



中药药理与临床

Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica

ISSN 1001-859X, CN 51-1188/R

《中药药理与临床》网络首发论文

题目： 基于 P38 MAPK 信号通路探讨乌梅丸对溃疡性结肠炎小鼠肠黏膜屏障修复的作用机制

作者： 杜丽东, 王颖, 赵冠宇, 邵晶, 任远, 仇正英, 吴国泰, 辛蕊华

DOI: 10.13412/j.cnki.zyyl.20240425.003

网络首发日期: 2024-04-26

引用格式: 杜丽东, 王颖, 赵冠宇, 邵晶, 任远, 仇正英, 吴国泰, 辛蕊华. 基于 P38 MAPK 信号通路探讨乌梅丸对溃疡性结肠炎小鼠肠黏膜屏障修复的作用机制 [J/OL]. 中药药理与临床. <https://doi.org/10.13412/j.cnki.zyyl.20240425.003>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式 (包括网络呈现版式) 排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊 (光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊 (网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊 (网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物 (ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

基于 P38 MAPK 信号通路探讨乌梅丸对溃疡性结肠炎小鼠肠黏膜屏障修复的作用机制*

杜丽东^{1,2}, 王颖¹, 赵冠宇¹, 邵晶^{1,2}, 任远^{1,2}, 仇正英³, 吴国泰^{1,2**}, 辛蕊华^{3**}

(¹甘肃中医药大学药学院, 兰州 730000;

²甘肃省中药药理与毒理学重点实验室, 兰州 730000

³中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 兰州 730050)

摘要 目的: 基于 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (P38MAPK) 信号通路探讨乌梅丸对 UC 模型小鼠肠黏膜屏障损伤修复的作用机制。**方法:** 40 只 C57BL/6J 小鼠随机分为正常对照组、模型对照组、美沙拉嗪 0.5 g/kg 组、乌梅丸 13.04、26.09 g/kg 组。正常对照组小鼠自由饮水, 造模组小鼠自由饮用 2% 的葡聚糖硫酸钠 (DSS) 水溶液。造模同时, 正常对照组和模型对照组灌胃生理盐水, 各给药组灌胃相应药物。评价小鼠疾病活动指数 (DAI); HE 染色观察结肠组织形态并评分; ELISA 法检测小鼠血清二胺氧化酶 (DAO)、D-乳酸水平; 实时荧光定量 PCR 法 (RT-qPCR) 检测结肠组织闭合蛋白 1 (Occludin1)、封闭蛋白 1 (Claudin1)、闭锁小带蛋白 1 (ZO1) mRNA 的表达; 蛋白免疫印迹法 (WB) 检测结肠组织 Occludin1、Claudin1、ZO1 和 p38MAPK、细胞外信号调节激酶 (ERK)、氨基末端激酶 (JNK) 蛋白及其磷酸化产物 p-ERK、p-JNK、p-p38MAPK 的表达。**结果:** 与正常对照组比较, 模型对照组小鼠造模第 4 d 起 DAI 评分、HE 评分、外周血 DAO、D-乳酸水平均显著升高 ($P < 0.01$); 结肠组织 Occludin 1、Claudin 1、ZO1 mRNA 和蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$); 结肠组织 p-p38MAPK/p38MAPK、p-ERK/ERK、p-JNK/JNK 的比值显著升高 ($P < 0.01$)。与模型对照组比较, 乌梅丸各组小鼠 DAI 评分、HS 评分均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 结肠 Occludin 1、Claudin 1、ZO1 mRNA 和蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$); 结肠 p-p38MAPK/p38MAPK、p-ERK/ERK、p-JNK/JNK 的比值显著降低 ($P < 0.01$); 乌梅丸 13.04 g/kg 组血清 D-乳酸、乌梅丸 26.09 g/kg 组血清 DAO、D-乳酸含量均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); **结论:** 抑制 p38MAPK 信号通路蛋白磷酸化、升高紧密连接蛋白的表达可能是乌梅丸修复 UC 小鼠肠黏

*基金项目: 甘肃省自然科学基金项目 (编号: 20JR10RA317); 甘肃省中医药管理局科研课题 (编号: GZK-2019-23) 甘肃省中医药研究中心开放课题 (编号: ZYX-2020-20)。 **通信作者: 吴国泰, 博士, 副教授, 从事中药药理、毒理及安全性评价, E-mail: 1018830451@qq.com; 辛蕊华, 副研究员, 从事中药与天然免疫研究, E-mail: xinruihuamys@126.com; 作者简介: 杜丽东, 博士, 副教授, 从事中藏药药理、毒理及安全性评价, E-mail: lidong_du@126.com。

膜屏障损伤的机制之一。

关键词：乌梅丸；溃疡性结肠炎；P38 丝裂原活化蛋白酶信号通路；肠黏膜屏障

溃疡性结肠炎（UC）属于慢性炎症性肠病，以发作、缓解及复发交替为特点，病程较长，往往迁延难愈，导致肠道反复损伤，形成溃疡、息肉，甚至恶变成为结直肠癌，病人往往苦不堪言，生活质量急剧降低^[1]。现代医学认为 UC 受遗传、环境、心理等多因素共同影响，以肠黏膜屏障受损为核心、导致上皮通透性增大、肠道菌群移位、其代谢产物侵入肠黏膜，甚至入血，激发或加重肠黏膜局部炎症反应，最终形成溃疡。临床以黏膜愈合，症状缓解和减少复发作为疗效评估的指标之一^[2]。寻找更好的治疗措施和更安全有效的药物，对提高患者生活质量、减少医疗消耗具有重要意义。

