以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠一般情况观察及体质量比较

空白组毛色柔润光泽,无稀便脓血便、情况。造模第 7 天,造模各组小鼠体质量下降,粪便变稀,其后肢位于身下,眯着眼睛,毛发凌乱并竖立。造模期间 3 只小鼠死亡(模型组 1 只,美沙拉嗪组 1 只,复方芩柏汤组 1 只)。治疗后,美沙拉嗪组、复方芩柏汤组大便次数逐渐减少,黏液脓血便减少或消失,进食及饮水量增加,毛发逐渐恢复光泽。

与空白组比较,模型组小鼠的体质量明显降低( $P<0.01$ )。治疗第 7、14、21 天,与模型组比较,美沙拉嗪组及复方芩柏汤组的体质量明显增加( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),接近空白组。详见表 2。

### 2.2 各组小鼠 DAI 评分比较

空白组小鼠 DAI 评分为 0 分,造模后,模型组的 DAI 评分明显增加。治疗第 7、14、21 天,与模型组比较,美沙拉嗪组和复方芩柏汤组 DAI 评分均明显降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ );美沙拉嗪组与复方芩柏汤组 DAI 评分比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。详见表 3。

### 2.3 各组小鼠结肠组织形态学观察

镜下观察发现,空白组小鼠结肠黏膜连续、结构完整、无明显缺损;黏膜腺体结构完整、排列整齐,未见组织坏死、出血及炎性细胞浸润;黏膜下层及肌层无明显炎性细胞浸润及增生。模型组小鼠结肠组织出现明显损伤,黏膜不连续,可见溃疡面及坏死

表2 各组小鼠不同时间段体质量比较( $\bar{x}\pm s$ , g)

组别	n	治疗前	治疗第7天	治疗第14天	治疗第21天
空白组	20	24.91±2.26	25.44±0.67	25.45±0.55	25.41±0.62
模型组	19	17.86±1.22**	17.30±1.16**	18.29±1.19**	19.45±1.02**
美沙拉嗪组	19	18.03±1.26*	21.86±1.91 <sup>#</sup>	22.33±1.64 <sup>##</sup>	24.67±0.71 <sup>###</sup>
复方芩柏汤组	19	18.27±1.10*	22.86±2.06 <sup>#</sup>	23.37±1.72 <sup>##</sup>	24.97±0.79 <sup>###</sup>

注:与空白组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ 。

表3 各组小鼠不同时间段 DAI 评分比较( $\bar{x}\pm s$ , 分)

组别	n	治疗前	治疗第7天	治疗第14天	治疗第21天
空白组	20	0	0	0	0
模型组	19	3.96±0.10	3.91±0.24	2.92±0.82	2.94±0.81
美沙拉嗪组	19	3.93±0.18	2.22±0.86 <sup>#</sup>	2.07±0.80 <sup>#</sup>	1.68±0.97 <sup>##</sup>
复方芩柏汤组	19	3.87±0.23	2.24±0.65 <sup>#</sup>	1.72±0.58 <sup>##</sup>	1.56±0.70 <sup>###</sup>

注:与模型组比较,\* $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ 。

灶,深达肌层;腺体结构被破坏,腺体排列紊乱,可见炎症细胞浸润和组织增生。美沙拉嗪组及复方芩柏汤组小鼠结肠组织病理改变呈不同程度恢复,腺体结构、形态开始恢复,排列较整齐;炎症细胞浸润及组织增生亦明显减轻,肠壁基本恢复。详见图1。

