

【 实验研究 】

基于 Nogo-B/RhoA 信号通路研究左金丸对 DSS 诱导溃疡性结肠炎小鼠巨噬细胞极化的作用及机制

曾 诚¹, 刘 璐², 申 盼¹, 吕旭涵¹, 张彩霞¹, 张磊昌³, 王海燕^{1,4*}, 葛 巍^{3*}

1. 江西中医药大学 研究生院, 江西 南昌 330004

2. 河南省永城市人民医院, 河南 永城 476600

3. 江西中医药大学附属医院, 江西 南昌 330006

4. 江西中医药大学 方-证研究中心, 江西 南昌 330004

摘 要: **目的** 观察左金丸对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导溃疡性结肠炎小鼠巨噬细胞极化和 Nogo-B/RhoA 信号通路的影响。**方法** 将 40 只 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为对照组、模型组、左金丸(0.3 g·kg⁻¹)组及美沙拉嗪肠溶片(5-ASA, 300 mg·kg⁻¹)组, 每组 10 只。除对照组外, 其余各组采用“2.3% DSS(第 1~7 天)—自由饮水(第 8~14 天)—2.3% DSS(第 15~21 天)”制备小鼠实验性结肠炎模型。造模第 8 天开始 ig 给药, 持续 14 d。每天定时监测小鼠体质量, 计算每日疾病活动指数(DAI); 造模第 22 天, 观察小鼠一般情况和结肠病理变化; 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测小鼠结肠组织肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-1β(IL-1β)、转化生长因子-β1(TGF-β1)和白细胞介素-10(IL-10)含量; 采用流式细胞术检测结肠组织 CD11b⁺F4/80⁺细胞中 MHC-II⁺、CD64⁺、CD206⁺、CD209⁺表达水平; 采用 Western blotting 法测定结肠组织内质网膜蛋白 4B(Nogo-B)、Rho 关联含卷曲螺旋结合蛋白激酶 1(Rock1)和 Ras 同源家族成员 A(RhoA)蛋白表达水平; 采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法测定结肠组织 Nogo-B 和 RhoA mRNA 表达水平。**结果** 与模型组比较, 左金丸显著改善 DSS 诱导结肠炎小鼠体质量降低、DAI 升高、结肠长度降低、结肠质量降低、结肠指数升高、病理损伤评分升高($P<0.05$ 、 0.01); 降低结肠组织 TNF-α、IL-1β、CD11b⁺F4/80⁺MHC-II⁺、CD11b⁺F4/80⁺CD64⁺细胞水平, 以及 Nogo-B、RhoA、Rock1 蛋白和 mRNA 的表达($P<0.05$ 、 0.01); 同时提高 IL-10、TGF-β1、CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺、CD11b⁺F4/80⁺CD209⁺细胞水平($P<0.05$ 、 0.01)。**结论** 左金丸对 DSS 诱导小鼠结肠炎具有明显缓解作用, 其作用机制可能与抑制 Nogo-B/RhoA 信号通路, 调控巨噬细胞 M1/M2 极化, 进而恢复促炎/抗炎因子平衡相关。

关键词: 左金丸; 巨噬细胞 M1/M2 极化; Nogo-B/RhoA 信号通路; 溃疡性结肠炎

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)12-3428-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.12.002

Study on effect and mechanism of Zuojin Pill on macrophage polarization in DSS-induced mice ulcerative colitis based on Nogo-B/RhoA signaling pathway

ZENG Cheng¹, LIU Lu², SHEN Pan¹, LÜ Xuhan¹, ZHANG Caixia¹, ZHANG Leichang³, WANG Haiyan^{1,4}, GE Wei³

1. Graduate School, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Yongcheng People's Hospital, Yongcheng 476600, China

3. Affiliated Hospital of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330006, China

4. Formula-Pattern Research Center, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

收稿日期: 2025-08-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82160870); 江西省教育厅科技计划项目(GJJ2200910); 江西省中医药中青年骨干人才培养计划(赣中医药科教字(2022)7号); 江西中医药大学省级大学生创新创业训练计划(S202510412126); 江西中医药大学校级研究生创新专项基金(XJ-S202456)

作者简介: 曾 诚(2000—), 男(土家族), 硕士研究生, 研究方向为中医药防治溃疡性结肠炎。E-mail: 731503156@qq.com

***通信作者:** 葛 巍(1987—), 男(汉族), 副教授, 主要从事中医药防治溃疡性结肠炎机制研究。E-mail: 303860796@qq.com

王海燕(1986—), 女(汉族), 副教授, 主要从事经方配伍及作用机制研究。E-mail: 378278287@qq.com

Abstract: Objective To observe the effect of Zuojin Pill on dextran sodium sulfate (DSS)-induced macrophage polarization and Nogo-B/RhoA signaling pathway in ulcerative colitis mice. **Methods** Forty C57BL/6J male mice were randomly divided into control group, model group, Zuojin Pill ($0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, and 5-Aminosalicylic Acid Enteric Tablets (5-ASA, $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group. Except for the control group, the rest of the groups were treated with "2.3% DSS (1st to 7th d)—free drinking water (8th to 14th d)—2.3% DSS (15th-21st d)" to replicate experimental colitis in mice. Ig administration began on day 8 of modeling and lasted for 14 d. On the 22nd d of modeling, the general condition and pathological changes of the colon of mice were observed. The expression levels of tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and interleukin-10 (IL-10) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The expression levels of MHC-II $^{+}$, CD64 $^{+}$, CD206 $^{+}$ and CD209 $^{+}$ in CD11b $^{+}$ F4/80 $^{+}$ cells in colon tissue were detected by flow cytometry. Western blotting was used to determine reticulon protein family 4B (Nogo-B), recombinant Rho associated coiled coil containing protein kinase 1 (Rock1), and Ras homolog family member A (RhoA) protein expression level; Reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to determine the mRNA expression levels of *Nogo-B* and *RhoA* in colon tissue. **Results** Compared with model group, Zuojin Pill significantly improved the body weight change rate, disease activity index, colon length, colon mass, intestinal weight index, pathological injury score and pathological morphology of DSS-induced colitis mice ($P < 0.05$ and 0.01); Reduced the levels of TNF- α , IL-1 β , CD11b $^{+}$ F4/80 $^{+}$ MHC-II $^{+}$, CD11b $^{+}$ F4/80 $^{+}$ CD64 $^{+}$, and the expression of Nogo-B, RhoA, Rock1 protein and mRNA in colon tissues. At the same time, the levels of IL-10, TGF- β 1, CD11b $^{+}$ F4/80 $^{+}$ CD206 $^{+}$ and CD11b $^{+}$ F4/80 $^{+}$ CD209 $^{+}$ were up-regulated ($P < 0.05$ and 0.01). **Conclusion** Zuojin Pill has a significant alleviating effect on DSS-induced colitis in mice, and its mechanism of action may be to regulate macrophage M1/M2 polarization by inhibiting the Nogo-B/RhoA signaling pathway, thereby restoring the balance of pro-inflammatory/anti-inflammatory factors.

