

# 葛根芩连汤调控MMP-9/p38 MARK途径修复溃疡性结肠炎小鼠肠黏膜上皮屏障功能

李亚兰<sup>1</sup>, 刘佳静<sup>1</sup>, 马沛广<sup>1</sup>, 董瑞娟<sup>1</sup>, 葛东宇<sup>1</sup>, 刘红双<sup>1</sup>, 彭桂英<sup>1\*</sup>, 李军祥<sup>2\*</sup>

(1. 北京中医药大学 生命科学学院, 北京 100029;

2. 北京中医药大学 东方医院, 北京 100078)

**[摘要]** 目的:探讨葛根芩连汤对溃疡性结肠炎(UC)小鼠肠黏膜上皮屏障功能的保护作用,并通过基质金属蛋白酶-9(MMP-9)/p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)信号通路探究其治疗UC的作用机制。方法:48只雌性C57BL/6小鼠随机分为正常组、模型组、柳氮磺吡啶组(0.3 g·kg<sup>-1</sup>)及葛根芩连汤高、中、低剂量组(2.84, 1.42, 0.71 g·kg<sup>-1</sup>)。采用3%葡聚糖硫酸钠(DSS)溶液构建UC小鼠模型,葛根芩连汤和柳氮磺吡啶于造模后第8天灌胃给药,连续7 d,正常组给予等量生理盐水处理。末次给药后取结肠组织,苏木素-伊红(HE)染色观察结肠组织病理变化,免疫组化(IHC)观察结肠组织紧密连接(TJ)蛋白,如闭合蛋白(Occludin),闭锁连接蛋白-1(ZO-1)的表达,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测结肠组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ),MMP-9 mRNA表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测结肠组织中磷酸化(p)-p38 MAPK, p38 MAPK和MMP-9蛋白的表达。结果:与正常组比较,模型组小鼠体质量显著下降( $P<0.01$ ),疾病活动指数(DAI)评分显著升高( $P<0.01$ ),结肠黏膜上皮破损并可见黏膜和黏膜下层炎细胞浸润明显,Occludin,ZO-1蛋白表达显著降低( $P<0.01$ ),TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ ,MMP-9 mRNA相对表达量显著升高( $P<0.01$ ),p-p38 MAPK和MMP-9蛋白表达显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,柳氮磺吡啶组、葛根芩连汤各剂量组小鼠体质量和DAI评分均有明显改善( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),结肠组织损坏明显改善,Occludin,ZO-1蛋白明显增多( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ ,MMP-9 mRNA相对表达量显著下降( $P<0.01$ ),p-p38 MAPK和MMP-9蛋白表达显著下降( $P<0.01$ ),其中葛根芩连汤各组中以中剂量组的变化最为明显。结论:葛根芩连汤能够通过抑制MMP-9和炎性细胞因子TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ 的表达,阻断p38 MAPK信号通路的激活,增加TJ蛋白的表达,从而修复肠道黏膜屏障功能。

**[关键词]** 葛根芩连汤; 溃疡性结肠炎; 闭合蛋白; 闭锁连接蛋白-1; 基质金属蛋白酶-9; p38丝裂原活化蛋白激酶

**[中图分类号]** R2-0;R289;R318.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)04-0008-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20210436

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20201229.1120.001.html>

**[网络出版日期]** 2020-12-29 16:05

## Gegen Qinliantang Regulates MMP-9/p38 MARK Pathway to Repair Intestinal Mucosal Barrier Function in Mice with Ulcerative Colitis

LI Ya-lan<sup>1</sup>, LIU Jia-jing<sup>1</sup>, MA Pei-guang<sup>1</sup>, DONG Rui-juan<sup>1</sup>, GE Dong-yu<sup>1</sup>, LIU Hong-shuang<sup>1</sup>,

PENG Gui-ying<sup>1\*</sup>, LI Jun-xiang<sup>2\*</sup>

(1. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the protective effect of Gegen Qinliantang on the intestinal mucosal epithelial barrier function of ulcerative colitis (UC) mice, and to explore its mechanism of action in the

