

葛根芩连汤及配伍调控 Nrf2/NQO1 信号通路抑制 溃疡性结肠炎大鼠氧化应激损伤

林川, 王菲, 王鸿卿, 王新宏, 安睿*
(上海中医药大学中药学院, 上海 201203)

[摘要] 目的:探讨葛根芩连汤治疗溃疡性结肠炎(UC)大鼠的可能机制,同时讨论缺少药味对葛根芩连汤疗效的影响。方法:采用自由饮用5%葡聚糖硫酸钠盐水溶液诱导UC大鼠模型,雄性SD大鼠随机分为正常组、模型组、西药组(柳氮磺吡啶肠溶片,350 mg·kg⁻¹)、葛根芩连汤全方组(17 g·kg⁻¹)、全方去甘草组(17 g·kg⁻¹)、全方去葛根组(17 g·kg⁻¹)、葛根甘草组(17 g·kg⁻¹)和黄芩黄连组(17 g·kg⁻¹)。用1,1-二苯基-2-苦肟基(DPPH)、2,2-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)和荧光漂白后恢复技术(FRAP)法评估葛根芩连汤及其不同配伍组体外抗氧化活性;通过比较大鼠体质量变化和记录结肠长度、观察结肠剖面和苏木素-伊红(HE)染色病理组织切片评估给药治疗后各组大鼠结肠组织损伤程度;比色法测定大鼠血清中髓过氧化物酶(MPO)、脂质过氧化物(LPO)、丙二醛(MDA)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、过氧化氢酶(CAT)和还原型谷胱甘肽(GSH)水平变化;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测结肠组织中核因子E₂相关因子2(Nrf2)、醌氧化还原酶1(NQO1)和血红素氧合酶-1(HO-1) mRNA和蛋白表达的变化。结果:与正常组比较,模型组大鼠结肠黏膜组织坏死,炎症浸润,血清中过氧化物MPO、LPO和MDA含量显著上升(P<0.01),抗氧化酶T-SOD、CAT和GSH活性显著下降(P<0.01),Nrf2、NQO1和HO-1 mRNA表达均呈下降趋势,Nrf2蛋白表达显著下降(P<0.01),NQO1和HO-1蛋白表达呈下降趋势;与模型组比较,葛根芩连汤及配伍组能改善UC大鼠结肠组织病理损伤和形态结构,显著降低大鼠血清中过氧化物MPO、LPO和MDA水平(P<0.05),提高无葛根组抗氧化酶T-SOD,无甘草组、黄芩黄连组CAT和GSH(P<0.01)活性,增加结肠组织中Nrf2、NQO1和HO-1 mRNA和蛋白的相对表达,全方组差异明显(P<0.05)。结论:葛根芩连汤对UC大鼠病理损伤具有恢复作用,其机制可能与激活Nrf2信号通路、抑制氧化应激反应有关。葛根芩连汤组方中缺少君药葛根或仅有臣药黄芩和黄连对其治疗UC有较大影响。研究结果可为中药复方临床应用及复方配伍机制研究做出有益探索。

[关键词] 葛根芩连汤; 不同配伍; 氧化应激; 溃疡性结肠炎; 核因子E₂相关因子2(Nrf2)信号通路

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R284;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)13-0019-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220602

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220111.1118.004.html>

[网络出版日期] 2022-01-11 14:45

Gegen Qinliantang and Its Combinations Inhibit Oxidative Stress Injury in Ulcerative Colitis Rats by Regulating Nrf2/NQO1 Signaling Pathway

LIN Chuan, WANG Fei, WANG Hongqing, WANG Xinhong, AN Rui*

(School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the underlying mechanism of Gegen Qinliantang (GGQL) in the treatment of ulcerative colitis (UC) in rats and discuss the effects of modification of GGQL on its efficacy. **Method:** The UC model was induced in rats by free access to 5% dextran sulfate sodium in saline solution. Male SD rats were randomly divided into a normal group, a model group, a positive control group (sulfasalazine

[收稿日期] 2021-10-31

[基金项目] 上海市“科技创新行动计划”自然科学基金项目(19ZR1451900)

[第一作者] 林川,在读硕士,从事药物分析与体内过程研究,E-mail:3325892608@qq.com

[通信作者] *安睿,博士,教授,从事药物分析与体内过程研究,Tel:021-51322183,E-mail:anruimw@126.com

enteric-coated tablets, $350 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), a GGQL group ($17 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), a Glycyrrhizae Radix et Rhizoma (GR)-absent GGQL group ($17 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), a Puerariae Lobatae Radix (PLR)-absent GGQL group ($17 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), a GR-PLR group ($17 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and a Scutellariae Radix (SR)-Coptidis Rhizoma (CR) group ($17 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). The *in vitro* antioxidant activities of GGQL and its combinations were evaluated by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), and fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) methods. The degree of colonic tissue injury in each group was evaluated based on the weight changes of rats, the length of the colon, the colon sections, and hematoxylin-eosin (HE)-stained histopathologic sections. The serum levels of myeloperoxidase (MPO), lipid peroxide (LPO), malondialdehyde (MDA), total superoxide dismutase (T-SOD), catalase (CAT), and reduced glutathione (GSH) were measured by colorimetry. The mRNA and protein expression of nuclear factor-erythroid 2 related factor (Nrf2), quinone oxidoreductase 1 (NQO1), and heme oxygenase-1 (HO-1) in colon tissues was detected by real-time fluorescence-based quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot, respectively. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed colonic mucosal necrosis, inflammatory infiltration, increased serum levels of MPO, LPO, and MDA ($P < 0.01$), blunted activities of T-SOD, CAT, and GSH ($P < 0.01$), decreasing trend of mRNA expression of Nrf2, NQO1, and HO-1, reduced expression of Nrf2 protein ($P < 0.01$), and decreasing trend of expression of NQO1 and HO-1 proteins. Compared with the model group, the GGQL and its combination groups showed improved pathological injury and morphological structure of colon tissues in UC rats, reduced serum levels of MPO, LPO, and MDA ($P < 0.05$), potentiated T-SOD activity (the PLR-absent GGQL group), CAT activity (the GR-absent GGQL group and the SR-CR group), and GSH activity ($P < 0.01$), and increased mRNA and protein expression of Nrf2, NQO1, and HO-1 in colon tissues. The difference in the GGQL group was significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** GGQL has a restorative effect on the pathological injury of UC rats, and its mechanism may be related to the activation of the Nrf2 signaling pathway and inhibition of oxidative stress response. The absence of PLR or only presence of SR and CR has a great impact on the treatment of UC. The results can provide references for the clinical rational medication of Chinese medicine and the research on the mechanism of compound combinations.

