

青黛通过 ERK/p38 MAPK/MEK 信号通路对湿热内蕴型溃疡性结肠炎大鼠抗炎修复和免疫功能的影响

王博¹, 丁晓坤^{1*}, 权沛沛², 王国琛³

1. 南开大学附属北辰医院, 天津 300400

2. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300250

3. 天津市东丽区中医院, 天津 300300

摘要: **目的** 探讨青黛对湿热内蕴型溃疡性结肠炎大鼠抗炎修复和免疫功能的影响, 并探讨其机制。 **方法** 60 只大鼠随机分为 6 组, 分别为对照组、模型组、青黛低剂量组、青黛中剂量组、青黛高剂量组以及柳氮磺胺吡啶 (SASP) 组、每组 10 只。青黛低、中、高剂量组分别 ig 0.6、1.2、2.4 g/kg 青黛悬浊液, SASP 组 ig 500 mg/kg 柳氮磺胺吡啶悬浊液, 对照组、模型组 ig 等体积生理盐水。检测各组大鼠血清白细胞介素 (IL)-4、IL-10 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 含量; 流式细胞术检测外周血单个核细胞 (PBMC) 中 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞百分率; 放射免疫法检测超氧化物歧化酶 (SOD) 和丙二醛 (MDA) 水平; 荧光实时定量 PCR 法检测蛋白激酶 (ERK)、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK) 和 MEK mRNA 相对表达; 免疫印迹法检测 ERK、p38 MAPK 和 MEK 蛋白表达。 **结果** 与对照组相比, 模型组大鼠血清中 IL-4、IL-10 降低, TNF- α 升高, PBMC 中 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞含量降低, 大鼠结肠组织中 ERK、p38 MAPK mRNA 和蛋白表达升高、MEK mRNA 和蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 青黛低、中、高剂量组大鼠血清中 IL-4、IL-10 升高, TNF- α 降低, PBMC 中 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞升高, ERK、p38 MAPK mRNA 和蛋白表达降低, MEK mRNA 和蛋白表达升高 ($P < 0.05$), 青黛低、中、高剂量组间比较差异存在统计学意义 ($P < 0.05$)。对照组肠组织结构完好, 模型组结肠肠壁糜烂、溃疡形成, 炎症明显; 青黛低剂量组仍伴随较大溃疡形成及炎症浸润; 青黛中剂量组肠壁轻微增厚; 青黛高剂量组与 SASP 组肠壁结构尚完整, 有极少量炎症细胞浸润。 **结论** 青黛能够降低湿热内蕴型溃疡性结肠炎大鼠体内炎症因子的产生, 抑制炎症反应, 促进免疫功能的恢复, 其机制与调节 ERK/p38 MAPK/MEK 信号通路有关。

关键词: 青黛; 柳氮磺胺吡啶片; 湿热内蕴; 溃疡性结肠炎; 抗炎修复; 免疫功能; 丝裂原活化蛋白激酶 p38 抗体

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)06-1297-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.06.002

Effect of *Indigo Naturalis* on anti-inflammatory repair and immune function in rats with damp-heat ulcerative colitis by ERK/p38 MAPK/MEK signaling pathway

WANG Bo¹, DING Xiao-kun¹, QUAN Pei-pei², WANG Guo-chen³

1. Beichen Hospital of Nankai University, Tianjin 300400, China

2. The Second Affiliated Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300250, China

3. Tianjin Dongli Chinese Medicine Hospital, Tianjin 300300, China

Abstract: Objective To explore the effect of *Indigo Naturalis* on anti-inflammatory repair and immune function in rats with ulcerative colitis induced by damp-heat, and to explore its mechanism. **Methods** Sixty rats were randomly divided into control group ($n = 10$), model group ($n = 10$), low dose group ($n = 10$), middle dose group ($n = 10$), high dose group ($n = 10$) and sulfasalazine (SASP) group ($n = 10$). The model rats in the *Indigo Naturalis* low, middle and high dose groups were given 0.6, 1.2 and 2.4 g/kg, respectively. The model rats in the SASP group were gavaged according to 500 mg/kg sulfasalazine suspension, and the control group and model group were given the same volume of normal saline. The contents of IL-4, IL-10 and TNF- α in serum, the percentage of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were detected by flow cytometry, the levels of MDA and SOD were detected by radioimmunoassay, the mRNA expressions of ERK, p38 MAPK and MEK genes were detected by Real-time PCR method, and the expressions of ERK, p38 MAPK and MEK proteins were detected by western blotting. **Results** Compared with the control