**[收稿日期]** 20201120(016)

**[基金项目]** “十三五”国家重点研发计划项目(2018YFC1705405);北京中医药大学基本科研业务费项目(2019-JYB-TD014)

**[第一作者]** 李亚兰,在读硕士,从事中医药免疫调节作用研究,Tel:010-53912169,E-mail:liyalan@bucm.edu.cn

**[通信作者]** \* 彭桂英,博士,副教授,从事中医药免疫调节作用研究,Tel:010-53912169,E-mail:penggy@bucm.edu.cn;

\* 李军祥,博士,教授,从事中医临床消化疾病研究,Tel:010-676189751,E-mail:lijunxiang1226@163.com

treatment of ulcerative colitis via matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)/p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) signaling pathway. **Method:** The 48 female C57BL/6 mice were randomly divided into normal group, model group, sulfasalazine group ( $0.3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and Gegen Qinliantang high, medium and low dose groups ( $2.84, 1.42, 0.71 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). The UC murine model was established by 3% dextran sulfate sodium (DSS). Gegen Qinliantang and sulfasalazine were intragastrically administered on the 8<sup>th</sup> day after the model was established for 7 days, and the normal group was treated with the same amount of normal saline. Colon tissues were collected after the last administration, and the pathological changes of colon tissues were detected by hematoxylin-eosin (HE) staining. The expression of tight junction (TJ) proteins such as Occludin and zonula occludens-1 (ZO-1) in colon tissues was detected by immunohistochemistry (IHC), and the expression levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), and MMP-9 mRNA in colon tissues were detected by Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). The expression of phosphorylated p38 MAPK (p-p38 MAPK), p38 MAPK and MMP-9 protein in colon tissues was detected by Western blot. **Result:** Compared with normal group, the body weight of mice decreased ( $P<0.01$ ) and disease activity index (DAI) score increased significantly ( $P<0.01$ ) in model group, the colon tissues of the model group were damaged more obviously, the expression of occludin and ZO-1 proteins in model group was significantly reduced ( $P<0.01$ ), and the relative expression levels of TNF- $\alpha$ , IL- $1\beta$ , and MMP-9 mRNA in model group were significantly increased ( $P<0.01$ ), the expression of p-p38 MAPK and MMP-9 in model group was significantly increased ( $P<0.01$ ). Compared with model group, the body mass and DAI score of the sulfasalazine group and Gegen Qinliantang group were significantly improved ( $P<0.05, P<0.01$ ), the colonic tissues damage were significantly improved, and the expression of Occludin and ZO-1 protein was significantly increased ( $P<0.05, P<0.01$ ), the relative expression levels of TNF- $\alpha$ , IL- $1\beta$ , and MMP-9 mRNA were significantly decreased ( $P<0.01$ ), and the expression of p-p38 MAPK and MMP-9 was significantly decreased ( $P<0.01$ ). The changes in the middle dose group were the most obvious among the various dose groups of Gegen Qinliantang. **Conclusion:** Gegen Qinliantang repairs the intestinal mucosal barrier function by inhibiting the expressions of MMP-9 and inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL- $1\beta$ , blocking the activation of the p38 MAPK signaling pathway, and increasing the expressions of tight junction protein.

**[Key words]** Gegen Qinliantang; ulcerative colitis; Occludin; zonula occludens-1; matrix metalloproteinase-9; p38 mitogen-activated protein kinase

溃疡性结肠炎(UC)是炎症性肠病中最为常见、发生在结、直肠的慢性非特异性炎症,是消化内科的难治病,易复发,且癌变风险大<sup>[1]</sup>。研究显示,葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的UC小鼠闭合蛋白(Occludin),闭锁连接蛋白(ZO-1)的mRNA和蛋白的相对表达量均下降<sup>[2]</sup>,而基质金属酶蛋白-9(MMP-9)对于调节紧密连接(TJ)蛋白起重要作用,抑制MMP-9的表达能够降低肠道通透性<sup>[3]</sup>。亦有研究显示<sup>[4]</sup>,丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路参与UC发病的全过程,抑制MAPK途径可以明显减轻UC造成的炎症反应和细胞凋亡。UC临床主要表现为腹痛、腹泻、黏液脓血便、里急后重等,根据其临床特点,隶属于中医“泄泻”“痢疾”“肠澼”等范畴,其病在三阳,病位主在大肠<sup>[5]</sup>。《伤寒论·太阳病脉证并治》曰:“太阳病,桂枝证,医反下之,利

遂不止。脉促者,表未解也;喘而汗出者,葛根黄芩黄连汤主之。”指出葛根芩连汤主治太阳表邪内陷所致的热下利证。该方由葛根、黄连、炙甘草、黄芩4味药组成,被现代医家认为是治疗UC的经典良方<sup>[6-7]</sup>。临床上已证实此方可有效治疗炎症性肠病、细菌性痢疾等肠道疾病,同时动物实验也表明葛根芩连汤能通过调节肠道菌群以及代谢途径来发挥肠道保护作用<sup>[8-10]</sup>。最新的网络药理学分析发现,白细胞介素- $1\beta$ (IL- $1\beta$ ), MMP-9, 肿瘤坏死因子(TNF)等是葛根芩连汤治疗UC的关键靶点,并且通路富集分析显示,关键靶点主要集中在MAPK信号通路, TNF信号通路等途径<sup>[11-12]</sup>,但是其修复肠黏膜上皮屏障的作用机制仍不明确。因此,本研究旨在从保护肠黏膜上皮屏障的免疫学机制角度出发探究葛根芩连汤治疗UC小鼠的作用机制,为其临

床用药提供科学的参考价值。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级雌性C57BL/6小鼠48只,6~8周龄,体质量20~22 g,购自北京斯贝福生物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2011-0004,本研究经北京中医药大学实验动物伦理委员会批准,实验过程符合动物伦理相关指导原则。

**1.2 药物与试剂** 葛根芩连汤由葛根15 g,黄连9 g,炙甘草6 g,黄芩9 g组成,均为中药配方颗粒,购自华润三九医药股份有限公司,批号分别为2008004S,2004004S,2005020C,2008001C,将所有配方颗粒混匀后加入蒸馏水分别配置成0.07,0.14,0.28 g·mL<sup>-1</sup>的混悬液;DSS(美国MP Biomedicals公司,批号S0433);柳氮磺吡啶肠溶片(上海信宜天平药业有限公司,批号H31020557);便隐血试剂(珠海贝索生物技术有限公司,批号BA-2020B);BCA蛋白测定试剂盒(美国Thermo公司,批号A53225);磷酸化p38 MAPK(p-p38 MAPK),p38 MAPK,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GADPH)单克隆抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(美国CST公司,批号分别为4511T,8690P,5174T,7074S);MMP-9单克隆抗体(美国Biologend公司,批号819701);Occludin,ZO-1单克隆抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab216327,ab216880);总RNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司,批号DP419);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)反转录试剂盒,SYBR-Green试剂盒(美国Qiagen公司,批号分别为205411,208054);免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号SP-9001);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(碧云天生物技术研究,批号C0105)。