[Keywords] Gegen Qinliantang; different combinations; oxidative stress; ulcerative colitis; nuclear factor-erythroid 2 related factor (Nrf2) signaling pathway

溃疡性结肠炎(UC)是一种病因尚未完全清楚的结肠和直肠慢性非特异性炎症性疾病,病变局限于大肠黏膜及黏膜下层。病变多位于乙状结肠和直肠,也可延伸至降结肠,甚至整个结肠^[1-3]。病程漫长,常反复发作。本病见于任何年龄,但20~30岁最多见。其发生机制可能与多种因素有关,具有多层次、多靶点^[4-7]的特点。研究表明UC的发病机制与结肠组织氧化应激损伤有一定关系^[8-11],核因子E₂相关因子2(Nrf2)是调控细胞氧化应激反应的重要转录因子,也是维持细胞内氧化还原稳态的中枢调节者。Nrf2可诱导调控一系列抗氧化蛋白组成型和诱导型表达,减轻活性氧和亲电体引起的细胞损伤,维持组织细胞氧化还原动态平衡^[12-13]。研究发现药物对UC的治疗作用与其上调Nrf2信号通路有关^[14-17]。

葛根芩连汤出自《伤寒论》,由葛根、黄芩、黄连

和炙甘草4味中药配伍组成,有解表清里,升清止利之功效,主要用于治疗“协热下利”证,对菌痢、UC及小儿病毒性腹泻等有良好疗效^[18-19]。葛根芩连汤具有解热、抗菌、抗病毒等作用,在治疗UC方面有较好效果^[18-21]。课题组前期在葛根芩连汤的相关研究工作中已取得一定的进展,葛根芩连汤及不同配伍组之间在化学成分、药效以及体内过程的确呈现出一定差异^[20],并从微生态角度阐释葛根芩连汤治疗结肠炎的作用机制及配伍合理性,研究表明该复方可能是部分通过改善肠道屏障、调节炎症因子水平及肠道菌群的结构而发挥治疗结肠炎的作用^[21]。葛根芩连汤治疗UC的机制虽有一定的报道^[18-19],是否与抗氧化应激作用相关尚未完全阐明。为更深入探讨其治疗机制,本实验从抗氧化应激的角度探讨其治疗UC的作用机制及复方中各药味的作用。希冀研究结果可进一步阐明葛根芩连汤的抗氧化

应激作用与其治疗 UC 大鼠结肠损伤之间的关系,并为该复方配伍规律研究奠定基础。

1 材料

1.1 动物 健康 SD 雄性大鼠, SPF 级, 体质量(180±20) g, 购买于上海斯莱克实验动物有限公司, 合格证号 SCXK(沪)2017-0005。饲养环境为 SPF 级屏障环境, 温度(22±1) °C, 相对湿度 45%~65%, 12 h 明暗循环, 饲料和饮用水消毒后由动物自由摄取。该实验由上海中医药大学实验动物伦理委员会审核批准, 伦理编号为 PZSHUTCM201211005。实验结束后, 颈椎脱臼处死大鼠。

1.2 药物与试剂 葛根、黄芩、黄连、炙甘草饮片(批号分别为 201016、201103、201118、201109)均购自上海康桥中药饮片有限公司, 上述药材经上海中医药大学倪梁红副教授鉴定, 符合 2020 年版《中华人民共和国药典》规定。柳氮磺吡啶肠溶片(上海信谊天平药业有限公司, 批号 09200609); 1, 1-二苯基-2-苦肟基/DPPH(批号 S21J11M116469)、2, 2-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)和 2, 4, 6-三吡啶基三嗪(TPTZ)(上海源叶生物科技有限公司, 批号分别为 H09N11B130256、X11O11D126717); Nrf2/NFE2L2 抗体、醌氧化还原酶 1(NQO1)抗体、和血红素氧合酶-1(HO-1/HMOX1)抗体(美国 Proteintech 公司, 批号分别为 00086801、10017852、00083458); 葡聚糖硫酸钠、RIPA Lysis Buffer(Strong)RIPA 裂解液(强)和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)(上海翊圣生物公司, 批号分别为 D2021241、R1001221、B1001231); 髓过氧化物酶(MPO)测试盒(比色法)、脂质过氧化物(LPO)试剂盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒(TBA 法)、T-SOD 试剂盒(测总)、过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒(可见光法)(钼酸铵法)、还原型谷胱甘肽(GSH)测定试剂盒(微板法)(南京建成生物工程研究所, 批号分别为 20210123、20210520、20210105、20201231、20210222、2021010); 增强化学发光法(ECL)化学发光试剂盒(碧云天生物技术公司, 批号 030519190603); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、苏木素-伊红(HE)染液(武汉塞维尔生物科技有限公司, 批号分别为 GB12002、G1005-500ML)。