Key words: Zuojin Pill; macrophage M1/M2 polarization; Nogo-B/RhoA signaling pathway; ulcerative colitis

溃疡性结肠炎(UC)是一种结直肠的慢性非特异性疾病,其发病率逐年攀升,被世界卫生组织列为现代难治性疾病之一^[1]。目前该病发病机制尚不十分明确,其中免疫失衡所致的肠道炎症损伤被国内外学者公认^[2]。相关研究表明巨噬细胞 M1/M2 极化失衡与 UC 的发生发展密切相关^[3-4]。然而巨噬细胞具有显著的可塑性,也使得靶向调控肠道巨噬细胞 M1 和 M2 极化可成为 UC 治疗的重要策略之一^[5]。

左金丸出自于元代《丹溪心法·火六》,由黄连、吴茱萸按 6:1 组成,方中重用黄连清泄肝胃郁火,少佐吴茱萸温中散寒、疏肝降逆。黄连、吴茱萸一辛一苦、一寒一热、一补一泻,畅达脾胃气机,顺应 UC 中焦寒热虚实错杂的病理特性,再临证加减皆获良效^[6-8]。因此,本研究拟建立葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导实验性结肠炎小鼠模型,验证左金丸疗效的同时,观察其对结肠炎小鼠巨噬细胞 M1/M2 极化状态及内质网膜蛋白 4B(Nogo-B)/Ras 同源家族成员 A(RhoA)信号通路相关蛋白和 mRNA 表达的影响,为后续左金丸的临床应用提供参考。

1 材料

1.1 动物

40 只 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠,体质量 20~22 g,8 周龄,购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司,实验动物生产许可证号 SCXK(苏)2023-

0009,并饲养于江西中医药大学实验动物科技中心,实验动物使用许可证号 SYXK(赣)2022-002,12 h 光/暗循环、恒温恒湿环境下自由饮食饮水,全程符合中心实验动物伦理标准(伦理号 JZLLSC20220607)。适应性饲养 3 d 后开展实验。

1.2 药品及主要试剂

左金丸(冻干粉)自制:取黄连 1 286 g(江西江中中药饮片有限公司,批号 230506)与吴茱萸 214 g(江西江中中药饮片有限公司,批号 220309),经江西中医药大学药学院韩飞教授鉴定,分别为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎和芸香科植物吴茱萸 *Tetradium ruticarpum* (A. Juss.) T. G. Hartley 的干燥成熟果实。上述饮片经 10 倍量 75%乙醇浸泡 30 min 后,60 ℃加热回流提取 2 次(每次 1 h),合并滤液浓缩后于-80 ℃预冻 24 h,经 0.23~0.25 MPa 冻干获 297 g 粉末(得率 19.8%)。

美沙拉嗪肠溶片(5-ASA,规格 0.25 g,批号 230202)购于葵花药业佳木斯鹿灵制药有限公司;DSS(相对分子质量 $3.6 \times 10^4 \sim 5.0 \times 10^4$,批号 YD03042)购于美国 MB 公司;肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)和白细胞介素-10(IL-10)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒均购于美国 Thermo Fisher 公司(批号 326012-013、386644-001、394950-002、355429-005);流式细胞 APC-CY7 anti-mouse

F4-80 Antibody、PECY7 anti-mouse CD11b Antibody、BV421 anti-mouse CD64 Antibody、AF647 anti-mouse CD206 Antibody 和 PE anti-mouse CD209 Antibody 均购于 Biolegend 公司 (批号 B352753、B346888、B334521、B375474、B369767); EF500 anti-mouse 主要组织相容性复合体 II (MHC-II) Antibody 购于 TONBO Biosciences 公司 (批号 C5321022522853); Nogo-B、RhoA、Rock1 和 GAPDH 抗体均购于美国 abcam 公司 (批号 ab47085、ab187027、ab134181、ab205718)。

1.3 主要仪器

BD FACS Verse 流式细胞仪 (美国 BD Biosciences 公司); ChemiDoc XRS⁺凝胶成像分析系统、ChemiDoc MP 全能型蛋白转印系统、CFX 96 touch 实时荧光定量 PCR 系统、T100 梯度 PCR 仪 (美国伯乐公司); SpectraMax 190 全波长多功能酶标仪 (美国 MD 公司); DM2000 LED 正置荧光显微镜 (德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药

将 40 只实验小鼠随机分为 4 组: 对照组、模型组、左金丸 (0.3 g·kg⁻¹) 组及 5-ASA (0.3 g·kg⁻¹) 组, 每组 10 只。参照既往文献建立 DSS 诱导实验性结肠炎小鼠模型^[10], 除对照组外, 其余各组于造模 1~7 d 给予 2.3% DSS 溶液, 8~14 d 恢复正常饮水, 15~21 d 再次给予 2.3% DSS 溶液。自造模第 8 天起, 左金丸组和 5-ASA 组分别 ig 给予左金丸 (冻干粉) 混悬液和 5-ASA 混悬液, 连续 14 d。对照组及模型组 ig 等量 0.9% 氯化钠溶液, 连续 14 d。

2.2 一般情况观察

每天定时监测小鼠体质量。记录小鼠体质量增长率评分、粪便黏稠度评分、大便隐血评分, 并计算每日疾病活动指数 (DAI)^[11]。

2.3 结肠长度、结肠质量、结肠指数及结肠病理学观察

造模第 22 天, 依据体质量予以 2% 戊巴比妥钠溶液 3 mL·kg⁻¹ 深度麻醉, 快速分离结肠和肠系膜淋巴结, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗粪便, 测量结肠长度和结肠质量, 计算结肠指数 (结肠质量/小鼠体质量)。截取近端 2 cm 结肠组织于 4% 甲醛溶液固定 7 d 后, 经脱水→浸蜡、包埋→切片、烤片→苏木精-伊红 (HE) 染色处理。光学显微镜下观察结肠黏膜炎细胞浸润和组织损伤程度, 并进行双盲法评分^[12]。