#### 2.4 各组小鼠血清中 IL-22、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 含量比较

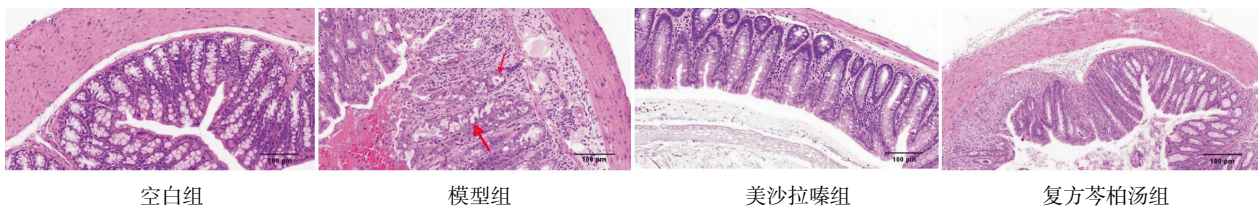
与空白组比较,模型组促炎因子IL-6、TNF- $\alpha$  含量明显升高( $P<0.01$ ),抗炎因子IL-22、IL-10 含量差异无统计学意义( $P>0.05$ );与模型组比较,美沙拉嗪组和复方芩柏汤组IL-22、IL-10 含量明显升高( $P<0.01$ ),IL-6、TNF- $\alpha$  含量明显下降( $P<0.01$ );美沙拉嗪组和复方芩柏汤组组间IL-22、IL-10、IL-6、TNF- $\alpha$  含量比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。详见表4。

#### 2.5 各组小鼠结肠组织中 p90RSK、p-JNK、p-ERK 1/2 蛋白相对表达比较

与空白组比较,模型组p90RSK、p-JNK以及p-ERK 1/2 蛋白相对表达均明显升高( $P<0.01$ );与模型组比较,美沙拉嗪组和复方芩柏汤组p90RSK、p-JNK以及p-ERK 1/2 相对表达均明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );美沙拉嗪组和复方芩柏汤组p90RSK、p-JNK及p-ERK 1/2 相对表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。详见表5。

### 3 讨论

UC 归属于中医学“肠澼”“赤沃”“痢疾”“泄泻”等范畴,从直肠往上成倒灌性发病,可遍及全结肠,呈弥漫性分布<sup>[15]</sup>。中医从辨证论治、整体观念出发,在保护靶器官、控制炎症反应、改善临床症状、减少复发方面具有一定的优势<sup>[16]</sup>。复方芩柏汤是基于刘完

图1 各组小鼠结肠组织病理变化(HE,  $\times 100$ )表4 各组小鼠血清 IL-22、IL-10、IL-6 和 TNF- $\alpha$  表达水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	IL-22( $\times 10^{-3}$ )	IL-10/(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)	TNF- $\alpha$ /(pg/mL)
空白组	20	132.382±12.962	64.858±9.343	60.977±22.980	27.302±6.651
模型组	19	194.417±38.634	74.864±9.269	376.844±67.861**	176.220±9.016**
美沙拉嗪组	19	444.103±71.886 <sup>##</sup>	341.032±23.312 <sup>##</sup>	170.441±17.763 <sup>###</sup>	56.875±7.804 <sup>###</sup>
复方芩柏汤组	19	488.914±43.983 <sup>##</sup>	322.777±27.313 <sup>##</sup>	153.414±18.567 <sup>###</sup>	65.616±11.387 <sup>###</sup>

注:与空白组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>##</sup> $P<0.01$ 。

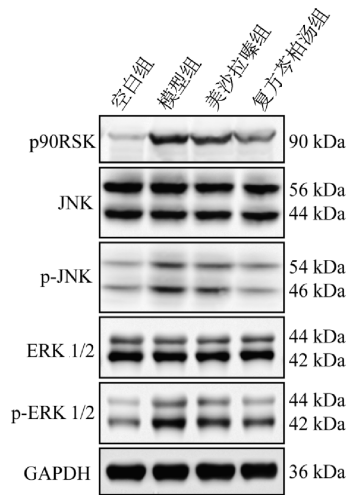


图3 各组小鼠结肠组织中 p90RSK、p-JNK、p-ERK 1/2 蛋白印迹图

表5 各组小鼠结肠组织中 p90RSK、p-JNK、p-ERK 1/2 蛋白相对表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	p-ERK 1/2/ERK 1/2	p-JNK/JNK	p90RSK
空白组	20	1.092±0.313	0.907±0.117	1.065±0.249
模型组	19	2.684±0.235**	2.602±0.078**	3.940±0.267**
美沙拉嗪组	19	1.977±0.408#	1.687±0.174*#	2.758±0.369**
复方芩柏汤组	19	1.568±0.212#	1.185±0.063#	2.312±0.671#

