

# 芍药苷对溃疡性结肠炎小鼠氧化应激的影响及机制<sup>△</sup>

代鑫<sup>1\*</sup>, 王莹<sup>1</sup>, 任鑫悦<sup>1</sup>, 范丁兴<sup>1</sup>, 李贤哲<sup>1</sup>, 冯嘉轩<sup>2</sup>, 娄石磊<sup>2</sup>, 阎慧<sup>2</sup>, 孙聪<sup>2#</sup> (1. 长春中医药大学药学院, 长春 130117; 2. 长春中医药大学临床医学院, 长春 130117)

中图分类号 R965; R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)04-0427-07  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.04.07



**摘要** 目的 基于腺苷一磷酸活化的蛋白激酶(AMPK)/核转录因子红系2相关因子2(Nrf2)通路,探讨芍药苷对小鼠溃疡性结肠炎(UC)氧化应激的影响及潜在机制。方法 将雄性BALB/c小鼠随机分为对照组,模型组,抑制剂组(AMPK抑制剂Compound C 20 mg/kg),芍药苷低、中、高剂量组(芍药苷12.5、25、50 mg/kg)、芍药苷高+抑制剂组(芍药苷50 mg/kg+Compound C 20 mg/kg),每组8只。除对照组外,其余各组小鼠均自由饮用4%葡聚糖硫酸钠溶液5 d以构建UC模型。随后,各药物组小鼠灌胃或腹腔注射相应药液,每天1次,连续7 d。实验期间,记录各组小鼠体重的变化情况;末次给药24 h后,检测其结肠长度,结肠组织中丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性,观察其结肠组织病理学形态、肠上皮细胞间紧密连接情况并进行组织病理学评分,检测其结肠组织中AMPK、Nrf2 mRNA及AMPK、Nrf2、血红素加氧酶1(HO-1)、闭合蛋白(occludin)、密封蛋白1(claudin-1)蛋白的表达情况。结果 与模型组比较,芍药苷各剂量组小鼠结肠组织中炎症细胞浸润、隐窝受损等病理改变均有所恢复,肠上皮细胞间紧密连接受损情况均有所改善;其体重,结肠长度,SOD、GSH-Px活性,以及AMPK蛋白的磷酸化水平,Nrf2、HO-1、occludin、claudin-1蛋白和AMPK、Nrf2 mRNA的表达均显著升高,延长或上调,MDA含量及组织病理学评分均显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),而抑制剂组上述指标与模型组相当( $P > 0.05$ )或更差( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。加用抑制剂可显著逆转高剂量芍药苷对上述指标的改善作用( $P < 0.01$ )。结论 芍药苷可修复小鼠肠上皮细胞损伤,改善上皮细胞间紧密连接,并上调相关蛋白、促抗氧化分子的表达和释放,从而改善UC;其作用机制可能与激活AMPK/Nrf2抗氧化通路有关。

**关键词** 芍药苷;溃疡性结肠炎;氧化应激;AMPK/Nrf2通路

## Effects and mechanism of paeoniflorin on oxidative stress of ulcerative colitis mice

DAI Xin<sup>1</sup>, WANG Ying<sup>1</sup>, REN Xinyue<sup>1</sup>, FAN Dingxing<sup>1</sup>, LI Xianzhe<sup>1</sup>, FENG Jiaxuan<sup>2</sup>, LOU Shilei<sup>2</sup>, YAN Hui<sup>2</sup>, SUN Cong<sup>2</sup> (1. School of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 2. School of Clinical Medicine, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To investigate the effects and potential mechanism of paeoniflorin on oxidative stress of ulcerative colitis (UC) mice based on adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) pathway. **METHODS** Male BALB/c mice were randomly divided into control group, model group, inhibitor group (AMPK inhibitor Compound C 20 mg/kg), paeoniflorin low-, medium- and high-dose groups (paeoniflorin 12.5, 25, 50 mg/kg), high-dose of paeoniflorin+inhibitor group (paeoniflorin 50 mg/kg+Compound C 20 mg/kg), with 8 mice in each group. Except for the control group, mice in all other groups were given 4% dextran sulfate sodium solution for 5 days to establish the UC model. Subsequently, mice in each drug group were given the corresponding drug solution intragastrically or intraperitoneally, once a day, for 7 consecutive days. The changes in body weight of mice were recorded during the experiment. Twenty-four hours after the last administration, colon length, malondialdehyde (MDA) content, and activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in colon tissues were measured; histopathological morphology of colon tissues, tight junctions between intestinal epithelial cells, and histopathological scoring were all observed and evaluated; the mRNA expressions of AMPK and Nrf2, as well as the protein expressions of heme oxygenase-1 (HO-1), occludin and claudin-1, were all determined in colon tissue.