2.4 结肠组织细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β 1 和 IL-10 水平测定

截取适量结肠组织, 加入 300 μ L 裂解液, 冰上裂解 20 min, 完成裂解的样品在 4 $^{\circ}$ C、12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 收集上清液。采用 ELISA 检测小鼠结肠组织上清液中细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β 1 和 IL-10 水平。实验前仔细阅读说明书, 实验步骤严格按照 ELISA 试剂盒说明书执行。

2.5 肠系膜淋巴结 CD11b⁺F4/80⁺细胞中 MHC-II⁺、CD64⁺、CD206⁺及 CD209⁺表达测定

快速分离肠系膜淋巴结置于含 RPMI 1640 培养基的 EP 管中, 冰上研磨、筛网, 获得单细胞悬液, 洗涤 2 次。上述单细胞重悬后加入 FC 阻断剂, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 5 min; 加入 F4-80、CD11b、CD64 和 CD209 抗体, 室温避光染色 30 min, Stain Buffer 洗涤 2 次; Fixation/Perm 溶液固定破膜 20 min, Perm/Wash 液清洗 2 次; 加入 CD206 胞内抗体, 室温避光孵育 30 min, 离心去除未结合抗体, 再次加入 Stain Buffer 混匀、定容, 上机检测。采用 FlowJo V10 软件进行数据分析。

2.6 结肠组织 RhoA、Nogo-B 和 Rock1 蛋白表达测定

按照“2.4”项方法处理结肠组织, 完全收集组织裂解物。按 A:B=50:1 配制 BCA 工作液, 5 $\times$ 稀释样品后与标准品同步加入 96 孔板, 540 nm 测吸光度测定蛋白浓度。根据目标蛋白相对分子质量配制 8%~10% SDS-PAGE 胶, 煮沸样品后上样, 调整电压进行电泳分离。分离后将蛋白转至甲醇活化的 PVDF 膜, 200 mA 转膜 90 min, TBST 洗膜后室温封闭 15 min, 加入一抗 (RhoA、Nogo-B、Rock1、GAPDH) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗 3 次, 室温孵育 HRP 标记二抗 1.5 h, TBST 洗 5 次。ECL 显影液滴膜, 凝胶成像系统捕获信号。以 GAPDH 为内参, 采用 Image J 软件对目的蛋白条带灰度值进行统计分析。

2.7 结肠组织 Nogo-B 和 RhoA mRNA 表达测定

按照“2.4”项方法处理结肠组织, 完全收集组织裂解物。使用 TRIzol 法提取样本 RNA, 根据 cDNA 逆转录试剂盒说明书将其逆转录为 cDNA, 以所得 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增程序如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 随后, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火延伸 15 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 为参照基因, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法计算相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 逆转录 PCR 引物序列
Table 1 Reverse transcription PCR primer sequences

基因	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')
<i>Nogo-B</i>	TTCCCCAGATGAGGCACTTG	ACAGCCAGACTACCTGCAAC
<i>RhoA</i>	AGCTTGTGGTAAGACATGCTTG	GTGTCCCATAAAGCCAACCTCTAC
<i>GAPDH</i>	GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG	ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA

2.8 统计学分析

采用 GraphPad Prism software 10.0 软件进行统计分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 左金丸对结肠炎小鼠体质量、DAI 的影响

如图 1、2 所示,与对照组比较,经 DSS 处理后小鼠分别从第 1 天和第 5 天开始 DAI 明显升高 ($P<0.01$) 和体质量明显下降 ($P<0.05$ 、 0.01);与模型组比较,左金丸组自第 10 天和第 11 天开始体质量明显上升 ($P<0.05$ 、 0.01) 和 DAI 评分明显降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。

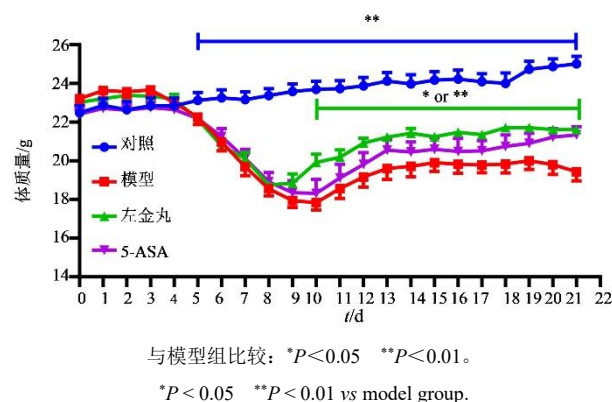


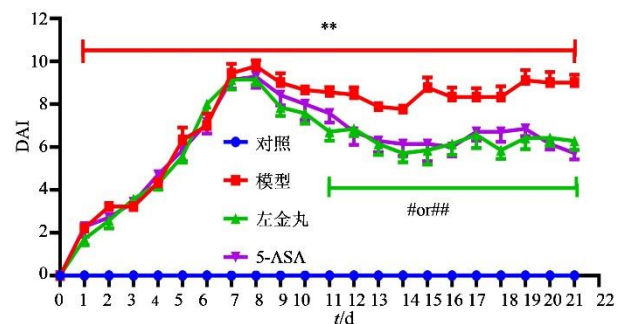
图 1 各组小鼠体质量的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Fig. 1 Comparison of body mass of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

表 2 各组小鼠结肠长度、结肠质量、结肠指数和病理损伤评分的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Comparison of colon length, colon quality, intestinal weight index and pathological injury score of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	结肠长度/cm	结肠质量/g	结肠指数/%	病理损伤评分
对照	—	8.44±0.36	0.25±0.02	1.09±0.08	0.40±0.52
模型	—	6.28±0.33**	0.31±0.07*	1.59±0.15**	11.20±0.79**
左金丸	0.3	7.16±0.29##	0.26±0.02#	1.34±0.14##	6.70±1.57##
5-ASA	0.3	7.02±0.34##	0.27±0.03#	1.41±0.14##	7.20±0.63##

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ 。
* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs model group.



与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ 。
** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs model group.