1.3 仪器 Synergy H1MFD 型酶标仪(美国 BioTek 公司); AI 600 型超灵敏多功能成像仪(美国 GE 公司); PowerPac Basic 型电泳仪及 Mini Transblot 型湿转印槽(美国 Bio-Rad 公司); BioPhotometer D30 型核酸蛋白检测仪、Mastercycler pro 型梯度聚合酶链

式反应(PCR)仪(德国 Eppendorf 公司); StepOnePlus 型实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)仪(美国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 葛根芩连汤及不同配伍组药液配制 参考文献[19]及课题组前期研究^[20-21], 全方(GQ)组按照质量比葛根-黄芩-黄连-甘草(5:3:2:2), 煎煮, 浓缩成 1 g·mL⁻¹ 药液, 其余配伍组: 全方去甘草(WGC)组(葛根、黄芩、黄连)、全方去葛根(WG)组(黄芩、黄连、甘草)、葛根甘草(GG)组(葛根、甘草)、黄芩黄连(QL)组(黄芩、黄连), 同法煎制, 备用。

2.2 葛根芩连汤及不同配伍组体外抗氧化活性测定 将全方及不同配伍组药液稀释, 得到质量浓度为 3、6、12、18、24、30 g·L⁻¹ 的供试品药液, 备用。将 DPPH、ABTS 和 TPTZ 试剂分别配制为相应的工作液^[22-24]。取工作液 200 μL 于 96 孔板, 加入供试品药液 10 μL, 震荡混匀。DPPH、ABTS 工作液与供试品药液反应后分别于 517 和 734 nm 处测定吸光度 *A*, 按照文献中方法^[22]计算清除率; TPTZ 工作液与供试品药液混匀后, 37 °C 孵育 30 min, 于 595 nm 处测定 *A*, FRAP 法^[22]计算总抗氧化能力。

2.3 溃疡性结肠炎大鼠模型的建立、分组与给药

SD 大鼠适应性饲养 1 周, 随机取出 8 只作为正常(CON)组, 其他大鼠自由饮用 5% DSS^[19]水溶液 7 d。随机解剖 2 只大鼠, 发现盲肠端肿大, 结肠充血性水肿, 说明造模成功。除 CON 组外, UC 大鼠随机分为 7 组: 模型组(DSS)组、西药(SASP)组、全方 GQ 组、WGC 组、WG 组、GG 组、QL 组, 每组 8 只。

给药前禁食 24 h, 不禁水。参考课题组前期研究^[20], GQ 组、WGC 组、WG 组、GG 组和 QL 组均按 17 g·kg⁻¹ 剂量灌胃给药, SASP 组按 350 mg·kg⁻¹ 剂量灌胃给药, CON 组与 DSS 组灌服等体积生理盐水, 每日定时给药 1 次, 连续给药 7 d。记录各组大鼠体质量变化。

2.4 生化指标检测 第 7 天灌胃给药后禁食不禁水 24 h, 腹主动脉取血, 分离血清于 -80 °C 冰箱冷冻保存。严格按照试剂盒说明书操作步骤, 酶标仪测定血清中 MPO、LPO、MDA、T-SOD、CAT 和 GSH^[19]含量。

2.5 结肠损伤程度评估^[18] 取血完成后, 颈椎脱臼处死大鼠, 距肛门 1 cm 处取结肠组织 1 cm, 经 4% 多聚甲醛固定后, 进行 HE 染色, 于 200 倍光镜下观察组织形态学变化、炎性浸润等。将剩余结肠, 洗净, 吸干水分, 记录长度。纵向剖开肠管, 仔细观察黏

膜充血、水肿及出血点等情况。参考Wallace评分标准^[20]进行结肠黏膜损伤指数(CMDI)评分。

2.6 Real-time PCR检测结肠组织中Nrf2、NQO1和HO-1 mRNA水平 取部分结肠组织,剪碎,加入TRIzol提总mRNA^[16],测定浓度和纯度。反转录成cDNA,逆转录(RT)-PCR法扩增目的基因,反

应条件为95℃预变性30s,循环反应为95℃变性10s,60℃退火30s,40个循环。 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[16]分析Nrf2、NQO1、HO-1 mRNA相对内参基因 β -肌动蛋白(β -actin)的表达水平。PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成,引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列上游(5'-3')	序列下游(5'-3')	长度/bp
Nrf2	TGACAATGAGGTTTCTTCGGCTACG	GGAGAGGATGCTGCTGAAGGAATC	354
NQO1	GCGGTGAGAAGAGCCCTGATTG	GCCTTCCTTATACGCCAGAGATGAC	234
HO-1	GGAAC TTTCAGAAGGGTCAGGTGTC	GCTGTGTGGCTGGTGTGTAAGG	234
β -actin	CTGTGTTGTCCCTGTATGCCTCTG	GGAACCGCTCATTGCCGATAGTG	385

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测结肠组织中Nrf2、NQO1和HO-1蛋白的表达^[25-26] 取部分结肠组织,剪碎,加入含PMSF的RIPA裂解液,提取总蛋白。BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,用生理盐水将蛋白质稀释至相同浓度,加入稀释后蛋白1/4体积的Loading buffer,水煮变性。取等量蛋白样品进行SDS-PAGE电泳分离,转至PVDF膜上,封闭。加入稀释后的Nrf2(1:2 000)、NQO1(1:1万)、HO-1(1:1 000)和GAPDH(1:3 000)抗体,4℃孵育过夜。加入稀释后的二抗(1:3 000),室温孵育2h,显影。用Image J软件分析目的条带灰度值。

