

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.15.006

芍药苷对溃疡性结肠炎大鼠肠道屏障功能和 ERK 信号通路的影响*

李玉龙 闫春英 吕颐菲 张玲瑞 宗伟[△]

(陕西省人民医院消化内一科 陕西 西安 710068)

摘要 目的:探究芍药苷对溃疡性结肠炎(UC)发生过程中肠道屏障功能和 ERK 信号通路的影响。方法:将 24 只 7-8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为 4 组:正常组(Normal 组,未造模及给药的大鼠)、模型组(Model 组,100 mg/kg TNBS 给药造模)、低剂量芍药苷组(LPF 组,100 mg/kg TNBS+10 mg/kg 芍药苷给药处理)和高剂量芍药苷组(HPF 组,100 mg/kg TNBS+100 mg/kg 芍药苷给药处理),每组 6 只大鼠。对大鼠推注 5%三硝基苯磺酸(TNBS)进行 UC 大鼠造模,然后灌胃指定浓度的芍药苷,连续处理 14 d。通过苏木精伊红(HE)染色进行组织病理学观察,通过阿尔辛蓝(AB)染色计算结肠粘液层厚度。通过 ELISA 法检测结肠组织中细胞因子(IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和 IL-10)、髓过氧化物酶(MPO)和粘蛋白(MUC2 和 MUC5AC)的水平。通过免疫组化检测各组大鼠结肠组织中 IL-6 和 IL-10 的蛋白表达。通过 Western blotting 分析蛋白激酶 C α (PKC α)、p-PKC α 、ERK1/2 和 p-ERK1/2 的蛋白表达。**结果:**与 Model 组(8.38 $\pm$ 0.42 cm)相比,LPF 组(9.88 $\pm$ 0.49 cm)和 HPF 组(10.92 $\pm$ 0.55 cm)UC 大鼠的结肠长度显著增加($P<0.05$)。与 Model 组(22.54 $\pm$ 1.13 μ m)相比,LPF 组(41.07 $\pm$ 2.05 μ m)和 HPF 组(50.33 $\pm$ 2.52 μ m)UC 大鼠结肠粘液层厚度显著增加($P<0.05$)。与 Model 组相比,LPF 组和 HPF 组 UC 大鼠的结肠形态明显改善,结肠组织中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和 MPO 的水平显著降低,而 IL-10 显著升高($P<0.05$)。与 Model 组相比,LPF 组和 HPF 组 UC 大鼠结肠组织中 MUC2 和 MUC5AC 水平均显著升高,p-PKC α 和 p-ERK1/2 的磷酸化水平也显著升高($P<0.05$)。**结论:**芍药苷抑制了 TNBS 诱导的 UC 大鼠结肠炎症并增加了结肠粘液层厚度,从而保护了肠道屏障功能,其机制可能与 ERK 信号通路的激活有关。

关键词: 溃疡性结肠炎;芍药苷;结肠粘液;肠道屏障功能;ERK 信号通路

中图分类号:R285.5;R574.62 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2022)15-2829-07

Effect of Paeoniflorin on the Intestinal Barrier Function and ERK Signal Pathway in Rats with Ulcerative Colitis*

LI Yu-long, YAN Chun-ying, LÜ Yi-fei, ZHANG Ling-rui, ZONG Wei[△]

(Digestive System Department No.1, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of paeoniflorin on the intestinal barrier function and ERK signaling pathway during the occurrence of ulcerative colitis (UC). **Methods:** Twenty-four SPF male Sprague-Dawley (SD) rats aged 7-8 weeks were randomly divided into 4 groups: normal group (Normal group, rats without modeling and administration), TNBS model group (Model group, 100 mg/kg TNBS administration model), low-dose paeoniflorin group (LPF group, 100 mg/kg TNBS + 10 mg/kg paeoniflorin administration treatment), high-dose paeoniflorin group (HPF group, 100 mg/kg TNBS + 100 mg/kg paeoniflorin administration treatment). Each group had 6 rats. Rats were given a bolus injection of 5% trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) for UC modeling, and then the designated concentration of paeoniflorin was intragastrically administered. Continuous treatment for 14 d. Histopathological observation was performed by hematoxylin and eosin (HE) staining, and the thickness of colon mucus layer was calculated by alcian blue (AB) staining. The levels of cytokines (IL-6, IL-1 β , TNF- α and IL-10), myeloperoxidase (MPO) and mucin (MUC2 and MUC5AC) in colon tissue was analyzed by ELISA. The protein expression of IL-6 and IL-10 in the colon tissue of rats in each group was detected by immunohistochemistry. The protein expression of protein kinase C α (PKC α), p-PKC α , ERK1/2 and p-ERK1/2 was analyzed by Western blotting. **Results:** Compared with Model group(8.38 $\pm$ 0.42 cm), the colon length of UC rats in LPF group(9.88 $\pm$ 0.49 cm) and HPF group (10.92 $\pm$ 0.55 cm) increased significantly($P<0.05$). Compared with Model group(22.54 $\pm$ 1.13 μ m), the thickness of the colonic mucus layer of UC rats in LPF group (41.07 $\pm$ 2.05 μ m) and HPF group (50.33 $\pm$ 2.52 μ m) increased significantly($P<0.05$). Compared with Model group, the colon morphology of the UC rats in LPF group and HPF group was significantly improved, the levels of IL-6, IL-1 β , TNF- α and MPO in the colon tissue were significantly reduced, while IL-10 was significantly increased ($P<0.05$). Compared with Model group, the levels of MUC2 and MUC5AC in the colon tissue of UC rats in the LPF group and the HPF group were significantly increased, and the phosphorylation levels

* 基金项目:陕西省自然科学基金研究计划项目(2020JM-654)

作者简介:李玉龙(1987-),男,博士,主治医师,研究方向:消化系统肿瘤的基础与临床

[△] 通讯作者:宗伟(1981-),男,硕士,副主任医师,研究方向:炎症性肠病的研究,E-mail: iamzongwei@126.com

(收稿日期:2021-10-23 接受日期:2021-11-18)

of p-PKC α and p-ERK1/2 were also significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Paeoniflorin inhibits TNBS-induced colonic inflammation in UC rats and increases the thickness of the colonic mucus layer, thereby protecting the intestinal barrier function, the mechanism may be related to the activation of the ERK signaling pathway.