收稿日期: 2023-01-20

基金项目: 河北省中医药管理局科研计划项目 (2015012)

作者简介: 王博, 硕士, 主治医师, 研究方向为胃肠外科。E-mail: wangbo840518@163.com

*通信作者: 丁晓坤, 女, 硕士, 研究方向为中医科。E-mail: jahytlp26@163.com

group, the serum IL-4 and IL-10 of the model group decreased, the TNF- α increased, the content of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in PBMC decreased, and the mRNA expression and protein expression of ERK and p38 MAPK gene and MEK decreased in the colon tissue of rats in the model group. Compared with the model group, IL-4 and IL-10 in serum increased, TNF- α decreased, CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in PBMC increased, mRNA expression and protein expression of ERK and p38 MAPK decreased and MEK increased in serum of rats in low, middle and high *Indigo Naturalis* groups. The intestinal tissue structure of the control group was intact, and the intestinal wall erosion, ulcer formation and inflammation of the model group were obvious; the low dose group was still accompanied by large ulcer formation and inflammatory infiltration; the middle dose group of indigo slightly thickened; the high dose group and SASP group intestinal wall structure was still intact, with a very small amount of inflammatory cell infiltration. **Conclusion** *Indigo Naturalis* can reduce the production of inflammatory factors, inhibit the inflammatory reaction and promote the recovery of immune function in rats with ulcerative colitis of damp-heat type, and its mechanism is related to the regulation of ERK/p38 MAPK/MEK signaling pathway.

Key words: *Indigo Naturalis*; Sulfasalazine Tablets; damp-heat; ulcerative colitis; anti-inflammatory repair; immune function; p38 MAPK

溃疡性结肠炎(UC)作为一种非特异性肠道炎症性疾病,近年来发病率不断升高^[1]。病变多累及直肠和远端结肠,结肠黏膜出现弥漫性炎性细胞浸润,伴有多发性溃疡形成,临床表现为腹痛、腹泻和脓血便等症状,有些患者也会伴随关节炎和角膜炎等肠外表现,表现痛苦,需要及时治疗,且具有易复发、易迁延的特点,具体的发生机制可能与患者所处环境、遗传以及自身免疫有关^[2]。研究显示,湿热内蕴型 UC 患者机体内炎症升高、免疫异常,可能与激活细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)/p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)通路有关^[3]。UC 在中医里属“痢疾”“泄泻”范畴,湿热内蕴、脾胃失调是其主要原因。清热解毒、燥湿止痢的同时配合健脾益气能够治根、治本,采用中药治疗 UC 患者症状缓解持久,具有复发率低、不良反应小的优势^[4]。青黛来源于爵床科、蓼科等植物的叶、茎,性寒,味咸,归肝、肺、胃经,具有清热燥湿、凉血、解毒和化腐生肌的功效。研究表明青黛颗粒中的有效成分能够抑制溃疡,调节免疫,促进肠道创口愈合^[5]。本研究主要探讨青黛对于湿热内蕴型 UC 的抗炎修复、免疫功能及 ERK/p38 MAPK 的影响,为其在临床中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

60 只 8 周龄 SD 雄性大鼠,体质量 180~200 g,由河北医科大学动物实验中心提供,合格证号 506468,许可证号 SCXK(冀)2003-1-003。大鼠在河北医科大学实验动物中心饲养,室温控制在 20~22 °C,湿度控制在 40%~60%,明暗周期 12 h/12 h,进食饮水自由,通风整洁环境中饲养 1 周。

1.2 主要试剂与仪器

青黛饮片由四川江油恒源药业提供,批号

120301,实验时用纯化水配制成所需浓度的混悬液,每次给药前摇匀后使用。柳氮磺吡啶肠溶片(H31020450, 0.25 g/片)由上海中西三维制药有限公司提供。三硝基苯磺酸(TNBS)购自美国 Sigma 公司;戊巴比妥钠购自上海氟德化工有限公司;PBS 缓冲液购自康迪斯化工(湖北)有限公司;RIPA 裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司;白细胞介素(IL)-4、IL-10 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA 试剂盒购自第四军医大学;超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;DNA 提取试剂盒购自南京诺唯赞有限公司;荧光实时定量 PCR 试剂盒购自美国 ABI 公司;cDNA 第一链合成试剂盒购自上海烜雅有限公司;SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;CD4⁺、CD8⁺单抗购自武汉生物制品厂;ERK(BS-5469R)、p38 MAPK(IAAI6948)、 β -actin(FT-B3350S)抗体均购自日本 Dako 公司;Centrifuge 5424R 型高速低温离心机购自美国贝克曼库;分光光度计购自北京天根有限公司;荧光实时定量 PCR 仪购自北京赛百奥有限公司;Forma 900 系列超低温冰箱购自美国 Thermo Scientific 公司;超速低温离心机购自美国 Sigma 公司。

