

基于 KEAP1/NRF2/ARE 通路探讨参苓白术散改善 溃疡性结肠炎氧化应激及线粒体保护机制

张全辉^{1,2}, 张秀敏², 邓永文^{1,2*}, 姚玉乔¹, 苏 亮²

(1. 江西中医药大学附属医院, 江西 南昌 330006; 2. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004)

【摘要】目的 基于 KEAP1/NRF2/ARE 通路探讨参苓白术散对溃疡性结肠炎(UC)大鼠氧化应激及线粒体保护机制。**方法** 将 72 只 SD 大鼠, 随机分为对照组($n=12$)、造模组($n=60$)。采用 TNBS 诱导 UC 模型成功后随机分为 5 组, 各 12 只, 给予对应药物处理 21d。比较各组大鼠疾病活动指数(DAI)评分, 结肠黏膜损伤指数(CMDI)评分, 血清炎症因子水平, 结肠组织学损伤指数(TDI)评分、氧化应激指标、病理学改变、线粒体超微结构及蛋白表达。**结果** 与 Control 组相比, TNBS 组 DAI、CMDI、TDI 评分, 血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MPO 水平均升高($P<0.01$); 结肠黏膜有溃疡形成, 黏膜下层有大量炎性细胞浸润; 线粒体数量减少, 线粒体结构被破坏; 结肠组织 ROS 水平升高, GSH-PX、CAT 水平降低, Nrf2、ARE、MFN2 蛋白表达降低, Keap-1、NF- κ B 蛋白表达升高($P<0.01$)。与 TNBS 组比较, 给药各组 DAI、CMDI、TDI 评分, 血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MPO 水平均降低($P<0.01$); 结肠黏膜溃疡好转, 炎性细胞浸润减轻; 线粒体数目及结构改善; 结肠组织 ROS 水平降低, GSH-PX、CAT 水平升高, Nrf2、ARE、MFN2、MFN2 蛋白表达增加, Keap-1、NF- κ B 蛋白表达减少($P<0.05$)。**结论** 参苓白术散可促进 Keap-1/Nrf2/ARE 通路活化抑制氧化应激反应实现对 UC 大鼠结肠黏膜损伤的保护。

【关键词】 参苓白术散; 溃疡性结肠炎; 氧化应激; Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1; 核因子 E2 相关因子 2; 抗氧化反应元件

DOI:10.70976/j.1008-0805.SZGYGY-2025-1309

CSTR:32392.14.j.1008-0805.SZGYGY-2025-1309

【中图分类号】R285.5 【文献标识码】A 【文章编号】1008-0805(2025)13-2461-06

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种慢性肠道炎症性疾病, 主要表现为腹痛、腹泻、黏液脓血便等, 有着较高的复发率, 严重影响患者的生活质量^[1]。其发病机制尚不完全明确, 研究表明: 环境、免疫、遗传等均与 UC 的发病相关, 其中, 氧化应激反应过度激活被认为是 UC 发病的关键机制之^[2,3]。Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1(KEAP1)/核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)/抗氧化反应元件(ARE)通路与氧化应激密切相关, 在氧化应激细胞调控方面发挥关键作用^[4]。在中医理论中, UC 属“痢疾”“腹痛”等范畴, 认为其病机是脾虚失于运化, 湿热熏蒸导致肠道气血阻滞, 腐败成脓^[5]。白自《太平惠民和剂局方》的参苓白术散是中医治疗脾虚湿盛证的经典方剂, 方中含白术、山药、党参、茯苓、砂仁、白扁豆、薏苡仁、陈皮、桔梗、莲子、炙甘草等^[6], 具有行气健脾, 利水渗湿的功效, 契合 UC 病因病机, 且临床治疗 UC 安全性、有效性均得到验证^[7], 但其治疗 UC 的内在机制仍未完全明确。

因此, 本研究采用 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)诱导 UC 大鼠模型, 基于 Keap-1/Nrf2/ARE 信号通路

探讨参苓白术散对 UC 大鼠模型肠黏膜损伤的保护作用, 以期临床 UC 的治疗提供依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 72 只, 9 周龄, 雄性, 体质量 220 ~ 240 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 生产许可证号: SCXK(湘)2019-0004。

1.2 主要药品与试剂

参苓白术散药液制备: 白术、山药、党参、茯苓各 15g, 白扁豆 12g, 薏苡仁、莲子、炙甘草各 9g, 砂仁、桔梗、陈皮各 6g, 加入适量蒸馏水浸泡 30min, 煎煮 2 次, 合并药液浓缩, 药液浓度为含生药 0.65, 1.3, 2.6g/ml, 4℃保存备用。2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)(货号: P2297, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 美沙拉嗪缓释颗粒(上海爱的发制药有限公司, 批号: 20180706, 0.5g/袋), 配制为 0.04g/ml 的溶液, 现用现配。过氧化氢酶(CAT)、活性氧(ROS)、髓过氧化物酶(MPO)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(上海

