

本文引用: 李前昆, 邹巍莹, 宾东华, 余 炼. 基于 ERK/JNK 通路探究参苓白术散对克罗恩病大鼠结肠黏膜氧化应激的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(6): 1000-1007.

基于 ERK/JNK 通路探究参苓白术散对克罗恩病大鼠结肠黏膜氧化应激的影响

李前昆¹, 邹巍莹², 宾东华^{3*}, 余 炼^{1*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 江华瑶族自治县人民医院, 湖南 永州 425500;

3. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

[摘要] **目的** 探究参苓白术散通过调节细胞外信号调节蛋白激酶/c-Jun(ERK/JNK)氨基末端激酶(ERK/JNK)通路影响克罗恩病(CD)大鼠结肠炎性表达及氧化应激的机制。**方法** 采用随机法将 60 只 SD 大鼠均分为空白组(CG 组)、模型组(M 组)、美沙拉秦组(MG 组)及参苓白术散高、中、低剂量组(SLZ-H、SLZ-M、SLZ-L 组)。使用 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)灌肠液诱导 CD 模型,造模成功后各组给予相应差异处理。监测每组大鼠在用药期间的体重变化,14 d 后进行结肠组织病理学观察及黏膜损伤指数(CMDI)评分,ELISA 检测 C 反应蛋白(CRP)、白细胞介素(IL)-2、IL-8、白蛋白(ALB)、血红蛋白(Hb)、 γ -干扰素(INF- γ)的含量;DHE-荧光法检测活性氧(ROS)的含量;Western blot 法检测结肠黏膜组织中 JNK、磷酸化 JNK(p-JNK)、ERK1/2、磷酸化 ERK1/2(p-ERK1/2)蛋白表达水平。**结果** 与 CG 组比较,M 组大鼠 CMDI 评分明显升高($P<0.01$),血清中 INF- γ 、IL-2、IL-8、CRP 水平显著升高($P<0.01$),ALB、Hb 水平明显下降($P<0.01$),结肠组织中 ROS 水平明显升高($P<0.01$),JNK、p-JNK、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达显著升高($P<0.01$);与 M 组相比,MG 组及 SLZ-H 组、SLZ-M 组 CMDI 评分显著降低($P<0.01$),SLZ-H 组 INF- γ 、IL-2、IL-8、CRP 水平明显下降($P<0.01$),ALB、Hb 水平显著上升($P<0.01$),SLZ-M 组 INF- γ 、IL-2 水平明显下降($P<0.01$),MG 组 Hb 水平显著上升($P<0.01$),MG、SLZ 各剂量组 JNK、p-ERK1/2 蛋白表达明显降低($P<0.01$),SLZ-H 组、SLZ-M 组 p-JNK、ERK1/2 蛋白表达显著降低($P<0.01$);与 MG 组对比,SLZ-L 组 CMDI 评分升高($P<0.05$),SLZ-H 组 IL-2 明显下降($P<0.01$),IL-8 和 ROS 水平降低($P<0.05$),p-JNK、p-ERK1/2 蛋白水平显著降低($P<0.01$),JNK、ERK1/2 蛋白表达降低($P<0.05$),SLZ-M 组 p-ERK1/2 降低($P<0.05$)。**结论** 参苓白术散可抑制肠道氧化应激反应,以此缓解 CD 大鼠肠道炎症,其作用机制可能是通过对 ERK/JNK 通路的抑制作用,削减 ROS 生成量,减少 INF- γ 、IL-2、IL-8 等炎症因子的释放,促使 CRP 水平降低,提升 ALB 与 Hb 水平。

[关键词] 克罗恩病;参苓白术散;炎症因子;活性氧;细胞外信号调节蛋白激酶/c-Jun 氨基末端激酶

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.06.002

Effects of Shenling Baizhu Powder on colonic oxidative stress in rats with Crohn's disease based on ERK/JNK pathway

LI Qiankun¹, ZOU Weiyang², BIN Donghua^{3*}, YU Lian^{1*}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Jianghua Yao Autonomous County People's Hospital, Yongzhou, Hunan 425500, China; 3. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism by which Shenling Baizhu Powder (SLBZP) affects colonic inflammatory

[收稿日期]2025-03-14

[基金项目]湖南省自然科学基金高校联合基金项目(2025JJ90101);湖南省教育厅科学研究重点项目(24A0275)。

[通信作者]* 余 炼,男,硕士,副教授,E-mail:yulian@hnuem.edu.cn;宾东华,男,博士,主任医师,副教授,E-mail:bindonghua@163.com。