1.3 分组及动物模型建立

60 只实验大鼠随机取 10 只作为对照组进行常规喂养,其余 50 只分为模型组,青黛低、中、高剂量组及 SASP 组,每组 10 只。采取高脂高糖饮食法,以普通饲料喂养为基础,自由饮用 200 g/L 蜂蜜水,每日上午 ig 猪油 10 g/kg,次日 ig 56° 白酒 10 mL/kg,交替 ig,连续 20 d,建立湿热内蕴型 UC 大鼠模型^[6]。结束后各组大鼠的饲料中混合 12% 动物脂肪和 10% 糖浆,并按照 20 mL/kg 的剂量隔日交替 ig 56° 白酒。将大鼠放置于温度、湿度分别为

35 °C、95%的人工气候箱饲养 21 d 后，禁食 1 d，促进大鼠排空大便，清洁肛周。ip 1%戊巴比妥钠(40 mg/kg) 对大鼠进行麻醉，仰卧固定于解剖台，将石蜡润滑后的灌肠管由肛门插入结肠约 8 cm 位置，按照 100 mg/kg 注入 1:1 的三硝基苯磺酸 (TNBS) 与无水乙醇混合液，保持头低脚高倾斜 45° 姿势 2 min。清醒后自由进食饮水。3 周后对大鼠进行评估，出现明显的结肠膜出血水肿、纹理不清晰；部分溃疡、糜烂以及出血点或附着白色伪膜；结肠长度缩短、肠腔狭窄以及脏器黏连等情况为模型建立成功。

1.4 药物制备及给药

SASP 悬浊液的制备：SASP 片研磨成粉，使用蒸馏水溶解成悬浊液，使药物浓度保持在 0.1 mg/mL。SASP 组大鼠 ig 0.5 g/kg SASP 悬浊液。青黛悬浊液制备：使用蒸馏水溶解成药物浓度分别为 0.1、0.2、0.4 mg/mL 的低、中、高剂量悬浊液。青黛高剂量按成人最大给药浓度，折算剂量 2.4 g/kg，青黛中、低剂量分别为 1.2、0.6 g/kg，分别相当于 24、12 倍临床人用剂量^[7]；对照组及模型组大鼠给予同等体积的生理盐水。造模后各组大鼠于每日同一时间连续给药 10 d，各组大鼠于同等条件下饲养。

1.5 样本采集

于末次给药 24 h 后，3%戊巴比妥钠对大鼠进行麻醉，取腹主动脉血，4 °C 下离心 20 min，3 000 r/min，血清分装于 EP 管中，存于 -20 °C 冰箱内备用。取血后开腹，取结肠组织中病变的最明显处，生理盐水洗净，多聚甲醛固定，备用。

1.6 大鼠血清 IL-4、IL-10 和 TNF- α 水平比较

从腹主动脉取得的血液置于离心机离心 10 min (4 °C，3 000 r/min)，收集上清液于 -80 °C 保存备测。按照 ELISA 试剂盒操作规程测定血清 IL-4、IL-10 以及 TNF- α 的水平。

1.7 HE 染色

取大鼠结肠组织，二甲苯及梯度乙醇脱蜡，用苏木素浸染 5 min，清洗，1%盐酸乙醇溶液分色 30 s，清洗，伊红染液，染色 1 min，清洗，梯度乙醇及二甲苯脱水、透明、中性树胶封片，光学显微镜观察结肠组织病理学变化。

1.8 流式细胞术检测 PBMC 中 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞百分率

100 μ L 血液放入离心管中，加入 10 μ L 的抗体 CD4⁺、CD8⁺，混合后在室温环境下孵育 20 min，加入红细胞裂解液，溶解 10 min，按照 1 500 r/min (离

心半径 10 cm) 离心 5 min，弃去上清液，其余用 PBS 冲洗，最后将悬浮于 0.3 mL PBS 溶液加入 1%多聚甲醛固定，采用流式细胞仪检测 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞百分率。