乌梅丸源自张仲景《伤寒论》，由乌梅、细辛、干姜、黄连、当归、附子、川椒、桂枝、人参、黄柏组成。黄连、黄柏与乌梅配伍，酸苦合用，柔肝止痛，清热燥湿；附子、桂枝、干姜、细辛和花椒与乌梅配伍，酸收辛散，木金同调；与黄连黄柏配伍，辛开苦降、寒热并用，阴阳调和；人参当归与乌梅配伍，酸甘化阴，养肝阴补肝体；与附子桂枝干姜细辛等辛味药物合用，辛甘化阳，阳气生、寒湿散、阴阳和合^[3]。

MAPKs 是一类细胞内广泛分布的丝氨酸/苏氨酸残基蛋白激酶，对不同生理性刺激，如细胞因子、缺氧等作出不同反应，进而调控细胞的增殖、分化和凋亡^[4]。研究表明，MAPK 信号通路可能在肠道炎症性疾病中通过磷酸化调节紧密连接，在重构黏膜屏障和修复损伤中起关键作用。Dun^[5]等研究发现人参皂苷可抑制炎症反应，减轻衰老大鼠结肠上皮紧密连接损伤，上调 claudin1 和 claudin 蛋白表达，下调 JNK、ERK1/2、p38 的磷酸化水平有关。

本研究建立 UC 小鼠模型，观察乌梅丸对 UC 小鼠的症状改善和黏膜通透性的影响；研究紧密连接蛋白和结肠 p38MAPK 信号通路 p38MAPK、ERK、JNK 蛋白及其磷酸化产物 p-p38MAPK、p-ERK、p-JNK 表达水平，旨在探讨乌梅丸修复 UC 小鼠肠黏膜屏障的机制，为乌梅丸的临床应用和进一步研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验药物

乌梅、花椒、细辛、附子、桂枝、干姜、当归、人参、黄连、黄柏，购于甘肃中医药大学附属医院，经甘肃中医药大学附属医院杨锡仓主任药师鉴定符合中国药典标准。乌梅丸水煎液制备：按照《方剂学》（“十四五”规划教材，人民卫生出版社）乌梅丸处方比例（乌梅 30 g，当归 6 g，桂枝 6 g，人参 6 g，干姜 9 g，制附子 6 g，花椒 5 g，细辛 3 g，黄连 9 g，黄柏 6 g）称取药材，加 10 倍蒸馏水浸泡 30 min（制附子浸泡 30 min，先煎 30 min、人参隔水蒸 30 min）后武火煮沸、文火保持沸腾 45 min 后过滤。药渣再加 8 倍蒸馏水煎煮 45 min，

过滤,浓缩成含生药 1.3 g/mL 煎液,置 4 °C 冰箱保存备用。500 mg/袋美沙拉嗪,美国 GLP BIO 公司,批号: GC16607。

1.2 动物及细胞

40 只 C57BL/6J 雄性小鼠,体质量 20 g -24 g,由中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心提供,动物生产合格证号: SCXK (甘) 2022-0022。小鼠在室温 25 °C,湿度 55% 环境适应性饲养 7 d 开始实验。本研究由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所实验动物伦理委员会批准并在其指南下进行,伦理批准号: 2022-009。

1.3 试剂

DSS (分子量 36000-50000 Da, 美国 MP 公司,批号: S2839); 羧甲基纤维素钠 (国药集团化学试剂有限公司,批号: 20220713); 小鼠 DAO、D-乳酸试剂盒 (上海江莱生物科技有限公司,批号: JL-T0649); 山羊抗兔 IgG、山羊抗鼠 IgG (博奥龙免疫技术有限公司,批号分别为: BF03008、BF03001); 反转录试剂盒 (湖南艾瑞克生物有限公司,批号: G1108); 蛋白预染 Marker (上海雅酶生物医药科技有限公司,批号: 2621850); Trizol 裂解液 (美国英杰 invitrogen 公司,批号: 89-57-6); RIPA 蛋白裂解液 (Biosharp 生物有限公司,批号: 70110001); qPCR 试剂盒 (湖南艾瑞克生物有限公司,批号: 20220403); ZO 1 鼠多克隆抗体、Occludin 1 和 Claudin 1 兔多克隆抗体 (美国 proteintech 公司,批号分别为: 21773-1-AP、8674-1-AP、28674-1-AP); BCA 蛋白定量试剂盒 (北京酷来搏科技有限公司,批号: SK1070); β -actin 鼠多克隆抗体、p38MAPK、p-p38MAPK、ERK、p-ERK、JNK、p-JNK 兔多克隆抗体 (艾博抗上海有限公司,批号分别为: ab6276、ab32142、ab284564、ab184699、ab214036、ab179461、ab76572)。