收稿日期: 2024-09-30; 修订日期: 2025-03-14

基金项目: 江西省自然科学基金资助项目(20224BAB206101); 江西省中医药中青年骨干人才计划项目(赣中医药科教字[2022]7号)

作者简介: 张全辉(1981-), 女(汉族), 江西南昌人, 江西中医药大学附属医院副主任中医师, 硕士研究生导师, 硕士学历, 主要从事中医外科学肛肠的研究工作。

*通讯作者简介: 邓永文(1976-), 男(汉族), 江西赣州人, 江西中医药大学附属医院副主任中医师, 硕士学历, 主要从事中医外科学肛肠的研究工作。

邦奕生物科技有限公司);苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(武汉百浩天生物科技有限公司);兔抗鼠 Keap-1、Nrf2、ARE、NF- κ B、MFN2、 β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体,山羊抗兔 HRP 二抗(英国 Abcam 公司)。

1.3 主要仪器

透射电子显微镜(日本 JEOL 公司,型号:EOL-JEM-1230);多功能酶标测定仪(美国 Thermo Scientific 公司,型号:Varskan Flash 3001);超灵敏多功能成像仪(美国 GE 公司,型号:AI 600)。

2 方法

2.1 造模、分组及给药

72 只大鼠按随机数字表法分为对照组(Control 组)、模型组(TNBS 组)、参苓白术散低剂量组(TNBS+低剂量 SBP 组)、参苓白术散中剂量组(TNBS+中剂量 SBP 组)、参苓白术散高剂量组(TNBS+高剂量 SBP 组)、阳性对照组(TNBS+MES 组),每组 12 只。除对照组外所有大鼠采用一次施用 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)诱导 UC^[8],具体操作如下:将 TNBS(100 mg/kg)在 25%乙醇中制备,然后通过婴儿导管注入结肠 8 cm,将大鼠尾巴倒置 30s,以确保溶液均匀分布在结肠中。对照组使用生理盐水溶液。造模成功观察 3d,参苓白术散低、中、高剂量组分别灌胃给予给予 2.95, 5.9, 11.8 g/kg 参苓白术散药液,阳性对照组灌胃给予 0.04g/ml 美沙拉嗪溶液 50mg/kg,对照组、模型组灌胃给予蒸馏水 10ml/kg,1 次/d,连续给药 21d。

2.2 标本采集与处理

2.2.1 血液样本

末次给药结束后,禁食不禁水 12h,腹腔注射 10%水合氯醛麻醉(300mg/kg),腹主动脉采血 5mL,离心 15min(3000r/min),收集血清, -80℃ 保存备用。

2.2.2 结肠组织样本

取完整结肠组织,用预冷的 0.9%生理盐水清洗干净,肉眼观察评估大鼠结肠病理损伤情况;将结肠组织,用 4%多聚甲醛固定,梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋,4 μ m 切片备用。

2.3 观察指标

2.3.1 疾病活动指数(DAI)评分

每天定时测量小鼠体质量,观察大便性状、血便状态,并根据其状态进行评分:体质量下降 0%,大便正常,无大便隐血,计 0 分;体质量下降 1%~5%,大便松散,大便隐血阳性,计 1 分;体质量下降 6%~10%,稀便,隐血强阳性,计 2 分;体质量下降 11%~15%,稀水样腹泻,肉眼轻微血便,计 3 分;体质量下降 $\geq$ 16%,水样腹泻,肉眼血便,计 4 分。

2.3.2 肉眼观察大鼠结肠黏膜损伤情况(CMDI)

评分标准^[9]:无损伤,0 分;充血但无溃疡,1 分;1

处溃疡但无明显炎症反应,2 分;1 处溃疡并伴有炎症反应,3 分;2 处或以上溃疡或炎症反应,直径<1cm,4 分;2 处或以上溃疡及炎症反应,直径>1cm,5 分。