1.9 荧光实时定量 PCR 法检测 ERK、p38 MAPK 和 MEK mRNA 表达

取各组大鼠结肠组织，DNA 提取试剂盒提取总 RNA，分光光度计检测其浓度及纯度，cDNA 第一链合成试剂盒逆转录合成 cDNA，Primerpremier 5.0 软件设计 ERK、p38 MAPK、MEK 基因引物，完成后利用荧光实时定量 PCR 仪，在 94 °C 条件下预变性 5 min，95 °C 变性 60 °C 退火 30 s，此循环进行 40 次，收集 ERK、p38 MAPK、MEK 荧光信号，反应结束后进行数据分析，以同一样本中的 β -actin 的 Ct 值作为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算其基因相对表达量，引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
ERK	正向: CTCTGTCATTGCCACCA
	反向: ATCCACTCTCCATCTCCAT
p38 MAPK	正向: CAGCCCACGGACCAAATA
	反向: AACGAGCATCTTCTCCAGTA
MEK	正向: ACGGACAAATACCAGGAGCCC
	反向: CATACGACCGGAGTAGTTAACTC
β -actin	正向: CACCCGCGAGTACAACCTTC
	反向: CCCATACCCACCATCACACC

1.10 免疫印迹检测 ERK、p38 MAPK 和 MEK 蛋白表达

取大鼠结肠组织，按 1:5 的比例加入裂解液，14 000 r/min、4 °C 离心 15 min，取上清液，收集在 EP 管中备用，按照 4:1 的比例混合 TBST 稀释蛋白样品，沸水煮沸 10 min，采用 BCA 法测总蛋白浓度，每孔上样蛋白量 30 μ g，SDS-PAGE 凝胶电泳。转印缓冲液于 4 °C 冰箱内预冷，然后全部转移到 PVDF 膜上，封闭 1 h。加入一抗 ERK (1:100)、p38 MAPK (1:100)、MEK (1:500)，4 °C 过夜孵育后，室温 37 °C 孵育二抗 1 h (1:2 000)，显色发光，检测，获取图像，并与内参 β -actin 的测定结果比较。

1.11 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 统计学软件进行分析，计量数据符合正态分布及方差齐性，采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，两组间对比

采用 LSD-*t* 检验。

2 结果

2.1 大鼠血清中 IL-4、IL-10 和 TNF- α 表达水平

与对照组相比,模型组大鼠血清中 IL-4、IL-10 降低, TNF- α 升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比,青黛低、中、高剂量组和 SASP 组大鼠血清中 IL-4、IL-10 升高, TNF- α 降低,不同剂量组的比较差异存在统计学意义 ($P < 0.05$),且青黛高剂量组 IL-4、IL-10 表达最高, TNF- α 表达最低,与 SASP 组比较

差异无统计学意义,见表 2。

2.2 HE 染色

对照组大鼠肠组织及黏膜结构完好;模型组大鼠结肠肠壁增厚,糜烂及溃疡形成,全层可见大量炎症细胞浸润;青黛低剂量组大鼠仍伴随较大的溃疡形成,固有层基层明显增厚,大量炎症细胞浸润至全层;青黛中剂量组大鼠肠壁轻微增厚,黏膜层有糜烂,有炎症细胞浸润;青黛高剂量组与 SASP 组大鼠肠壁结构尚完整,有极少量炎症细胞浸润,见图 1。

表 2 大鼠血清 IL-4、IL-10 和 TNF- α 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Comparison on serum expression levels of IL-4, IL-10 and TNF- α in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-4/(pg·mL ⁻¹)	IL-10/(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)
对照	—	138.71 ± 8.11	87.26 ± 3.54	27.45 ± 4.37
模型	—	77.35 ± 4.78*	49.17 ± 4.38*	112.36 ± 5.54*
青黛	0.6	89.46 ± 8.76#	53.24 ± 4.26#	88.56 ± 3.95#
	1.2	110.45 ± 7.32# [▲]	62.54 ± 5.84# [▲]	57.45 ± 3.27# [▲]
	2.4	129.88 ± 8.90# ^{▲△}	79.35 ± 5.24# ^{▲△}	39.89 ± 3.68# ^{▲△}
SASP	0.5	124.32 ± 7.35# ^{▲△}	76.35 ± 4.75# ^{▲△}	44.79 ± 4.01# ^{▲△}

与对照组相比: * $P < 0.05$; 与模型组相比: # $P < 0.05$; 与青黛低剂量组相比: [▲] $P < 0.05$; 与青黛中剂量组相比: [△] $P < 0.05$;

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs Qingdai low-dose group; [△] $P < 0.05$ vs Qingdai medium-dose group