**RESULTS** Compared with model group, paeoniflorin groups exhibited recovery from pathological changes such as inflammatory cell infiltration and crypt damage in the colon tissue, as well as improved tight junction damage between intestinal epithelial cells. Additionally, significant increases or upregulations were observed in body weight, colon length, activities of SOD and GSH-Px, phosphorylation level of AMPK, and protein expression of Nrf2, HO-1, occludin, claudin-1, and mRNA expressions of AMPK and Nrf2; concurrently, MDA content and histopathological scores were significantly reduced ( $P <$

<sup>△</sup> 基金项目 吉林省自然科学基金项目(No. YDJZ202401060 ZYTS);吉林省教育厅科学技术研究项目(No. JJKH20230949KJ);长春中医药大学国家级大学生创新创业训练计划项目(No. 202210199023)

\* 第一作者 硕士研究生。研究方向:中药抗炎症性肠病作用机制。E-mail:1609497176@qq.com

# 通信作者 教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药抗常见多发病作用机制。E-mail:37363266@qq.com

0.05 or  $P < 0.01$ ). In contrast, the inhibitor group showed comparable ( $P > 0.05$ ) or worse ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ) indicators compared to the model group. Conversely, the addition of AMPK inhibitor could significantly reverse the improvement of high-dose paeoniflorin ( $P < 0.01$ ). **CONCLUSIONS** Paeoniflorin can repair intestinal epithelial cell damage in mice, improve tight junctions between epithelial cells, upregulate the expression of related proteins, and promote the expression and secretion of antioxidant-promoting molecules, thereby ameliorating UC; its mechanism may be associated with activating AMPK/Nrf2 antioxidant pathway.

**KEYWORDS** paeoniflorin; ulcerative colitis; oxidative stress; AMPK/Nrf2 pathway

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种反复发作的慢性炎症性肠病,可从远端开始向近端延伸直至累及整个结肠,以腹泻、腹痛、里急后重、黏液脓血便和体重减轻等为主要临床表现。近年来,UC的患病率和复发率逐年上升,尽管其病因尚不清楚,但有研究证实,UC的发生与遗传因素、环境因素、个体因素(机体炎症、氧化应激、免疫失衡)密切相关<sup>[1]</sup>。在UC炎症反应期,炎症细胞可募集到损伤部位,使得耗氧量增加、氧自由基生成增多;同时,炎症细胞还可分泌促炎因子,进一步刺激活性氧的产生,从而导致机体发生氧化应激反应,致使肠道黏膜屏障受损<sup>[1]</sup>。腺苷一磷酸活化的蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)/核转录因子红系2相关因子2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)是重要的抗炎和抗氧化信号通路,激活此通路可减少促炎因子释放、减轻机体氧化应激损伤,从而缓解UC症状<sup>[2]</sup>。

目前,临床治疗UC的常规药物效果有限且毒副作用大,患者复发率极高,而天然植物及其单体具有疗效好、副作用少的优点,备受学界关注<sup>[3]</sup>。芍药苷作为中药白芍的主要活性成分,在多种治疗UC的方剂中广泛存在,具有抗炎、抗氧化、调节免疫等药理活性<sup>[4]</sup>。本课题组前期研究表明,芍药苷可降低UC小鼠血清中肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)等促炎因子水平,上调AMPK、自噬相关蛋白Beclin-1、微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)mRNA的表达,下调哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、p62 mRNA的表达,增强细胞自噬,减轻UC小鼠的肠黏膜损伤,缓解UC症状<sup>[5]</sup>。考虑到芍药苷具有较强的抗氧化作用,而氧化应激是UC发生发展的重要因素之一<sup>[1]</sup>,故本研究拟从氧化应激角度探讨芍药苷对UC小鼠的影响及潜在机制,以期芍药苷用于UC治疗及相关药物研发提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括2720 Thermal Cycler型聚合酶链式反应(PCR)仪、7300型实时荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystems公司),SPECTROstar Nano型