expression and oxidative stress in rats with Crohn's disease (CD) by regulating the extracellular signal-regulated kinase/c-Jun N-terminal kinase (ERK/JNK) pathway. **Methods** A total of 60 SD rats were randomly and evenly divided into the blank group (CG group), the model group (M group), the mesalazine group (MG group), and the high-, medium-, and low-dose SLBZP groups (SLBZP-H, SLBZP-M, and SLBZP-L groups). The CD model was induced by enema solution of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) and corresponding treatments were given to each group after successful modeling. The changes in body mass of rats in each group during the medication period were continuously monitored. After 14 days, colonic histopathological observation and colonic mucosal damage index (CMDI) scoring were conducted. ELISA was used to detect the content of C-reactive protein (CRP), interleukin (IL)-2, IL-8, albumin (ALB), hemoglobin (Hb), and interferon- γ (IFN- γ). The content of reactive oxygen species (ROS) was detected by DHE-fluorescence method. The protein expression levels of JNK, phosphorylated JNK (p-JNK), ERK1/2, and phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2) in the intestinal mucosal tissue were measured by Western blot. **Results** Compared with CG group, the CMDI score of M group significantly increased ($P<0.01$), the serum levels of IFN- γ , IL-2, IL-8, and CRP were significantly higher ($P<0.01$), the levels of ALB and Hb significantly decreased ($P<0.01$), the level of ROS in the colonic tissue was significantly elevated ($P<0.01$), and the protein expressions of JNK, p-JNK, ERK1/2, and p-ERK1/2 significantly increased ($P<0.01$). Compared with M group, the CMDI scores of MG, SLBZP-H, and SLBZP-M groups significantly decreased ($P<0.01$); the levels of IFN- γ , IL-2, IL-8, and CRP in SLBZP-H group were significantly reduced ($P<0.01$), while the levels of ALB and Hb significantly increased ($P<0.01$); the levels of IFN- γ and IL-2 in SLBZP-M group decreased significantly ($P<0.01$); the level of Hb in MG group increased significantly ($P<0.01$); the protein expressions of JNK and p-ERK1/2 in MG group and all SLBZP groups were significantly downregulated ($P<0.01$), and the protein expressions of p-JNK and ERK1/2 in SLBZP-H and SLBZP-M groups were significantly reduced ($P<0.01$). Compared with MG group, SLBZP-L group showed an increase in the CMDI score ($P<0.05$), and the IL-2 level was significantly lower ($P<0.01$), the levels of IL-8 and ROS were reduced ($P<0.05$), the protein levels of p-JNK and p-ERK1/2 were significantly diminished ($P<0.01$), and the protein expressions of JNK and ERK1/2 decreased ($P<0.05$); p-ERK1/2 in SLSLBZP-M group was reduced ($P<0.05$). **Conclusion** SLBZP is capable of alleviating the intestinal inflammatory response in CD rats by suppressing the intestinal oxidative stress reaction. Its underlying mechanism of action may involve the inhibition of the ERK/JNK pathway, leading to a reduction in ROS generation, a decrease in the release of inflammatory cytokines such as IFN- γ , IL-2, and IL-8, a lowering of the CRP level, and an elevation in the levels of ALB and Hb.

[**Keywords**] Crohn's disease; Shenling Baizhu Powder; inflammatory factors; reactive oxygen species; extracellular signal-regulated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase

克罗恩病(Crohn's disease, CD)是炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的主要类型之一,是一种慢性肠道炎症性疾病,其特征是透壁性炎症和沿整个胃肠道的可变不对称节段性受累^[1]。CD主要症状包括疲劳、发热、腹痛、腹泻和体质量减轻,少数患者最初会出现肠狭窄、脓肿或瘘管等并发症^[2]。目前,CD的治疗手段以抗生素、生物制剂、免疫抑制剂等药物结合手术治疗为主,存在复发率高、不良反应大、费用高昂等问题^[3]。

研究发现,c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)和细胞外信号调节蛋白激酶1/2(extracellular signal-regulated protein kinase1/2, ERK1/2)是丝裂原活化蛋白激酶信号通路(MAPK 信号通路)的关键节点之一,ERK1/2 和 JNK 参与调控细胞生长、凋亡及肠道炎症反应等^[4]。结肠中异常高水平的活性氧(reactive oxygen species, ROS)诱导的氧化应

激是 IBD 的特征和致病因素,同时消除过量的 ROS,能有效减少细胞氧化应激反应,并减少促炎因子的表达,从而有效缓解 IBD 炎症^[5]。

参苓白术散对于炎症性肠病有良好的治疗效果,本课题组致力于研究参苓白术散缓解 CD 患者肠道炎症的作用机制,已证明参苓白术散可以下调 CD 模型大鼠炎症因子水平,同时能促进 CD 大鼠结肠黏膜屏障功能的修复,有效缓解 CD 大鼠结肠黏膜屏障损伤^[6-9]。研究表明,参苓白术散及其有效成分可以显著降低结肠炎小鼠血清和结肠中肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 和 IL-6 炎症因子的水平,提高 IL-10 的水平,从而减轻结肠组织学损伤^[9]。

因此,本研究通过构建 CD 大鼠模型,以 ERK/JNK 通路为切入点,深入研究参苓白术散对 CD 大鼠结肠黏膜状况以及氧化应激水平的作用效果,从

而为临床运用参苓白术散治疗 CD 提供有力的实验依据与支撑。

1 材料

1.1 动物

60 只雌雄各半 SPF 级 SD 大鼠, 体质量 180~200 g, 取材自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 实验动物许可证编号 SCXK(湘)2019-0004。动物饲养于湖南中医药大学第一附属医院实验中心, 在饲养温度 24~26 ℃, 相对湿度 50%~70% 环境下适应性喂养 3 d, 自由摄食饮水, 实验方案符合湖南中医药大学第一附属医院动物伦理委员会标准(伦理委员会审查编号 ZYFY20220220-01)。