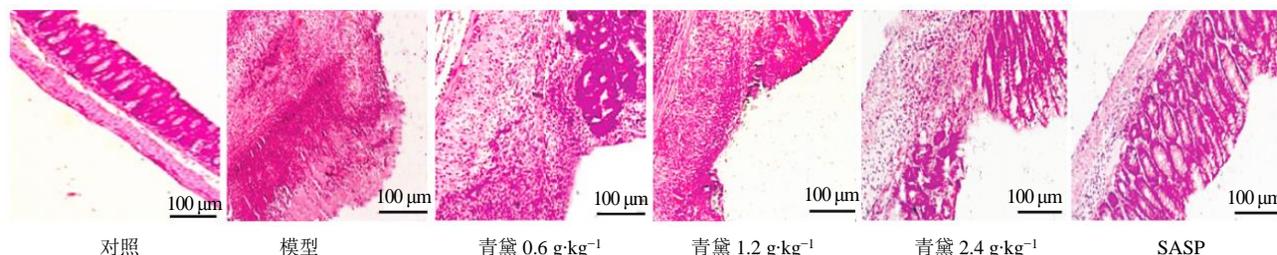


图 1 HE 染色 (×100)

Fig. 1 HE staining (×100)

2.3 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞百分率

与对照组相比,模型组大鼠血液 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞含量明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比,青黛低、中、高剂量组大鼠血液 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞百分率明显升高,且青黛高剂量组 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞含量最高,不同剂量组间比较差异存在统计学意义 ($P < 0.05$),青黛高剂量组与 SASP 组比较差异无统计学意义,见表 3、图 2。

2.4 结肠组织中 ERK、p38 MAPK 和 MEK mRNA 相对表达量

与对照组相比,模型组大鼠结肠组织中 ERK、p38 MAPK mRNA 表达明显升高,而 MEK mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比,青黛低、

表 3 大鼠血液中 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞含量比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Comparison on CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte contents in blood of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	CD4 ⁺ T 淋巴细胞%	CD8 ⁺ T 淋巴细胞%
对照	—	69.72 ± 5.59	30.12 ± 2.78
模型	—	26.79 ± 6.27*	16.56 ± 1.58*
青黛	0.6	36.79 ± 2.12#	19.74 ± 1.79#
	1.2	45.51 ± 2.57# [▲]	22.17 ± 1.58# [▲]
	2.4	56.32 ± 2.68# ^{▲△}	27.79 ± 2.03# ^{▲△}
SASP	0.5	54.39 ± 2.66# ^{▲△}	26.15 ± 1.57# ^{▲△}

与对照组相比: * $P < 0.05$; 与模型组相比: # $P < 0.05$; 与青黛低剂量组相比: [▲] $P < 0.05$; 与青黛中剂量组相比: [△] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs Qingdai low-dose group; [△] $P < 0.05$ vs Qingdai medium-dose group

中、高剂量组大鼠 ERK、p38 MAPK mRNA 表达降低, MEK mRNA 表达升高, 且不同剂量组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 青黛高剂量组与 SASP 组比较差异无统计学意义, 见表 4。

2.5 结肠组织 ERK、p38 MAPK 和 MEK 蛋白表达与对照组相比, 模型组大鼠结肠组织中 ERK、

p38 MAPK 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), MEK 蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 青黛低、中、高剂量组大鼠 ERK、p38 MAPK 蛋白表达降低, MEK 蛋白表达升高, 且不同剂量组的比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 青黛高剂量组与 SASP 组比较差异无统计学意义, 见表 5、图 3。