**1.3 仪器** Aperio VERSA型超分辨显微组织成像系统,HistoCore PEARL型自动组织脱水机,Leica RM2255型全自动轮转式切片机(德国Leica公司);QuantStudio6 Flex型Real-time PCR仪(美国Life Technologies公司);SpectraMax QuickDrop型超微量分光光度计(上海美谷分子仪器有限公司);PowerPac型电泳仪及电转仪,GelDoc Go凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

## 2 方法

**2.1 分组与给药** 按随机数字表法将48小鼠分为6组,每组8只,分别为正常组,模型组,葛根芩连汤高、中、低剂量组,柳氮磺吡啶组。动物适应性饲养1周后,模型组小鼠予以3%DSS溶液代替饮用水连

续自由饮水7 d,隔天更换1次。给药组于造模第8天灌胃给药,按照人与小鼠体表面积等效换算,得出葛根芩连汤高、中、低剂量组按照2.84,1.42,0.71 g·kg<sup>-1</sup>的剂量灌胃葛根芩连汤配方颗粒<sup>[13]</sup>,相当于临床人用量的28,14,7倍;柳氮磺吡啶组给药量为0.3 g·kg<sup>-1</sup>,小鼠灌胃体积均为10 mL·kg<sup>-1</sup>,连续给药7 d。

**2.2 小鼠疾病活动指数(DAI)评分标准** 每天记录小鼠体质量变化,观察并记录小鼠粪便性状改变,按照试剂盒说明检测便隐血情况,参考文献[14]进行DAI评分。评分标准如下,体质量下降率评分:体质量无减轻,0分;下降1%~5%,1分;下降5%~10%,2分;下降10%~15%,3分;下降>15%,4分。大便性状评分:正常,0分;松散,2分;稀便,4分。大便隐血评分:正常,0分;隐血阳性,2分,肉眼可见血便,4分。根据公式“DAI评分=(体质量评分+粪便性状评分+隐血评分)/3”计算各组小鼠的DAI评分。

**2.3 HE染色观察小鼠结肠组织病理形态学变化** 取小鼠结肠组织用10%甲醛固定24 h,梯度乙醇脱水,石蜡包埋切片(厚约4 μm),HE染色,中性树胶封片,光学显微镜下观察结肠组织形态学变化。

**2.4 免疫组化检测结肠组织中Occludin,ZO-1的表达** 将结肠组织石蜡块行4 μm连续切片,置于60℃烤箱中1 h,实验步骤按照试剂盒说明书操作,脱蜡、脱水、灭活、抗原修复、封闭、滴加一抗(Occludin 1:200,ZO-1 1:1 000),孵育二抗,DAB显色,复染,脱水,透明,封片。200倍光镜下随机选取5个不重叠的视野,利用ImagePro Plus软件测定目的蛋白的平均积分吸光度AA。

**2.5 Real-time PCR检测TNF-α,IL-1β,MMP-9 mRNA表达** 取冻存结肠组织50~100 mg,加入组织裂解液1 mL制成组织匀浆,按照试剂盒说明书提取总RNA,用超微量分光光度计测定RNA的纯度和浓度,按照试剂盒说明书将其逆转录为cDNA。PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司提供。TNF-α上游引物5'-CTGCAAAGGGAGAGTGGTCA-3',下游引物5'-TTGCACCTCAGGGAAGAATCTG-3',片段长度105 bp;IL-1β上游引物5'-AATGCCACCTTTTGACAGTGATG-3',下游引物5'-CCTGCCTGAAGCTCTTGTG-3',片段长度158 bp;MMP-9上游引物5'-TGTGCGACCACATCGAAC TT-3',下游引物5'-ATACAGCGGGTACATGAGCG-3',片段长度153 bp;GADPH上游引物5'-GCAC

CACCAACTGCTTAG-3', 下游引物 5'-GGATGCAG GGATGATGTTTC-3', 片段长度 176 bp。循环程序设定为 95 °C 3 min, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 重复 40 个循环。采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法计算各组 mRNA 相对表达量。

### 2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测结肠组织中 p-p38 MAPK, p38 MAPK 和 MMP-9 蛋白表达

提取结肠组织中总蛋白, 利用 BCA 法进行蛋白定量测定浓度, 经 SDS-PAGE 电泳, 电转, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后, 分别加入适量稀释后一抗 p-p38 MAPK (1:1 000), p38 MAPK (1:1 000) 和 MMP-9 (1:1 000), 4 °C 孵育过夜, 加入相应二抗 (1:5 000), 室温孵育 2 h, 使用 GelDoc Go 凝胶成像系统曝光显影, Image J 图像分析系统进行目的条带的灰度值分析。

2.7 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 检测数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

3.1 对小鼠体质量变化及 DAI 评分的影响 与正常组比较, 模型组小鼠体质量显著下降 ( $P < 0.01$ ), DAI 评分显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 葛根芩连汤高、中、低剂量和柳氮磺吡啶组小鼠体质量下降率显著降低 ( $P < 0.01$ ), DAI 评分均明显下降 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 其中葛根芩连汤各组中以中剂量组药效最佳。见表 1。