1.2 药品与试剂

以原方为基础, 组成: 山药 15 g, 白术 15 g, 茯苓 15 g, 人参 15 g, 白扁豆 12 g, 薏苡仁 9 g, 甘草 10 g, 莲子 9 g, 砂仁 6 g, 桔梗 6 g^[10]。以上所有药材均购自湖南中医药大学第一附属医院门诊药房(四川新绿色药业科技发展有限公司, 批号 0143431907); 美沙拉秦颗粒(国药准字 H20143164, 规格: 500 mg×10 袋); 4% 多聚甲醛(北京白鲨易科技有限公司, 批号: BL539A); 苏木精-伊红染色液(广州维格斯生物科技有限公司, 规格: 2 500 mL, 批号 3110200531102007); 2,4,6-三硝基苯磺酸(three nitrobenzene sulfonic acid, TNBS)(批号: P2297)、戊巴比妥钠(批号: P3761)均购自美国 Sigma 公司; γ -干扰素(interferon- γ , INF- γ)、IL-2、IL-8、C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、白蛋白(Albumin, ALB)、血红蛋白(Hemoglobin, Hb)试剂盒(厦门仑昌硕生物科技有限公司, 批号分别为 ED30173、ED30208、ED30221、ED30078、ED30183、ED30924); 抗荧光淬灭封片剂(谷歌生物科技有限公司, 批号: G1401); 冰冻切片活性氧检测试剂盒(DHE 探针)(北京百奥莱博科技有限公司, 批号: HR9069); JNK(美国 FAB Industries 公司, 批号: Fab7873); p-JNK、p-ERK1/2、ERK1/2、GAPDH(美国 ProteoTech 公司, 批号分别为 80024-1-RR、80031-1-RR、11257-1-AP、60004-1-Ig)。

1.3 仪器

酶标仪(厦门仑昌硕生物科技, 型号: Rayto RT-6100); 生物组织摊烤片机(武汉俊杰电子有限公司, 型号: JK-6); 微量移液器(德国 Eppendorf AG 公司, 型号: Q37553); 高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器, 型号: H2100R); 冰冻切片机(美国 Thermo

Fisher Scientific 公司, 型号: Cryotome E); 荧光显微镜(日本尼康, 型号: Nikon Eclipse Ti-SR); 双垂直电泳仪(北京六一生物科技有限公司, 型号: DY-CZ-24DN); 快速转膜仪(金斯瑞生物科技股份有限公司, 型号: eBlotTML1); 水平脱色摇床(海门其林贝尔制造商, 型号: TS-8)。

2 方法

2.1 参苓白术散药液的制备

参照《方剂学》^[10]中参苓白术散的组方, 生药量共 112 g, 用 8 倍水浸泡生药 30 min 后使用大火熬煮, 待煮沸后, 转文火慢煎 30 min, 后用纱布去渣留液, 取 6 倍蒸馏水再次煎煮, 用水浴锅混合并浓缩至 2.94 g/mL, 存于 4 ℃ 冰箱备用。

2.2 CD 大鼠模型的制备

参考 MORRIS 等^[11]的造模方法, 将 5% TNBS 与 50% 乙醇按 1:1 比例混合成 TNBS 灌肠液, 使用 TNBS 灌肠液 3 mL/kg(含 TNBS 80 mg/kg) 灌肠制备 CD 模型, 造模前禁食处理, 将大鼠经腹麻醉(2% 戊巴比妥钠)后倒置, 润滑肠管, 以 TNBS 灌肠液灌肠后倒置 1 min 促进 TNBS 吸收。14 d 周期内共灌肠 2 次, 造模成功后随机每组抽取 2 只大鼠处死, 取自肛门处向上结肠(15±2) cm 段, 沿纵轴剪开, 常规浸泡冲洗, 依据大鼠结肠黏膜充血水肿、肠壁增厚程度或有溃疡程度判断是否造模成功。

2.3 动物分组及给药

60 只 SD 大鼠依照随机数字表分为空白组(CG 组)及造模组(1:5), CG 组大鼠用同体积灭菌用水行上述灌肠操作, 再将造模组同上述操作分为模型组(M 组)、美沙拉秦组(MG 组)及参苓白术散高、中、低剂量组(SLZ-H、SLZ-M、SLZ-L 组), 每组 10 只, 经随机处死后, 每组剩 8 只。各药均以灭菌用水作溶剂配制, 用药剂量折算以大鼠体表面积换算公式为计算标准, 大鼠每日给药剂量=[成人临床剂量×6.3(人与大鼠体表面积折算系数)/成人体质量(60 kg)]^[7]。所有大鼠均无限制饮食, 造模成功后定期灌胃给药, 综合给药剂量如下: MG 组, 美沙拉秦药液(0.21 g·kg⁻¹)灌胃; SLZ-H、SLZ-M、SLZ-L 组, 参苓白术散药液(5.88、11.76、23.52 g·kg⁻¹)灌胃; CG 组与 M 组均通过相同方式给予等体积的灭菌水, 每日进行 1 次操作, 持续 14 d。

2.4 实验指标检测

2.4.1 一般情况观察及结肠黏膜损伤指数(colon injury morphology index, CMDI)评分 观察各组大鼠

是否有食纳量减少、大便习惯及性状改变、体质量减轻等情况。依据 BUTZNER 等^[12]提出的标准观察有无上述表现及治疗后情况是否改善,并根据取材后大鼠结肠黏膜损伤程度、有无溃疡等进行 CMDI 评分,每组取 6 只大鼠进行检测,具体评分标准如下^[12]:依据形态学改变特征,黏膜完整为 0 分;黏膜仅存在轻度充血水肿为 1 分;肠黏膜充血水肿伴糜烂为 2 分;黏膜高度充血水肿,主要溃疡面积<40%为 3 分;肠管与周围组织有粘连,主要溃疡面积>40%为 4 分。

2.4.2 HE 染色 取各组大鼠结肠组织,经选用石蜡固定,进一步脱水后切成 4 μm 厚度的连续切片,再经干燥、脱蜡,二甲苯暴露清晰视野并封片。封片后,在光学显微镜下观察结肠组织的病理变化。

2.4.3 ELISA 检测 使用双抗体夹心法,每组取 6 只大鼠,抗体包被于酶标板上,抗体与复合物结合,洗去表面杂质,再加入辣根过氧化物酶标记的抗体,最终形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,洗去游离试剂成分,加入显色底物,用酶标仪在 450 nm 波长处测光密度(optical density, OD)值,大鼠炎症因子浓度与该值之间成正比,通过绘制标准曲线计算出样品中炎症因子的浓度。