Key words: Ulcerative colitis; Paeoniflorin; Colonic mucus; Intestinal barrier function; ERK signaling pathway

Chinese Library Classification(CLC): R285.5; R574.62 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)15-2829-07

前言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种非特异性慢性炎症性疾病,以腹痛、腹泻和便血等典型症状为特征。UC具有复发性高、并发症严重、容易引起心理疾病等各种,严重影响了患者的生活质量^[1],并且UC会加重炎症性息肉和结直肠癌的风险^[2]。目前用于治疗UC的药物,包括5-氨基水杨酸盐、皮质类固醇和免疫抑制药物,主要通过减少UC中的炎症或抑制宿主免疫应答起作用^[3]。不幸的是,长期使用这些药物可以引起多种不良反应,包括恶心和头痛,因此限制了它们的临床应用^[4]。因此,UC患者仍然迫切需要具有高效和较少副作用的新药。芍药总苷是从中药白芍中提取的有效成分,包括芍药苷、羟基芍药苷、芍药花苷等,其中芍药苷(paeoniflorin, PF)占90%,分子式为C₂₃H₂₈O₁₁^[5]。多项研究显示,芍药苷具有抗炎、抗癌、保肝、调节免疫以及影响细胞增殖等多种药理作用^[6,7]。最近的研究报道,芍药苷对三硝基苯磺酸(trinitro-benzene-sulfonic acid, TNBS)诱导的UC小鼠模型具有良好的抗炎作用^[8]。然而,芍药苷治疗UC的确切机制仍未完全阐明。

先前的研究表明,结肠粘液在UC的发病机制中起着关键作用^[9]。许多共生微生物区系在人体肠道定居^[10],粘液通过作为结肠粘膜的屏障来保护上皮免受肠道细菌的侵袭。多项研究表明,在结肠炎和UC患者的动物模型中,粘液产量减少或异常,粘液层变薄,这会导致细菌与肠上皮接触增加,最终引发肠道炎症^[11]。这些研究表明粘液层厚度减少或粘液分泌减少可能与UC的发病有关,加强结肠粘液分泌和粘液层可能是UC治疗的潜在策略。最近研究表明,黏蛋白的产生依赖于ERK信号通路的激活^[12]。MAPK信号通路调节细胞增殖、分化、转化及凋亡等多种细胞生物学行为。ERK是MAPK家族的一员,属于一种传递丝裂原信号的关键激酶。多项研究报道,ERK调控肠黏膜上皮细胞增殖、凋亡及黏膜修复^[13-15]。此外,芍药苷在多种疾病中调控ERK信号通路。例如,芍药苷通过激活ERK-CREB通路改善慢性应激诱导的大鼠抑郁样行为和神经元损伤^[16]。芍药苷通过MEK/ERK信号通路拮抗皮质酮诱导的原代皮层神经细胞的神经损伤^[17]。芍药苷通过ERK信号通路上调人支气管上皮细胞中抗菌肽防御素-2的表达,从而增强上皮抗菌屏障^[18]。然而,尚不清楚芍药苷是否通过ERK信号通路改善UC。本研究旨在探讨芍药苷对UC发生过程中ERK信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂 芍药苷购自滁州仕诺达生物科技有限公司。5%三硝基苯磺酸(TNBS)购自美国Sigma-Aldrich公司。用于髓过氧化物酶(MPO)、白细胞介素-6(IL-6)、IL-1 β 、肿瘤坏死

因子- α (TNF- α)、IL-10、MUC2和MUC5AC的ELISA试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。苏木精伊红(HE)试剂盒、放射免疫沉淀分析(RIPA)裂解液、BCA蛋白检测试剂盒、超敏ECL化学发光试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。阿尔辛蓝(AB)染色试剂盒购自美国Lifeline Cell Technology公司。硝酸纤维素膜购自德国Merck Millipore公司。蛋白激酶C α (PKC α)、p-PKC α 、ERK1/2、p-ERK1/2、IL-6、IL-10、GAPDH、辣根过氧化物酶(HRP)偶联二抗购自英国Abcam公司。

1.1.2 实验动物 24只7-8周龄SPF级雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠(体重200-220g)由西安交通大学实验动物中心提供,生产许可证:SCXK(陕)2020-001。大鼠饲养在标准实验室条件下(25 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C,相对湿度60~65%,12h明暗周期)。用标准大鼠饲料和自来水喂养大鼠,不限制饮食。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理 适应环境1周后,SD大鼠随机分为4组:正常组(Normal组)、模型组(Model组)、低剂量芍药苷组(LPF组)、高剂量芍药苷组(HPF组),每组6只大鼠。模型组大鼠采用TNBS造模,将5%TNBS与无水乙醇按照1:1(体积)配成25mg(TNBS)/mL(混合液)。除正常组大鼠灌胃等体积的溶剂之外,其余组大鼠用润滑后的聚丙烯管由肛门轻柔插入深约8cm处,推注100mg/kg(0.4mL/100g体重)TNBS溶液,连续推注14d。芍药苷溶于二甲基亚砜:Tween 80:生理盐水(1:1:18)混合溶液中。低剂量芍药苷组和高剂量芍药苷组大鼠在TNBS给药基础上分别灌胃10mg/kg和100mg/kg的芍药苷混合溶液,其他组大鼠灌胃等体积溶剂。芍药苷的剂量参考以往文献报道^[19-22]进行确定。连续治疗14d,期间自由饮食,每日更换垫料,添加鼠食,观察大鼠状态。实验结束时,所有组大鼠采用氯胺酮(110mg/kg)/赛拉嗪(10mg/kg)麻醉。腹主动脉穿刺取血,3000rpm离心20min后,保存在-80 $^{\circ}$ C冰箱。于超净工作台上解剖大鼠,迅速分离结肠,并用PBS冲洗。即刻用游标卡尺测量结肠长度。将部分结肠固定在4%多聚甲醛固定液中进行组织病理学检查。其余结肠组织保存于-80 $^{\circ}$ C。