图 2 各组小鼠 DAI 的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 2 Comparison of DAI of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

3.2 左金丸对结肠炎小鼠结肠长度、结肠质量、结肠指数和病理损伤评分的影响

如表 2 和图 3 所示,与对照组相比,模型组小鼠呈现明显的结肠长度缩短、结肠质量增加及结肠指数升高 ($P<0.05$ 、 0.01);经左金丸干预 14 d 后,上述指标均得到明显改善 ($P<0.05$ 、 0.01)。此外,模型组小鼠出现明显结肠黏膜病理损伤,具体表现为结肠黏膜下层炎症细胞广泛浸润、黏膜部分缺损、腺体数量减少及溃疡形成,病理损伤评分显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,左金丸组小鼠结肠黏膜趋于完整,杯状细胞增多,炎症细胞浸润显著减少,溃疡消失,组织病理学评分明显降低 ($P<0.01$)。

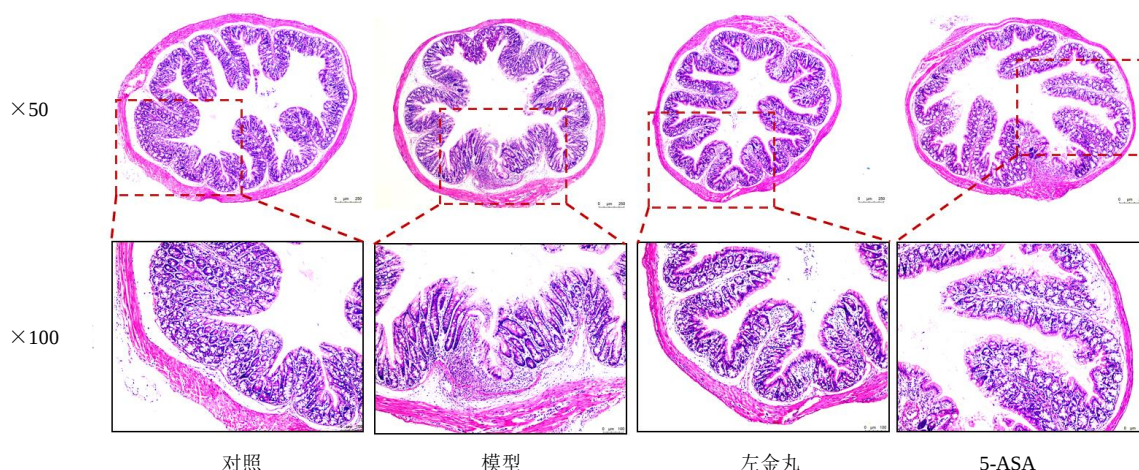


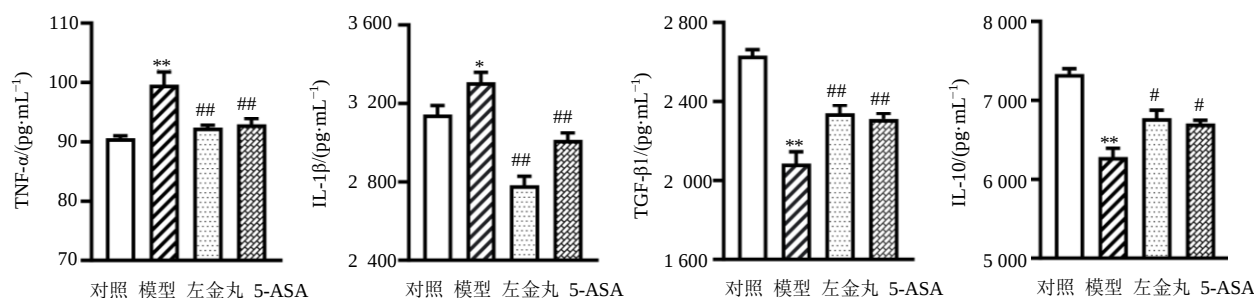
图 3 各组小鼠结肠黏膜病理损伤 HE 染色

Fig. 3 HE staining of colonic mucosal pathological damage in mice in each group

3.3 左金丸对结肠炎小鼠结肠组织 TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β 1 和 IL-10 含量的影响

如图 4 所示,与对照组比较,模型组小鼠结肠组织 TNF- α 和 IL-1 β 含量明显升高($P<0.05, 0.01$),

IL-10 和 TGF- β 1 含量显著降低($P<0.01$); 相比于模型组,左金丸组结肠组织 TNF- α 和 IL-1 β 含量明显下降($P<0.01$), IL-10 和 TGF- β 1 含量显著上升($P<0.05, 0.01$)。



与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs model group.

图 4 各组小鼠结肠组织 TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β 1、IL-10 含量的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Fig. 4 Comparison of TNF- α , IL-1 β , TGF- β 1 and IL-10 contents in colonic tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

3.4 左金丸对肠系膜淋巴结细胞中 CD11b⁺F4/80⁺MHC-II⁺、CD11b⁺F4/80⁺CD64⁺表达的影响

如图 5 所示,与对照组比较,模型组小鼠肠系膜淋巴结 CD11b⁺F4/80⁺MHC-II⁺、CD11b⁺F4/80⁺CD64⁺细胞水平明显提升($P<0.01$); 与模型组相比,左金丸组肠系膜淋巴结 CD11b⁺F4/80⁺MHC-II⁺、CD11b⁺F4/80⁺CD64⁺细胞水平显著下降($P<0.05, 0.01$)。