注:与空白组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,# $P < 0.05$ ,<sup>#</sup> $P < 0.01$ 。

素在《素问·病机气宜保命集》中提出的“行血则便脓自愈,调气则后重自除”的理论,结合“湿热”“气滞”“血瘀”贯穿于 UC 急性活动期全过程的发病特点,采取以清热利湿为主、行气活血为辅的治疗方法<sup>[10]</sup>。方中,君药黄芩、黄柏性寒味苦,入大肠经,功擅清热燥湿、泻火解毒;臣药防风、秦艽胜湿止痛,泽泻利水渗湿;佐以延胡索、槟榔、当归、桃仁、大黄,共奏清热燥湿、行气活血、止血镇痛之功<sup>[17-18]</sup>。课题组前期研究证实,复方芩柏汤可能通过激活 PI3K/AKT-mTOR 信号通路<sup>[6]</sup>、抑制 TLR2/I $\kappa$ B- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  信号通路<sup>[9]</sup>、弱化 p38MAPK 信号通路<sup>[8]</sup>、调节炎症因子 IL-17、TNF- $\alpha$ 、超敏 C 反应蛋白、IL-6 等<sup>[7,20]</sup>,改善肠黏膜屏障,促进溃疡修复。UC 发病与诸多炎症因子相关<sup>[21]</sup>,结肠组织损伤后,肠黏膜内的炎症反应导致机体大量释放炎症因子,使血清中促炎因子 IL-6、TNF- $\alpha$  表达增加,炎症反应过程加剧,进一步影响参与免疫抑制的细胞因子 IL-10、IL-22 等的合成与分泌,使肠黏膜上层完整性丧失和通透性增加,加剧炎症过程。而组织修复过程中,上皮细胞的再生与肠黏膜屏障的维持及器官功能至关重要。IL-22 是 IL-20 细胞因子家族中的重要成员,由 T 细胞和先天淋巴样细胞产生,可诱导上皮细胞产生抗菌肽和黏液,

而免疫细胞可以维持肠道黏膜上皮屏障的结构完整性,加强其基本防御系统功能<sup>[22]</sup>。IL-22 已被证明是上皮细胞稳态和修复的关键调节因子,对 UC 具有抗炎作用<sup>[23-24]</sup>。肠道损伤后,IL-22 通过产生先天淋巴样细胞,增加了小鼠小肠类器官的生长。重组 IL-22 直接靶向结肠干细胞(intestinal stem cell, ISC),促进小鼠和人肠道类器官的生长与增殖,从而促进 ISCs 的扩增。LINDEMANS 等<sup>[25]</sup>研究发现,IL-22 通过直接作用于 ISCs,增强了 ISC 介导的上皮再生,促进了细胞周期进程、上皮增殖和 ISC 池的再生。另外,IL-22 在高度增殖的细胞(如肠上皮细胞)中诱导细胞增殖,与 ERK 1/2 介导的 p90RSK、c-Jun 和 Stomatin 的转录及激活肠上皮细胞中的 JAK-STAT 信号通路、蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB)通路、MAPK 途径有关<sup>[26]</sup>。NIESS 等<sup>[27]</sup>研究发现,IL-22 亦可促进 ERK 1/2 参与细胞增殖和迁移的非依赖性基因的表达,表明 p90RSK 和 c-Jun 是 IL-22 调节 ERK 1/2 信号通路的下游调节因子。IL-10 由效应 T 细胞和 Treg 细胞产生,在参与炎症反应过程中通过抑制巨噬细胞的特异性免疫功能,减少黏附分子的表达,达到抑制过度炎症反应、促进组织修复的目的,对于维持组织免疫稳态具有重要作用<sup>[27]</sup>。IL-6 由淋巴细胞、巨噬细胞等多种细胞分泌,与多效性促炎因子 TNF- $\alpha$  一样,具有促进炎症反应的发生及加速机体炎症反应的作用,与 UC 发病及疾病活动度成正相关。IL-6 还可对 B 细胞、T 细胞和其他免疫细胞的增殖产生细胞作用,并引起免疫损伤<sup>[21,28]</sup>。