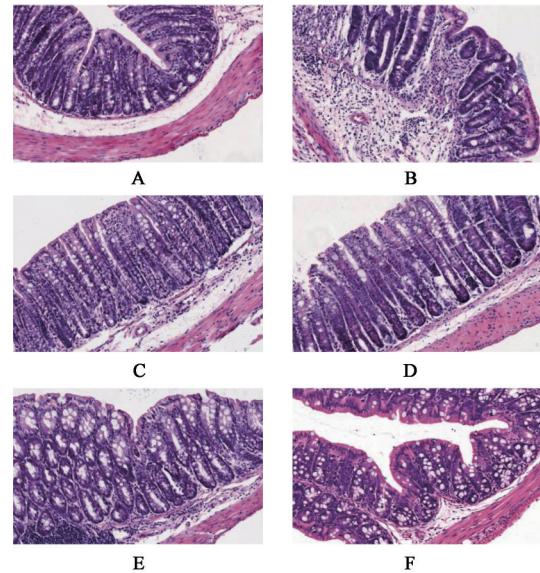
表 1 葛根芩连汤对 UC 小鼠体质量和 DAI 指数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )  
Table 1 Effect of Gegen Qinliantang on weight and DAI score in UC mice ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	体质量下降率/%	DAI 评分/分
正常		0	0
模型		16.45±2.77 <sup>1)</sup>	3.75±0.35 <sup>1)</sup>
葛根芩连汤	2.84	9.66±2.92 <sup>3)</sup>	2.96±0.58 <sup>2)</sup>
	1.42	7.96±3.55 <sup>3)</sup>	2.00±0.56 <sup>3)</sup>
	0.71	10.05±3.84 <sup>3)</sup>	2.88±0.47 <sup>3)</sup>
柳氮磺吡啶	0.3	4.75±2.63 <sup>3)</sup>	1.46±0.50 <sup>3)</sup>

注: 与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$  (表 2 同)。

3.2 对小鼠结肠组织形态学的影响 正常组小鼠结肠黏膜上皮完整, 黏膜下血管清晰, 无充血和水肿, 腺体和杯状细胞排列整齐, 无溃疡形成, 未见炎性细胞浸润; 模型组小鼠肠黏膜上皮破损, 腺体排列紊乱, 部分坏死或消失, 隐窝和杯状细胞明显减少, 黏膜及黏膜下层大量炎性细胞浸润, 溃疡形成; 葛根芩连汤及柳氮磺吡啶组小鼠结肠黏膜上皮大

部分增生修复, 腺体、杯状细胞增多, 排列较为整齐, 炎细胞明显减少。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 葛根芩连汤高剂量组; D. 葛根芩连汤中剂量组; E. 葛根芩连汤低剂量组; F. 柳氮磺吡啶组 (图 2, 3 同)

图 1 葛根芩连汤对 UC 小鼠结肠组织形态学的影响 (HE, ×100)

Fig. 1 Effect of Gegen Qinliantang on colonic tissue in morphology of syndrome UC mice (HE, ×100)

3.3 对小鼠结肠黏膜屏障相关分子 Occludin, ZO-1 表达的影响 与正常组比较, 模型组小鼠结肠组织 Occludin, ZO-1 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 葛根芩连汤各剂量组小鼠结肠组织 Occludin 蛋白表达明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 高、中剂量组的 ZO-1 蛋白表达明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 而低剂量变化不明显, 葛根芩连汤各组中以中剂量组药效最佳。柳氮磺吡啶组中 Occludin, ZO-1 蛋白表达均显著增多 ( $P < 0.01$ )。见图 2, 3, 表 2。

3.4 对小鼠结肠组织 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MMP-9 mRNA 表达的影响 与正常组比较, 模型组小鼠结肠组织 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MMP-9 mRNA 表达均显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 葛根芩连汤各剂量组与柳氮磺吡啶组小鼠结肠组织 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  和 MMP-9 mRNA 的相对表达量均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 其中葛根芩连汤各组中以中剂量组药效最佳。见表 3。

3.5 对小鼠结肠组织 p-p38 MAPK, p38 MAPK, MMP-9 蛋白表达的影响 前述研究结果显示, 葛根芩连汤 1.42 g·kg<sup>-1</sup> 中剂量组药效最佳, 故此部分选择葛根芩连汤中剂量组, 进一步研究其对 MMP-9/p38 MAPK 信号通路的影响。与正常组比较, 模型组大鼠结肠组织 p-p38 MAPK 和 MMP-9 的蛋白表

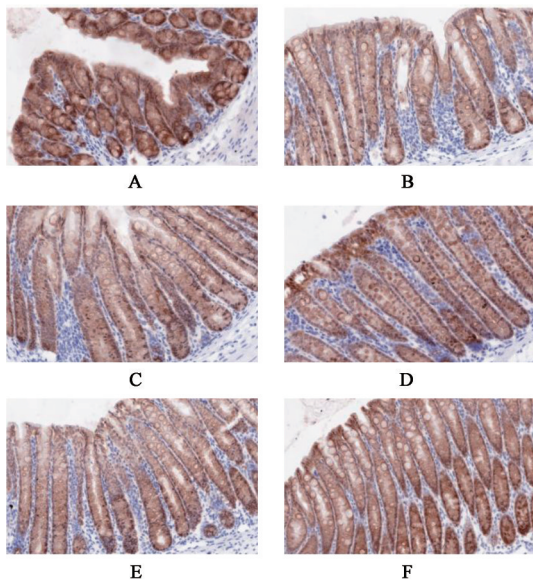


图2 葛根芩连汤对UC小鼠结肠组织Occludin表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 2 Effect of Gegen Qinliantang on expression of Occludin in colon of UC mice (IHC, ×200)