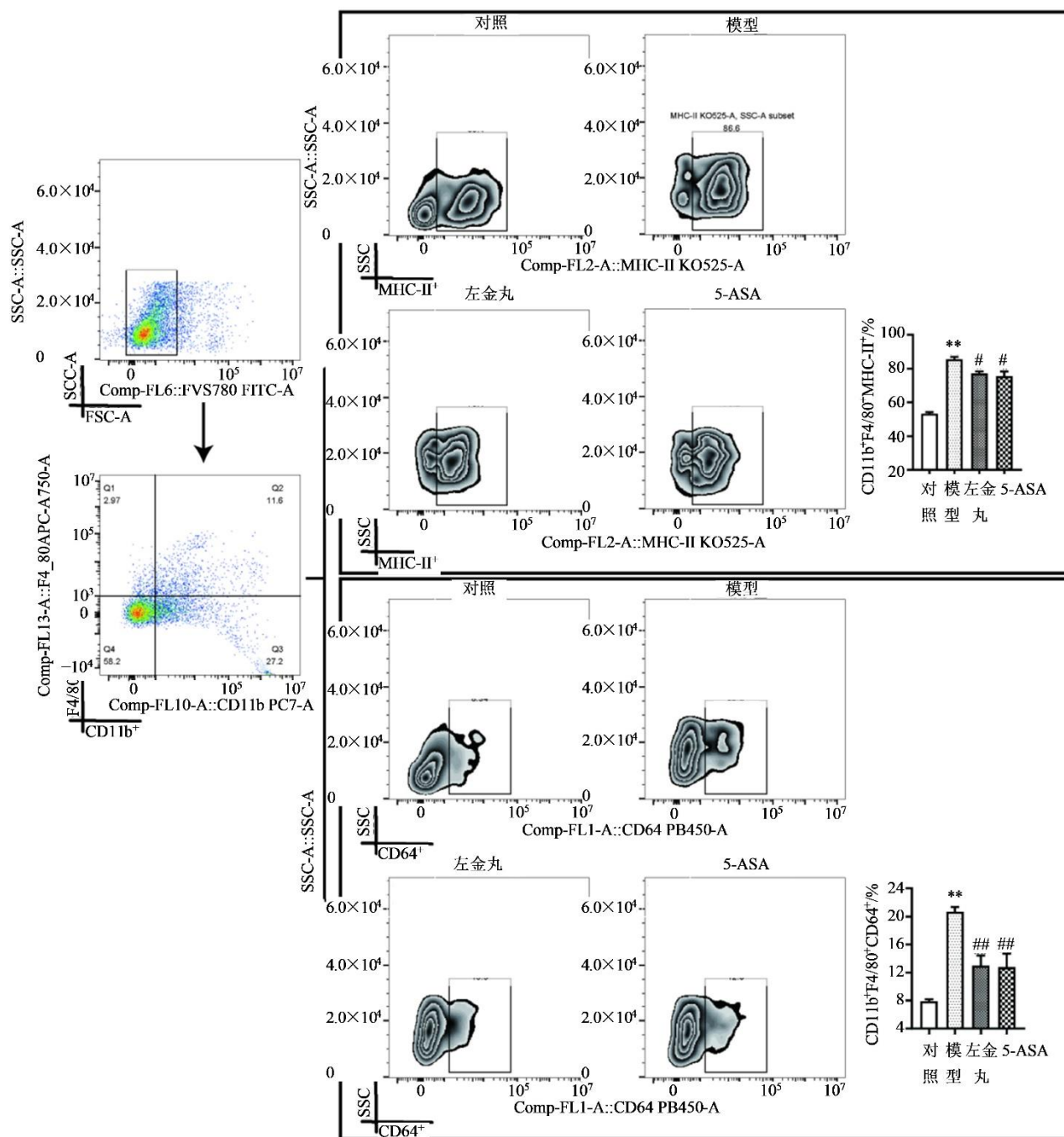
3.5 左金丸对结肠炎小鼠肠系膜淋巴结细胞中 CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺、CD11b⁺F4/80⁺CD209⁺表达的影响

如图 6 所示,相较于对照组,模型组小鼠肠系

膜淋巴结 CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺、CD11b⁺F4/80⁺CD209⁺细胞水平显著下降($P<0.05, 0.01$); 与模型组相比,左金丸组肠系膜淋巴结 CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺、CD11b⁺F4/80⁺CD209⁺细胞水平显著提升($P<0.01$)。

3.6 左金丸对小鼠结肠组织 Nogo-B、RhoA 和 Rock1 蛋白表达的影响

如图 7 所示,与对照组相比,模型组小鼠结肠组织 Nogo-B、Rock1 和 RhoA 蛋白表达水平显著升高($P<0.01$); 与模型组相比,干预 14 d 后,左金丸组结肠组织 Nogo-B、Rock1 和 RhoA 蛋白表达被显著抑制($P<0.01$)。



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

图 5 各组小鼠肠系膜淋巴结细胞中 CD11b⁺F4/80⁺MHC-II⁺、CD11b⁺F4/80⁺CD64⁺表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 5 Comparison of CD11b⁺F4/80⁺MHC-II⁺ and CD11b⁺F4/80⁺CD64⁺ expression levels in cells of mesenteric lymph nodes in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

3.7 左金丸对结肠炎小鼠结肠组织 *Nogo-B* 和 *RhoA* mRNA 表达的影响

如图 8 所示,与对照组相比,模型组小鼠结肠组织 *Nogo-B* 和 *RhoA* mRNA 水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组相比,干预 14 d 后,左金丸组

结肠组织 *Nogo-B* 和 *RhoA* mRNA 表达水平明显下降 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