2.3.3 HE 染色观察大鼠结肠组织病理改变

取石蜡切片,脱蜡、水化,苏木素染色,伊红染液复染,脱水、透明、封片,每张切片选 5 个非重叠视野,采集图像,进行结肠组织学损伤指数(TDI)评分。评分标准^[10]:(1)炎症程度:无炎症,0 分;轻度炎症,1 分;中度炎症,2 分;重度炎症,3 分。(2)病变范围:无病变,0 分;病变 1%~25%,1 分;病变 26%~50%,2 分;病变 51%~75%,3 分;病变>75%,4 分。(3)病变深度:无病变,0 分;至黏膜层,1 分;至黏膜下层,2 分;贯穿全部黏膜层,3 分。(4)隐窝损伤:无损伤,0 分;损伤 1/3,1 分;损伤 2/3,2 分;全部损伤 3 分。

2.3.4 采用 ELISA 测定肠内容物 ROS 水平和结肠组织 GSH-PX 及 CAT 水平

取各组小鼠肠内容物及结肠组织,称质量,分别适量 PBS 混匀,离心 10min(3000r/min,4℃),按照 ELISA 试剂盒说明操作。

2.3.5 采用 ELISA 试剂盒检测大鼠血清炎症因子水平

取各组大鼠血清,ELISA 法检测大鼠血清白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、髓过氧化物酶(MPO)等炎症因子水平,按照 ELISA 试剂盒说明操作。

2.3.6 透射电镜检测线粒体超微结构

给药结束后,结肠组织切为 1mm $\times$ 1mm 小块,2.5%戊二醛液固定 24h 以上,0.1%磷酸漂洗,1%锇酸固定 1h,磷酸缓冲液冲洗,50%,70%,80%,90%丙酮梯度脱水 1min,丙酮脱水 2 次,每次 10min,环氧树脂 812 常规包埋,37℃恒温箱中过夜后移到 45℃恒温箱中 12h,60℃放置 24h,超薄切片,硝酸铅-醋酸双氧铀染色,透射电子显微镜下观察。

2.3.7 WB 检测大鼠结肠组织中蛋白水平的表达

取各组大鼠结肠组织并,使用玻璃匀浆器充分研磨裂解,4℃离心 10 min(12000 r/min),取上清液,BCA 蛋白试剂盒测定蛋白质浓度,取少量蛋白质,配制成上样缓冲液,电泳、转膜、封闭、加入一抗,4℃孵育过夜, TBST 洗涤,加入 HRP 标记二抗,室温孵育 2h, TBST 洗涤,用 ECL 化学发光试剂显色后,化学发光仪成像。以相应的 β -actin 作为内参,计算各目标条带的灰度值。

2.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 软件,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠 DAI 评分比较

与 Control 组相比,TNBS 组大鼠 DAI 评分明显增高($P<0.01$);与 TNBS 组相比,TNBS + 低剂量 SBP 组、TNBS + 中剂量 SBP 组、TNBS + 高剂量 SBP 组、TNBS + MES 组大鼠 DAI 评分均显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$),且 TNBS + 高剂量 SBP 组与 TNBS + MES 组治疗效果相当。见表 1。

表 1 各组大鼠 DAI 评分比较($\bar{x}\pm s$)

组别	DAI 评分
Control 组	0.00±0.00
TNBS 组	5.64±0.17**
TNBS + 低剂量 SBP 组	3.72±0.41**
TNBS + 中剂量 SBP 组	2.93±0.32**
TNBS + 高剂量 SBP 组	2.36±0.35**
TNBS + MES 组	2.17±0.21**

与 Control 组比较,** $P<0.01$;与 TNBS 组比较,** $P<0.01$;
 $n=12$

3.2 各组大鼠结肠黏膜损伤情况比较

与 Control 组相比,TNBS 组大鼠结肠有明显溃疡,黏膜糜烂,宏观损伤评分明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。TNBS + 低剂量 SBP 组、TNBS + 中剂量 SBP 组、TNBS + 高剂量 SBP 组、TNBS + MES 组大鼠结肠溃疡数量、面积明显减少,程度减轻,宏观损伤评分均显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$),且 TNBS + 高剂量 SBP 组与 TNBS + MES 组治疗效果相当。见表 2。

表 2 各组大鼠 CMDI 评分比较($\bar{x}\pm s$)

组别	CMDI 评分
Control 组	0.40±0.516
TNBS 组	7.50±0.97**
TNBS + 低剂量 SBP 组	4.60±0.97**
TNBS + 中剂量 SBP 组	3.80±0.63**
TNBS + 高剂量 SBP 组	3.10±0.99**
TNBS + MES 组	2.90±0.57**