2.8 统计学分析 实验数据采用统计学软件分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,服从正态分布,采用方差分析Oneway Analysis Of Variance进行各组间差异比较,方差齐者采用最小显著性差异法(LSD)及SNK法进行两两比较,方差不齐者采用Tamhane's法进行比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对UC大鼠体外抗氧化活性的影响 供试品药液的DPPH和ABTS半数抑制浓度(IC_{50})大小、供试品和TPTZ工作液反应后切线斜率大小代表其抗氧化能力强弱。GQ组的DPPH和ABTS半数清除率均小于其他组,切线斜率大于其他组,说明其体外抗氧化活性强于其他组。见表2、表3。

3.2 对UC大鼠结肠损伤程度评估的影响

3.2.1 对UC大鼠体质量、结肠长度和CMDI指数的影响 CON组大鼠活动、饮食及体质量增加正常,皮毛光亮、肛周清洁、粪便呈丸状且无腹泻。从第3天开始,除CON组外,大鼠摄食明显减少、毛发粗糙无光泽、体质量减轻、排便增加、肛周较脏,出

表2 各用药组体外抗氧化活性 IC_{50} 比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Comparison of *in vitro* antioxidant activity IC_{50} of each drug group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	$IC_{50}/g \cdot L^{-1}$	
	DPPH	ABTS
GQ组	6.79±0.44	12.79±0.98
WGC组	7.10±0.06	19.44±1.71
WG组	8.89±0.33	22.86±2.44
GG组	7.60±0.54	13.39±0.84
QL组	25.95±2.79	21.00±0.77

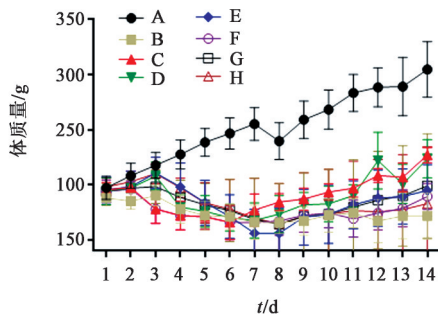
表3 各用药组总抗氧化活性($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Total antioxidant activity of each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	斜率
GQ组	0.113±0.009
WGC组	0.059±0.037
WG组	0.053±0.004
GG组	0.065±0.005
QL组	0.028±0.030

现稀便、无定形软便及粪便隐血阳性等情况。第9天用药组大鼠体质量开始恢复,第14天用药组大鼠体质量均有一定恢复。见图1。与CON组比较,DSS组结肠长度显著缩短,CMDI评分显著升高($P < 0.01$);与DSS组比较,各给药组明显升高结肠长度($P < 0.05, P < 0.01$);与GQ组比较,WG组和QL组结肠长度差异有明显统计学意义,GQ组升高结肠长度效果更明显($P < 0.05, P < 0.01$)。见表4。

3.2.2 对UC大鼠结肠组织病理学的影响 分析大鼠结肠剖面图,DSS组大鼠结肠炎症损伤严重,与CON组比较,DSS组CMDI评分显著升高($P <$



注: A. CON组; B. DSS组; C. SASP组; D. GQ组; E. WGC组; F. WG组; G. GG组; H. QL组(图2-图4同)

图1 葛根芩连汤及不同配伍对UC大鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 1 Effect of Gegen Qinliantang and different combinations on body weight of UC rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

0.01);与DSS组比较,各给药组炎症损伤均有不同程度的减轻,CMDI评分均有不同程度的降低($P < 0.05, P < 0.01$);与GQ组比较,WG组和QL组CMDI评分有明显统计学差异,GQ组降低CMDI评分效果更明显($P < 0.05, P < 0.01$)。见表4和图2。观察HE染色的病理切片,CON组结肠黏膜上皮组织、腺体及杯状细胞完整,结构清晰,隐窝无破坏,上皮细胞

表4 葛根芩连汤及不同配伍对UC大鼠结肠长度和CMDI指数的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 4 Effect of Gegen Qinliantang and different combinations on colon length and CMDI index of UC rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	结肠长度/cm	CMDI/分
CON组		17.92 \pm 1.89	0.13 \pm 0.35
DSS组		12.73 \pm 0.59 ²⁾	3.50 \pm 0.76 ²⁾
SASP组	0.35	20.27 \pm 1.34 ⁴⁾	1.13 \pm 0.64 ^{1,4)}
GQ组	17.00	20.15 \pm 2.10 ⁴⁾	0.88 \pm 0.83 ⁴⁾
WGC组	17.00	17.45 \pm 1.29 ⁴⁾	1.88 \pm 0.83 ⁴⁾
WG组	17.00	17.15 \pm 2.03 ^{4,5)}	2.38 \pm 0.74 ^{3,6)}
GG组	17.00	19.65 \pm 1.73 ⁴⁾	1.75 \pm 0.71 ⁴⁾
QL组	17.00	16.15 \pm 2.45 ^{3,6)}	2.88 \pm 0.83 ⁶⁾

注:与CON组比较¹⁾ $P < 0.05, ^2) P < 0.01$;与DSS组比较³⁾ $P < 0.05, ^4) P < 0.01$;与GQ组比较⁵⁾ $P < 0.05, ^6) P < 0.01$ (表5-表8同)

排列整齐,无炎症细胞浸润。DSS组隐窝、腺体、上皮结构多数不完整,肠黏膜坏死脱落,炎症细胞浸润。经药物干预后,相比DSS组肠腺体变长且丰富,得到一定程度恢复,其黏膜层内隐窝构损伤程度得到缓解。见图3。