多功能酶标仪(德国BMG Labtech公司),HT7700型透射电子显微镜(日本Hitachi公司),RM2016型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司),PowerPac型电泳仪、小型电泳槽和转印槽(美国Bio-Rad公司),OI 600MF型全自动化学发光凝胶成像系统(广州光仪生物科技有限公司)等。

### 1.2 主要药品与试剂

芍药苷对照品(批号S31585,纯度 $> 98\%$ )、AMPK抑制剂Compound C的对照品(批号S24HS195965,纯度 $> 98\%$ )均购自上海源叶生物科技有限公司;葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS;批号S8634)购自美国MP公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号YX-130401M)购自上海优选生物科技有限公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(批号S0101M)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)试剂盒(批号S0059S)均购自上海碧云天生物技术股份有限公司;苏木精-伊红(HE)染液(批号G1005)购自北京索莱宝科技有限公司;BCA蛋白质定量试剂盒(批号AR1110)、鼠源 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(批号BM0627)均购自德国Boster Biological公司;兔源AMPK、Nrf2、血红素加氧酶1(heme oxygenase-1, HO-1)、闭合蛋白(occludin)、密封蛋白1(claudin-1)抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔、羊抗鼠IgG二抗(批号分别为10929-2-AP、16396-1-AP、10701-1-AP、27260-1-AP、10305-1-AP、SA00001-2、SA00001-1)均购自美国Proteintech公司;兔源磷酸化AMPK(phosphorylated AMPK, p-AMPK)抗体(批号CY5608)购自美国Abways公司;高灵敏度ECL化学发光试剂盒(批号20230406)购自南京建成生物工程研究所;电镜固定液(批号G1102)购自武汉谷歌生物科技有限公司。

### 1.3 实验动物

本研究选用SPF级雄性BALB/c小鼠56只,体重为(20 $\pm$ 2)g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,动物生产许可证号为SCXK(辽)2020-0001。所有动物均在温度(20 $\pm$ 5) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度30%~50%、每12h自然光照/黑暗循环条件下饲养。本实验方案已通过长春中医药大学实验动物伦理委员会审批(批准编号2023477)。

## 2 方法

### 2.1 造模、分组与给药

所有小鼠适应性饲养1周后,随机分为对照组,模型组,抑制剂组(Compound C 20 mg/kg,剂量参考相关文献<sup>[6]</sup>设置),芍药苷低、中、高剂量组(芍药苷12.5、25、50 mg/kg,剂量根据预实验结果设置)和芍药苷高+抑制剂组(芍药苷50 mg/kg+Compound C 20 mg/kg),每组8只。除对照组外,其余各组小鼠均自由饮用4%DSS溶液5 d以构建UC模型<sup>[7]</sup>。随后,芍药苷各剂量组小鼠灌胃相应剂量的芍药苷(以水为溶剂,灌胃体积为0.2 mL),并腹腔注射生理盐水0.2 mL;抑制剂组小鼠腹腔注射Compound C药液(以生理盐水为溶剂,注射体积为0.2 mL),并灌胃水0.2 mL;对照组和模型组小鼠灌胃水0.2 mL,并腹腔注射生理盐水0.2 mL;每天1次,连续7 d。

### 2.2 小鼠体重记录、结肠长度测量及标本收集

实验期间,每天称定并记录各组小鼠的体重。末次给药24 h后,以吸入CO<sub>2</sub>麻醉后将小鼠处死,分离其结肠,拍照并测量长度;以生理盐水漂洗结肠后,随机选取各组6只小鼠相同部位的结肠组织,裁剪到合适大小,于2 min内放入2.5%戊二醛溶液中固定,用于透射电镜观察。另取上述小鼠相同部位、相同长短的结肠组织,置于4%多聚甲醛溶液中固定,用于组织病理学分析;取剩余结肠组织,剪开清洗内容物后,于-80℃下冻存,用于相关指标检测。

### 2.3 小鼠结肠组织中氧化应激指标检测

随机选取“2.2”项下各组小鼠冻存的结肠组织适量,加生理盐水,匀浆,再于4℃下以3 000 r/min离心10 min,取上清液。按照试剂盒说明书方法,使用酶标仪检测其中MDA含量及SOD、GSH-Px活性。

### 2.4 小鼠结肠组织病理学形态观察

随机选取“2.2”项下各组小鼠固定于4%多聚甲醛溶液中的结肠组织适量,经乙醇梯度脱水、常规石蜡包埋后切片(厚约4 μm)。取切片,进行HE染色,使用显微镜观察其病理改变并进行组织病理学评分(组织病理学评分=黏膜水肿评分+炎症细胞浸润评分+上皮完整性评分+上皮增生比例评分),具体标准<sup>[7]</sup>见表1。