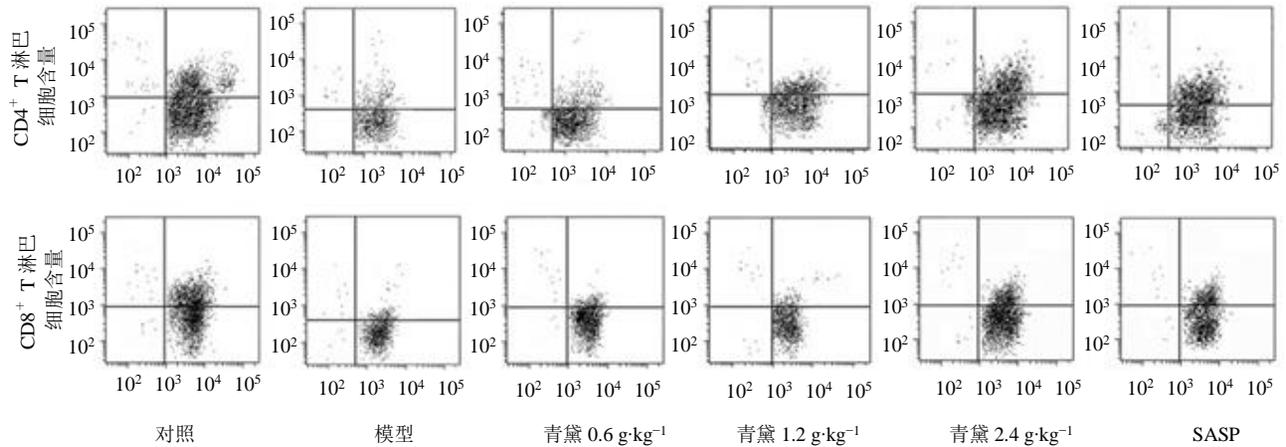


图 2 流式细胞仪检测各组大鼠血液中 CD4⁺和 CD8⁺百分率

Fig. 2 Proportion of CD4⁺ and CD8⁺ in the blood of rats in each group by flow cytometry

表 4 结肠组织中 ERK、p38 MAPK 和 MEK mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Relative mRNA expression of ERK, p38 MAPK and MEK in colon tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达水平		
		ERK	p38 MAPK	MEK
对照	—	0.04 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.39 ± 0.19
模型	—	0.43 ± 0.12*	0.62 ± 0.08*	0.08 ± 0.02*
青黛	0.6	0.27 ± 0.09*#	0.42 ± 0.04*#	0.17 ± 0.05*#
	1.2	0.16 ± 0.04*#▲	0.29 ± 0.03*#▲	0.26 ± 0.09*#▲
	2.4	0.09 ± 0.03*#▲△	0.15 ± 0.02*#▲△	0.32 ± 0.15*#▲△
SASP	0.5	0.11 ± 0.03*#▲△	0.17 ± 0.03*#▲△	0.30 ± 0.16*#▲△

与对照组相比: * $P < 0.05$; 与模型组相比: # $P < 0.05$; 与青黛低剂量组相比: ▲ $P < 0.05$; 与青黛中剂量组相比: △ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ vs Qingdai low-dose group; △ $P < 0.05$ vs Qingdai medium-dose group

表 5 结肠组织 ERK、p38 MAPK 和 MEK 蛋白相对表达 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 5 Comparison on ERK, p38 MAPK and MEK protein expression in colon tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	蛋白相对表达水平		
		ERK	p38 MAPK	MEK
对照	—	17.69 ± 1.97	24.42 ± 4.39	0.41 ± 0.19
模型	—	82.37 ± 5.91*	94.52 ± 6.87*	0.06 ± 0.02*
青黛	0.6	62.27 ± 4.67*#	73.25 ± 5.45*#	0.12 ± 0.05*#
	1.2	41.58 ± 3.52*#▲	54.77 ± 4.12*#▲	0.21 ± 0.09*#▲
	2.4	22.79 ± 3.26*#▲△	31.56 ± 4.08*#▲△	0.31 ± 0.15*#▲△
SASP	0.5	23.77 ± 3.85*#▲△	34.21 ± 4.39*#▲△	0.30 ± 0.16*#▲△

与对照组相比: * $P < 0.05$; 与模型组相比: # $P < 0.05$; 与青黛低剂量组相比: ▲ $P < 0.05$; 与青黛中剂量组相比: △ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ vs Qingdai low-dose group; △ $P < 0.05$ vs Qingdai medium-dose group

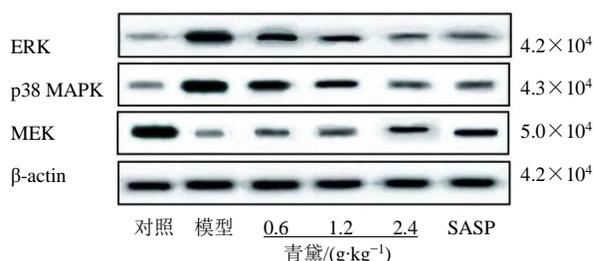


图 3 结肠组织 ERK、p38 MAPK 和 MEK 电泳图

Fig. 3 ERK, p38 MAPK and MEK electrophoresis in colon tissue of rats in each group

3 讨论

湿热内蕴型 UC 属于炎症性肠病，发作时患者症状痛苦，治疗困难且具有容易复发的特点，影响患者的正常生活。近年来，UC 的发病率逐年增加，其具体发生机制尚不完全明确。研究发现，在遗传、环境的基础上，机体内的炎症反应、免疫功能的紊乱以及 ERK/p38 MAPK 信号通路可能与 UC 的发生有着密切的关系^[8]。柳氮磺吡啶是临床上治疗 UC 的常见药，主要通过对抗体以及杀伤细胞等发挥治疗作用，但患者长时间服药，可能会产生不良反应^[9]。青黛属于中药范畴，具有清热燥湿、化腐生肌的功效，对于湿热内蕴型 UC 具有良好效果且具有不良反应小的优点。