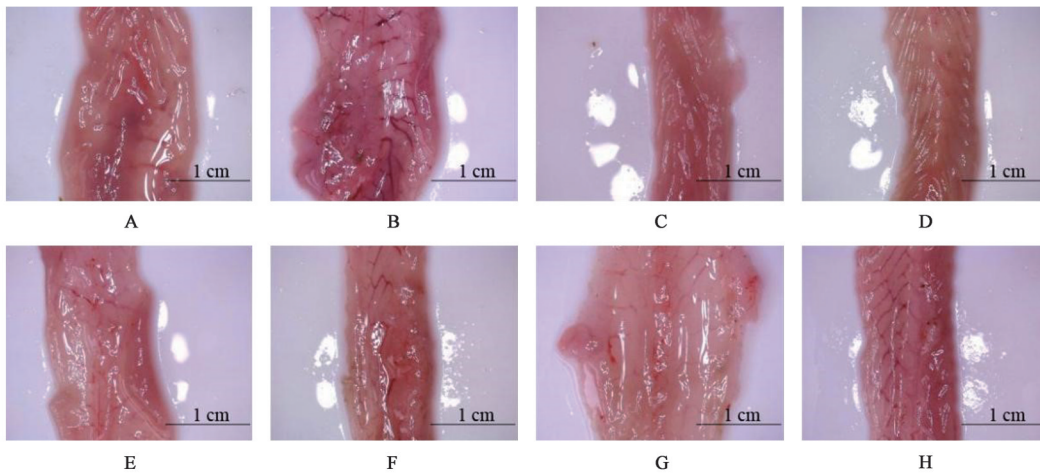


图2 葛根芩连汤及不同配伍对UC大鼠结肠组织结肠剖面的影响

Fig. 2 Effect of Gegen Qinliantang and different combinations on section of rats colon in UC rats

3.3 对UC大鼠血清中过氧化物含量影响 与CON组比较,DSS组的MPO、LPO和MDA含量均显著上升($P < 0.01$);与CON组比较,各给药组MPO、LPO和MDA含量均明显降低($P < 0.05, P < 0.01$);与GQ组比较,WG组的MPO和MDA值,QL组的LPO值明显降低($P < 0.05$)。见表5。

3.4 对UC大鼠血清抗氧化酶活性影响 与CON组比较,DSS组T-SOD、CAT、GSH水平均显著下降($P < 0.01$);与DSS组比较,WG组的T-SOD水平,WGC组和QL组的CAT含量差异无统计学意义,其

他各给药组T-SOD、CAT、GSH水平均明显升高($P < 0.05, P < 0.01$);与GQ组比较,WGC组、GG组、QL组的CAT水平和QL组的GSH水平差异有统计学意义,GQ组的CAT、GSH水平升高较明显($P < 0.05, P < 0.01$)。见表6。

3.5 对UC大鼠结肠组织Nrf2、NQO1、HO-1 mRNA水平的影响 与CON组比较,DSS组Nrf2、NQO1、HO-1 mRNA表达均呈下降趋势,但差异无统计学意义。与DSS组比较,WG组和QL组的Nrf2 mRNA差异无统计学意义,其余各给药组明显

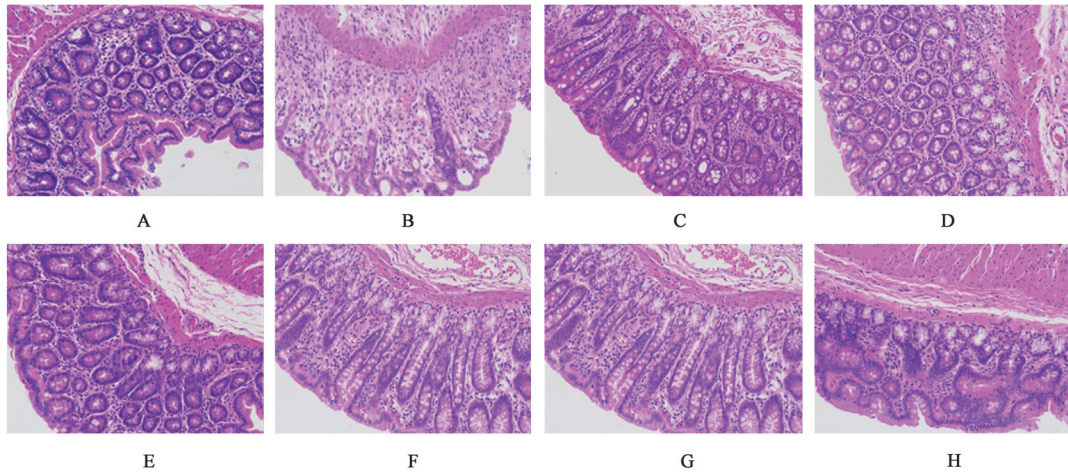


图3 葛根芩连汤及不同配伍对UC大鼠结肠组织病理学的影响(HE,×200)

Fig. 3 Effects of Gegen Qinliantang and different compatibility on colon histopathology in UC rats (HE,×200)

表5 葛根芩连汤及其不同配伍对UC大鼠血清脂质过氧化物含量的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 5 Effect of Gegen Qinliantang and its different combinations on content of serum lipid peroxide in UC rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MPO/U·L ⁻¹	LPO/μmol·L ⁻¹	MDA/μmol·L ⁻¹
CON组		1.71±0.21	5.25±0.81	2.98±0.23
DSS组		6.74±1.55 ²⁾	8.93±3.24 ²⁾	8.74±1.51 ²⁾
SASP组	0.35	3.67±0.63 ^{2,4)}	4.15±0.84 ⁴⁾	3.38±0.59 ⁴⁾
GQ组	17.00	3.04±1.38 ⁴⁾	2.72±1.39 ⁴⁾	3.54±0.25 ⁴⁾
WGC组	17.00	3.23±1.10 ⁴⁾	2.27±0.93 ⁴⁾	3.57±0.56 ⁴⁾
WG组	17.00	4.91±0.67 ^{3,6)}	3.76±0.86 ⁴⁾	4.48±0.74 ^{4,5)}
GG组	17.00	3.44±0.55 ⁴⁾	3.36±0.64 ⁴⁾	3.67±0.55 ⁴⁾
QL组	17.00	3.89±0.77 ⁴⁾	4.52±1.38 ^{4,5)}	3.67±0.75 ⁴⁾