2.4.4 二氢乙锭(dihydroethidium, DHE)-荧光探针 每组取 6 只大鼠结肠组织,将细胞按“2.3”实验部分分组,分别向各组细胞中加入适量体积的 DHE(终浓度 5 $\mu\text{mol/L}$),放回 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱避光孵育 20 min。孵育完成后,使用荧光显微镜在 500 $\mu\text{m}\times$ 500 μm 的视野范围内观察并拍摄各组细胞的荧光图像,通过 ImageJ 软件定量分析,计算相对荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)以评估 ROS 水平。

2.4.5 Western blot 检测 每组剪取 6 只大鼠等量结肠组织,经研磨,PBS 洗涤,RIPA 裂解后离心 30 min, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ (离心半径 8.6 cm)、4 $^{\circ}\text{C}$ 取上清液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,用酶标仪测定,检测 JNK、p-JNK、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白含量,本研究采用 ImageJ 软件对实验结果进行分析,以 GAPDH 表达水平作为内参,通过计算目标蛋白与内参的灰度值比值,以及磷酸化蛋白水平与总蛋白水平的灰度值比值变化来确定各蛋白的相对表达水平。

2.5 统计学分析

运用 SPSS 27.0 统计软件对数据进行分析分析,其中计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。满足正态性与方差

齐性的多组间均数,采用单因素方差分析(One-way ANOVA),在组间两两比较运用 LSD 检验;若不满足正态性条件,则采用 Kruskal-Wallis H 检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况观察及 CMDI 评分

CG 组大鼠在研究期间整体活动度及饮食正常,排出颗粒样粪便。造模后的第 1 天,M 组、MG 组以及 SLZ 各剂量组均出现稀便的迹象,其进食量与活动功能相较于之前均有所减少,在进行第二次灌肠操作后,相关症状表现更为严重。当给药持续 14 d 后,M 组大鼠的体质量与 CG 组相比明显降低,活动能力也显著减弱,稀便成为普遍现象,并且有少量大鼠还同时出现了便血以及黏液便的情况。相较于 M 组,MG 组以及 SLZ 的各剂量组大鼠在体质量方面,于造模后均呈现出不同程度的上升态势,其大便形态基本成形,仅在个别大鼠身上出现少量便血情况,且未发现明显的黏液便。对大鼠结肠组织展开解剖观察,并进行 CMDI 评分。与 CG 组对比,M 组的 CMDI 评分出现显著升高($P<0.01$);与 M 组相比,MG 组以及 SLZ-H、SLZ-M 组的 CMDI 评分则有明显的降低($P<0.01$);与 MG 组对比,SLZ-L 组的 CMDI 评分有所提高($P<0.05$)。详见表 1。

表 1 SLZ 对克罗恩病大鼠 CMDI 评分的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Effects of Shenling baizhu Powder on CMDI score of Crohn's disease rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	CMDI 评分/分
CG 组	—	0
M 组	—	3.39 \pm 0.32**
MG 组	0.21	1.99 \pm 0.29 $^{\Delta\Delta}$
SLZ-H 组	23.52	1.33 \pm 0.32 $^{\Delta\Delta}$
SLZ-M 组	11.76	1.62 \pm 0.25 $^{\Delta\Delta}$
SLZ-L 组	5.88	2.18 \pm 0.32 $^{\#}$

注:与 CG 组比较,** $P<0.01$;与 M 组比较, $^{\Delta\Delta}P<0.01$;与 MG 组比较, $^{\#}P<0.05$ 。

3.2 参苓白术散对 CD 大鼠结肠组织病理形态的影响

CG 组的结肠黏膜结构在形态方面未出现显著的改变情况。与 CG 组进行对照,M 组结肠组织镜下可见轻度的黏膜上皮脱落及腺体坏死,同时伴有黏膜下层明显水肿、大量炎症细胞浸润。各个用药组的

黏膜损伤程度较 M 组都有明显的减轻, MG 组的部分充血水肿现象主要存在于黏膜层, 镜下见部分腺体萎缩, 少量炎症细胞浸润; SLZ-L 剂量组可见明显充血水肿情况, 且存在少量炎症细胞浸润; SLZ-M 组仅有部分区域能够观察到炎症反应, 大部分区域呈现正常结构; SLZ-H 组绝大部分黏膜结构保持完好, 仅有轻微的炎症反应存在。详见图 1。

3.3 参苓白术散对 CD 大鼠血清中 IFN- γ 、IL-2、IL-8、CRP、ALB、Hb 水平表达的影响

与 CG 组比较, M 组大鼠血清中 IL-2、IL-8、CRP、IFN- γ 水平显著升高 ($P<0.01$), ALB、Hb 水平明显下降 ($P<0.01$); SLZ-L 组中 CRP、IFN- γ 、IL-2 水

平升高 ($P<0.01$), ALB 水平下降 ($P<0.01$); SLZ-M 组中 CRP 水平升高 ($P<0.01$), Hb 水平下降 ($P<0.01$)。与 M 组比较, SLZ-H 组的 IFN- γ 、IL-2、IL-8 以及 CRP 水平均呈下降态势 ($P<0.01$), 而 ALB、Hb 水平显著上升 ($P<0.01$); SLZ-M 组 IFN- γ 、IL-2 水平明显下降 ($P<0.01$), MG 组 Hb 水平显著上升 ($P<0.01$)。与 MG 组对比, SLZ-H 组 IL-2 明显下降 ($P<0.01$), IL-8 水平下降 ($P<0.05$)。详见表 2。