4 讨论

UC 是一种慢性非特异性的肠道炎症性疾病,主要表现为腹泻、黏液脓血便等肠道症状,以及抑

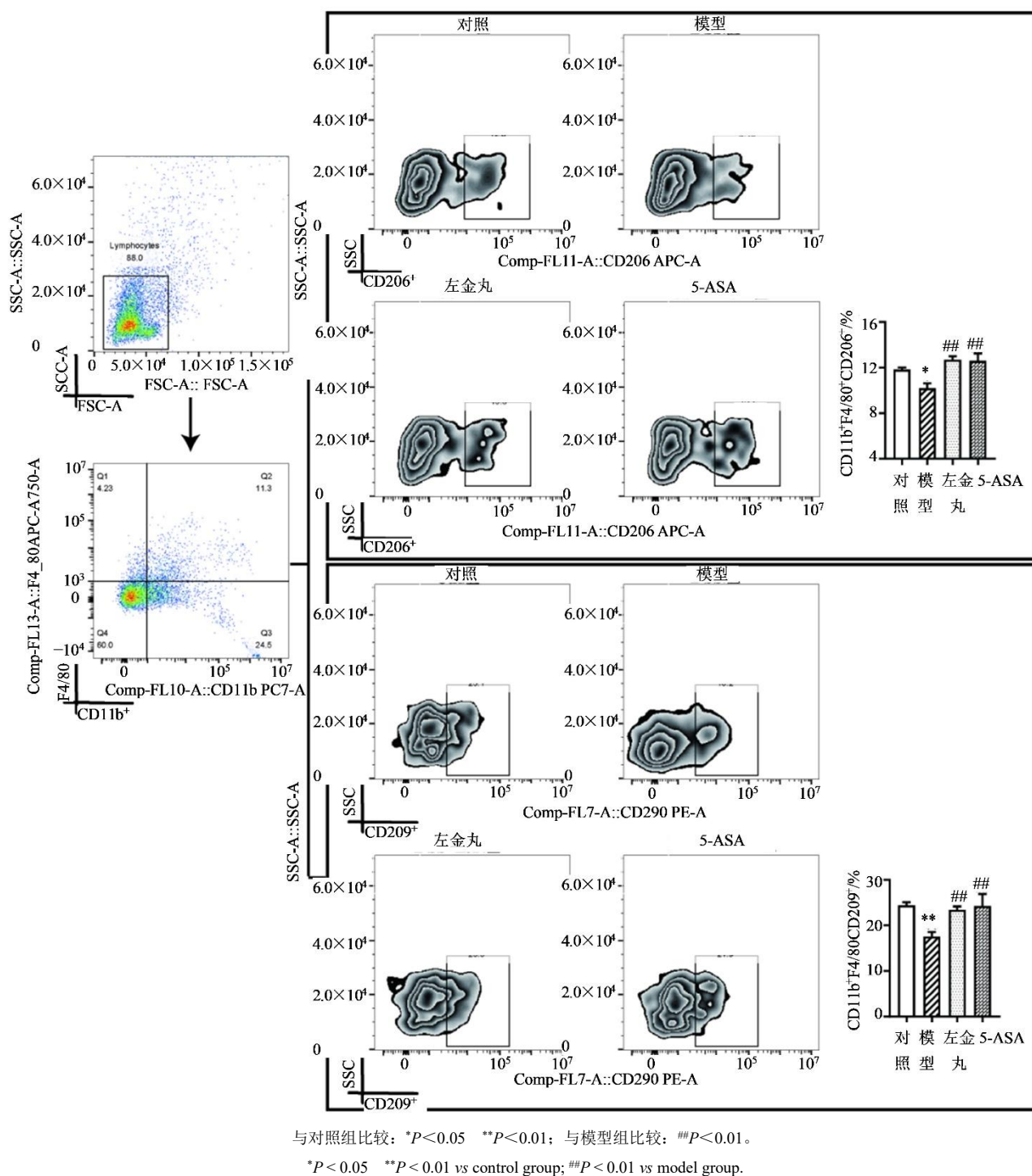
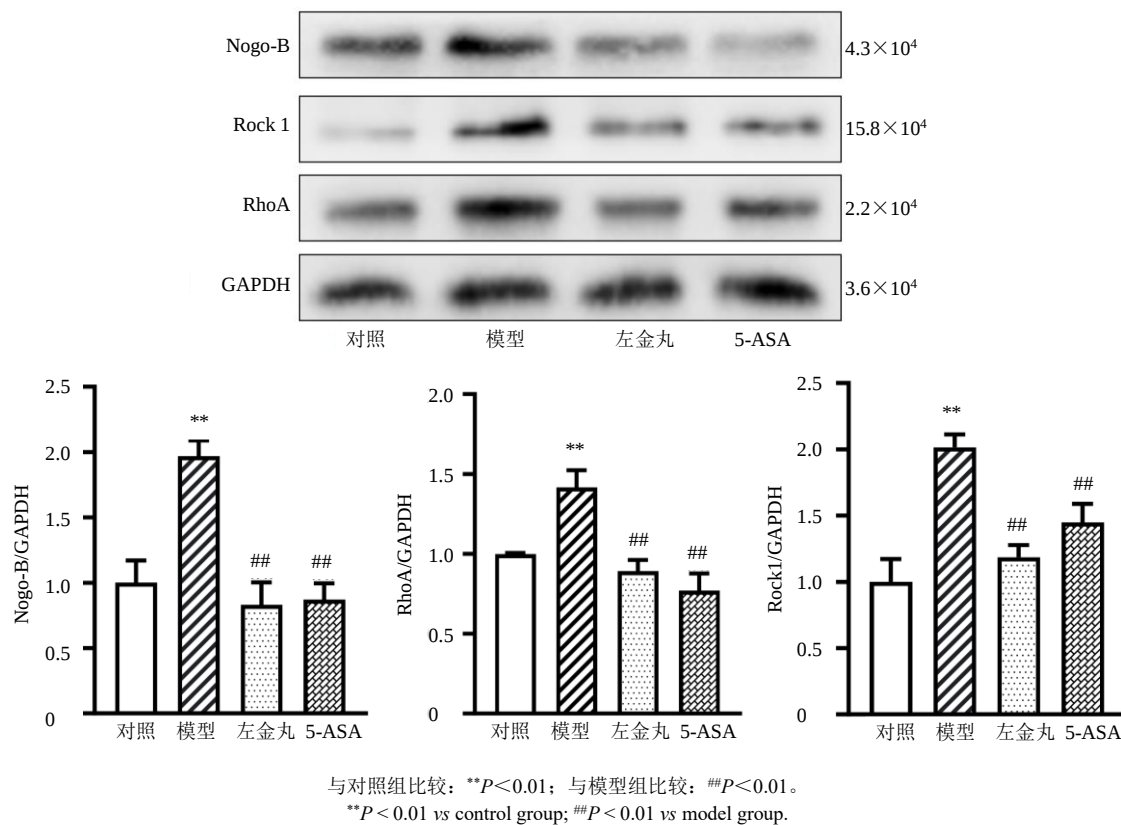
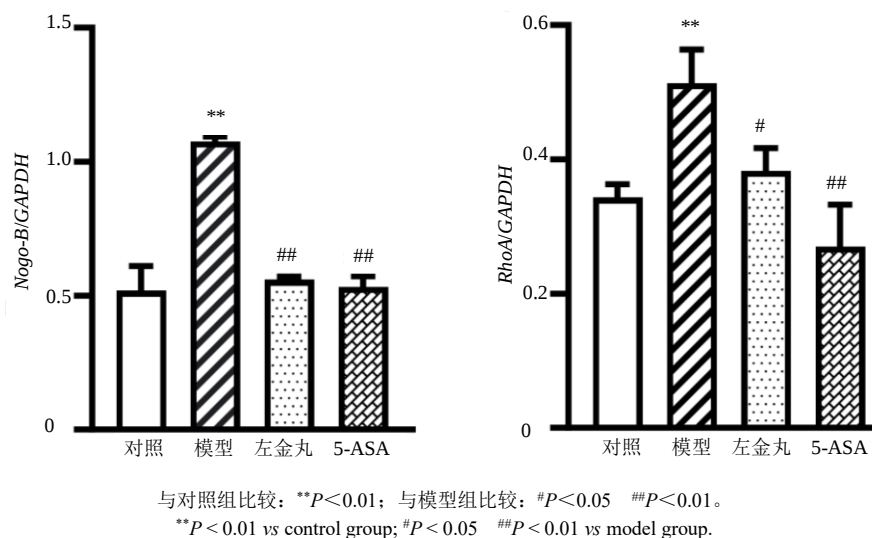