1.4 仪器

组织研磨机 (美国 Omni International 公司); MC-4C 振荡涡旋混匀器 (北京奥秘佳得医药科技有限公司); Centrifuge 5418 R 低温离心机 (德国 Eppendorf AG 公司); BioPhotometer plu/D30 核酸蛋白测定仪 (德国 Eppendorf AG 公司); Gen 5 多功能酶标仪 (美国伯腾仪器 (Bio Tek) 有限公司); ProFlex 3 \times 32 荧光定量 PCR 仪 (美国赛默飞世尔科技公司); Quant Studio 5 实时荧光定量 PCR 分析仪 (美国应用生物系统 (ABI) 公司); SKL-O3000-S 脱色摇床 (美国 scilogex 公司); DYCZ-40S 转膜槽 (北京六一生物技术有限公司); PowerPac HC 电泳仪 (美国伯乐公司)。

1.5 方法

1.5.1 小鼠分组、模型复制及给药

参照文献^[6]并结合预试验, 40 只 C57BL/6J 小鼠, 适应性饲养 7 d, 按照体质量随机分为正常对照组、模型对照组、美沙拉嗪 0.5 g/kg 组、乌梅丸 13.04、26.09 g/kg (相当于临床等效剂量的 1、2 倍) 组, 每组 8 只。正常对照组自由饮水, 其余造模小鼠自由饮用 2% DSS 水溶液 (每天更换一次), 共 7 d 制备 UC 模型。造模同时, 各组灌胃给予相应药物; 正常对照组和模型对照组灌胃生理盐水, 给药容积均为 20 mL/kg, 1 次/d, 连续 7 d。

1.5.2 小鼠血液、组织样本采集

第 7 d 给药后, 各组小鼠均禁食不禁水 12 h, 摘眼球取血, 4 °C 放置 1 h, 3 500 r/min 离心 10 min, 取血清-80 °C 保存。断颈椎处死小鼠, 迅速解剖, 取出自盲肠至肛门段肠管。沿肠系膜纵行剖开, 预冷生理盐水冲洗后剪成 1 cm 长的标本。一部分 4% 多聚甲醛固定液固定, 4 °C 保存; 另取部分肠段于冻存管中-80 °C 保存。

1.5.3 疾病活动指数 (DAI) 评分

每日称质量、观察粪便稠度和血便情况, 参照表 1 进行评分。按 $DAI = (\text{体质量下降率评分} + \text{粪便稠度评分} + \text{血便情况评分}) / 3$ 计算^[7]。

表 1 疾病活动指数 (DAI) 评分标准

分值	体质量下降率	粪便稠度	血便情况
0	<1%	正常	无
1	1%-5%	软便	少量潜血
2	6%-10%	软便且黏附肛门	潜血
3	>10%	粪便稀溏	脓血
4	>15%	粪便稀溏	明显出血

1.5.4 HE 染色观察结肠组织学变化并进行组织学 (HS) 评分

取小鼠结肠约 1 cm, 于 4% 多聚甲醛固定。经脱水、包埋、切片、HE 染色, 中性树脂封片后烘干。光镜下观察切片组织形态学变化、按表 2 标准进行 HS 评分^[8]。

表 2 结肠组织病理学评分标准

分值	组织病理学分评分
0	正常形态、无炎症
1	小部分杯状细胞丢失、轻微炎症浸润
2	大面积的杯状细胞缺失、黏膜层中度炎症浸润
3	少量/ 部分隐窝缺失、黏膜肌层广泛的炎症浸润且伴有黏膜水肿增厚
4	大面积的隐窝缺失、黏膜下层广泛的炎症浸润

1.5.5 ELISA 法检测小鼠血清 DAO、D-乳酸的含量

取 1.5.2 离心得到的血清, 严格按 ELISA 试剂盒说明书操作方法测定。

1.5.6 实时荧光定量 PCR 法 (RT-qPCR) 检测小鼠结肠组织 *Zo1*、*Occludin 1*、*Claudin 1* mRNA

的表达

参考文献^[9],称取小鼠结肠组织 40 mg 于 1.5 mL 无酶离心管,用 Trizol 法提取总 RNA,取总 RNA 2.5 μ L,超微量分光光度计检测并计算 A260/A280 比值与 RNA 浓度。DEPC 水调 RNA 浓度范围为 600-800 pg/mL。加入 5 \times gDNA 2 μ L、5 \times Evo M-mLV RT Reaction MIX 4 μ L、总 RNA+DEPC 水 14 μ L 配置好反转录体系,37 $^{\circ}$ C,15 min、85 $^{\circ}$ C,5 sec 进行反转录。取 cDNA 0.5 μ L 加入 2 \times SYBR[®] Green Pro Tap HS 5 μ L、上下游引物各 0.2 μ L,DEPC 水 4.1 μ L 配置 PCR 扩增体系,内参为 β -actin。扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5min,95 $^{\circ}$ C 变性 10s,60 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s,40 个循环。用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 *Zo1*、Occludin 1、Claudin 1 mRNA 的相对表达量。PCR 引物由苏州金唯智生物技术有限公司设计合成,见表 3。