本研究发现,复方芩柏汤可能通过抑制 ERK/JNK 信号通路发挥治疗 UC 的作用。在治疗第 7、14、21 天,美沙拉嗪组及复方芩柏汤组 DAI 评分较模型组明显降低,结肠组织病理改变呈不同程度恢复,腺体结构、形态开始恢复,排列较整齐;炎性细胞浸润及组织增生亦明显减轻,肠壁基本恢复,说明复方芩柏汤对 DSS 诱导的 UC 小鼠有保护作用。同时,通过检测血清中的炎症因子,UC 模型组 IL-6、TNF- $\alpha$  含量比空白组明显升高,经复方芩柏汤治疗后 IL-6、TNF- $\alpha$  含量降低,IL-22、IL-10 水平升高,从而调节 UC 小鼠炎症因子的分泌,减轻机体炎症反应,达到缓解 UC 的目的。其作用机制可能通过使 p90RSK、p-JNK、p-ERK 1/2 表达下降抑制 ERK/JNK 通路,促进抗炎因子 IL-22、IL-10 的表达,抑制促炎因子 IL-6、TNF- $\alpha$  的分泌,改善急性期 UC 小鼠临床症状并缓解肠道病理改变,其机制可能与改善黏膜屏障、促进上皮细胞再生有关。

综上所述,复方芩柏汤对于 DSS 诱导的 UC 小



鼠有治疗作用,其具体机制可能与促进抗炎因子IL-22、IL-10的表达从而促进黏膜修复,抑制促炎因子IL-6、TNF- $\alpha$ 的分泌从而防止黏膜损伤有关。但基于IL-22、IL-10对于胃肠道黏膜修复功能可能与多因素相关<sup>[25,29]</sup>,此研究局限于从ERK/JNK信号通路进行探索,今后还需从多方面探索复方芩柏汤在UC治疗上的可能作用机制,以加强对其治疗机制的研究,为中医药治疗UC提供新的理论依据。