图 6 各组小鼠结肠组织 CD11b⁺F4/80⁺细胞中 CD206⁺、CD209⁺表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 6 Comparison of CD206⁺ and CD209⁺ expression levels in CD11b⁺F4/80⁺ cells in colonic tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

郁、焦虑、性功能障碍等身心问题，严重影响患者的生活质量^[13]。中医认为 UC 多属湿热瘀毒壅滞肠络，若迁延不愈则热邪郁久灼伤阴津，湿浊阻滞日久损耗脾肾气阳，可出现寒热错杂、虚实并见的复杂证候^[10,14-15]。黄连 6 倍于吴茱萸的经典配伍，一

辛一苦、一寒一热构建了左金丸“辛开苦降、寒热并调”的核心治法。方中黄连苦寒清泻肠腑湿热瘀毒，直折肝胃实火；吴茱萸辛热疏达肝气郁滞，兼防黄连寒遏伤中，二者相伍调和肝胃、畅利枢机，既解湿热壅滞之急，又顾中焦升降之衡，调和寒热

图 7 小鼠结肠组织中 Nogo-B、RhoA 和 Rock1 蛋白表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Fig. 7 Comparison of expression levels of Nogo-B, RhoA and Rock1 proteins in mouse colon tissue ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)图 8 小鼠结肠组织中 Nogo-B、RhoA mRNA 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Fig. 8 Comparison of mRNA expression levels of Nogo-B and RhoA in mouse colon tissue ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

错杂之证候。在本研究中,模型组小鼠出现体质量下降、结肠长度缩短、结肠质量增加、结肠指数升高和 DAI 评分下降等临床表现和病理改变,进一步结肠组织 HE 染色显示结肠黏膜下层炎症细胞广泛浸润、隐窝结构破坏及溃疡形成。经左金丸(冻干

粉)干预 14 d 后,上述临床表现及结肠病理损伤均得到明显改善,提示左金丸在抗 UC 治疗的潜力较大,然而其相关机制仍需进一步研究。

UC 的发病受多种因素影响,本质上仍是一种肠道慢性炎症^[16],在此过程巨噬细胞 M1/M2 极化

异常是其肠道炎症损伤的核心环节,其中经典活化的 M1 型巨噬细胞高表达 Toll 样受体 2 (TLR2)、TLR-4、CD64、CD86、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 和 MHC-II 等表型,替代活化的 M2 型巨噬细胞高表达 CD10、CD163、CD206、CD209 等表型^[5,17]。在 UC 发病初期,感染、受损细胞、活化淋巴细胞和肠道上皮屏障损伤等因素促使巨噬细胞向促炎 M1 型极化,释放大量的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等促炎因子加剧炎症反应和肠道损伤;在 UC 缓解期,本该发挥修复作用的 M2 型巨噬细胞分化受阻,导致 IL-10、TGF- β 1 等抗炎因子分泌不足^[18-19]。Xiong 等^[20]发现小檗碱可有效显著下调结肠炎小鼠结肠组织 CD11b⁺F4/80⁺细胞中 CD86⁺的表达,同时上调 CD206⁺的表达,进而缓解肠道炎症。葛巍等^[21]研究发现予四神丸干预后,结肠炎小鼠结肠组织 CD11b⁺F4/80⁺细胞中 MHC-II⁺、iNOS⁺的表达水平显著降低,CD163⁺、CD209⁺的表达水平显著升高。因此,通过重塑巨噬细胞 M1/M2 极化平衡是实现肠道抗炎与修复的重要策略之一^[5]。在本研究中,相比于对照组,模型组小鼠肠系膜淋巴结细胞中 CD11b⁺F4/80⁺MHC-II⁺、CD11b⁺F4/80⁺CD64⁺表达水平明显上调,而 CD206⁺、CD209⁺表达水平明显下调;同时伴随着结肠组织 TNF- α 、IL-1 β 含量显著升高,以及 IL-10、TGF- β 1 含量显著降低,提示 DSS 诱导结肠炎小鼠处于巨噬细胞极化和炎症因子失衡状态。经左金丸(冻干粉)干预后,上述巨噬细胞极化及炎症因子失衡状态得到有效逆转,提示左金丸可通过调节巨噬细胞 M1/M2 极化,改善促炎/抑炎因子的平衡,进而在 DSS 诱导结肠炎小鼠模型中发挥治疗作用。

Nogo 位于真核细胞内质网,主要包含 Nogo-A、Nogo-B 和 Nogo-C 3 种类型^[22]。其中 Nogo-B 在结肠组织、神经细胞、肝细胞等多种组织细胞中广泛表达^[23]。在酒精性肝病中,Nogo-B 可诱导 Kupffer 细胞向 M1 型极化,加重肝损伤^[24];而在肝细胞癌中,Nogo-B 则通过调控转录调节因子 Yap/Taz 促进肿瘤相关巨噬细胞向 M2 型极化并促进肝细胞癌进展^[25],上述研究表明 Nogo-B 在不同疾病中对巨噬细胞极化调控存在差异性。Zheng 等^[26]研究表明 Nogo 基因表达缺失的小鼠可显著改善 DSS 诱导肠道炎症的同时,增加肠黏膜屏障 E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、闭合小带 (ZO)-1、 α -连环蛋白 (catenin)、闭合蛋白 (Occludin) 蛋白表达,降低结肠和血清中

IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平。此外,Nogo-B 可通过激活 Rac1/RhoA 以及下游 Rock1 蛋白,增加肌动蛋白轻链的磷酸化并提高肌动球蛋白收缩力,促进巨噬细胞的迁移和扩散^[27]。在本研究中,左金丸组小鼠结肠组织 Nogo-B、RhoA 和 Rock1 蛋白表达和 Nogo-B、RhoA mRNA 表达较模型组显著降低。上述研究进一步提示左金丸可能通过抑制 Nogo-B/RhoA 信号通路,改善巨噬细胞 M1/M2 极化失衡所介导的肠道炎症损伤。