表 3 实时荧光定量 PCR 引物序列

基因	Forward	Reverse	引物片段/bp
β -actin	TTCTACAATGAGCTGCGTGTGGC	CTCATAGCTCTTCTCCAGGGAGGA	240
<i>Zo1</i>	TGAACGCTCTCATAAGCTTCGTAA	ACCGTACCAACCATCATTTCATTG	190
Occludin 1	TGTGGATAAGGAACACATTTATGA	CAGACACATTTTAAACCCACTCTTCA	178
Claudin 1	AGCACCGGGCAGATACAGT	GCCAATTACCATCAAGGCTCG	125

1.5.7 蛋白免疫印迹法(WB)检测小鼠结肠 ZO 1、Occludin 1、Claudin 1、p38MAPK、ERK、JNK 蛋白及其磷酸化产物 p-p38MAPK、p-ERK、p-JNK 的蛋白表达

参考文献^[6]用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测各蛋白表达,称取小鼠结肠组织约 50 mg 于 1.5 mL 无酶无菌 EP 管内,加预冷 RIPA 组织裂解液和高压处理的研磨珠,研磨机研磨 20 s 提取蛋白。4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min,取上清用 BCA 法测定蛋白浓度,加 PBS 调节蛋白浓度一致后进行变性。上样 8 μ g/孔进行 SDS-PAGE 电泳(150 v,60 min),0.5 A 恒流转膜 1 h,5%脱脂奶粉孵育盒中脱色摇床转速 90,封闭 2 h 后 TBST 洗涤 3 次,每次 5 min。分别加入 10 mL 按比例稀释的一抗(ZO1 1:800, Occludin 1 1:25 000, Claudin 1 1:1 000, p38MAPK1:1 000, ERK1:1 000, JNK1:1 000, p-p38MAPK1:1 000, p-ERK1:1 000, p-JNK1:1 000),4 $^{\circ}$ C 慢摇过夜。洗膜后加入与一抗同源的二抗(1:1 000 稀释的 IgG)室温孵育 1 h,洗膜 3 次。ECL 显色,暗室内曝光。用 Image J 软件分析目的蛋白和内参蛋白的条带灰度值,根据内参蛋白带灰度值计算目的蛋白相对蛋白表达量和 p-p38MAPK/p38MAPK、p-ERK/ERK、p-JNK/JNK 的比值。

1.5.8 统计学方法 数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS 25.0 和 Image J 进行数据统计和处理,多组间比较采用单因素方差分析,当方差齐性时采用 LSD-t 法进行两两比较,方差不齐时,加用 Bonferroni 分析由统计算法自动校正。以 $P<0.05$, $P<0.01$ 表示两组

差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 乌梅丸对 UC 小鼠 DAI 评分的影响

各组小鼠前两天 DAI 评分均为一致且均为 0，与正常对照组比较，模型对照组小鼠 DAI 评分自第 4 d 起显著升高 ($P<0.01$)；与模型对照组比较，乌梅丸 13.04 g/kg 组第 6 d 起、26.09 g/kg 组第 4 d 起 DAI 评分明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表 4。

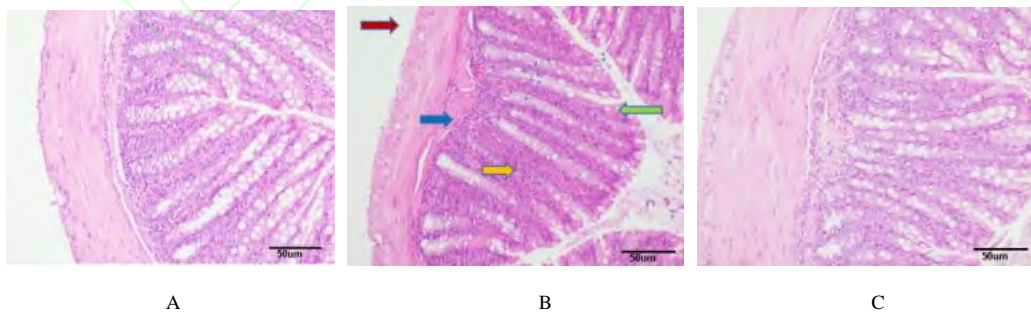
表 4 乌梅丸对 UC 小鼠疾病活动指数 (DAI) 的影响 (n=8, $\bar{x}\pm s$)

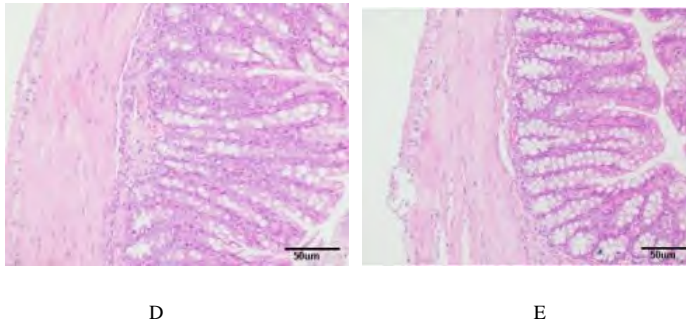
组别	剂量/ (g/kg)	第 3 d	第 4 d	第 5 d	第 6 d	第 7 d
正常对照	0	0.00±0.00	0±0**	0±0**	0±0**	0±0**
模型对照	0	0.25±0.35	0.92±0.35	1.83±0.91	2.38±0.42	2.62±0.33
美沙拉嗪	0.5	0.17±0.31	0.58±0.43	1.08±0.61	1.46±0.43**	1.87±0.35**
乌梅丸	13.04	0.08±0.24	0.67±0.36	1.17±0.59	1.58±0.35**	1.87±0.35**
乌梅丸	26.09	0.08±0.24	0.58±0.24*	0.92±0.35*	1.17±0.47**	1.58±0.35**