3.4 对 CD 大鼠结肠组织中 ROS 水平表达的影响

与空白组比较, MG 组、M 组大鼠结肠组织中 ROS 水平明显升高 ($P<0.01$); 与 MG 比较, SLZ-H 组 ROS 水平降低 ($P<0.05$)。详见图 2、表 3。

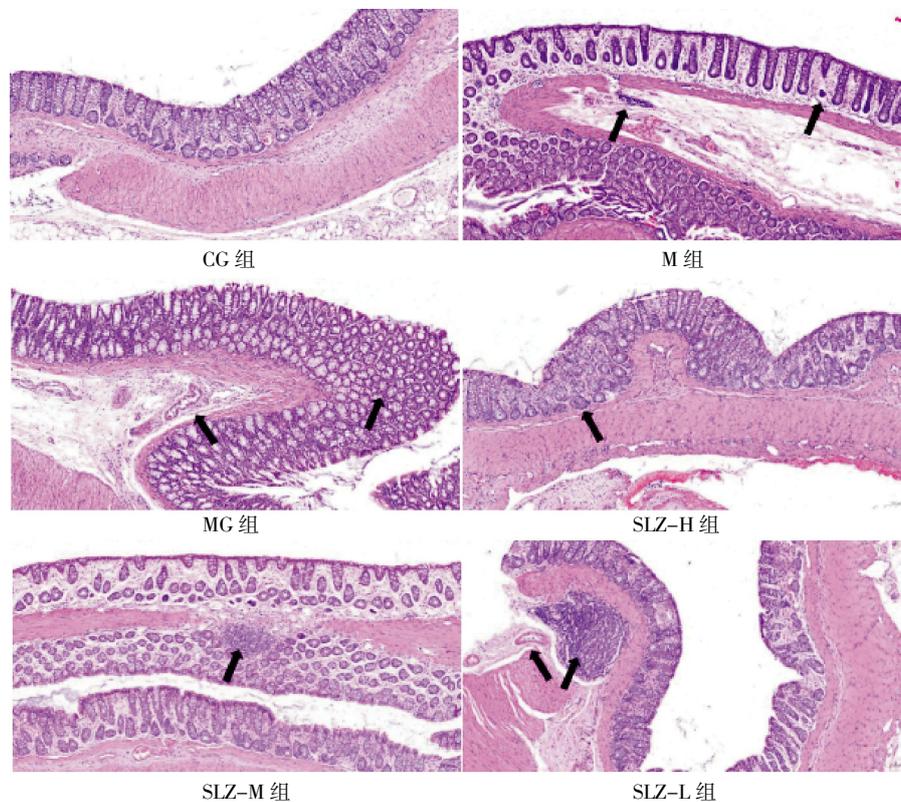


图 1 各组大鼠结肠病理图(HE, $\times 100$)

Fig.1 Pathological images of rat colon in each group (HE, $\times 100$)

表 2 各组大鼠血清中 IFN- γ 、IL-2、IL-8、CRP、ALB、Hb 的水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Serum levels of IFN- γ , IL-2, IL-8, CRP, ALB and Hb in each group of rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IFN- γ /(pg·mL ⁻¹)	IL-2/(pg·mL ⁻¹)	IL-8/(pg·mL ⁻¹)	CRP/(pg·mL ⁻¹)	ALB/(pg·mL ⁻¹)	Hb/(pg·mL ⁻¹)
CG 组	—	1 022.57 \pm 146.21	785.33 \pm 89.74	153.12 \pm 4.45	996.16 \pm 157.65	67.60 \pm 9.30	285.72 \pm 23.99
M 组	—	2 053.09 \pm 75.51**	1 175.75 \pm 19.49**	206.81 \pm 26.80**	1 937.58 \pm 383.50**	37.54 \pm 15.00**	117.60 \pm 3.71**
MG 组	0.21	1 529.40 \pm 85.76	994.88 \pm 40.21	161.84 \pm 5.66	1 424.17 \pm 237.63	59.79 \pm 4.48	246.59 \pm 26.99 ^{△△}
SLZ-H 组	23.52	1 085.15 \pm 138.84 ^{△△}	680.99 \pm 126.87 ^{△△#}	138.65 \pm 7.18 ^{△△#}	1 095.46 \pm 47.94 ^{△△}	69.24 \pm 5.73 ^{△△}	276.77 \pm 4.00 ^{△△}
SLZ-M 组	11.76	1 413.91 \pm 176.96 ^{△△}	859.68 \pm 103.92 ^{△△}	177.54 \pm 10.05	1 610.87 \pm 213.21**	55.36 \pm 8.73	194.77 \pm 21.84**
SLZ-L 组	5.88	1 696.78 \pm 39.70*	1 072.29 \pm 127.37**	179.29 \pm 17.20	1 697.7 \pm 220.54**	51.67 \pm 2.17**	204.21 \pm 34.11

注:与 CG 组比较, ** $P<0.01$;与 M 组比较, ^{△△} $P<0.01$;与 MG 组比较, # $P<0.05$, #[△] $P<0.01$ 。