1.2.2 结肠组织苏木精伊红(HE)染色 结肠组织在4%多聚甲醛中固定48h,石蜡包埋,切成4 μ m切片,脱蜡复水。然后,用蒸馏水冲洗组织切片,通过苏木精伊红(HE)染色进行组织病理学观察,通过阿尔辛蓝(AB)染色计算结肠粘液层厚度^[23]。通过光学显微镜观察染色的结肠切片,并用ImageJ软件测量粘液层厚度。

1.2.3 ELISA法检测炎症细胞因子、髓过氧化物酶活性和粘蛋白水平 通过ELISA法检测结肠组织中细胞因子(IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和IL-10)、髓过氧化物酶(MPO)和粘蛋白(MUC2和MUC5AC)的水平。检测在组织采集后1个月内进行。将结肠标本在室温下解冻,将100mg组织转移到EP管中,在EP管中

加入 0.9 mL PBS 溶液,然后用组织研磨机匀浆。匀浆在 4℃、10000 rpm 离心 15 min。接下来,收集上清液并保存在 -80℃。采用 ELISA 试剂盒检测炎症细胞因子、髓过氧化物酶(MPO)和粘蛋白水平。

1.2.4 免疫组织化学染色检测结肠组织中 IL-6 和 IL-10 的蛋白表达 各组大鼠结肠组织切片脱蜡、水化、3% H₂O₂ 灭活内源酶后,浸入 0.01 mol/L 柠檬酸盐进行抗原修复。切片用 5%牛血清白蛋白封闭 20 min,然后与 IL-6(1:1000 稀释)和 IL-10(1:500 稀释)一抗在 4℃过夜孵育。随后将切片与生物素化的 IgG(1:500 稀释)在 37℃下孵育 20 min, PBS 洗涤 3 次,用二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木精复染,蒸馏水洗涤,脱水、透明、树脂封片、显微镜观察。

1.2.5 Western blotting 分析蛋白表达水平 用添加蛋白酶抑制剂的放射免疫沉淀分析(RIPA)裂解液提取结肠组织总蛋白,用 BCA 蛋白检测试剂盒定量总蛋白。用 10% SDS-PAGE 分离等量蛋白质(36 μg)并转移到硝酸纤维素膜(孔径 0.45 μm)。在室温下用 5%脱脂牛奶(含 1× TBST)封闭膜 2 h 后,分别与蛋白激酶 Cα(PKCα, 1:1000)、p-PKCα(1:1000)、ERK1/2(1:500)、p-ERK1/2(1:500)和 GAPDH 抗体(1:1000)一抗在 4℃孵育过夜。次日,将膜与辣根过氧化物酶(HRP)偶联二抗(1:1000)室温孵育 1 h,并用超敏 ECL 化学发光试剂盒检测蛋白条带。使用 ImageJ 进行条带的密度分析。GAPDH 作为内参蛋白。

1.3 统计学分析

使用 SPSS21.0 执行所有统计分析。数据均进行正态分布检验,用均值±标准差表示。组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),采用 Tukey 检验进行多重比较。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 芍药苷对 UC 大鼠结肠长度的影响

与 Normal 组(12.83 ± 0.64 cm)相比,Model 组(8.38 ± 0.42 cm)UC 大鼠的结肠长度显著缩短($P<0.05$)。与 Model 组相比,LPF 组(9.88 ± 0.49 cm)和 HPF 组(10.92 ± 0.55 cm)UC 大鼠的结肠长度显著增加($P<0.05$)。见图 1。

2.2 芍药苷对 UC 大鼠结肠组织损伤和炎症反应的影响

HE 分析结果显示,Normal 组大鼠结肠组织形态正常。与

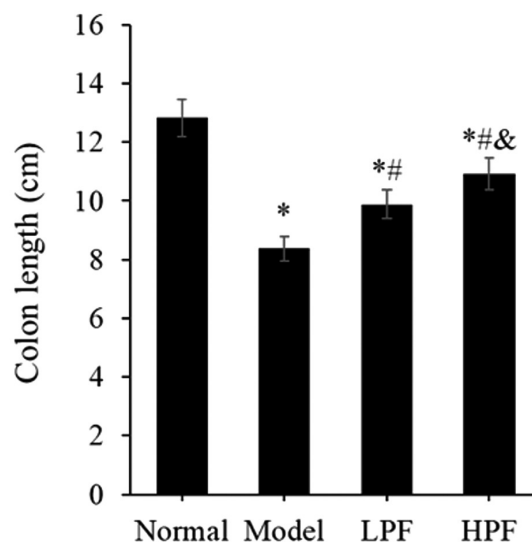


图 1 各组大鼠的结肠长度

Fig.1 Colon length of rats in each group

Note: Compared with Normal group, * $P<0.05$; Compared with Model group, # $P<0.05$; Compared with LPF group, & $P<0.05$.

Normal 组相比,Model 组大鼠结肠伴有上皮细胞丢失、隐窝结构破坏、大量炎细胞浸润等组织损伤。然而,LPF 组和 HPF 组的结肠形态较 Model 组显著改善。见图 2。

与 Normal 组相比,Model 组 UC 大鼠的结肠组织中的 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 水平均显著增加($P<0.05$),IL-10 水平显著降低($P<0.05$)。与 Model 组相比,LPF 组和 HPF 组 UC 大鼠结肠组织中的 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 水平均显著降低($P<0.05$),IL-10 水平显著增加($P<0.05$)。免疫组化检测结果与 ELISA 检测结果一致,与 Normal 组相比,Model 组 UC 大鼠的结肠组织中的 IL-6 阳性表达明显增多,而 IL-10 明显降低。与 Model 组相比,LPF 组和 HPF 组 UC 大鼠结肠组织中的 IL-6 阳性表达明显降低,而 IL-10 明显增多。见图 3 和图 4。