与模型对照组比较* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ (下同)。

2.2 乌梅丸对 UC 小鼠结肠组织学变化与病理损伤 (HS) 评分的影响

正常对照组小鼠结肠组织结构完整，未见异常病理组织学变化；模型对照组小鼠肠管肌层 (红色箭头) 变薄，隐窝结构被破坏 (黄色箭头)，杯状细胞 (绿色箭头) 丢失，并出现大量的炎性细胞 (蓝色箭头) 浸润；HS 评分显著升高 ($P<0.01$)；与模型对照组比较，乌梅丸两个剂量干预后，小鼠肠管肌层增厚，隐窝结构完整，杯状细胞增多，炎性细胞浸润减少；HS 评分显著降低 ($P<0.01$)。见图 1、表 5。





红色箭头：肠管肌层变薄；黄色箭头：隐窝结构被破坏；绿色箭头：杯状细胞丢失；蓝色箭头：炎性细胞浸润。

A：正常对照；B：模型对照；C：美沙拉嗪 0.5 g/kg；D：乌梅丸 13.04 g/kg；E：乌梅丸 26.09 g/kg（下同）。

图 1 乌梅丸对 UC 小鼠结肠组织学影响（×200）

表 5 乌梅丸对 UC 小鼠结肠组织学评分（HS）的影响（ $n=8$, $\bar{x} \pm s$ ）

组别	剂量/(g/kg)	HS 评分/分
正常对照	0	0.3±0.5**
模型对照	0	3.5±0.5
美沙拉嗪	0.50	1.5±0.8**
乌梅丸	13.04	2.1±0.6**
乌梅丸	26.09	1.5±0.5**

2.3 乌梅丸对 UC 小鼠血清二胺氧化酶（DAO）、D-乳酸的影响

与正常对照组比较，模型对照组小鼠血清 DAO、D-乳酸含量显著升高（ $P<0.01$ ），与模型对照组比较，乌梅丸 26.09 g/kg 组血清 DAO 显著降低、两个剂量组血清 D-乳酸均显著降低（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）。结果见表 6。

表 6 乌梅丸对 UC 小鼠血清二胺氧化酶（DAO）和 D-乳酸含量的影响（ $\bar{x} \pm s$ ， $n=6$, pg/mL）

组别	剂量/(g/kg)	DAO	D-乳酸
正常对照	0	66.33±3.27**	4.53±0.29**
模型对照	0	352.85±31.45	52.09±1.47
美沙拉嗪	0.50	261.48±16.58**	42.48±0.50**
乌梅丸	13.04	316.64±20.11*	47.07±0.59**
乌梅丸	26.09	302.39±18.52*	45.63±0.93**

2.4 乌梅丸对 UC 小鼠结肠组织 Occludin 1、Claudin 1、Zo1mRNA 的影响

与正常对照组比较，模型对照组小鼠结肠组织 Occludin 1、Claudin 1、Zo1mRNA 的表达均显著降低（ $P<0.01$ ），两个剂量乌梅丸组小鼠结肠组织 Zo1、Occludin 1、Claudin 1m

RNA 的表达水平均显著升高 ($P<0.01$)，结果见表 7。

表 7 乌梅丸对 UC 小鼠结肠闭合蛋白 1 (Occludin 1)、封闭蛋白 1 (Claudin 1)、闭锁小带蛋白 1 (ZO1) mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(g/kg)	Occludin 1	Claudin 1	Zo1
正常对照	0	1.000±0.037**	1.017±0.088**	1.004±0.097**
模型对照	0	0.139±0.023	0.115±0.007	0.286±0.044
美沙拉嗪	0.50	0.820±0.054**	0.637±0.032**	0.839±0.014**
乌梅丸	13.04	0.550±0.026**	0.431±0.021**	0.474±0.033**
乌梅丸	26.09	0.802±0.032**	0.530±0.022**	0.760±0.041**

2.5 乌梅丸对 UC 小鼠结肠组织 Occludin 1、Claudin 1、ZO 1 蛋白表达的影响

与正常对照组比较，模型对照组小鼠结肠组织 Occludin 1、Claudin 1 和 ZO 1 的表达显著下调 ($P<0.01$)；两个剂量乌梅丸组小鼠结肠组织 Occludin 1、Claudin 1 和 ZO1 蛋白的表达均显著上调 ($P<0.01$)。见图 2、表 8。