表1 组织病理学评分标准

评分	黏膜水肿	炎症细胞浸润	上皮完整性	上皮增生比例
0	无变化	无变化	无变化	无变化
1	轻度	轻度	上皮细胞轻微脱落	1%~50%
2	中度	中度	上皮细胞严重脱落	>50%~<100%
3	重度	重度	上皮溃疡	100%
4			上皮溃疡并破坏隐窝	

### 2.5 小鼠结肠组织中肠上皮细胞间紧密连接情况观察

取“2.2”项下各组小鼠固定于2.5%戊二醛溶液中的结肠组织适量,以0.1 mmol/L磷酸盐缓冲液漂洗3次,用1%锇酸固定液固定2 h,再经梯度乙醇和丙酮脱水、渗透、包埋后切片(厚60~80 nm)。取切片,进行醋酸-枸

橐酸铅双重染色,使用透射电子显微镜观察其结肠组织中肠上皮细胞间紧密连接情况并采集图像。

### 2.6 小鼠结肠组织中AMPK、Nrf2 mRNA表达的检测

采用实时荧光定量PCR法检测。随机选取“2.2”项下各组小鼠冻存的结肠组织适量,以TRIzol法提取总RNA,经浓度、纯度检测后,逆转录合成cDNA。以上述cDNA为模板,进行PCR扩增。反应体系共20 μL,包括cDNA模板2 μL、正/反向引物各1 μL、2×Talent qPCR PreMix 10 μL、10 mmol/L dNTP Mixture 1 μL、Oligo-dT 0.5 μL、核糖核酸酶抑制剂0.5 μL、AMV逆转录酶0.5 μL、无核糖核酸酶水3.5 μL。反应条件为95℃预变性15 min;95℃变性15 s,60℃退火31 s,72℃延伸31 s,共40个循环。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,按照2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算AMPK、Nrf2 mRNA的相对表达量,结果以对照组为参照进行归一化处理。本研究所用正/反向引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计、合成,具体信息见表2。

表2 引物序列和产物大小

基因	引物序列(5'→3')	产物大小/bp
AMPK	正向:AGCCAAATCAGGGACTGCTA	136
	反向:GAGGAGGTGACAGATGAGG	
Nrf2	正向:GACTACAGTCCCAGCAGAGTG	100
	反向:TCTGCGTGTCTCAGAAACCTC	
GAPDH	正向:TGACCTCAACTACATGGTCTACA	85
	反向:CTTCCCATCTCGGCCTTG	

### 2.7 小鼠结肠组织中AMPK、Nrf2、HO-1、occludin、claudin-1蛋白表达的检测

随机选取“2.2”项下各组小鼠冻存的结肠组织适量,剪碎后置于1.5 mL离心管中,加入组织裂解液,充分匀浆,以12 000 r/min离心10 min,取上清液,采用BCA法进行蛋白定量,并于95℃加热10 min使变性。取变性蛋白,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转移至硝酸纤维素膜上,以封闭液封闭15 min;以PBST缓冲液洗膜后,加入β-actin、AMPK、p-AMPK、Nrf2、HO-1、occludin、claudin-1一抗(稀释比例分别为1:2 000、1:2 000、1:2 000、1:8 000、1:2 000、1:2 000、1:2 000),于4℃孵育过夜;以PBST缓冲液洗膜后,加入相应二抗(稀释比例均为1:1 000),于室温孵育1 h;用高灵敏度ECL化学发光试剂显影,于化学发光凝胶成像系统上成像。使用Image J软件分析条带灰度值,以目的蛋白与内参蛋白β-actin的条带灰度值比值表示目的蛋白的相对表达量,以p-AMPK与AMPK蛋白的灰度值比值作为AMPK蛋白的磷酸化水平。

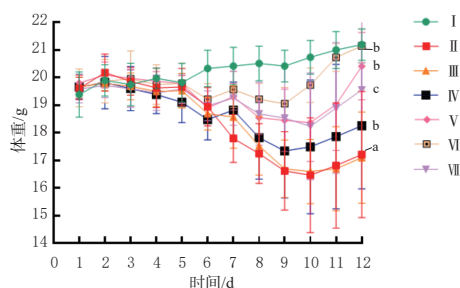
### 2.8 统计学方法

使用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用SNK-q检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