与 Normal 组(3.12 ± 0.16 U/mg)相比,Model 组(3.56 ± 0.18 U/mg)UC 大鼠的结肠组织中的中性粒细胞浸润的标志 MPO 活性显著增加($P<0.05$)。与 Model 组相比,LPF 组(3.35 ± 0.17 U/mg)和 HPF 组(3.16 ± 0.16 U/mg)UC 大鼠结肠组织中的 MPO 活性显著降低($P<0.05$)。见图 5。

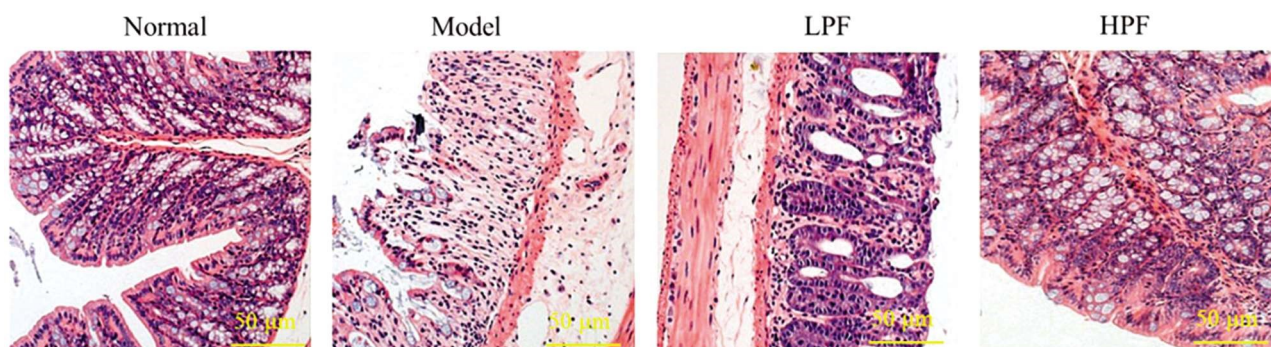


图 2 苏木精伊红(HE)染色检查各组大鼠的结肠形态

Fig.2 Hematoxylin and eosin (HE) staining to check the colon morphology of rats in each group

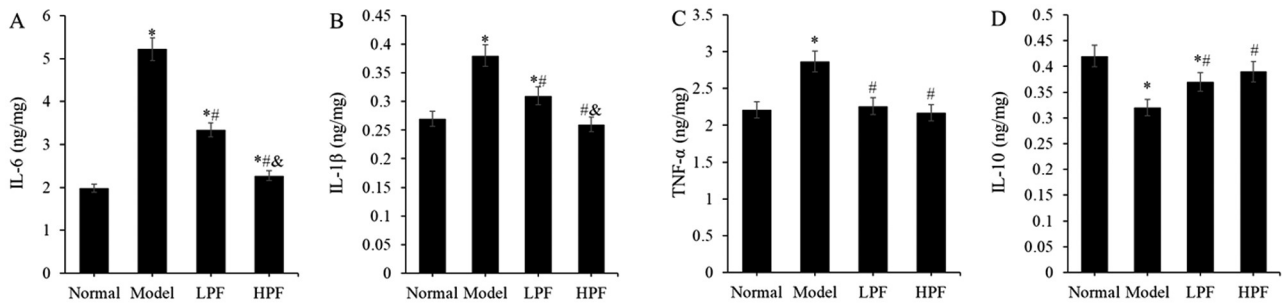


图3 ELISA 检测各组大鼠结肠组织中细胞因子水平

Fig. 3 The levels of cytokines in the colon tissues of rats in each group rats were detected by ELISA

Note: A-D: the levels of IL-6, IL-1β, TNF-α and IL-10 in colon tissue in turn; Compared with Normal group, * $P < 0.05$; Compared with Model group, # $P < 0.05$; Compared with LPF group, & $P < 0.05$.

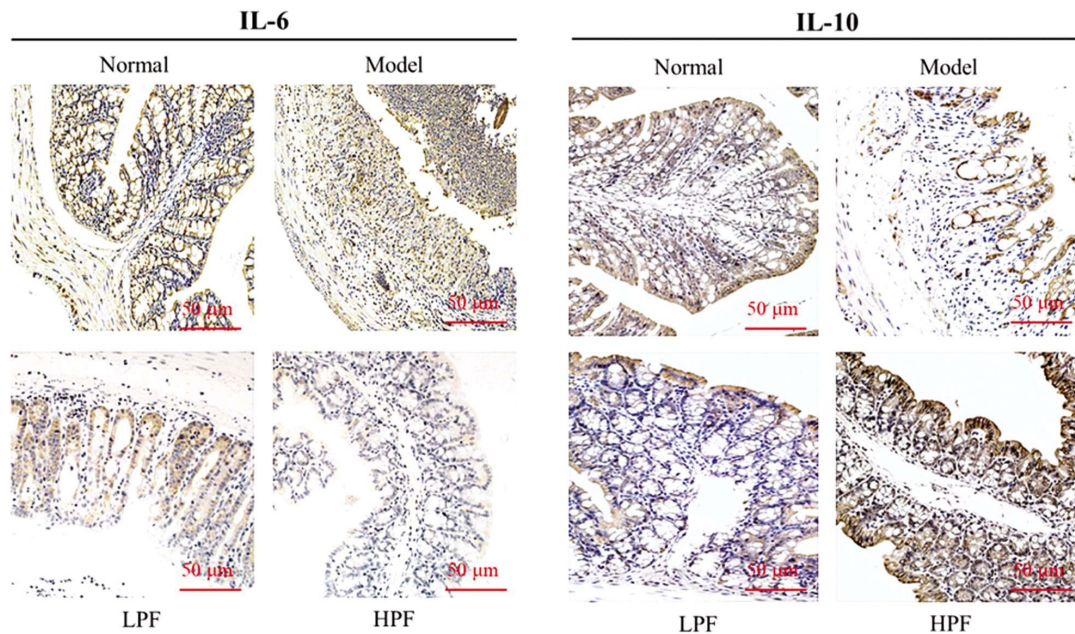


图4 免疫组化检测各组大鼠结肠组织中 IL-6 和 IL-10 的蛋白表达

Fig.4 Immunohistochemical detection of the protein expression of IL-6 and IL-10 in the colon tissue of rats in each group