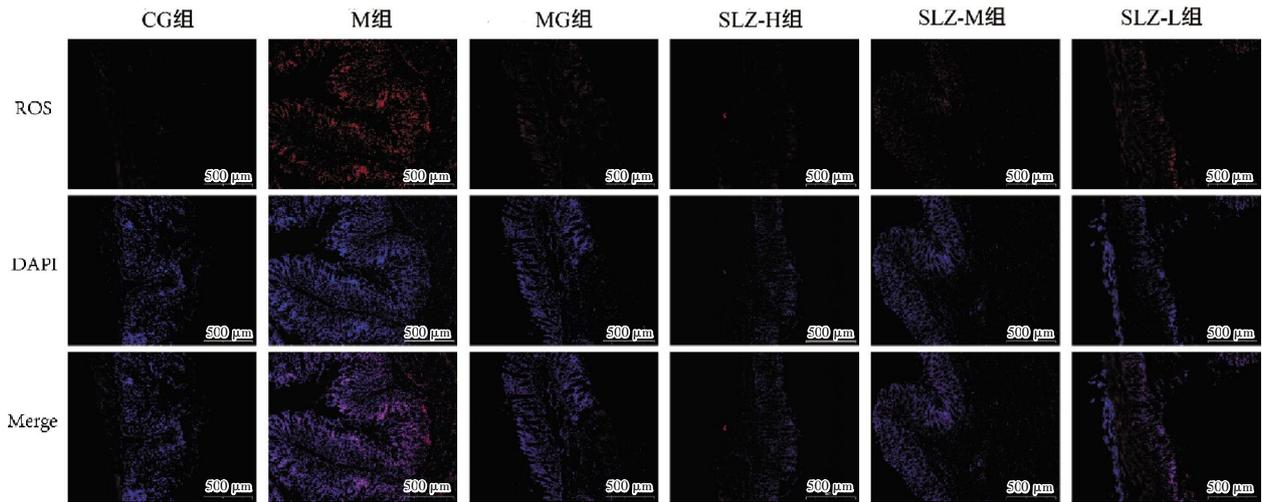


图 2 各组大鼠结肠组织 ROS 含量比较(DHE 染色, ×100)

Fig.2 ROS content of rat colon tissue in each group (DHE staining, ×100)

表 3 各组大鼠结肠组织 ROS 含量比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 ROS content of rat colon tissue in each group ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	ROS/MFI
CG 组	—	18.58±1.57
M 组	—	25.64±8.71**
MG 组	0.21	23.67±2.7**
SLZ-H 组	23.52	20.51±3.11 [#]
SLZ-M 组	11.76	21.45±3.85
SLZ-L 组	5.88	24.33±8.11

注:与 CG 组比较,** $P<0.01$;与 MG 组比较,[#] $P<0.05$ 。

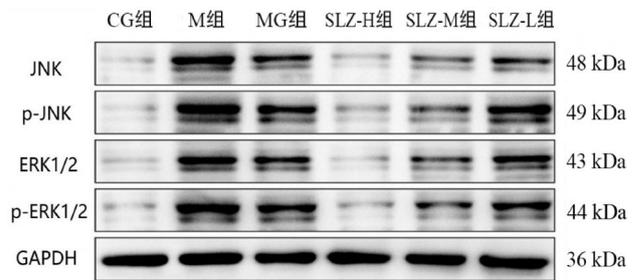


图 3 各组大鼠结肠组织 JNK、p-JNK、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达电泳图

Fig.3 Electrophoresis of JNK, p-JNK, ERK1/2, and p-ERK1/2 protein expressions in rat colon tissue in each group

3.5 对 CD 大鼠结肠上皮组织 JNK、p-JNK、ERK1/2、p-ERK1/2 表达的影响

相较于 CG 组,M 组、MG 组、SLZ-L 组的 JNK、p-JNK、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达均显著上升($P<0.01$),且 SLZ-M 组的 p-ERK1/2 蛋白表达也显著升高($P<0.01$);与 M 组相比,MG 组、SLZ-H 组、

SLZ-M 组、SLZ-L 组的 JNK、p-ERK1/2 蛋白表达明显下降($P<0.01$),SLZ-H 组、SLZ-M 组的 p-JNK、ERK1/2 蛋白表达显著降低($P<0.01$)。与 MG 组对比,SLZ-H 组 p-JNK、p-ERK1/2 蛋白水平显著降低($P<0.01$),JNK、ERK1/2 蛋白表达降低($P<0.05$);SLZ-M 组 p-ERK1/2 降低($P<0.05$)。详见图 3、表 4。

表 4 SLZ 对各组大鼠结肠上皮组织 JNK、p-JNK、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白相对表达量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effects of SLBZP on the relative expression levels of JNK, p-JNK, ERK1/2, and p-ERK1/2 proteins in the rat colonic epithelial tissue in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	JNK/GAPDH	p-JNK/JNK	ERK1/2/GAPDH	p-ERK1/2/ERK1/2
CG 组	—	1 269.94±465.32	0.125 4±0.041 0	813.55±283.11	0.164 5±0.031 9
M 组	—	3 102.65±377.22**	0.928 9±0.092 8**	3 301.18±368.41**	1.060 0±0.032 8**
MG 组	0.21	1 986.91±228.06** ^{△△}	0.654 6±0.073 3**	2 359.75±370.24**	0.647 2±0.050 6** ^{△△}
SLZ-H 组	23.52	1 397.51±330.84 ^{△△#}	0.166 0±0.055 8 ^{△△##}	1 129.35±387.98 ^{△△#}	0.232 6±0.043 0 ^{△△##}
SLZ-M 组	11.76	1 626.14±242.28 ^{△△}	0.438 5±0.084 2 ^{△△}	1 930.46±181.12 ^{△△}	0.504 6±0.050 3** ^{△△#}
SLZ-L 组	5.88	1 838.22±291.58** ^{△△}	0.750 7±0.116 8**	2 563.77±349.27**	0.849 9±0.180 3** ^{△△}

注:与 CG 组比较,** $P<0.01$;与 M 组比较,^{△△} $P<0.01$;与 MG 组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

4 讨论

CD 是一种病因不明的反复发作性的肠道黏膜慢性炎症,可以影响全消化道,常见症状有腹泻、腹痛、体质量减轻、发热、肠道出血等^[13]。中医难以用一个病名概括 CD,据其临床表现可“肠痛”“腹痛”“便血”“痢疾”“痔漏”“虚劳”等^[14]。CD 的演变是由炎症反应的复杂改变介导的,其特征是肠黏膜屏障先天免疫的改变^[15]。