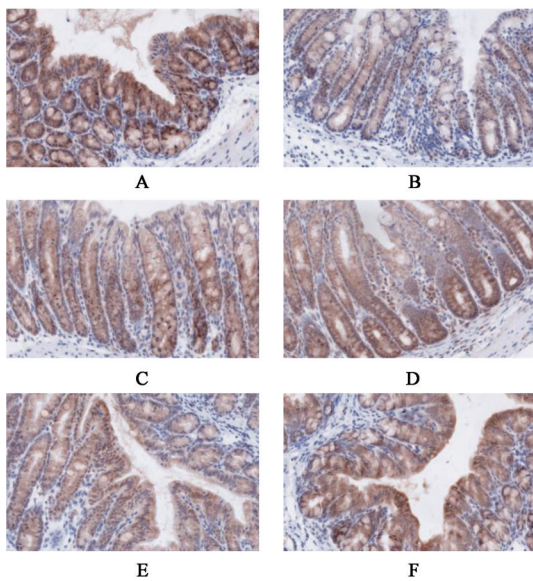


图3 葛根芩连汤对UC小鼠结肠组织ZO-1表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 3 Effect of Gegen Qinliantang on expression of ZO-1 in colon of UC mice (IHC, ×200)

达显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,经葛根芩连汤治疗后,小鼠结肠组织p-p38 MAPK和MMP-9的蛋白表达显著受到抑制( $P < 0.01$ ),与柳氮磺吡啶的结果类似( $P < 0.01$ )。见图4,表4。

#### 4 讨论

UC是炎症性肠病(IBD)的一种类型,目前现代医学认为与免疫功能紊乱、凝血功能异常、脂质过氧化反应等因素有关,在治疗上主要使用氨基水杨

表2 葛根芩连汤对UC小鼠结肠组织Occludin, ZO-1蛋白表达平均光密度的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 2 Effect of Gegen Qinliantang on average optical density of Occludin and ZO-1 protein expression in colon of UC mice ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Occludin/(×10 <sup>-3</sup> )	ZO-1/(×10 <sup>-3</sup> )
正常		198.90±18.47	88.12±14.10
模型		67.11±11.23 <sup>1)</sup>	26.96±5.44 <sup>1)</sup>
葛根芩连汤	2.84	92.37±7.66 <sup>3)</sup>	43.42±6.17 <sup>2)</sup>
	1.42	145.50±13.07 <sup>3)</sup>	54.65±9.45 <sup>3)</sup>
	0.71	88.26±14.60 <sup>2)</sup>	41.26±9.05
柳氮磺吡啶	0.3	164.50±20.20 <sup>3)</sup>	72.30±10.02 <sup>3)</sup>

酸类、激素、免疫抑制剂等药物,但其存在疗效不稳定、个体差异大、不同程度的毒副作用、价格昂贵等问题<sup>[1]</sup>。中医认为,UC多证属六经之三阳证,三阳热利证重心在阳明,太阳、少阳之邪气可内犯阳明致泄利,其病位主在大肠,大肠为阳明之腑,易感湿邪而化热<sup>[5]</sup>,这与葛根芩连汤以清热化湿止利之法治疗UC的功效相符<sup>[6]</sup>。葛根芩连汤为太阳阳明两解之方,方中以葛根为君药,葛根性甘凉轻散,既可生津止利、升清降浊,又可透邪解表;黄芩、黄连性苦寒,入阳明大肠经,泻热祛浊,善清大肠之火,泻下焦湿热,为臣药;炙甘草缓急和中,调和诸药为使药。诸药和合以达清热解表止利之效,因此,现代不少医家认为无论有无表证皆可使用此方治疗以阳明热利为主的下利证<sup>[7]</sup>。与临床报道一致,本动物实验结果表明,葛根芩连汤各剂量组能够明显改善小鼠的体质量和疾病活动指数,减轻肠道病理损伤,对UC小鼠起到显著的保护和治疗作用。

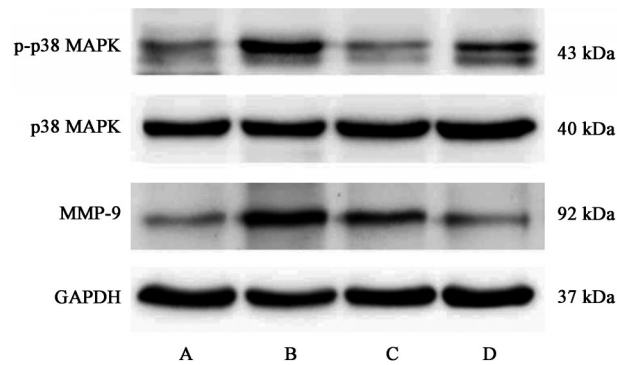
TJ蛋白是肠黏膜上皮细胞屏障的重要组成部分,包括跨膜蛋白(Occludin, Claudins),连接黏附分子(JAM),外周膜蛋白(ZO-1, ZO-2, ZO-3)等,对于调节细胞之间的物质交换,阻止有害物质渗入黏膜下层有重要意义<sup>[15]</sup>。临床上,UC患者的Occludin基因mRNA水平和蛋白表达均显著下调<sup>[16]</sup>,这与本动物实验结果一致,说明Occludin在促进屏障功能方面起着关键作用。ZO-1含有PDZ结构域,有助于将TJ蛋白(如Occludin)锚定于细胞质,为跨膜蛋白和细胞质TJ蛋白搭建了具有连接作用的脚手架样平台,这对于协调细胞屏障功能和平衡肠上皮细胞通透性有着重要的作用<sup>[15]</sup>。本研究显示,葛根芩连汤能够有效恢复Occludin, ZO-1蛋白的表达,这不仅有助于修复肠黏膜上皮屏障,阻止病原微生物的入侵,而且有利于增强细胞内外的物质交换,使肠