与 Control 组比较,** $P<0.01$;与 TNBS 组比较,** $P<0.01$;
 $n=12$

3.3 各组大鼠结肠组织病理学变化

Control 组大鼠结肠组织黏膜结构完整,腺体无异常;TNBS 组大鼠结肠黏膜有大量溃疡,黏膜下层有炎性细胞浸润;与 TNBS 组比较,TNBS + 中剂量 SBP 组大鼠结肠黏膜溃疡数量、面积有所减少,炎性细胞浸润明显减少;TNBS + 高剂量 SBP 组大鼠结肠黏膜比较完整,炎性细胞浸润几乎没有;TNBS + MES 组大鼠结肠黏膜完整,炎性细胞浸润明显改善。见图 1。

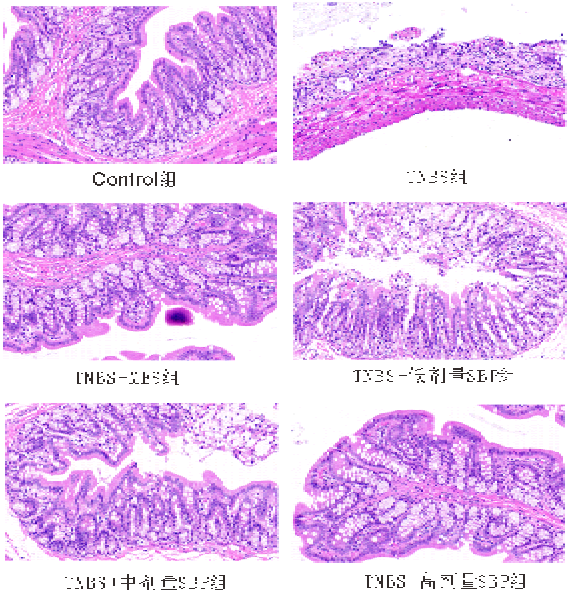


图 1 各组大鼠结肠组织病理学变化(40×)

3.4 各组大鼠 TDI 评分比较

与 Control 组相比,TNBS 组大鼠 TDI 评分明显增高($P<0.01$);与 TNBS 组比较,TNBS + 低剂量 SBP 组、TNBS + 中剂量 SBP 组、TNBS + 高剂量 SBP 组、TNBS + MES 组大鼠 TDI 评分均显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 3。

表 3 各组大鼠 TDI 评分比较($\bar{x}\pm s$)

组别	TDI 评分
Control 组	0.60±0.52
TNBS 组	7.30±0.82**
TNBS + 低剂量 SBP 组	4.90±0.74**
TNBS + 中剂量 SBP 组	4.20±0.79**
TNBS + 高剂量 SBP 组	3.30±0.82**
TNBS + MES 组	2.60±0.52**

与 Control 组比较,** $P<0.01$;与 TNBS 组比较,** $P<0.01$;
 $n=12$

3.5 各组大鼠 ROS、GSH-PX 及 CAT 水平比较

与 Control 组相比,TNBS 组大鼠 ROS 水平明显增高,GSH-PX、CAT 水平明显减低($P<0.01$);与 TNBS 组比较,TNBS + 低剂量 SBP 组、TNBS + 中剂量 SBP 组、TNBS + 高剂量 SBP 组、TNBS + MES 组大鼠 ROS 水平明显减低,GSH-PX、CAT 水平明显增高($P<0.05$, $P<0.01$)。见表 4。

3.6 各组大鼠血清炎症因子水平比较

与 Control 组相比,TNBS 组大鼠 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MPO 水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。与 TNBS 组比较,TNBS + 低剂量 SBP 组、TNBS + 中剂量 SBP 组、TNBS + 高剂量 SBP 组、TNBS + MES 组大鼠 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MPO 水平明显减低($P<0.05$, $P<0.01$)。见表 5。

表 4 各组大鼠 ROS、GSH-Px 及 CAT 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	ROS/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	GSH-Px/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	CAT/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$
Control 组	2.17 $\pm$ 0.28	17.84 $\pm$ 1.15	1.65 $\pm$ 0.21
TNBS 组	5.73 $\pm$ 0.41 ^{**}	8.95 $\pm$ 0.33 ^{**}	0.72 $\pm$ 0.14 ^{**}
TNBS + 低剂量 SBP 组	4.89 $\pm$ 0.29 ^{**}	10.413 $\pm$ 0.96 ^{**}	0.85 $\pm$ 0.12 ^{**}
TNBS + 中剂量 SBP 组	3.68 $\pm$ 0.29 ^{**}	11.66 $\pm$ 1.35 ^{**}	1.02 $\pm$ 0.19 ^{**}
TNBS + 高剂量 SBP 组	3.15 $\pm$ 0.23 ^{**}	14.41 $\pm$ 0.58 ^{**}	1.31 $\pm$ 0.12 ^{**}
TNBS + MES 组	2.87 $\pm$ 0.21 ^{**}	15.51 $\pm$ 1.32 ^{**}	1.41 $\pm$ 0.15 ^{**}