表6 葛根芩连汤及其不同配伍对UC大鼠血清抗氧化酶活性的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 6 Effect of Gegen Qinliantang and its different combinations on antioxidant enzyme activities in serum of UC rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	T-SOD/U·mL ⁻¹	CAT/U·mL ⁻¹	GSH/μmol·L ⁻¹
CON组		386.80±8.72	21.62±3.07	218.90±31.23
DSS组		322.30±26.57 ²⁾	5.20±1.11 ²⁾	76.92±9.50 ²⁾
SASP组	0.35	357.20±14.37 ^{1,4)}	20.81±2.88 ⁴⁾	173.70±24.49 ⁴⁾
GQ组	17.00	360.70±11.21 ⁴⁾	13.60±1.48 ⁴⁾	182.50±43.52 ⁴⁾
WGC组	17.00	355.10±17.93 ³⁾	7.63±0.53 ⁶⁾	159.30±24.14 ⁴⁾
WG组	17.00	347.30±4.97 ²⁾	12.38±2.74 ⁴⁾	164.10±15.82 ⁴⁾
GG组	17.00	356.90±31.48 ⁴⁾	9.30±0.93 ^{3,6)}	143.60±19.88 ⁴⁾
QL组	17.00	356.30±9.08 ³⁾	8.02±2.88 ⁶⁾	132.90±22.79 ^{4,5)}

升高 Nrf2 mRNA 表达 ($P<0.05, P<0.01$), SASP 组、GQ 组、WGC 组的 NQO1 mRNA 表达均明显升高 ($P<0.05, P<0.01$), 其余各组 NQO1 mRNA 表达差异均无统计学意义, SASP 组、GQ 组的 HO-1 mRNA 表达显著升高 ($P<0.01$), 其余各组 HO-1 mRNA 表达差异均无统计学意义; 与 GQ 组比较, WG 组、QL 组的 Nrf2 mRNA 表达, WG 组的 HO-1 mRNA 表达

差异有统计学意义, GQ 组的 Nrf2、NQO1、HO-1 mRNA 表达升高较明显 ($P<0.05, P<0.01$)。见表 7。

3.6 对 UC 大鼠结肠组织 Nrf2、NQO1、HO-1 蛋白表达的影响 与 CON 组比较, DSS 组的 Nrf2 蛋白表达显著下降 ($P<0.01$), NQO1 和 HO-1 蛋白表达呈下降趋势, 但差异无统计学意义。与 DSS 组比较,

表7 葛根芩连汤及其配伍对UC大鼠结肠组织中Nrf2、NQO1、HO-1 mRNA相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 7 Effect of Gegen Qinliantang and its different combinations on mRNA relative expression of Nrf2, NQO1 and HO-1 in colon tissue of UC rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Nrf2	NQO1	HO-1
DSS组		0.41±0.38	0.54±0.39	0.47±0.20
SASP组	0.35	2.34±1.56 ⁴⁾	2.79±0.92 ⁴⁾	4.13±1.72 ⁴⁾
GQ组	17.00	3.48±1.30 ⁴⁾	2.10±1.16 ⁴⁾	3.24±0.90 ⁴⁾
WGC组	17.00	2.30±1.27 ⁴⁾	1.63±0.69 ³⁾	2.09±1.80
WG组	17.00	1.64±0.99 ⁶⁾	1.14±0.63	1.10±0.98 ⁵⁾
GG组	17.00	2.19±1.31 ⁴⁾	1.35±0.87	1.96±1.19
QL组	17.00	0.38±0.33 ⁶⁾	1.08±0.53	1.85±1.65

注:设CON组各指标相对mRNA表达量为1

WG组和QL组的Nrf2差异无统计学意义,其余各给药组明显升高Nrf2蛋白表达($P<0.05, P<0.01$),SASP组和GQ组的NQO1蛋白表达均明显升高($P<0.05, P<0.01$),其余各组NQO1蛋白表达差异均无统计学意义,GQ组的HO-1蛋白表达显著升高($P<0.01$),其余各组HO-1蛋白表达差异均无统计学意义;与GQ组比较,WG组、GG组、QL组的Nrf2蛋白表达,WG组、QL组的NQO1蛋白表达,WG组、GG组、QL组的HO-1蛋白表达差异有统计学意义,GQ组的Nrf2、NQO1、HO-1蛋白表达升高较明显($P<0.05, P<0.01$)。见图4和表8。

4 讨论

UC的发病与多种因素相关,经常性的不规律作息和饮食导致胃肠道运化功能紊乱,肠组织结构和一些黏膜细胞会产生一些病理变化。这些会导致一些超氧自由基和亲电体大量增加,抗氧化应激作用相关的酶和细胞因子会迅速消耗,组织细胞中氧化还原系统平衡被破坏,结肠黏膜组织被破坏。自由基氧化应激^[27-29]有关的Nrf2信号通路是目

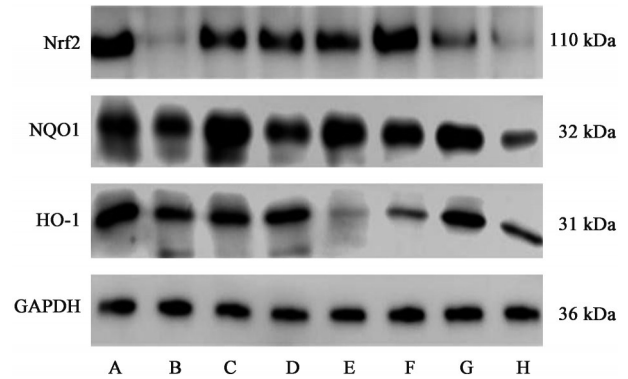


图4 各组大鼠结肠组织中Nrf2、NQO1、HO-1的蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of Nrf2, NQO1 and HO-1 in colonic tissues in each groups