表 3 葛根芩连汤对 UC 小鼠结肠组织 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MMP-9 mRNA 相对表达量的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 3 Effect of Gegen Qinliantang on relative expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MMP-9 mRNA in colon of UC mice ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	MMP-9
模型		13.20±0.93 <sup>1)</sup>	49.16±5.40 <sup>1)</sup>	13.81±0.45 <sup>1)</sup>
葛根芩连汤	2.84	6.00±0.58 <sup>2)</sup>	15.07±0.63 <sup>2)</sup>	5.54±0.47 <sup>2)</sup>
	1.42	3.59±0.67 <sup>2)</sup>	13.07±0.69 <sup>2)</sup>	3.19±0.85 <sup>2)</sup>
	0.71	8.80±0.31 <sup>2)</sup>	36.03±0.57 <sup>2)</sup>	8.71±0.84 <sup>2)</sup>
柳氮磺吡啶	0.3	3.02±0.15 <sup>2)</sup>	2.50±0.39 <sup>2)</sup>	2.36±0.40 <sup>2)</sup>

注: 设正常组各 mRNA 表达量均为 1; 与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.01; 与模型组比较<sup>2)</sup>P<0.01(表 4 同)。



A. 正常组; B. 模型组; C. 葛根芩连汤组; D. 柳氮磺吡啶组

图 4 各组小鼠结肠组织 p-p38 MAPK, p38 MAPK, MMP-9 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of p-p38 MAPK, p38 MAPK, MMP-9 protein expression of mice colon tissues in each group

上皮细胞的功能得到恢复。TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  是由多种免疫细胞释放的促炎性细胞因子, 已被证实参与 UC 的整个发病过程。研究表明, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  等炎症细胞因子可引起 Occludin 蛋白分布异常, 引起 TJ 的断裂, 同时能够下调 ZO-1, 增加上皮通透性<sup>[17]</sup>。而本结果显示, 给予葛根芩连汤治疗后, 能够逆转小鼠结肠组织 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  mRNA 的表达水平, 这对于减轻肠道炎症反应, 减少 TJ 蛋白的破坏起着重要的作用。

p38 MAPK 是 MAPK 家族的重要成员之一, 是细胞内信号传导的重要分子, 主要参与机体细胞的生长、繁殖分化、凋亡及炎症等重要过程。当细胞暴露于 TNF, IL-1 或其他胞外刺激时, MAPK 激酶-3 通过磷酸化被激活, 活化的 MAPK 激酶-3/MAPK 激

酶-6 引发 p38 MAPK 中 Thr180 和 Tyr182 两个位点磷酸化, 后者通过激活下游转录因子促发炎症反应<sup>[18-19]</sup>。在 UC 的病理情况下, p-p38 MAPK 可促进淋巴细胞和嗜中性粒细胞的募集和激活、以及延迟其在 UC 中的凋亡, 且促使循环单核细胞迁移至炎症肠组织并转化为炎性巨噬细胞, 加重 UC 的发生。此外, 活化的 p38 MAPK 通路还可促进胞内 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  等细胞因子的分泌, 介导炎症的发生<sup>[19]</sup>。而 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  等炎症因子又通过旁分泌作用激活 p38 MAPK 信号通路, 在炎症反应的发展中形成恶性循环<sup>[20]</sup>。葛根芩连汤能够通过抑制 p38 MAPK 磷酸化阻断 p38 MAPK 信号通路的激活, 避免炎症因子风暴的发生。MAPK 信号通路的激活与 TJ 蛋白的表达密切相关。在铜绿假单胞菌刺激 Caco-2 细胞的体外实验研究中显示<sup>[21]</sup>, 抑制 p38 MAPK 磷酸化能够有效增加 Occludin, ZO-1 的表达, 明显改善由铜绿假单胞菌感染引发肠上皮屏障的破坏。本研究结果发现, 葛根芩连汤通过抑制 UC 小鼠肠黏膜组织 p38 MAPK 过度磷酸化, 增加肠黏膜上皮细胞 Occludin, ZO-1 的表达。笔者推测这可能与调节肠道微生态有关, 且葛根芩连汤的现代药理研究发现, 其药效组分对大肠杆菌、痢疾杆菌、乙型链球菌等多种菌敏感, 显示明显的抑菌效果<sup>[22-23]</sup>。所以葛根芩连汤可能通过调理肠道微生物群落抑制 p38 MAPK 信号通路的过度激活, 减少 TJ 蛋白的破坏。

MMP-9 被认为是在 IBD 发生发展中起重要作用

表 4 葛根芩连汤对 UC 小鼠结肠组织 p-p38 MAPK, p38 MAPK, MMP-9 蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 4 Effect of Gegen Qinliantang on relative expression of p-p38 MAPK, p38 MAPK, MMP-9 protein in colon of UC mice ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	p-p38 MAPK/GAPDH	p38 MAPK/GAPDH	MMP-9/GAPDH
正常		0.16±0.06	0.83±0.04	0.22±0.03
模型		0.76±0.05 <sup>1)</sup>	1.02±0.18	0.65±0.06 <sup>1)</sup>
葛根芩连汤	1.42	0.19±0.01 <sup>2)</sup>	0.84±0.07	0.37±0.04 <sup>2)</sup>
柳氮磺吡啶	0.3	0.44±0.10 <sup>2)</sup>	0.90±0.10	0.30±0.05 <sup>2)</sup>