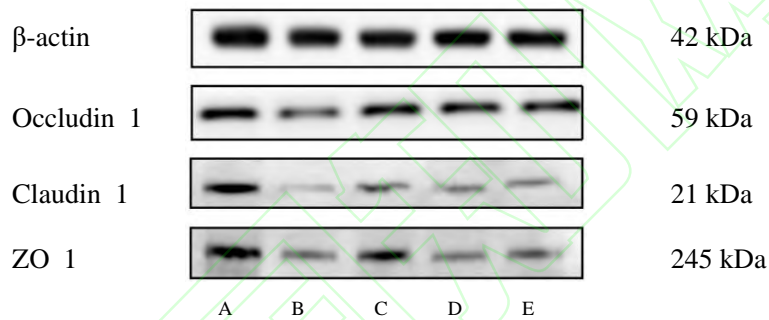


图 2 乌梅丸对小鼠结肠组织 Occludin 1、Claudin 1、ZO 1 蛋白表达的影响

表 8 乌梅丸对 UC 小鼠结肠组织闭合蛋白 1 (Occludin 1)、封闭蛋白 1 (Claudin 1)、闭锁小带蛋白 1 (ZO 1) 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(g/kg)	Occludin 1/β-actin	Claudin 1/β-actin	ZO1/β-actin
正常对照	0	1.042±0.085**	0.856±0.066**	0.498±0.045**
模型对照	0	0.567±0.024	0.174±0.038	0.184±0.004
美沙拉嗪	0.50	0.830±0.034**	0.655±0.057**	0.424±0.039**
乌梅丸	13.04	0.813±0.032**	0.354±0.025**	0.381±0.048**
乌梅丸	26.09	0.816±0.013**	0.413±0.030**	0.437±0.037**

2.6 乌梅丸对 UC 小鼠结肠组织 p38MAPK、ERK、JNK 蛋白及其磷酸化产物 p-p38MAPK、p-ERK、p-JNK 蛋白表达的影响

与正常对照组比较，模型对照组小鼠结肠组织 p-p38/p38、p-ERK/ERK 和 p-JNK/JNK 相对水平显著升高 ($P<0.01$)；与模型对照组比较，两个剂量乌梅丸组 p-p38/p38、p-ERK/ERK 和 p-JNK/JNK 相对水平显著降低 ($P<0.01$)。见图 3、表 9。

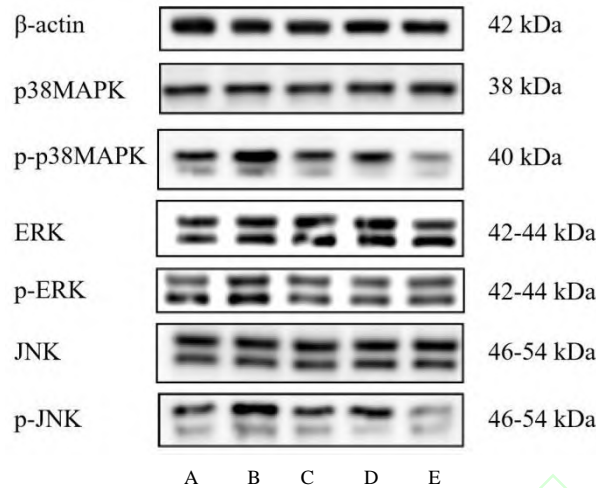


图3 乌梅丸对 UC 小鼠结肠 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (P38MAPK)、细胞外信号调节激酶 (ERK)、氨基末端激酶 (JNK) 蛋白及磷酸化蛋白表达的影响

表9 乌梅丸对 UC 小鼠结肠 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (P38MAPK)、细胞外信号调节激酶 (ERK)、氨基末端激酶 (JNK) 蛋白表达及磷酸化比率的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=6)

组别	剂量/ (g/kg)	p38/ β -actin	ERK/ β -actin	JNK/ β -actin	p-p38/p38	p-ERK/ERK	p-JNK/JNK
正常对照	0	0.880 \pm 0.234	1.056 \pm 0.065	1.619 \pm 0.285	0.764 \pm 0.019**	0.522 \pm 0.019**	0.582 \pm 0.036**
模型对照	0	0.858 \pm 0.130	1.024 \pm 0.061	1.673 \pm 0.297	1.281 \pm 0.044	0.848 \pm 0.060	0.857 \pm 0.043
美沙拉嗪	0.50	0.846 \pm 0.195	1.133 \pm 0.207	1.662 \pm 0.321	0.883 \pm 0.015**	0.526 \pm 0.060**	0.549 \pm 0.051**
乌梅丸	13.04	0.832 \pm 0.136	1.155 \pm 0.195	1.565 \pm 0.269	0.819 \pm 0.010**	0.584 \pm 0.064**	0.639 \pm 0.037**
乌梅丸	26.09	0.872 \pm 0.199	1.169 \pm 0.317	1.478 \pm 0.237	0.813 \pm 0.014**	0.552 \pm 0.050**	0.579 \pm 0.007**