前研究体内抗氧化应激的主要通路。Nrf2信号通路是一种综合的氧化还原敏感信号系统和关键调节因子,存在于全身各机体器官和组织细胞,承担着机体中很多种Ⅱ相相关的解毒酶的主要转录因子。实验研究证实,促进Nrf2的核转移可上调NQO1和HO-1的蛋白表达^[27]。NQO1和HO-1^[28]是体内重要的Ⅱ相解毒酶和抗氧化剂,在体内发挥着重要的抗氧化作用。NQO1同时也是辅酶Q(泛醌)和维生素E的还原酶,可通过维持辅酶Q和维生素E的还原状态来发挥抗氧化应激作用;HO-1是血红素生成胆绿素、一氧化碳和铁离子的限速酶。当组织细胞受到氧化应激损伤时,Nrf2会上调并激活下游相关的抗氧化酶,增强细胞对氧化应激,对机体组织产生保护作用,维持体内氧化还原稳态。因此,研究葛根芩连汤对DSS组诱导的UC大鼠模型中Nrf2信号通路的影响具有重要意义。本研究发现葛根芩连汤具有较好的体外抗氧化活性;可明显恢复UC大鼠体质量、结肠长度和形态结构;并且能够上调Nrf2、NQO1和HO-1 mRNA和蛋白的表达,对UC中氧化应激损伤产生一定的治疗作用。

表8 葛根芩连汤及其配伍对UC大鼠结肠组织中Nrf2、NQO1、HO-1蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 8 Effect of Gegen Qinliantang and its different combinations on Nrf2, NQO1 and HO-1 in colonic tissues ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Nrf2/GAPDH	NQO1/GAPDH	HO-1/GAPDH
CON组		1.00±0.21	0.94±0.42	1.16±0.31
DSS组		0.39±0.08 ²⁾	0.51±0.28	0.80±0.38
SASP组	0.35	0.83±0.17 ⁴⁾	1.14±0.27 ⁴⁾	1.35±0.51
GQ组	17.00	1.08±0.31 ⁴⁾	0.98±0.41 ³⁾	1.73±0.37 ⁴⁾
WGC组	17.00	0.86±0.26 ⁴⁾	0.85±0.24	1.25±0.19
WG组	17.00	0.68±0.22 ⁵⁾	0.38±0.23 ⁶⁾	0.94±0.43 ⁶⁾
GG组	17.00	0.72±0.10 ^{3,5)}	0.58±0.14	1.11±0.32 ⁵⁾
QL组	17.00	0.27±0.13 ⁶⁾	0.24±0.21 ⁶⁾	0.46±0.52 ⁶⁾

SOD、CAT和GSH^[11,27-29]是Nrf2通路的下游酶。这些酶将氧自由基转化为过氧化氢,并迅速分解为水,有效防止组织细胞被过氧化物破坏。SOD可以清除机体内产生的超氧化阴离子,CAT是机体抗氧化系统中酶系统的重要组成部分,可与SOD协同清除自由基,GSH是机体内广泛存在的过氧化氢酶,可以保护细胞膜结构和功能免受过氧化氢的氧化损伤。SOD、CAT和GSH均具有抗氧化等重要作用,当其含量和活力降低时,会导致自由基堆积。MPO是中性粒细胞嗜天青颗粒产生的一种重要的过氧化物酶,其活性高低反映了中性粒细胞浸润程度^[29]。自由基损害细胞膜脂质双层中的不饱和脂肪酸会产生脂质过氧化物(LPO)^[28],MDA为ROS与细胞膜上不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的终产物,其含量可以间接反映脂质过氧化程度^[29]。通过对大鼠血清中MPO、LPO、MDA、T-SOD、CAT和GSH进行检测发现,与模型组比较,葛根芩连汤可显著降低MPO、LPO和MDA水平和增大T-SOD、CAT和GSH水平。

本研究同时发现黄芩黄连组的体外抗氧化活性弱于其他用药组;无葛根组和黄芩黄连组对于UC大鼠体质量和结肠形态结构的恢复、降低溃疡性结肠炎大鼠血浆内过氧化物、增加抗氧化酶活性以及对Nrf2信号通路的调节作用均明显弱于全方组。君药葛根在方中通过抑制抗氧化应激治疗UC大鼠起主要作用,缺少君药葛根或缺少葛根甘草对其治疗作用有较大影响,从而说明葛根芩连汤全方配伍的重要性。黄芩黄连对溃疡性结肠炎大鼠病理损伤恢复作用较弱并且下调Nrf2 mRNA的表达,这可能与其苦寒药性对胃肠道的刺激有关^[30-32]。

综上所述,葛根芩连汤可通过上调Nrf2/NQO1信号通路对抗结肠组织中的氧化应激损伤来治疗溃疡性结肠炎。君药葛根在其治疗溃疡性结肠炎的作用中至关重要。本研究为溃疡性结肠炎的研究和指导合理用药配伍提供了一定的理论依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 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.
[2] 刘峰,刘林,王垂杰. 溃疡性结肠炎病因病机及治疗进展[J]. 山东中医药大学学报,2021,45(1):143-147.