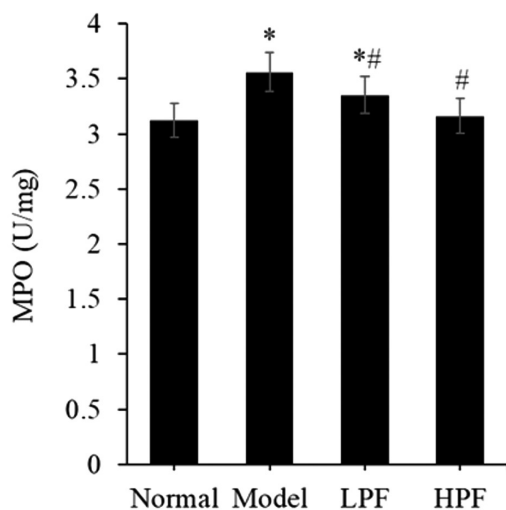


图5 ELISA 检测各组大鼠结肠组织中髓过氧化物酶(MPO)水平

Fig. 5 The levels of myeloperoxidase (MPO) in the colon tissues of rats in each group rats were detected by ELISA

Note: Compared with Normal group, * $P < 0.05$; Compared with Model group, # $P < 0.05$; Compared with LPF group, & $P < 0.05$.

2.3 芍药苷对 UC 大鼠结肠粘液屏障功能的影响

与 Normal 组 ($53.26 \pm 2.66 \mu\text{m}$) 相比, Model 组 ($22.54 \pm 1.13 \mu\text{m}$) UC 大鼠的结肠粘液层厚度显著降低 ($P < 0.05$)。与 Model 组相比, LPF 组 ($41.07 \pm 2.05 \mu\text{m}$) 和 HPF 组 ($50.33 \pm 2.52 \mu\text{m}$) UC 大鼠结肠粘液层厚度显著增加 ($P < 0.05$)。见图 6。与 Normal 组相比, Model 组 UC 大鼠结肠组织中 MUC2 和 MUC5AC 水平均显著降低 ($P < 0.05$)。与 Model 组相比, LPF 组和 HPF 组 UC 大鼠结肠组织中 MUC2 和 MUC5AC 水平均显著升高 ($P < 0.05$)。见图 7。

2.4 芍药苷对 UC 大鼠结肠组织中 ERK 信号通路的影响

与 Normal 组相比, Model 组 UC 大鼠结肠组织中 p-PKCα 和 p-ERK1/2 的蛋白相对表达量分别升高了 121.00% 和 117.00% ($P < 0.05$)。与 Model 组相比, LPF 组和 HPF 组 UC 大鼠结肠组织中 p-PKCα 的蛋白相对表达量分别升高了 29.86% 和 48.42%, p-ERK1/2 的蛋白相对表达量分别升高了 33.18% 和 68.20% ($P < 0.05$)。然而, 各组 UC 大鼠结肠组织中 PKCα 和 ERK1/2 的蛋白相对表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 8。

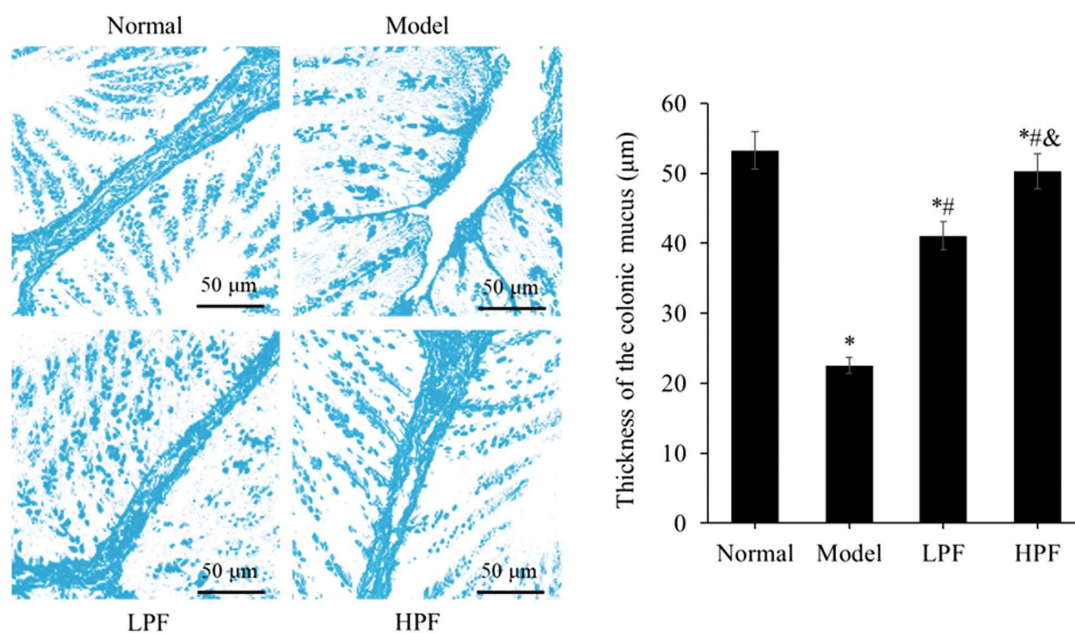


图6 阿尔辛蓝(AB)染色检查各组大鼠结肠粘液层厚度

Fig. 6 Alcian blue (AB) staining to check the thickness of the colonic mucin in each group rats