本研究表明,左金丸对 DSS 诱导小鼠结肠炎具有显著的缓解作用,其作用机制可能与抑制 Nogo-B/RhoA 信号通路,调节巨噬细胞 M1/M2 极化,进而恢复促炎/抗炎因子平衡有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Le Berre C, Honap S, Peyrin-Biroulet L. Ulcerative colitis [J]. Lancet, 2023, 402(10401): 571-584.
- [2] Kobayashi T, Siegmund B, Le Berre C, et al. Ulcerative colitis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2020, 6: 74.
- [3] Delfini M, Stakenborg N, Viola M F, et al. Macrophages in the gut: Masters in multitasking [J]. Immunity, 2022, 55(9): 1530-1548.
- [4] Wang E J, Wu M Y, Ren Z Y, et al. Targeting macrophage autophagy for inflammation resolution and tissue repair in inflammatory bowel disease [J]. Burns Trauma, 2023, 11: tkad004.
- [5] Yang Z H, Lin S S, Feng W Y, et al. A potential therapeutic target in traditional Chinese medicine for ulcerative colitis: Macrophage polarization [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 999179.
- [6] 王海燕,袁望圆,钟友宝,等.基于“病证方药”结合探析左金丸对寒热错杂证溃疡性结肠炎的治疗价值 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34(3): 665-667.
Wang H Y, Yuan W Y, Zhong Y B, et al. Based on the combination of “disease syndrome prescription and medicine”, the therapeutic value of Zuojin Pill on ulcerative colitis with cold-heat syndrome was analyzed [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2023, 34(3): 665-667.
- [7] 黄建,黄政德.黄政德运用左金丸加减治疗溃疡性结肠炎经验 [J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(5): 23-25.
Huang J, Huang Z D. Huang Zhengde's experience in treating ulcerative colitis with Zuojin Pill [J]. Hunan J

- Tradit Chin Med, 2018, 34(5): 23-25.
- [8] 周青, 张丹, 徐超, 等. 陈玉根教授治疗炎症性肠病临床经验 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2015, 23(3): 202-203.
Zhou Q, Zhang D, Xu C, et al. Professor Chen Yugen's clinical experience in treating inflammatory bowel disease [J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig, 2015, 23(3): 202-203.
- [9] 葛巍. 左金丸干预脂肪酸代谢调控巨噬细胞极化治疗溃疡性结肠炎的机制研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2024.
GE W. Mechanism of Zuojin Pill intervention in the regulation of fatty acid metabolism by macrophage polarization in the treatment of ulcerative colitis [D]. Nanchang: Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, 2024.
- [10] Vlantis K, Polykratis A, Welz P S, et al. TLR-independent anti-inflammatory function of intestinal epithelial TRAF6 signalling prevents DSS-induced colitis in mice [J]. Gut, 2016, 65(6): 935-943.
- [11] 葛巍, 刘素萍, 赵海梅, 等. 四神丸对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎小鼠炎性树突状细胞的调节作用 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(7): 66-70.
Ge W, Liu S P, Zhao H M, et al. Regulatory effect of Sishen Pill on inflammatory dendritic cells in mice with ulcerative colitis of spleen-kidney Yang deficiency type [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2022, 40(7): 66-70.
- [12] Dieleman L A, Palmen M J, Akol H, et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines [J]. Clin Exp Immunol, 2001, 114(3): 385-391.
- [13] Bel L G J, Vollebregt A M, Van der Meulen-de Jong A E, et al. Sexual dysfunctions in men and women with inflammatory bowel disease: The influence of IBD-related clinical factors and depression on sexual function [J]. J Sex Med, 2015, 12(7): 1557-1567.
- [14] 黎祖鸣, 封杰妮, 陈雪如, 等. 多组学分析揭示溃疡性结肠炎缓解期脾虚湿困证与活动期湿热阻滞证间的潜在分子机制及靶向中药预测 [J]. 中草药, 2024, 55(9): 3041-3056.
Li Z M, Feng J N, Chen X R, et al. Revelation of potential molecular mechanism between spleen deficiency and dampness-stagnation syndrome in remission stage and damp-heat stagnation syndrome in active stage of ulcerative colitis based on multiomics analysis and prediction of targeted traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(9): 3041-3056.
- [15] 陈琴, 张志云, 朱云婴, 等. 基于国家专利的中药复方治疗溃疡性结肠炎用药规律研究 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(1): 171-178.
Chen Q, Zhang Z Y, Zhu Y Y, et al. Study on dosage pattern of Chinese herbal medicine compound for ulcerative colitis based on national patent [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(1): 171-178.
- [16] 吴开春, 梁洁, 冉志华, 等. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2018 年·北京) [J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(9): 796-813.
Wu K C, Liang J, Ran Z H, et al. Chinese consensus on diagnosis and treatment of inflammatory bowel disease (Beijing, 2018) [J]. Chin J Pract Intern Med, 2018, 38(9): 796-813.
- [17] Yao Y L, Xu X H, Jin L P. Macrophage polarization in physiological and pathological pregnancy [J]. Front Immunol, 2019, 10: 792.
- [18] Bain C C, Schridde A. Origin, differentiation, and function of intestinal macrophages [J]. Front Immunol, 2018, 9: 2733.
- [19] 张仪霖, 刘禹杉, 杨树森, 等. Nrf2 通过调控巨噬细胞极化治疗溃疡性结肠炎的机制 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2023, 48(11): 1746-1752.
Zhang Y L, Liu Y S, Yang S S, et al. Mechanism of Nrf2 in the treatment of ulcerative colitis via regulating macrophage polarization [J]. J Cent South Univ Med Sci, 2023, 48(11): 1746-1752.
- [20] Xiong K, Deng J, Yue T H, et al. Berberine promotes M2 macrophage polarisation through the IL-4-STAT6 signalling pathway in ulcerative colitis treatment [J]. Heliyon, 2023, 9(3): e14176.
- [21] 葛巍, 袁望圆, 谢昌营, 等. 四神丸对 DSS 诱导的结肠炎小鼠巨噬细胞极化的调控机制 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34(10): 2315-2319.
Ge W, Yuan W Y, Xie C Y, et al. Regulatory mechanism of Sishen Pill on macrophage polarization induced by DSS in colitis mice [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2023, 34(10): 2315-2319.
- [22] Zhang S, Guo F L, Yu M, et al. Reduced Nogo expression inhibits diet-induced metabolic disorders by regulating ChREBP and insulin activity [J]. J Hepatol, 2020, 73(6): 1482-1495.
- [23] Chen Y L, Duan Y J, Kang Y H, et al. Activation of liver X receptor induces macrophage interleukin-5 expression