与 Control 组比较, ^{**} $P < 0.01$; 与 TNBS 组比较, ^{**} $P < 0.01$; $n = 12$

表 5 各组大鼠 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MPO 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β / $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	IL-6/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	TNF- α / $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	MPO/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
Control 组	26.71 $\pm$ 1.32	135.82 $\pm$ 2.47	47.14 $\pm$ 0.97	3.92 $\pm$ 0.34
TNBS 组	38.64 $\pm$ 0.76 ^{**}	189.45 $\pm$ 4.16 ^{**}	89.52 $\pm$ 2.06 ^{**}	5.57 $\pm$ 0.82 ^{**}
TNBS + 低剂量 SBP 组	34.82 $\pm$ 0.63 ^{**}	171.04 $\pm$ 5.21 ^{**}	74.29 $\pm$ 1.75 ^{**}	5.18 $\pm$ 0.61 ^{**}
TNBS + 中剂量 SBP 组	32.06 $\pm$ 0.71 ^{**}	162.31 $\pm$ 4.03 ^{**}	69.03 $\pm$ 1.24 ^{**}	4.94 $\pm$ 0.75 ^{**}
TNBS + 高剂量 SBP 组	29.32 $\pm$ 0.84 ^{**}	151.14 $\pm$ 3.62 ^{**}	60.42 $\pm$ 0.87 ^{**}	4.83 $\pm$ 0.62 ^{**}
TNBS + MES 组	27.21 $\pm$ 0.72 ^{**}	146.22 $\pm$ 3.45 ^{**}	52.39 $\pm$ 0.92 ^{**}	4.59 $\pm$ 0.67 ^{**}

与 Control 组比较, ^{**} $P < 0.01$; 与 TNBS 组比较, ^{**} $P < 0.01$; $n = 12$

3.7 各组大鼠透射电镜下线粒体超微结构比较

Control 组大鼠结肠组织线粒体数量较多, 结构清晰, 内膜嵴较多, 脊丰富。与 Control 组比较, TNBS 组大鼠线粒体数量明显减少, 线粒体肿胀, 结构被破坏, 膜缺损, 脊断裂。TNBS + 中剂量 SBP 组、TNBS + 高剂量 SBP 组、TNBS + MES 大鼠线粒体数目及结构有改善, TNBS + 高剂量 SBP 组、TNBS + MES 组大鼠线粒体更接近正常。见图 2。

3.8 各组大鼠结肠组织中蛋白表达比较

与 Control 组比较, TNBS 组大鼠结肠组织中 Nrf2、ARE、MFN2 蛋白表达明显减少, Keap-1、NF- κ B 蛋白表达明显增多($P < 0.01$); 与 TNBS 组比较, TNBS + 低剂量 SBP 组、TNBS + 中剂量 SBP 组、TNBS + 高剂量 SBP 组、TNBS + MES 组大鼠结肠组织 Nrf2、ARE、MFN2 蛋白相对表达量明显增加, Keap-1、NF- κ B 蛋白相对表达量明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 6、图 3。

4 讨论

氧化应激是指机体在受到外部有害刺激时, 会大量产生氧自由基, 氧化和抗氧化系统失衡, 导致疾病的发生或加重^[11-13]。诸多研究显示, 炎症疾病一般都伴有氧化应激反应, 氧化应激反应也是 UC 发病的重要发病机制^[14,15], UC 患者 ROS 水平明显升高, 一方面会损伤蛋白质、脂质等大分子物质, 破坏细胞结构; 另一方面氧自由基会刺激细胞因子表达, 激活线粒体依赖的凋亡通路等, 诱导细胞凋亡^[16]。线粒体受损时, 呼吸链功能障碍, 电子传递过程受阻, 电子泄露增加, 导致 ROS 的生成增多, 会进一步损伤线粒体结构和功能, 形成恶性循环^[17]。当 ROS 生成过多时, 它们会攻击肠上

皮细胞, 导致细胞膜的损伤和功能的紊乱, 加剧 UC 中的炎症反应, 进一步引起组织损伤^[18]。MDA 作为质子过氧化物最终产物能够间接反映氧化应激程度^[19]。CAT 是抗氧化系统的重要组成部分, 可以和 SOD 协同清除氧自由基, 保护机体免受损伤, 可作为评价抗氧化能力的指标^[20]。GSH-Px 是一种过氧化氢酶, 可以保护细胞膜结构和功能, 从而避免过氧化氢的氧化损伤^[21]。