《太平惠民和剂局方·卷三·治脾胃虚弱泄泻方》^[16]中云参苓白术散:莲子肉(去皮)、薏苡仁、缩砂仁、桔梗(炒至深黄色)各一斤,白扁豆(姜汁浸,去皮,微炒)一斤半,白茯苓、人参(去芦)、甘草(炒)、白术、山药(各)二斤。方中人参、白术相合,大补脾气;茯苓、白术相合,清肠道之湿;山药平补脾胃;莲子肉甘平而涩、涩肠止泻;白扁豆、薏苡仁佐臣药以淡渗之功;砂仁辛温醒脾、化湿和胃;桔梗宣开肺气、通利水道、载药上行,炙甘草益气和中,调和诸药^[17]。诸药配伍,补脾培中、淡渗利湿、补泻兼施、补而不滞。

目前认为,氧化应激是 IBD 发生、进展和严重程度的关键因素,而 ROS 生成增加和抗氧化活性降低则是 IBD 的主要发病机制^[18]。BALUMUS 等^[19]研究表明,氧化应激与 IBD 活动有关,并且 ROS 产生的主要部位是被大量白细胞浸润吞噬产生的炎症性黏膜。ROS 的过度形成会导致氧化还原稳态被破坏,进而导致氧化应激对黏膜的损伤^[20]。目前研究还发现在 CD 患者中,IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 的黏膜水平显著高于空白组^[21]。T Helper 1 细胞因子(IFN- γ 和 IL-2)基因内单核苷酸多态性的基因型与 IBD、CD 和 UC 显著相关;而 IFN- γ 是过度免疫反应的主要驱动因素,可导致肠黏膜损伤,并促成 CD 发病^[22-23]。本研究结果发现,SLZ-H 组 IFN- γ 、IL-2、IL-8 促炎因子水平较 M 组显著下降,表明参苓白术散能下调 CD 大鼠促炎因子 IFN- γ 、IL-2、IL-8 的表达,减轻 CD 大鼠肠道氧化应激及炎症反应。

ERK 是高度特异性三层激酶级联中的效应激酶,在细胞周期进程、存活和分化过程中起着关键作用^[24]。JNK 也是 MAPK 家族的成员之一,主要介导真核细胞对各种非生物和生物应激损伤的反应^[25]。JNK 可以通过与硫氧还蛋白和谷二氧还蛋白等氧化还原活性蛋白的相互作用而被 ROS 激活^[26]。马齿苋提取物及其活性化合物通过抑制 DSS 诱发的结肠炎小鼠的促炎性细胞因子(TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β)的产生改善炎症性肠疾病,抑制 ERK、JNK 和 p38 表达的

磷酸化^[27]。研究发现,减少 TNF- α 、IL-1 β 、p-JNK、p-ERK 等炎症细胞因子群的释放可能与 MAPK 的 COX2/p38/JNK/ERK/I κ B- α /NF- κ B 炎症通道发挥抗炎作用有关^[28]。然而尚未有研究证明参苓白术散是否通过上述通道抑制 CD 患者肠道炎症反应。本研究表明,SLZ-H 组、SLZ-M 组大鼠 JNK、p-JNK、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达较 M 组明显降低。

CRP 是检测和随访 CD 疾病活动度的重要标志物,在机体发生炎症时,CRP/ALB 比值水平对 IBD 疾病活动性敏感,可用于 UC 和 CD 疾病活动性的评估^[29-30]。本研究表明,M 组 CRP 水平较 CG 组显著升高,ALB、Hb 水平较 CG 组明显下降。而 SLZ-H 组相较 M 组 CRP 水平明显下降,ALB、Hb 水平显著上升。

本研究结果提示,完成给药周期后,CD 大鼠出现明显肠道炎症反应,M 组大鼠的体质量与 CG 组相比明显降低,稀便成为普遍现象,并且有少量大鼠出现黏液血便的情况。M 组结肠组织镜下可见轻度的黏膜上皮脱落及腺体坏死,同时伴有黏膜下层明显水肿、大量炎症细胞浸润。MG 组以及 SLZ 各剂量组大鼠在体质量方面,于造模后较 M 组均呈现出不同程度的上升态势,且仅部分大鼠可见少量便血,未发现明显的黏液便。与 CG 组比较,M 组大鼠血清中 IL-2、IL-8、CRP、IFN- γ 水平显著升高,ALB、Hb 水平明显下降。相较于 CG 组,M 组、MG 组、SLZ-L 组的 JNK、p-JNK、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达均显著上升,且 SLZ-M 组的 p-ERK1/2 蛋白表达也显著升高。

综上,参苓白术散能下调 CD 大鼠促炎因子 IFN- γ 、IL-2、IL-8 的表达,降低 CRP、ALB、Hb 水平,减轻 CD 大鼠肠道氧化应激及炎症反应,抑制 JNK、p-JNK、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达,有效缓解 CD 大鼠肠道炎症,其机制可能与抑制 ERK/JNK 信号通路表达有关。本次实验样本量小,抗氧化涉及信号通路较多,仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] SLEIMAN J, EL OUALI S, QAZI T, et al. Prevention and treatment of stricturing Crohn's disease—perspectives and challenges[J]. Expert Review of Gastroenterology & Hepatology, 2021, 15(4): 401-411.
- [2] CUSHING K, HIGGINS P D R. Management of crohn disease: A review[J]. JAMA, 2021, 325(1): 69-80.
- [3] 陶 冉, 黄晓琳, 龚恬韵, 等. 克罗恩病肛瘘中医药治疗研究进展. 陕西中医, 2022, 43(5): 666-669.
- [4] 李 雪. 高脂饮食促进小鼠结肠炎的机理及维生素 D 及其类似物的抑制作用的研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2020.