[3] 龙喻,卢必超,吕文亮. 吕文亮治疗溃疡性结肠炎经验探析[J]. 湖北中医杂志,2020,42(9):22-24.
[4] 宋红新,马旭冉,王敦方,等. 基于网络药理学的黄芩汤治疗溃疡性结肠炎的潜在机制研究[J]. 药学报,2020,55(2):247-255.
[5] 吴娜,毛祥坤,万治平,等. 溃疡性结肠炎活动期关键基因与治疗中药的生信分析及系统评价[J]. 中国中药杂志,2020,45(11):2677-2686.
[6] 王敦方,王彦礼,王怡薇,等. 基于UHPLC-MS研究黄芩汤对溃疡性结肠炎大鼠血清代谢谱的影响[J]. 药学报,2017,52(8):1306-1312.
[7] 王敦方,王彦礼,王怡薇,等. 黄芩汤对溃疡性结肠炎大鼠TLR4/MyD88通路调控作用研究[J]. 药学报,2016,51(10):1558-1563.
[8] 吴娜,万治平,曾娟,等. 黄芩汤对溃疡性结肠炎小鼠氧化应激及铁死亡相关指标GSH-Px4, P53, SLC7A11的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(8):17-24.
[9] 熊艳玲,钟慧文,陈雅茜,等. 基于抗炎和氧化应激角度研究参苓白术颗粒对脾虚湿困溃疡性结肠炎大鼠的作用机制[J]. 中药新药与临床药理,2021,32(2):149-157.
[10] 全帅,吕开原,李新宇,等. 低聚葡萄糖原花青素对葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠溃疡性结肠炎的影响及作用机制[J]. 中草药,2020,51(1):149-156.
[11] WEERACHAYAPHORN J, MENNONE A, SOROKA C J, et al. Nuclear factor-E₂-related factor 2 is a major determinant of bile acid homeostasis in the liver and intestine[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012,302(9):G925-G936.
[12] KLAASSEN C D, REISMAN S A. Nrf2 the rescue: Effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2010, 244(1):57-65.
[13] 庄帅星. 黄芩汤调控Nrf2通路对溃疡性结肠炎的抗氧化应激作用机制研究[D]. 北京:中国中医科学院,2016.
[14] 马旭冉,王彦礼,邹迪新,等. 黄芩汤调控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):653-659.
[15] 方静,陈江,彭君伟,等. 基于Nrf2通路探讨薏苡附子败酱散治疗溃疡性结肠炎的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(13):85-92.
[16] GAO H, LI Y, SUN J, et al. *Saccharomyces boulardii* ameliorates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice by regulating NF- κ B and Nrf2 signaling pathways [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021:1622375.

- [17] CHEN Y, ZHANG P, CHEN W, et al. Ferroptosis mediated DSS-induced ulcerative colitis associated with Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. *Immunol Lett*, 2020, 225: 9-15.
- [18] ZHAO Y, LUAN H, GAO H, et al. Gegen Qinliantang maintains colonic mucosal homeostasis in acute/chronic ulcerative colitis via bidirectionally modulating dysregulated Notch signaling [J]. *Phytomedicine*, 2020, 68: 153182.
- [19] LI R, CHEN Y, SHI M, et al. Gegen Qinliantang alleviates experimental colitis via suppressing TLR4/NF- κ B signaling and enhancing antioxidant effect[J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(10): 1012-1020.
- [20] 陈阳. 基于肠道菌群的葛根芩连汤干预急性肠炎模型大鼠的作用机制研究[D]. 上海: 上海中医药大学, 2019.
- [21] 陈阳, 陆杰, 朱思敏, 等. 基于高通量测序技术研究葛根芩连汤及其配伍对急性肠炎大鼠肠道菌群多样性的影响[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(6): 1406-1417.
- [22] RAO F, YU-TING Z, YI-RAN G, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the phenolic extracts of *Sapium sebiferum* (L.) Roxb. leaves [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013, 147(2): 517-524.
- [23] LU Q, GU W, LUO C, et al. Phytochemical characterization and hepatoprotective effect of active fragment from *Adhatoda vasica* Nees. against tert-butyl hydroperoxide induced oxidative impairment via activating AMPK/p62/Nrf2 pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 266: 113454.
- [24] 林川, 杨小彤, 叶晓川. 青钱柳叶蛋白含量测定及其降血糖和抗氧化作用研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(12): 1485-1489.
- [25] 马旭冉, 王彦礼, 邹迪新, 等. 3首止泻名方治疗溃疡性结肠炎大鼠的相关机制对比分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(20): 1-8.
- [26] 苗金雪, 马旭冉, 冯雪, 等. 黄芩汤对UC模型大鼠PINK1/Parkin通路的作用研究[J]. *中医学报*, 2021, 49(4): 8-13.
- [27] HU T, WEI G, XI M, et al. Synergistic cardioprotective effects of Danshensu and hydroxysafflor yellow A against myocardial ischemia-reperfusion injury are mediated through the Akt/Nrf2/HO-1 pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(1): 83-94.
- [28] LI J, ICHIKAWA T, JANICKI J S, et al. Targeting the Nrf2 pathway against cardiovascular disease [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2009, 13(7): 785-794.
- [29] HE M, PAN H, CHANG R C, et al. Activation of the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway contributes to the protective effects of *Lycium barbarum* polysaccharides in the rodent retina after ischemia-reperfusion-induced damage[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e84800.
- [30] 李雪亮, 陈兰英, 官紫祎, 等. 降香新黄酮 latifolin 对大鼠急性心肌缺血影响及介导 Nrf2 信号通路机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(20): 3974-3982.
- [31] 柴冲冲. 基于颜色-滋味-成分-代谢的黄芩酒炙前后药性变化的科学内涵研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.
- [32] 杨伟鹏, 王怡薇, 王彦礼, 等. 吴茱萸汁炮制对黄连抗炎药效和苦寒药性的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2013, 20(8): 42-44, 47.

[责任编辑 周冰冰]