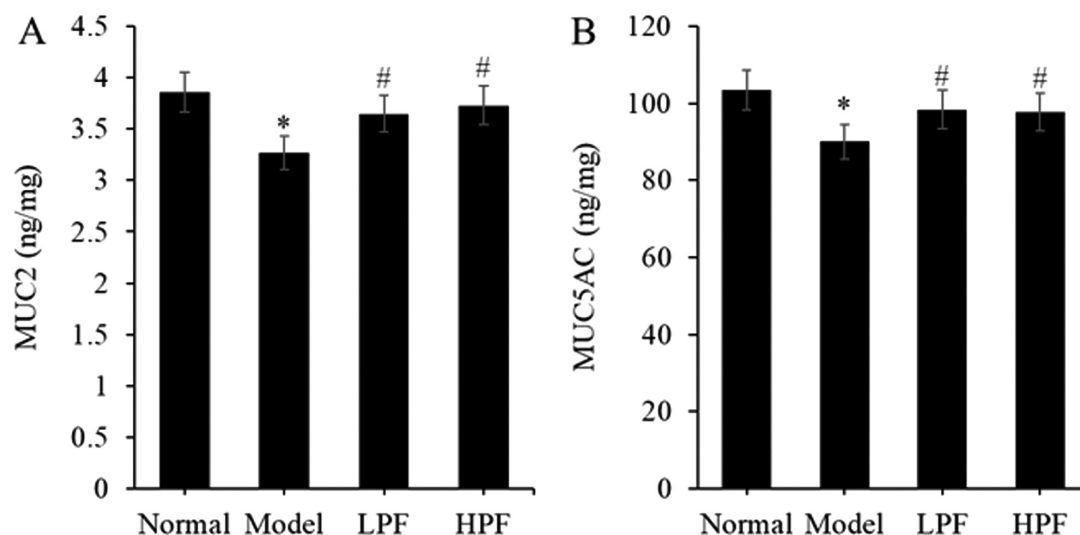
Note: Compared with Normal group, * $P<0.05$; Compared with Model group, # $P<0.05$; Compared with LPF group, & $P<0.05$.

图7 ELISA 检查各组大鼠结肠组织中粘蛋白的水平

Fig. 7 ELISA to check the level of mucin in the colon tissue of rats in each group

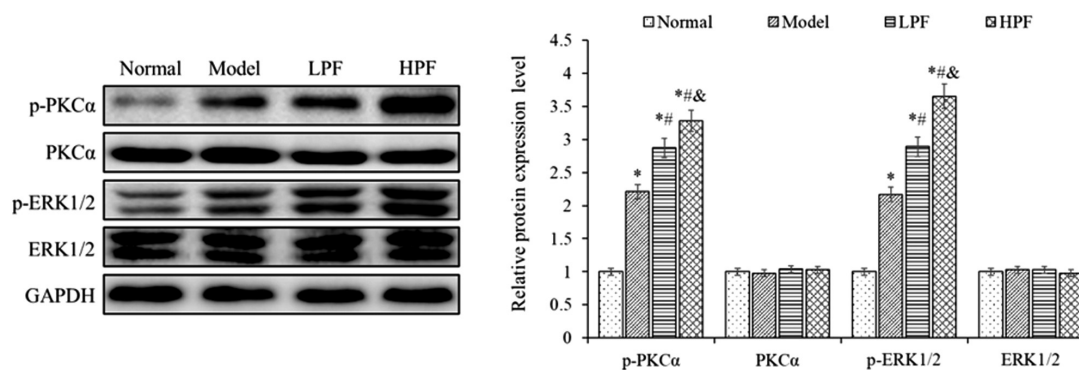
Note: A and B: the levels of MUC2 and MUC5AC in colon tissue respectively; Compared with Normal group, * $P<0.05$; Compared with Model group, # $P<0.05$; Compared with LPF group, & $P<0.05$.

图8 Western blotting 分析各组大鼠结肠组织中 ERK 信号通路的磷酸化水平

Fig. 8 Western blotting analysis of the phosphorylation level of ERK signaling pathway in the colon tissue of rats in each group

Note: Compared with Normal group, * $P<0.05$; Compared with Model group, # $P<0.05$; Compared with LPF group, & $P<0.05$.

3 讨论

目前,芍药苷的药理学作用已经被广泛报道,尤其是其抗炎和免疫调节作用。Wu 等人^[24]研究了芍药苷对内毒素(Lipopolysaccharide, LPS)刺激的人 Caco-2 细胞的抗炎作用,芍药苷显著提高了 LPS 诱导的 Caco-2 细胞单层模型跨膜电阻值,降低了肠上皮 FITC-葡聚糖通透性,并恢复了 occludin、ZO-1 和 claudin5 的表达。芍药苷可明显抑制 LPS 诱导的环氧合酶-2、诱导型一氧化氮合酶、TNF- α 、IL-6 和基质金属蛋白酶-9 的表达。此外,芍药苷激活了 NRF2/HO-1 信号通路并抑制了 NF- κ B 信号通路^[24]。Zheng 等人研究显示芍药苷可抑制 TNBS 诱导的 UC 小鼠树突状细胞(Dendritic cells, DC)表面 MHC-II 和 CD86 的表达,降低 IL-12 的分泌,恢复 TH17/Treg 比值。芍药苷处理 DC 细胞可减少 TH17 分化并降低 IL-17 表达,同时诱导 CD4+CD25+Foxp3+Treg 分化并增加 Foxp3 和 IL-10 的表达。提示芍药苷可通过调节 DC 介导的 TH17/Treg 平衡来改善 TNBS 诱导的 UC^[25]。在本研究中,不同剂量的芍药苷显著增加了 UC 大鼠结肠长度,改善了结肠形态,抑制了中性粒细胞浸润的标志 MPO 活性,证实了芍药苷对 UC 的治疗作用。

大量证据表明,促炎因子如 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的分泌加重了 UC 的炎症过程^[26]。在 UC 患者中,发现血清和肠固有层中 IL-6 和 IL-1 β 水平显著增加。抗炎药物可通过阻止炎症介质如 IL-1 β 和 IL-6 的释放来改善 UC^[27]。在 UC 发病机制中, TNF- α 可以增加结肠组织中的中性粒细胞浸润,并导致肠粘膜微循环障碍^[28]。在本研究中,芍药苷可以显著降低 UC 大鼠结肠组织中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的水平。此外,本研究数据显示,芍药苷也可以显著增加 UC 大鼠结肠组织中 IL-10 的表达。作为 Treg 细胞的重要抗炎细胞因子,IL-10 可以抑制过度的炎症反应并对结肠炎具有保护作用^[29]。此外,IL-10 可通过上调结肠粘蛋白的表达和增加肠粘液的产生来抵抗细菌和病原体侵入肠粘膜^[30]。本研究结果与 Gu 等人^[8]研究结果一致。Gu 等人采用芍药苷(15、30、45 mg/kg)治疗三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的 UC 小鼠模型,研究显示,芍药苷以剂量依赖性方式降低了 UC 小鼠结肠炎组织中 IL-2、IL-6、IL-12、IL-1 β 、TNF- α 和 IFN- γ 的水平,并升高了 IL-10 的水平,从而减少了 UC 小鼠中促炎因子的合成和抗炎因子的释放。此外,芍药苷以剂量依赖性方式减弱了 UC 小鼠结肠炎组织中 MAPK/NF- κ B 通路的活化和结肠组织细胞凋亡^[8]。