用的金属蛋白酶。体内外实验表明,伴随MMP-9浓度增加,Caco-2细胞肠上皮模型TJ通透性和小鼠肠通透性均逐渐增加<sup>[24-25]</sup>。对Caco-2单层肠上皮细胞的研究结果显示,MMP-9诱导的Caco-2细胞TJ渗透性的增加主要影响上皮细胞基底膜<sup>[3]</sup>,而TJ蛋白主要分布于肠上皮细胞的顶部<sup>[26]</sup>。因此推测MMP-9主要通过胞内机制调控TJ蛋白的表达。研究表明,MMP-9能在30 min内快速激活胞内p38 MAPK,p38的激活先于MMP-9诱导的Caco-2细胞TJ通透性的增加<sup>[3]</sup>。这表明MMP-9能够通过诱导p-p38 MAPK来破坏TJ蛋白。与本实验结果一致,DSS诱导的UC小鼠MMP-9在mRNA和蛋白水平上均升高,而葛根芩连汤能够显著降低MMP-9的表达,主要通过影响p-p38 MAPK信号通路的激活来恢复Occludin,ZO-1的表达。

综上所述,葛根芩连汤能够通过抑制MMP-9和炎性细胞因子TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ 表达,阻止p38 MAPK信号通路磷酸化,增加TJ蛋白的表达,从而修复肠道黏膜屏障功能。同时,葛根芩连汤能够减少炎性细胞因子的释放,缓解肠道炎症反应。然而葛根芩连汤具体哪些成分能抑制这些炎性因子阻断p38 MAPK的磷酸化,这种作用是直接作用亦或通过肠道菌群的间接作用,均值得后续深入探究。

#### [参考文献]

[1] 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.

[2] 谭悦,郑长清. 整肠生对溃疡性结肠炎小鼠肠上皮屏障的保护作用[J]. 中国微生态学杂志,2018,30(8):875-881,888.

[3] AL-SADI R, YOUSSEF M, RAWAT M, et al. MMP-9 induced increase in intestinal epithelial tight permeability is mediated by p38 kinase signaling pathway activation of MLCK gene [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2019, 316(2):G278-G290.

[4] GAO W, WANG C, YU L, et al. Chlorogenic acid attenuates dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis in mice through MAPK/ERK/JNK pathway [J]. *Biomed Res Int*, 2019, doi: 10. 1155/2019/6769789.

[5] 张天涵,沈洪. 沈洪教授运用六经辨证治疗溃疡性结肠炎经验探析[J]. 天津中医药,2019,36(8):784-787.

[6] 黄鑫磊,贾雪雯,丁元庆. 葛根芩连汤临床应用进展[J]. 山东中医药大学学报,2020,44(2):215-220.

[7] 赵旭凡,田立新. 从“火郁发之”论《伤寒论》葛根芩连

汤方证本义[J]. 环球中医药,2020,13(1):122-124.

[8] WU Y, WANG D, YANG X, et al. Traditional Chinese medicine Gegen Qinlian decoction ameliorates irinotecan chemotherapy-induced gut toxicity in mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109:2252-2261.

[9] GUO Y, DING P H, LIU L J, et al. Gegen Qinlian decoction attenuates high-fat diet-induced steatohepatitis in rats via gut microbiota [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, doi: 10. 1155/2018/7370891.

[10] LIU C S, LIANG X, WEI X H, et al. Gegen Qinlian decoction treats diarrhea in piglets by modulating gut microbiota and short-chain fatty acids [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10:825.

[11] 宋妍,徐坠成,蔡梦玲,等. 基于网络药理学探讨葛根芩连汤治疗溃疡性结肠炎潜在作用机制[J]. 中医学报,2020,35(10):2221-2226.

[12] 张智,钟子劭,余卫峰,等. 基于网络药理学探讨葛根芩连汤治疗溃疡性结肠炎的作用机制[J]. 中国中西医结合消化杂志,2020,28(6):403-407.

[13] 章元沛. 药理学实验[M]. 2版. 人民卫生出版社,1996:238.

[14] SUN Z, LI J, DAI Y, et al. Indigo naturalis alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis in rats via altering gut microbiota [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11:731.

[15] BUCKLEY A, TURNER J R. Cell biology of tight junction barrier regulation and mucosal disease [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10(1):a029314.

[16] TAN Y, GUAN Y, SUN Y, et al. Correlation of intestinal mucosal healing and tight junction protein expression in ulcerative colitis patients [J]. *Am J Med Sci*, 2019, 357(3):195-204.

[17] AL-SADI R, BOIVIN M, MA T. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier [J]. *Front Biosci*, 2009, 14:2765-2778.

[18] ZHOU S, LI Y, LU J, et al. Nuclear factor-erythroid 2-related factor 3 (NRF3) is low expressed in colorectal cancer and its down-regulation promotes colorectal cancer malignance through activating EGFR and p38/MAPK [J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9(3):511-528.

[19] FENG Y J, LI Y Y. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. *J Dig Dis*, 2011, 12(5):327-332.

[20] 王象鹏,谢文鹏,毕亦飞,等. 基于p38 MAPK信号通路的槲皮素保护骨性关节炎关节软骨机制的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,doi: 10. 13422/j.