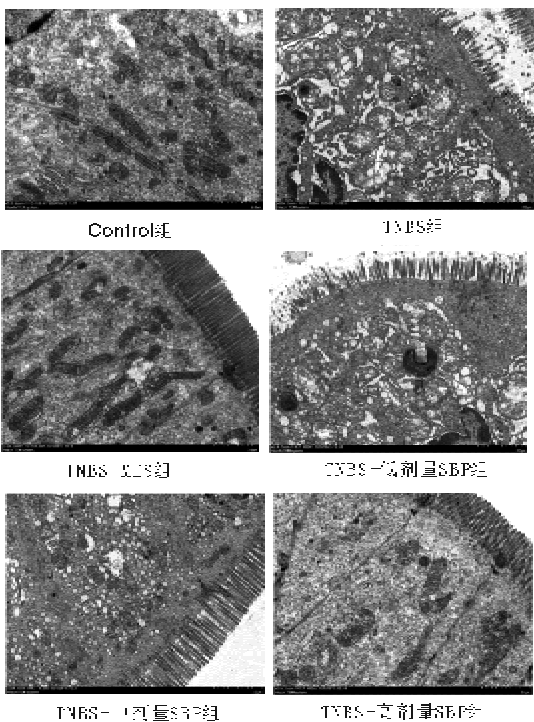


图 2 各组大鼠线粒体超微结构

表 6 各组大鼠结肠组织中 Keap-1、Nrf2、ARE、NF-κB、MFN2 蛋白表达比较(̄x±s)

组别	Keap-1	Nrf2	ARE	NF-κB	MFN2
Control 组	0.53±0.11	1.13±0.18	1.05±0.19	0.44±0.02	0.92±0.03
TNBS 组	1.43±0.12**	0.23±0.08**	0.31±0.11**	0.82±0.04	0.38±0.02
TNBS+低剂量 SBP 组	0.97±0.16†	0.39±0.10*	0.43±0.07*	0.79±0.02	0.51±0.03
TNBS+中剂量 SBP 组	0.81±0.09*	0.54±0.10*	0.51±0.11*	0.72±0.03	0.62±0.05
TNBS+高剂量 SBP 组	0.71±0.12*	0.66±0.12*	0.64±0.08*	0.64±0.05	0.75±0.04
TNBS+MES 组	0.59±0.07*	0.83±0.11*	0.75±0.13*	0.59±0.06	0.82±0.03

与 Control 组比较,**P<0.01;与 TNBS 组比较,*P<0.05,**P<0.01;n=12

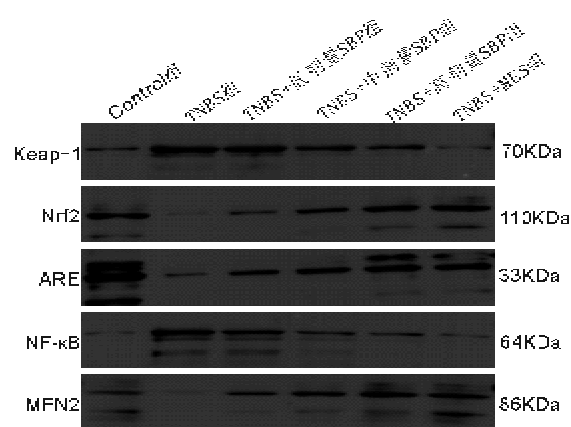


图 3 各组大鼠结肠组织中 Keap-1、Nrf2、ARE、NF-κB、MFN2 蛋白条带图

本研究结果显示,与 Control 组比较,TNBS 组大鼠结肠组织 DAI、CMDI、TDI 评分均明显增高(P<0.01),HE 染色结果显示结肠黏膜有大量溃疡,黏膜下层炎性细胞浸润较为严重,提示 UC 模型复制成功;血清中 ROS 水平明显升高,GSH-PX、CAT 水平明显降低(P<0.01),血清 IL-1β、IL-6、TNF-α、MPO 水平明显升高;透射电镜结果显示模型组大鼠线粒体数量明显减少,线粒体肿胀,结构被破坏,膜缺损,脊断裂;说明大鼠线粒体受损,处于氧化应激过度的状态。给予参苓白术散治疗后,大鼠结肠组织 DAI、CMDI、TDI 评分明显降低;大鼠结肠黏膜溃疡好转,炎性细胞浸润现象明显减少;ROS 水平明显降低高,GSH-PX、CAT 水平明显升高(P<0.01),血清 IL-1β、IL-6、TNF-α、MPO 水平明显升高;线粒体数目及结构得到明显改善;说明参苓白术散可以保护线粒体结构、减轻 UC 大鼠的氧化应激反应,从而对 UC 大鼠结肠黏膜损伤发挥保护作用。