机体内炎症反应是湿热内蕴型 UC 发生的重要环节，主要由于机体中抗炎和促炎因子的失衡导致。TNF- α 是最常见、炎症作用最强致炎因子，在肠炎中表达升高。研究表明，炎症因子激活可导致溃疡性结肠炎的发生发展，IL-4 的来源主要依靠活化的 T 细胞，是重要的抗炎因子，在肠道黏膜的创伤中发挥抑制炎症的作用，IL-10 主要来源于 Th2 细胞，具有抑制炎症因子形成的作用^[10]。本研究显示，湿热内蕴型 UC 发生后，大鼠血清中 IL-4 和 IL-10 降低，TNF- α 升高，经过青黛的治疗后，血清中 IL-4、IL-10 升高，TNF- α 降低，且治疗效果与青黛剂量有关，剂量越高，效果越好。说明青黛可以促进 IL-4、IL-10 的分泌，抑制 TNF- α 炎症因子，抑制炎症反应，缓解病情。中医认为湿热内蕴型 UC 由暑湿热毒侵入大肠、脾虚肝旺导致，青黛具有清热解毒、止泻等功效，能够发挥抗病原微生物的作用，具有生机作用，对溃疡、创伤有良好效果^[11]。研究显示，复方青黛颗粒对 UC 大鼠具有良好的临床效果，可降低充血指数，对于疼痛以及炎症具有缓解作用，抑制肠道蠕动改善患者病情^[12]。兰蕊等^[13]研究表

示，口服中药加灌肠治疗能够有效缓解患者病症，降低肠黏膜中 IL-6、提高 IL-10 表达，减轻炎症反应。对于直肠炎，IL-4、IL-10 具有逆转 Th1/Th2 细胞活化作用，加强 Th2 型反应，使得黏膜修复得以改善。T 淋巴细胞是免疫反应的重要组成部分，CD4⁺ 和 CD8⁺ 是 T 淋巴细胞的亚群细胞，参与机体的免疫反应^[14-15]。本研究显示，湿热内蕴型 UC 大鼠模型中的 CD4⁺、CD8⁺ 含量较低，经过青黛干预后，各剂量组均有所升高，其中 PBMC 中 CD4⁺、CD8⁺ 升高，且程度与青黛剂量有关。青黛及其中靛玉红成分具有降低血管的通透性、抑制平滑肌、增强巨噬细胞的吞噬能力的作用，可增强机体的免疫力^[16]。有研究显示，湿热内蕴型 UC 患者可产生氧化反应，青黛调节后可一定程度上抑制结肠组织中脂质过氧化反应，减少对机体造成的损伤^[17]。柯敏等^[18]研究显示经复方青黛贴治疗后，口腔溃疡患者 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞的比例明显增加，免疫功能逐渐恢复。青黛可通过提高 CD4⁺、CD8⁺ 水平，增强机体免疫能力。

ERK/p38 MAPK/MEK 均是结肠组织炎症反应相关的信号通路，该通路异常性改变会参与炎症细胞的产生进而加重炎症反应^[19]。MAPK 作为连接细胞膜与决定基因表达的信号调节酶，是转导信号的重要途径。ERK、p38 是 MAPK 家族的一员，参与细胞生长、应激以及炎症反应等活动，与机体发展和疾病的发生密不可分。ERK 由上游蛋白 Ras 激活进入细胞核调控转录因子而引起炎症反应释放 TNF- α 等炎症因子。p38 MAPK 主要调节炎症与细胞凋亡等应激反应。本研究显示，UC 大鼠模型结肠组织中 ERK、p38 MAPK mRNA 和蛋白表达升高、MEK 降低，各剂量青黛组干预后，ERK、p38 MAPK mRNA 和蛋白表达降低、MEK 升高，且程度与青黛剂量有关。研究发现，青黛提取物能够提高结缔组织生长因子和转化生长因子- β 1 水平，调节蛋白激酶 C 和 ERK MAPK 信号通路，进而促进溃疡的愈合^[20]。复方青黛颗粒在治疗 UC 过程中，抑制结肠组织中 p38 MAPK 表达，促进内皮细胞的分裂、迁移，减轻炎症反应，促进肠黏膜修复与创伤愈合^[21]。