- cnki. syfjx. 20202084.
- [21] VIKSTROM E, TAFAZOLI F, MAGNUSSON K E. Pseudomonas aeruginosa quorum sensing molecule N-(3 oxododecanoyl)-L-homoserine lactone disrupts epithelial barrier integrity of Caco-2 cells [J]. FEBS Lett, 2006, 580(30):6921-6928.
- [22] 王新雨, 晋臻, 凌霄, 等. 葛根芩连汤中14种主要成分在大鼠体内的药动学特征研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(23):4724-4734.
- [23] 徐蓓蕾, 张贵君, 崔向微, 等. 葛根芩连汤药效组分抑菌生物效价测定[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(1):230-233.
- [24] NIGHOT P, AL-SADI R, RAWAT M, et al. Matrix metalloproteinase 9-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability contributes to the severity of experimental DSS colitis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2015, 309(12):G988-G997.
- [25] LU Y, AN J, LIU Y, et al. MMP9 is involved in HO-1-mediated upregulation of apical junctional complex in Caco-2 cells under oxygen-glucose deprivation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 498(1):125-131.
- [26] CHELAKKOT C, GHIM J, RYU S H. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications[J]. Exp Mol Med, 2018, 50(8):103.
- [责任编辑 孙丛丛]

· 书讯 ·

## 基础护理实验教学中的情景模拟教学对护生自主学习能力提升作用 ——评《临床实用护理技术操作规范》

在护理教育中,如何能在专业课程的教育中体现以学生为中心,培养学生的自主学习能力使学生学会学习,这是护理教育工作者一直关注的问题,情景模拟教学法是指通过运用多媒体、实物演示、角色扮演、实验操作等多种手段创设课堂教学情景,将认知与情感、形象思维与抽象思维、教与学巧妙地结合起来,充分发挥学生学习积极性、主动性和创造性,改变学生单纯接受知识被动局面的一种教学方法。《临床实用护理技术操作规范》作为一本护理学专著,以流程图的方式对临床护理人员所必须掌握的基础和专科护理操作规范进行了介绍。

《临床实用护理技术操作规范》的作者蒋红,顾妙娟,赵琦,于2019年1月由上海科学技术出版社出版。本书主要对临床护理人员必须具备的基本素质要求进行了系统化的阐述,同时对护士必须掌握的基础和专科护理规范进行介绍,包括内科护理、外科护理、危及重症护理,妇产科护理、儿科护理、中医科护理,每一部分从目的、注意事项、情景对话、操作流程、评分标准进行阐述,与临床实际情境相符合。本书实用性和可操作性较强,可以作为所有临床护理人员的参考用书。全书针对临床实用护理技术操作规范研究各种问题,详细分析,系统阐述,层层递进的论述方式也比较容易让人接受。

《临床实用护理技术操作规范》内容比较全面,操作均按照流程图的形式进行详细介绍。《临床实用护理技术操作规范》的编写是按照国家卫生健康委员会及JCI评审要求,紧跟医学技术的发展而进行,各项操作更加严谨化、科学化、标准化。该书内容比较全面,包括了基础及内科、外科、妇科和儿科、中医等学科常用的操作。全书共分为三篇,第一篇为护士基本素质,共分为三个章节;第二篇为基础护理部分,共分为十一个章节;第三篇为专科护理篇,共分为六章节。

《临床实用护理技术操作规范》一书采用情景模拟的教学模式结合第一篇中的第二章,第三章让护士熟练掌握护理的具体礼仪规范和护理工作的相关技巧。着重培训护士生的沟通技巧,让医患关系能够进行有效沟通,为后期临床治疗和护理打下良好的基础。第二篇能够应用情景模拟教学的内容较多,第四章的准备病床更换床单,第五章的各种卧位,移动以及跌到护理,第六章的测量体温,呼吸以及脉搏血压等,第七章的注射采血以及第八章的无菌消毒隔离等内容都可以进行情景模拟教学。第三篇的第十九章妇科护理,第二十章的儿科护理以及第二十一章的中医护理也可以采用情景模拟的方式进行教学。随着时代的发展、科技的进步,我国护理学发展的步伐也在不断加快,达到了前所未有的高度。《临床实用护理技术操作规范》在编写过程中,经过前期大量临床调研、征求意见并反复实践,结合医院自身的经验,参考了国内外临床护理技术规范,吸取先进的科研成果,采纳在护理临床实践中业已证明的先进、有效的新技术和新设备,最终定稿。编写本书的初衷是为了适应临床护理中患者突发病情不断增加的形势,提高临床护士快速反应、有效处置的能力。编写过程是按照国家卫生健康委员会及JCI评审要求,紧跟医学技术的发展而进行。本书可促使护理操作严谨化、科学化、规范化,帮助护士更精准地为患者提供护理治疗,更全面地满足患者生理及心理需求。《临床实用护理技术操作规范》还详细的阐述了:“护理人员作为医院体系的重要组成部分,担负着对患者实施护理的重要作用,关系着患者的疾病治疗和康复结果,因此护理人员必须要具备较强的专业素质和实践能力。”书中突出强调了护理人员在工作中要注意保护患者的隐私,充分尊重患者,针对不同类型的病患做出不同的护理干预和指导,护理人员要主动和患者进行沟通,了解患者的内心所想,从而促进护理工作的顺利展开。

《临床实用护理技术操作规范》内容全面,针对性与专业性较强,是一本医学工具书,承担本书编写的作者是多家三甲医院临床一线的护理实践者、管理者和教育者,他们认真总结近年来临床护理操作技术发展和应用实践经验,充分考虑我国临床护理实际现状和需求,吸收借鉴国外先进国家经验,确保本规范符合我国国情,具有技术先进性、可操作性和合理性。主要针对临床实用护理技术操作规范展开详细论述,内容层层递进。该书对广大护理工作及教学人员的护理实践及教学有一定的帮助。

(作者李琴,谈学灵,陈彬,成都大学基础医学院护理学院[筹],成都 610106)