## 参考文献

- [1] ZHENG Y F, LIANG C H, LI Z W, et al. Study on the mechanism of Huangqin Decoction on rats with ulcerative colitis of damp-heat type base on mtDNA, TLR4, p-PI3K, p-Akt protein expression and microbiota[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2022, 295: 115356.
- [2] FRIES W, DEMARZO M G, NAVARRA G, et al. Ulcerative colitis in adulthood and in older patients: Same disease, same outcome, same risks?[J]. *Drugs & Aging*, 2022, 39(6): 441-452.
- [3] ROEDIGER W. A new curative therapy for ulcerative colitis[J]. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2022, 37(12): 2203.
- [4] ELHAG D A, KUMAR M, SAADAOU M, et al. Inflammatory bowel disease treatments and predictive biomarkers of therapeutic response[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(13): 6966.
- [5] 王春霞, 葛俊李, 李芳, 等. 中药治疗溃疡性结肠炎作用及机制研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(2): 270-282.
- [6] 肖佑, 肖超, 肖戈, 等. 复方芩柏颗粒剂通过靶向干预miR-199-3p对溃疡性结肠炎的改善作用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(9): 1100-1103.
- [7] 李克亚, 王真权, 张佳敏. 复方芩柏颗粒剂对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织中ROR $\gamma$ t、Foxp3表达的影响[J]. *中成药*, 2019, 41(6): 1411-1415.
- [8] 陆文洪, 罗雯鹏, 王真权. 复方芩柏颗粒剂对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜p-38MAPK、CK2表达的影响[J]. *湖南中医杂志*, 2018, 34(4): 136-137.
- [9] 胡响当, 陈艳, 罗敏, 等. 复方芩柏颗粒剂保留灌肠治疗湿热下注型溃疡性结肠炎临床研究[J]. *亚太传统医药*, 2016, 12(6): 148-149.
- [10] 高勇, 李克亚, 王真权. 王真权教授运用复方芩柏汤治疗湿热蕴结型溃疡性结肠炎的临床经验[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(1): 132-137.
- [11] KATSANDEGWAZA B, HORSNELL W, SMITH K. Inflammatory bowel disease: A review of pre-clinical murine models of human disease[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(16): 9344.
- [12] RANDHAWA P K, SINGH K, SINGH N, et al. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents[J]. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 2014, 18(4): 279.
- [13] ISLAM M S, MURATA T, FUJISAWA M, et al. Anti-inflammatory effects of phytosteryl ferulates in colitis induced by dextran sulphate sodium in mice[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2008, 154(4): 812-824.
- [14] DAI Y X, LU Q L, LI P Y, et al. Xianglian Pill attenuates ulcerative colitis through TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2023, 300: 115690.
- [15] 吴冬芝, 吴柯楠, 程雯, 等. 固肠止泻丸对溃疡性结肠炎小鼠的治疗作用研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2022, 42(10): 1626-1631.
- [16] 方震, 杨雪, 蔺晓源, 等. 溃疡性结肠炎的中西医治疗研究进展[J]. *湖南中医杂志*, 2021, 37(12): 181-183.
- [17] 王海萍. 清热化湿饮联合针刺治疗溃疡性结肠炎临床疗效及对血清炎症因子的影响[J]. *湖北中医药大学学报*, 2020, 22(2): 78-80.
- [18] 李多, 彭昭, 张泽天, 等. 复方黄柏液通过PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B信号通路逆转大鼠溃疡性结肠炎[J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(9): 2241-2244.
- [19] 刘雯, 侯晨辉, 李江. 芩柏汤通过调节TLR2/I $\kappa$ B- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ 通路保护溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜的研究[J]. *中成药*, 2022, 44(8): 2659-2663.
- [20] 肖超, 王真权. 复方芩柏汤对溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜屏障的影响[J]. *湖南中医杂志*, 2017, 33(7): 170-172.
- [21] GAO X, LI J, PANG X P, et al. Animal models and pathogenesis of ulcerative colitis[J]. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2022, 2022: 5927384.
- [22] NIESS J H, HRUZ P, KAYMAK T. The interleukin-20 cytokines in intestinal diseases[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 1373.
- [23] ALGHOUL Z, SUNG J, WU K J, et al. Preparation and characterization of IL-22 mRNA-loaded lipid nanoparticles[J]. *Bio-protocol*, 2023, 13(7): e4647.
- [24] MAR J S, OTA N, POKORZYNSKI N D, et al. IL-22 alters gut microbiota composition and function to increase aryl hydrocarbon receptor activity in mice and humans[J]. *Microbiome*, 2023, 11(1): 47.
- [25] LINDEMANS C A, CALAFIORE M, MERTELSMANN A M, et al. Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration[J]. *Nature*, 2015, 528(7583): 560-564.
- [26] MONIRUZZAMAN M, WANG R, JEET V, et al. Interleukin (IL)-22 from IL-20 subfamily of cytokines induces colonic epithelial cell proliferation predominantly through ERK1/2 pathway[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(14): 3468.
- [27] CHEN Z J, HAO W, GAO C F, et al. A polyphenol-assisted IL-10 mRNA delivery system for ulcerative colitis[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2022, 12(8): 3367-3382.
- [28] YE M, JOOSSE M E, LIU L, et al. Deletion of IL-6 exacerbates colitis and induces systemic inflammation in IL-10-deficient mice[J]. *Journal of Crohn's & Colitis*, 2020, 14(6): 831-840.
- [29] LI Y Y, WANG X J, SU Y L, et al. Baicalein ameliorates ulcerative colitis by improving intestinal epithelial barrier via AhR/IL-22 pathway in ILC3s[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2022, 43(6): 1495-1507.