3 讨论

UC 具有病程长、反复发作、迁延难愈等特点，是世界公认的难治性肠道炎症性疾病。不同国家、地区、种族人群中 UC 的发病率不同，地域和种族差异显著，我国 UC 患病率约为 11.6/10 万^[10]，呈现快速上升趋势。目前研究发现，UC 的发病受遗传、环境、心理、免疫等多因素共同影响，各种因素导致肠黏膜屏障受损、肠上皮通透性增加是其发病的核心因素和焦点。黏膜屏障受损，吸收功能减弱，水分吸收减少同时糜烂和溃疡导致肠黏膜分泌大量液体，形成恶性循环。临床以黏膜愈合，症状缓解和减少复发作为疗效评估的指标之一。

DAO^[11]是哺乳动物肠上皮细胞内的一种活性酶，当肠黏膜细胞受损脱落后释放 DAO，DAO 随通透性异常增加的肠道进入血液，导致血清 DAO 水平升高。D-乳酸^[11]是肠道多种固有细菌的代谢产物，很少被机体吸收，恒温动物也不具备分解 D-乳酸的酶系统，当肠道受炎症或缺血刺激、肠黏膜屏障功能受损时，肠中大量 D-乳酸通过受损的肠黏膜进入血液。因此，肠道来源的血液标志物如 DAO 和 D-乳酸可一定程度反映肠黏膜屏障的完整性及损伤程度。Occludin、Claudin 和 ZO-1 蛋白是构成肠道机械屏障中 TJs 的重要组成蛋白，参与维

持正常肠黏膜屏障功能^[12]。研究表明这几种蛋白表达异常会导致 TJs 功能失调,引起肠黏膜屏障功能紊乱、渗透性增加,是炎症性肠病的重要特征^[13]。本研究显示,DSS 诱导的 UC 小鼠血清 DAO 和 D-乳酸水平显著升高、结肠组织 3 种 TJs 蛋白表达显著降低。提示 UC 小鼠结肠黏膜屏障受损。乌梅丸降低血清 DAO 和 D-乳酸水平,升高结肠组织相关 TJs 蛋白表达,从而减轻或修复肠黏膜屏障损伤。

MAPK 信号通路在肠黏膜损伤、凋亡、增殖和修复中发挥着重要的作用^[14-15]。MAPK 信号通路活化可致肠黏膜上皮细胞凋亡、诱导多种炎症因子如 IL-1、IL-6、TNF- α 等释放,也可使 occludin、claudin-1、ZO-1 等 TJs 蛋白表达异常,黏膜受损^[16]。ERK、JNK、p-38 是 MAPKs 家族中的重要成员,p-ERK/ERK、p-JNK/JNK 及 p-p38/p-38 的相对含量可以反映 MAPK 通路的激活状态。本研究显示,DSS 诱导的 UC 小鼠结肠组织 p-38/P-38、ERK /p-ERK、JNK/p-JNK 表达均显著升高,而乌梅丸能降低小鼠结肠组织 p-38/P-38、ERK /p-ERK、JNK/p-JNK 的比值,抑制该信号通路活化。

4 结论

综上所述,乌梅丸对 DSS 诱导的 UC 小鼠肠黏膜屏障损伤具有一定的减轻/修复作用,其作用机制与抑制 p-38/MAPK 信号通路的活化,升高紧密连接蛋白的表达有关。但本研究仅从乌梅丸对实验小鼠肠黏膜机械屏障影响的角度探讨了其机制,乌梅丸对肠黏膜屏障的保护作用仍需进一步深入研究。

参考文献

- [1]甄建华,黄光瑞.溃疡性结肠炎病因和发病机制的现代医学研究进展[J].世界华人消化杂志,2019,27(4):245-251.
- [2]HUANG S S, LI L, Ben-Horin S, et al. Mucosal Healing Is Associated With the Reduced Disabling Disease in Crohn's Disease [J]. Clinical and Translational Gastroenterology, 2019,10(3):1-9.
- [3]王颖,赵冠宇,薛淑萍等.乌梅丸及其类方治疗胃肠疾病的临床与基础研究进展[J].中药药理与临床,2023,39(3):122-128.
- [4]LIN T C, WANG K H, CHUANG K H, et al. Interleukin-33 promotes invasiveness of human ovarian endometriotic stromal cells through the ST2/MAPK/MMP-9 pathway activated by 17 β -estradiol[J]. Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2021,60(4):658-664.
- [5] DUN Y Y, LIU M, CHEN J, et al. Regulatory effects of saponins from *Panax japonicus* on colonic epithelial tight junctions in aging rats [J]. Journal of Ginseng Research, 2017, 41(1):1-7.