Keap1/Nrf2/ARE 通路是内源性抗氧化应激的关键通路^[32],Nrf2 是该通路的核心成员,是调节抗氧化应激反应的重要转录因子,Keap1 是 Nrf2 的负调控因子,正常生理状态下,Keap1 和 Nrf2 在胞质内处于耦合状态^[33,34]。而当机体发生氧化应激反应时,Keap1 与 Nrf2 解离,Nrf2 磷酸化并移至细胞核,与 ARE 作用调节编码抗氧化蛋白,从而发挥抗氧化作用^[35]。马旭冉等^[26]研究表明,可通过激活 Nrf2 通路来抑制 UC 大鼠

结肠组织氧化应激反应,进而抑制炎症反应,缓解结肠组织损伤。在本研究中,TNBS 组大鼠结肠组织中 Nrf2、ARE、MFN2 蛋白表达较 Control 组明显减少;参苓白术散组和 MES 治疗组大鼠结肠组织 Nrf2、ARE、MFN2 蛋白表达均较 TNBS 组增多。说明参苓白术散组可促进 Keap-1/Nrf2/ARE 信号通路活化、抑制氧化应激反应,进而对 UC 大鼠结肠黏膜损伤发挥保护作用。

综上所述,参苓白术散对 UC 大鼠结肠组织黏膜损伤具有保护作用,其机制可能是通过激活 Keap-1/Nrf2/ARE 信号通路抑制氧化应激反应来实现的。

参考文献:

[1] 褚晓静,鲁笛,范文娟. 溃疡性结肠炎患者的压力管理干预[J]. 贵州医药,2017,41(10):1102.
[2] 林安娜,李雨晴,钟慕尧,等. 炎性细胞因子在溃疡性结肠炎患者中的表达及其对预后的影响[J]. 南方医科大学学报,2016,36(12):1712.
[3] ZHANG H, GONG C, QU L, et al. Therapeutic effects of triptolide via the inhibition of IL-1β expression in a mouse model of ulcerative colitis[J]. Exp Ther Med, 2016, 12(3):1279.
[4] 高纳影. 固公果根提取物基于 Nrf2 通路调节实验性溃疡性结肠炎的疗效及机制研究[D]. 广东药科大学硕士学位论文,2018.
[5] 张隼,孙建慧,李姪,等. 国医大师李佃贵治疗溃疡性结肠炎经验[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(4):1504.
[6] 谢鸣. 方剂学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2017.
[7] 刘景源. 太平惠民合剂局方[M]. 北京:人民卫生出版社, 2017:94.
[8] 焦文超,罗慧,苏聪平,等. 3 种溃疡性结肠炎动物模型的对比[J]. 中华中医药杂志,2020, 35(11):495.
[9] WANG D, SHI K F, WANG Y, et al. Effect of huangqin tang on colonic gene expression in rats with ulcerative colitis[J]. International Journal of Genomics, 2020(15):1.
[10] HOSSEINI SY, ABODRAB E, KHAZRAEI H, et al. Effect of egg white and honey enema on ulcerative colitis in an animal model[J]. Comparative Clinical Pathology, 2020, 29(1):61.
[11] 卢广英,邢训颢,王嘉奇,等. 经典名方参苓白术散的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(19):5171.
[12] 张广玉,张勤生,孙晓娜,等. 参苓白术散加减治疗抗生素相关性腹泻脾胃虚寒证的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(19):74.
[13] 刘影,董燕,孙道红,等. 参苓白术散联合多磺酸黏多糖封包对老年慢性湿疹血虚风燥证患者炎症因子和外周血 T 淋巴细胞亚群的影响[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(5):166.