结肠粘液是肠道屏障功能的主要组成部分,在上皮和外部环境之间建立了一道边界,并作为一种抵抗微生物和病原体的第一道防御屏障^[31]。结肠杯状细胞分泌的粘液形成粘液层并附着在上皮上。结肠粘液屏障功能障碍导致细菌和病原体入侵以及过度炎症^[32]。炎性细胞因子通过破坏粘液分泌和减弱粘液层来增加结肠粘液通透性。结肠粘液层的渗透性升高也有助于 UC 的发展^[33]。先前的一项研究证实,葛根素可以通过重建粘液层和阻断 DSS 诱导的 UC 的粘液通透性来减轻结肠炎^[34]。本研究使用 AB 染色测量了结肠粘液层的厚度。结果显示, TNBS 显著降低了 UC 大鼠结肠粘液层厚度。然而,不同剂量的芍药苷明显提高了粘液层厚度。这些结果表明,芍药苷通过增加结肠粘液层厚度保护了肠道屏障。

粘液由凝胶形成的粘蛋白(例如 MUC2、MUC5B 和 MUC5AC)以及杯状细胞的其他产物(例如抵抗素样分子和 IgG)组成,从而维持肠道粘液屏障功能^[35]。MUC2 和 MUC5AC 是参与构建结肠粘液层的两个关键蛋白。粘蛋白表达降低导致粘液屏障功能障碍,并与 UC 的发病有关。据报道, VAMP8 通过控制 MUC2 粘蛋白分泌抑制病原体入侵上皮层,维持肠道环境稳态^[36]。此外, MUC2 基因敲除小鼠出现结肠粘液分泌受损,并最终发展为结肠炎^[37]。本研究通过 ELISA 进一步研究了 MUC2 和 MUC5AC 的表达水平,结果显示,芍药苷显著提高了 UC 大鼠结肠中 MUC2 和 MUC5AC 的表达。上述数据说明芍药苷可能通过增加粘蛋白分泌来增加粘液层厚度。

粘蛋白的表达依赖于 ERK 信号通路的激活^[32]。蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)是 ERK1/2 的上游调控蛋白,其通过上调 ERK1/2 的转录活性来减少氧化应激和细胞凋亡。先前的研究表明, PKC 的激活诱导气道上皮细胞或杯状细胞过度产生 MUC2 和 MUC5AC^[37]。此外, PKC 通过激活 ERK1/2 促进 MUC2 和 MUC5AC 蛋白和 mRNA 表达^[38]。还有研究表明, ERK 在 UC 模型大鼠结肠组织中高表达^[39]。ERK 调控 UC 肠黏膜上皮细胞凋亡^[43]。磷酸化的 ERK1/2 有促进肠上皮细胞株由 G1 期进入 S 期并促进细胞增殖^[44]。活化的 ERK1/2 能促进肠上皮细胞增殖和迁移,从而促进黏膜修复^[45]。此外, ERK 信号通路还参与 UC 的炎症介质的调节^[40]。在本研究中, UC 大鼠结肠组织中 PKC α 和 ERK1/2 的磷酸化水平增加,然而,不同剂量的芍药苷进一步增加了 PKC α 和 ERK1/2 的磷酸化。基于上述研究结果,本研究推测芍药苷可能通过激活 ERK 信号通路来促进粘蛋白的表达,从而增加结肠粘液层厚度,保护了肠道屏障功能。

综上所述,本研究表明,芍药苷抑制了 TNBS 诱导的 UC 大鼠结肠炎症并增加了结肠粘液层厚度,从而保护了肠道屏障功能,其机制可能与 ERK 信号通路的激活有关。

参考文献(References)

- [1] Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, et al. Ulcerative colitis [J]. Lancet, 2017, 389(10080): 1756-1770
- [2] Bopanna S, Ananthakrishnan AN, Kedia S, et al. Risk of colorectal cancer in Asian patients with ulcerative colitis: a systematic review and meta-analysis [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2017, 2 (4): 269-276
- [3] Neurath MF. Current and emerging therapeutic targets for IBD[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14(5): 269-278
- [4] Crisculi V, Modesto I, Orlando A, et al. Mesalazine for the treatment of inflammatory bowel disease [J]. Expert Opin Pharmacother, 2013, 14(12): 1669-1678
- [5] Zhang L, Wei W. Anti-inflammatory and immunoregulatory effects of paeoniflorin and total glucosides of paeony [J]. Pharmacol Ther, 2020, 207: 107452
- [6] Xiang Y, Zhang Q, Wei S, et al. Paeoniflorin: a monoterpene glycoside from plants of Paeoniaceae family with diverse anticancer activities [J]. J Pharm Pharmacol, 2020, 72(4): 483-495
- [7] Zhou YX, Gong XH, Zhang H, et al. A review on the pharmacokinetics of paeoniflorin and its anti-inflammatory and immunomodulatory effects[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 130: 110505