- [6]祁燕,袁志伟,万春平等.溃结康对溃疡性结肠炎小鼠结肠抗氧化作用及 Nrf2/ARE 信号通路的影响[J].中药药理与临床,2019,35(2):115-119.
- [7]王潇晗,海英.基于脑肠互动探讨眼针调节 Th17/Treg 免疫平衡治疗溃疡性结肠炎作用机制研究[J].辽宁中医药大学学报,2023,25(8):86-93.
- [8]马琪,翁与竞,李佳,等.参苓白术散对溃疡性结肠炎模型小鼠的疗效评价[J].中国实验动物学报,2021,29(6):785-792.
- [9]朱金华,周军,万红娇等.黄连温胆汤对 2 型糖尿病模型大鼠细胞因子及 TLR4、NF- κ B 变化的影响[J].中药药理与临床,2021,37(3):6-11.
- [10]沈洪,唐志鹏,唐旭东,等.消化系统常见病溃疡性结肠炎中医诊疗指南(基层医生版)[J].中华中医药杂志,2019,34(9):4155-4160.
- [11]周婷婷,宋莎莎,唐敏等.溃疡性结肠炎患者肠粘膜屏障功能测定的临床意义[J].世界最新医学信息文摘,2018,18(61):3-4+7.
- [12]张宇,毛海峰,彭瑞.规律有氧运动促进梗阻性黄疸小鼠肠黏膜紧密连接蛋白 Claudin-1 的表达及激活 C 型鸟苷酸环化酶通路有利于损伤的修复[J].解剖学报,2020,51(4):588-594.
- [13]马军宏,于向阳,张楠,等.紧密连接蛋白与肠黏膜屏障损伤研究进展[J].中国中西医结合外科杂志,2015,21(1):104-105.
- [14]Gauthier Rény,Harnois Charline,Drolet Jean-Francois,et al.Human intestinal epithelial cell survival: differentiation state-specific control mechanisms[J].American journal physiology Cell physiology,2001,280(6):C1540-C1554.
- [15]Kinugasa Tetsushi, Takanori Sakaguchi, Gu Xuibin, et al.Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators[J].Gastroenterology,2000,118(6):1001-1011.
- [16]Oshima T, Sasaki M, Kataoka H, et al.Wip1 protects hydrogen peroxide-induced colonic epithelial barrier dysfunction[J].Cellular and molecular life sciences,2007,64(23):3139-3147.

Mechanism of Wumei (乌梅) Pills in Restoring Intestinal Mucosal Barrier in Mice with Ulcerative Colitis Based on P38MAPK Signaling Pathway*

DU Lidong^{1,2}, WANG Ying¹, ZHAO Guanyu¹, SHAO Jing^{1,2}, REN Yuan^{1,2}, QIU Zhengying³, WU Guotai^{1,2**}, XIN Ruihua^{3**}

(¹College of Pharmacy, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000; ²Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmacology and Toxicology in Gansu Province, Lanzhou 730000; ³Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences of CAAS, Lanzhou 730050)

Abstract Objective: To investigate the mechanism of Wumei (乌梅) Pills in restoring intestinal mucosal barrier injury in mice with ulcerative colitis (UC) based on the p38 mitogen activated protein kinase (P38MAPK) signaling pathway. **Methods:** Forty C57BL/6 mice were randomly divided into normal control group, model control group, mesalazine (0.5 g/kg) group, and Wumei Pill groups of 13.04 g/kg and 26.09 g/kg. The mice of the normal control group had free access to water, while the mice of the modeling groups had free access to 2% dextran sodium sulfate (DSS) aqueous solution. At the same time, mice in the normal control group and model control group were orally administrated with normal saline, while mice in the administration groups were orally administrated with corresponding medication. The disease activity index (DAI) of the mice was evaluated. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe and score the histopathological score (HS) of the colon. The levels of diamine oxidase (DAO) and D-lactate in the serum of the mice were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expressions of *Occludin-1*, *Claudin-1*, and zonula occludens-1 (*Zo-1*) in colon tissue were tested by real-time fluorescence quantification polymerase chain reaction (RT-qPCR). The expressions of Occludin-1, Claudin-1, and ZO-1 in colon tissue, as well as p38MAPK, extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-jun N-terminal kinase (JNK) protein, and its phosphorylation products including p-ERK, p-JNK, and p-p38MAPK were tested by western blotting (WB). **Results:** Compared with the normal control group, the DAI and HE scores and the levels of DAO and D-lactate in peripheral blood were all improved in the model control group from the 4th day of molding ($P < 0.01$). The protein and mRNA expressions of Occludin-1, Claudin-1, and ZO-1 in colon tissue were significantly reduced ($P < 0.01$). The ratios of p-p38MAPK/p38MAPK, p-ERK/ERK, and

p-JNK/JNK in colon tissue were significantly increased ($P<0.01$). Compared with the model control group, the DAI and HE scores were decreased in the Wumei Pill groups ($P<0.01$ or $P<0.05$). The protein and mRNA expressions of Occludin-1, Claudin-1, and ZO-1 in colon tissue were significantly increased ($P<0.01$), and the ratios of p-p38MAPK/p38MAPK, p-ERK/ERK, and p-JNK/JNK in colon were significantly decreased ($P<0.01$). The content of D-lactate in the serum of the Wumei Pill (13.04 g/kg) group, and the contents of DAO and D-lactate in the serum of the Wumei Pill (26.09 g/kg) group were significantly decreased ($P<0.01$ or $P<0.05$).

Conclusion: One of the mechanisms of Wumei Pills restoring intestinal mucosal barrier injury in mice with UC may be inhibiting the phosphorylation of p38MAPK signaling pathway protein and increasing the expression of tight junction protein.

Key words: Wumei (乌梅) Pills, Ulcerative colitis, P38 mitogen activated protein kinase signaling pathway, Intestinal mucosal barrier