- [14] 魏丹丹,林旭红,王慧超,等. 香草乙醚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-p38MAPK 信号通路的关系[J]. 生理学报,2015,67(1):74.
- [15] ZHU H,LI Y R. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence[J]. Exp Biol Med,2012,237(5):474.
- [16] 马涛. 溃疡性结肠炎组织中 NOX1、NOX2 表达量与肠黏膜氧化应激反应屏障功能损伤的相关性[J]. 海南医学院学报,2017,23(19):2638.
- [17] MOON S J, DONG W, STEPHANOPOULOS G N, et al. Oxidative pentose phosphate pathway and glucose anaplerosis support maintenance of mitochondrial NADPH pool under mitochondrial oxidative stress[J]. Bioeng Transl Med,2020,5(3):e10184.
- [18] BHATTACHARYA A, CHATTOPADHYAY R, MITRA S, et al. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases[J]. Physiol Rev,2014,94(2):329.
- [19] 石晓红,谈丰平,江文华. 美常安联合美沙拉嗪在 UC 患者中的应用效果及其对患者 SOD、MDA、白细胞介素和 TNF- α 的影响[J]. 世界华人消化杂志,2018,26(12):748.
- [20] KRAJKA-KUZNIAK V, PALUSZCZAK J, BAER-DUBOWSKA W. The Nrf2-ARE signaling pathway: an update on its regulation and possible role in cancer prevention and treatment[J]. Pharmacol Rep, 2017,69(3):393.
- [21] WANG G W, ZHANG X L, WU Q H, et al. The hepatoprotective effects of sedum sarmentosum extract and its isolated major constituent through Nrf2 activation and NF- κ B inhibition[J]. Phytomedicine, 2018,53(1):263.
- [22] ZHOU C, LI H, YAO Y, et al. Delayed remote ischemic preconditioning produces an additive cardioprotection to sevoflurane preconditioning through an enhanced heme oxygenase 1 level partially via nuclear factor erythroid 2-related factor 2 nuclear translocation[J]. Journal of Cardiovascular Pharmacology & Therapeutics, 2014,19(6):558.
- [23] MENEGON S, COLUMBANO A, GIORDANO S. The Dual roles of NFE2 in Cancer[J]. Trends Mol Med, 2016, 22(7):578.
- [24] LOBODA A, DAMULEWICZ M, PYZA E, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism[J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(17):3221.
- [25] WU K G, CUI J Y, KLAASSEN C D. Effect of graded Nrf2 activation on phase-I and -II drug metabolizing enzymes and transporter in mouse liver[J]. PLoS One, 2012,7(7):e39006.
- [26] 马旭冉,王彦礼,郭建新,等. 黄芩苷调控 Nrf2 通路对溃疡性结肠炎大鼠氧化应激作用的影响[J]. 药学报, 2019, 54(4):653.

Exploring the oxidative stress and mitochondrial protection mechanism of *Shenling Baizhu Powder*(参苓白术散) in alleviating ulcerative colitis based on the KEAP1/NRF2/ARE pathway

ZHANG Quanhui^{1,2}, ZHANG Xiuchai², DENG Yongwen^{1,2*}, YAO Yuqiao¹, SU Liang²

(1. *Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China*; 2. *Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China*)

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of oxidative stress and mitochondrial protection of *Shenling Baizhu Powder* (参苓白术散, SLBZP) in alleviating ulcerative colitis (UC) based on the KEAP1/NRF2/ARE signaling pathway. **Methods** Seventy-two SD rats were randomly divided into the control group ($n = 12$) and modeling group ($n = 60$). After successful construction of the UC modeling induced by TNBS, the rats were randomly divided into 5 groups, with 12 rats in each, and given corresponding drug treatments for 21 days. Disease activity index (DAI) scores, colonic mucosal damage index (CMDI) scores, serum inflammatory factor levels, colonic histological damage index (TDI) scores, oxidative stress indicators, pathological changes, mitochondrial ultrastructure and protein expression were compared among the rats in each group. **Results** Compared with the control group, DAI, CMDI, TDI scores, serum IL-1 β , IL-6, TNF- α , MPO levels were increased in the TNBS group ($P < 0.01$). There was ulcer formation in the colonic mucosa and a large number of inflammatory cells infiltrated in the submucosa layer; the number of mitochondria was reduced, and the structure of the mitochondria was disrupted; the ROS levels in the colonic tissues were increased; GSH-PX and CAT levels were reduced; Nrf2, ARE and MFN2 protein expression was reduced; Keap-1 and NF- κ B protein expression was elevated ($P < 0.01$). Compared with the TNBS group, DAI, CMDI and TDI scores, serum IL-1 β , IL-6, TNF- α and MPO levels were reduced in the administered groups ($P < 0.01$); colonic mucosal ulceration was alleviated and inflammatory cell infiltration was reduced; mitochondrial number and structure were improved; ROS levels in the colonic tissues were reduced; GSH-PX, CAT levels were elevated; Nrf2, ARE, MFN2 and MFN2 protein expressions were increased; Keap-1 and NF- κ B protein expressions were decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** SLBZP protects against colonic mucosal injury in UC rats by promoting Keap-1/Nrf2/ARE pathway activation and inhibiting oxidative stress.

Key words: *Shenling Baizhu Powder*(参苓白术散); Ulcerative colitis; Oxidative stress; KEAP1; NRF2; ARE

(责任编辑:周弈轩)