- [8] Gu P, Zhu L, Liu Y, et al. Protective effects of paeoniflorin on TNBS-induced ulcerative colitis through inhibiting NF-kappaB pathway and apoptosis in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 50: 152-160
- [9] Johansson ME, Sjövall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10(6): 352-361
- [10] Ni J, Wu GD, Albenberg L, et al. Gut microbiota and IBD: causation or correlation? [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14 (10): 573-584
- [11] Wenzel UA, Magnusson MK, Rydström A, et al. Spontaneous colitis in Muc2-deficient mice reflects clinical and cellular features of active ulcerative colitis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e100217
- [12] Wu X, Lee B, Zhu L, et al. Exposure to mold proteases stimulates mucin production in airway epithelial cells through Ras/Raf1/ERK signal pathway[J]. *PLoS One*, 2020, 15(4): e0231990
- [13] Seidelin JB, Coskun M, Vainer B, et al. ERK controls epithelial cell death receptor signalling and cellular FLICE-like inhibitory protein (c-FLIP) in ulcerative colitis [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2013, 91 (7): 839-849
- [14] Rivard N, Boucher MJ, Asselin C, et al. MAP kinase cascade is required for p27 downregulation and S phase entry in fibroblasts and epithelial cells[J]. *Am J Physiol*, 1999, 277(4): C652-664
- [15] Oliver BL, Sha'afi RI, Hajjar JJ. Transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor activate mitogen-activated protein kinase and its substrates in intestinal epithelial cells [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1995, 210(2): 162-170
- [16] Zhong X, Li G, Qiu F, et al. Paeoniflorin Ameliorates Chronic Stress-Induced Depression-Like Behaviors and Neuronal Damages in Rats via Activation of the ERK-CREB Pathway [J]. *Front Psychiatry*, 2018, 9: 772
- [17] 陈梦静, 龚雪媛, 龚恒佩, 等. 芍药苷对皮质酮致原代皮层细胞神经损伤的保护作用及机制研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(4): 1507-1511
- [18] Gan Y, Cui X, Ma T, et al. Paeoniflorin upregulates β -defensin-2 expression in human bronchial epithelial cell through the p38 MAPK, ERK, and NF- κ B signaling pathways [J]. *Inflammation*, 2014, 37(5): 1468-1475
- [19] 刘斌, 杨昭毅, 魏伟. LC-MS/MS 测定大鼠血浆中芍药苷及其药物动力学特征[J]. *安徽医科大学学报*, 2009, 44(6): 707-711
- [20] 刘琦, 罗霞, 罗爽, 等. 芍药苷通过抑制 NLRP3 炎症小体治疗溃疡性结肠炎小鼠的研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2018, 29(4): 409-414
- [21] 饶梦琳, 唐蜜, 何锦悦, 等. 芍药苷对大鼠局灶性脑缺血再灌注脑血流量及 PGI₂/TXA₂ 平衡的影响[J]. *药学报*, 2014, 49(1): 55-60
- [22] 司晓丽, 王辉, 王卓, 等. 芍药苷对 DSS 诱导大鼠慢性溃疡性结肠炎 IL-17 表达的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(8): 946-950
- [23] Desai MS, Seekatz AM, Koropatkin NM, et al. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility [J]. *Cell*, 2016, 167 (5): 1339-1353.e1321
- [24] Wu XX, Huang XL, Chen RR, et al. Paeoniflorin Prevents Intestinal Barrier Disruption and Inhibits Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammation in Caco-2 Cell Monolayers [J]. *Inflammation*, 2019, 42 (6): 2215-2225
- [25] Zheng K, Jia J, Yan S, et al. Paeoniflorin ameliorates ulcerative colitis by modulating the dendritic cell-mediated T (H)17/T (reg) balance[J]. *Inflammopharmacology*, 2020, 28(6): 1705-1716
- [26] Argollo M, Fiorino G, Hindryckx P, et al. Novel therapeutic targets for inflammatory bowel disease[J]. *J Autoimmun*, 2017, 85: 103-116
- [27] Oakley RH, Cidlowski JA. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 132(5): 1033-1044
- [28] Friedrich M, Pohin M, Powrie F. Cytokine Networks in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease[J]. *Immunity*, 2019, 50(4): 992-1006
- [29] Wang S, Wang J, Ma R, et al. IL-10 enhances T cell survival and is associated with faster relapse in patients with inactive ulcerative colitis[J]. *Mol Immunol*, 2020, 121: 92-98
- [30] Johansson ME, Gustafsson JK, Holm ϵ n-Larsson J, et al. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis [J]. *Gut*, 2014, 63(2): 281-291
- [31] Pei LY, Ke YS, Zhao HH, et al. Role of colonic microbiota in the pathogenesis of ulcerative colitis[J]. *BMC Gastroenterol*, 2019, 19(1): 10
- [32] Swidsinski A, Loening-Baucke V, Theissig F, et al. Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon[J]. *Gut*, 2007, 56(3): 343-350
- [33] Panaccione R, Ghosh S, Middleton S, et al. Combination therapy with infliximab and azathioprine is superior to monotherapy with either agent in ulcerative colitis [J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(2): 392-400.e393
- [34] Wu Y, Li Y, Ruan Z, et al. Puerarin Rebuilding the Mucus Layer and Regulating Mucin-Utilizing Bacteria to Relieve Ulcerative Colitis[J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(41): 11402-11411
- [35] Hansson GC. Mucus and mucins in diseases of the intestinal and respiratory tracts[J]. *J Intern Med*, 2019, 285(5): 479-490
- [36] Cornick S, Kumar M, Moreau F, et al. VAMP8-mediated MUC2 mucin exocytosis from colonic goblet cells maintains innate intestinal homeostasis[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4306
- [37] Song JS, Kang CM, Yoo MB, et al. Nitric oxide induces MUC5AC mucin in respiratory epithelial cells through PKC and ERK dependent pathways[J]. *Respir Res*, 2007, 8(1): 28
- [38] Damiano S, Sasso A, De Felice B, et al. Quercetin Increases MUC2 and MUC5AC Gene Expression and Secretion in Intestinal Goblet Cell-Like LS174T via PLC/PKC α /ERK1-2 Pathway[J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 357
- [39] 李姿慧, 王键, 蔡荣林, 等. 参苓白术散通过 ERK/p38 MAPK 信号通路干预溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 AQP3, AQP4 的表达 [J]. *中成药*, 2015, 37(9): 1883-1888
- [40] 袁中华, 谭艳美, 陶媛, 等. Adipophilin 通过 ERK1/2-AP-1 途径诱导炎症因子的表达[J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(11): 86-92