- [5] AMATYA N, GARG A V, GAFFEN S L. IL-17 signaling: The Yin and the Yang[J]. *Trends in Immunology*, 2017, 38(5): 310-322.
- [6] MA Y N, ZHAO J J, CHENG L L, et al. Versatile carbon dots with superoxide dismutase-like nanozyme activity and red fluorescence for inflammatory bowel disease therapeutics[J]. *Carbon*, 2023, 204: 526-537.
- [7] 李前昆, 宾东华. 参苓白术散对克罗恩病大鼠炎症因子 IL-1 β 、IL-1、IL-17C、IL-10 及 IL-4 的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(8): 1361-1367.
- [8] 邹巍莹, 刘 密, 余 炼, 等. 参苓白术散对克罗恩病大鼠肠黏膜屏障的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(11): 2034-2040.
- [9] QU Q, LI S P, DONG Q, et al. Transcriptome profiling Revealed the potential mechanisms of Shen Lin Bai Zhu San n-butanol extract on DSS induced Colitis in Mice and LC-MS analysis[J]. *Phytomedicine*, 2023, 110: 154645.
- [10] 李 冀. 方剂学[M]. 新世纪2版. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 123.
- [11] MORRIS G P, BECK P L, HERRIDGE M S, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon[J]. *Gastroenterology*, 1989, 96(3): 795-803.
- [12] BUTZNER J D, PARMAR R, BELL C J, et al. Butyrate Enema therapy stimulates mucosal repair in experimental colitis in the rat[J]. *Gut*, 1996, 38(4): 568-573.
- [13] GAJENDRAN M, LOGANATHAN P, CATINELLA A P, et al. A comprehensive review and update on Crohn's disease[J]. *Disease-a-Month*, 2018, 64(2): 20-57.
- [14] 赵延华, 赵智强. 略论克罗恩病的中医认识[J]. *南京中医药大学学报*, 2014, 30(5): 410-412.
- [15] PETAGNA L, ANTONELLI A, GANINI C, et al. Pathophysiology of Crohn's disease inflammation and recurrence[J]. *Biology Direct*, 2020, 15(1): 23.
- [16] 太平惠民和剂局. 太平惠民和剂局方[M]. 刘景源, 点校. 北京: 人民卫生出版社, 1985.
- [17] 余 炼, 宾东华, 尹园缘, 等. 从“培土生金, 肺合大肠”角度探析参苓白术散防治炎性肠病思路[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(14): 186-193.
- [18] TIAN T, WANG Z L, ZHANG J H. Pathomechanisms of oxidative stress in inflammatory bowel disease and potential antioxidant therapies[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 2017: 4535194.
- [19] BALMUS I M, CIOBICA A, TRIFAN A, et al. The implications of oxidative stress and antioxidant therapies in Inflammatory Bowel Disease: Clinical aspects and animal models[J]. *Saudi Journal of Gastroenterology*, 2016, 22(1): 3-17.
- [20] LIGUORI I, RUSSO G, CURCIO F, et al. Oxidative stress, aging, and diseases[J]. *Clinical Interventions in Aging*, 2018, 13: 757-772.
- [21] INDARAM A V, VISVALINGAM V, LOCKE M, et al. Mucosal cytokine production in radiation-induced proctosigmoiditis compared with inflammatory bowel disease[J]. *The American Journal of Gastroenterology*, 2000, 95(5): 1221-1225.
- [22] EBRAHIMI DARYANI N, SADR M, SOLTANI S, et al. Association of T helper 1 cytokine gene single nucleotide polymorphisms with ulcerative colitis and Crohn's disease[J]. *Digestive Diseases*, 2019, 37(1): 21-32.
- [23] LEE C S, KIM J E, CHA Y E, et al. IFN- γ -Induced intestinal epithelial cell-type-specific programmed cell death: PANoptosis and its modulation in Crohn's disease[J]. *Frontiers in Immunology*, 2025, 16: 1523984.
- [24] PARK J I. MAPK-ERK pathway[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(11): 9666.
- [25] ZEKE A, MISHEVA M, REMÉNYI A, et al. JNK signaling: Regulation and functions based on complex protein-protein partnerships[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2016, 80(3): 793-835.
- [26] JOMOVA K, RAPTOVA R, ALOMAR S Y, et al. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: Chronic diseases and aging[J]. *Archives of Toxicology*, 2023, 97(10): 2499-2574.
- [27] KIM Y, LIM H J, JANG H J, et al. Portulaca oleracea extracts and their active compounds ameliorate inflammatory bowel diseases in vitro and in vivo by modulating TNF- α , IL-6 and IL-1 β signalling[J]. *Food Research International*, 2018, 106: 335-343.
- [28] 郑 志, 姜林娟, 朱 瑜, 等. 鞣花酸对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠的改善及对 COX2/p38/JNK/ERK/I κ B- α /NF- κ B 和 iNOS/3-NT/CYP2E1 信号通路的作用. *食品与药品*, 2022, 24(4): 295-300.
- [29] VERMEIRE S, VAN ASSCHE G, RUTGEERTS P. C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease[J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2004, 10(5): 661-665.
- [30] 陈佳园, 陈 怡, 陈成帷, 等. 炎性肠病患者 C 反应蛋白/白蛋白比值与疾病活动性的相关性研究. *中国中西医结合消化杂志*, 2022, 30(2): 102-107.

(本文编辑 苏 维)