综上所述，青黛能够降低湿热内蕴型 UC 大鼠机体内炎症因子的产生，抑制炎症反应，促进免疫功能的恢复，其机制与调节 ERK/p38MAPK/MEK 通路有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 林轩永. 溃疡性结肠炎治疗现状及进展 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2020, 7(12): 191-193.
- [2] 张娇娇, 张帆, 余星星, 等. 溃疡性结肠炎发病机制及中西医治疗研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(1): 70-74.
- [3] Ahmedy O A, Ibrahim S M, Salem H H, *et al.* Antiulcerogenic effect of melittin via mitigating TLR4/ TRAF6 mediated NF- κ B and p38 MAPK pathways in acetic acid-induced ulcerative colitis in mice [J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 331: 109276.
- [4] 高艳奎, 申睿, 朱向东, 等. 中医药治疗溃疡性结肠炎作用机制研究进展 [J]. 中医药学报, 2020, 48(2): 75-80.
- [5] 张曦, 徐小婷, Mohammed Ismail, 等. 青黛及其有效成分抗溃疡性结肠炎药理作用及机制的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(5): 997-1002.
- [6] 葛曼青, 巫玉兰, 陈轩. 加味白头翁汤灌肠液治疗活动期湿热型溃疡性结肠炎大鼠疗效观察 [J]. 检验医学与临床, 2019, 16(7): 934-938.
- [7] 朱璋佩, 石娅萍, 闵志强. 青黛大鼠给药 90 天胃肠毒性研究 [J]. 中药与临床, 2016, 7(1): 45-47.
- [8] 魏丹丹, 林旭红, 王慧超, 等. 香草乙酮改善葡聚糖硫酸钠诱发溃疡性结肠炎小鼠的炎症反应与 NOXs-ROS-p38 MAPK 信号通路的关系 [J]. 生理学报, 2015, 67(1): 74-82.
- [9] 任艳红, 焦健, 任启明, 等. 柳氮磺胺吡啶联合复方谷氨酰胺治疗溃疡性结肠炎患者的临床研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(18): 2390-2393.
- [10] 张欣雨, 李明, 纪翔. 肠愈灌肠方对湿热型溃疡性结肠炎大鼠 p38 MAPK 及相关炎症因子影响研究 [J]. 亚太传统医药, 2022, 18(3): 16-20.
- [11] 何泽慧, 温红珠, 林江. 青黛治疗溃疡性结肠炎的机制研究进展 [J]. 中医药学报, 2022, 50(1): 101-105.
- [12] 苑致维, 张尔馨, 郑沁薇, 等. 青黛对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 TGF- β /Smad 信号通路相关因子表达的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(2): 63-67.
- [13] 兰蕊, 左进红, 谢倩文, 等. 青黛制剂保留灌肠治疗溃疡性结肠炎的系统评价及 Meta 分析 [J]. 中医学报, 2019, 34(9): 2018-2023.
- [14] Karagiannidis I, Jerman S J, Jacenik D, *et al.* G-CSF and G-CSFR modulate CD4 and CD8 T cell responses to promote colon tumor growth and are potential therapeutic targets [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1885.
- [15] 谭杨波, 梁典胤, 李柳丽. 结直肠癌患者 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞介导免疫功能的影响因素 [J]. 现代肿瘤医学, 2022, 30(18): 3321-3325
- [16] 孙中美, 李军祥, 路琼琼, 等. 青黛通过影响 GPR41/43 信号通路调控溃疡性结肠炎大鼠 Treg/Th17 免疫平衡的机制研究 [J]. 中国中医急症, 2021, 30(4): 604-607.
- [17] 李泽涵, 尚洪海, 赵彩琪, 等. 青黛散加减联合西药对急性期溃疡性结肠炎患者炎症-氧化应激的干预研究 [J]. 中国中医急症, 2021, 30(5): 801-804
- [18] 柯敏, 陈露, 吴琼. 复方青黛贴片对复发性口腔溃疡的治疗作用观察 [J]. 海南医学院学报, 2016, 22(18): 2146-2148
- [19] Ma S Q, Wei H L, Zhang X. TLR2 regulates allergic airway inflammation through NF- κ B and MAPK signaling pathways in asthmatic mice [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(10): 3138-3146.
- [20] 陈小璇, 代剑平, 朱丹霞, 等. 青黛对结肠黏膜成纤维细胞的影响及作用机制 [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2014, 23(11): 1290-1295.
- [21] 郝永彪. 青黛灌肠液灌肠联合美沙拉嗪治疗溃疡性结肠炎对患者症状改善和黏膜愈合的疗效观察 [J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(8): 137-140.

[责任编辑 金玉洁]