### 3 结果

#### 3.1 芍药苷对小鼠体重的影响

对照组小鼠饮食正常,体重呈逐渐上升趋势;模型组和抑制剂组小鼠的体重总体呈下降趋势;经芍药苷干预后,小鼠体重呈逐渐上升趋势。第12天,模型组小鼠的体重较对照组显著降低( $P<0.01$ );芍药苷各剂量组小鼠的体重均较模型组显著升高( $P<0.05$ ),而抑制剂组与模型组相当( $P>0.05$ );芍药苷高+抑制剂组小鼠的体重较芍药苷高剂量组显著降低( $P<0.01$ )。结果见图1。

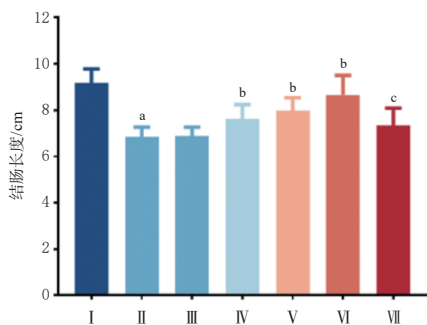


I:对照组;II:模型组;III:抑制剂组;IV:芍药苷低剂量组;V:芍药苷中剂量组;VI:芍药苷高剂量组;VII:芍药苷高+抑制剂组;a:与对照组比较, $P<0.01$ ;b:与模型组比较, $P<0.05$ ;c:与芍药苷高剂量组比较, $P<0.01$ 。

图1 芍药苷对小鼠体重的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

#### 3.2 芍药苷对小鼠结肠长度的影响

与对照组比较,模型组小鼠的结肠长度显著缩短( $P<0.01$ );与模型组比较,芍药苷各剂量组小鼠的结肠长度均显著延长( $P<0.05$ ),而抑制剂组则与模型组相当( $P>0.05$ );与芍药苷高剂量组比较,芍药苷高+抑制剂组小鼠的结肠长度显著缩短( $P<0.01$ )。结果见图2。



I:对照组;II:模型组;III:抑制剂组;IV:芍药苷低剂量组;V:芍药苷中剂量组;VI:芍药苷高剂量组;VII:芍药苷高+抑制剂组;a:与对照组比较, $P<0.01$ ;b:与模型组比较, $P<0.05$ ;c:与芍药苷高剂量组比较, $P<0.01$ 。

图2 芍药苷对小鼠结肠长度的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

#### 3.3 芍药苷对小鼠结肠组织中氧化应激指标的影响

与对照组比较,模型组小鼠结肠组织中MDA含量显著升高,SOD、GSH-Px活性均显著降低( $P<0.01$ )。与模型组比较,芍药苷各剂量组小鼠结肠组织中MDA

含量均显著降低,SOD、GSH-Px活性均显著升高( $P<0.05$ );抑制剂组小鼠除SOD活性显著降低( $P<0.05$ )外,其余指标均与模型组相当( $P>0.05$ )。与芍药苷高剂量组比较,芍药苷高+抑制剂组小鼠结肠组织中SOD、GSH-Px活性均显著降低( $P<0.01$ )。结果见表3。

表3 各组小鼠结肠组织中MDA、SOD和GSH-Px水平比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	MDA/(nmol/mL)	SOD/(U/mg)	GSH-Px/(U/mg)
对照组	7.03±0.76	152.47±3.20	743.20±26.71
模型组	9.89±0.90 <sup>a</sup>	57.30±2.16 <sup>a</sup>	444.40±32.89 <sup>a</sup>
抑制剂组	10.39±0.75	49.58±2.19 <sup>b</sup>	405.89±13.59
芍药苷低剂量组	8.43±0.70 <sup>b</sup>	67.52±3.53 <sup>b</sup>	503.43±35.44 <sup>b</sup>
芍药苷中剂量组	8.38±0.60 <sup>b</sup>	95.92±2.53 <sup>b</sup>	618.86±11.52 <sup>b</sup>
芍药苷高剂量组	7.50±0.44 <sup>c</sup>	146.82±3.18 <sup>b</sup>	744.57±7.53 <sup>b</sup>
芍药苷高+抑制剂组	7.84±0.69	76.19±3.30 <sup>c</sup>	616.13±31.49 <sup>c</sup>

a:与对照组比较, $P<0.01$ ;b:与模型组比较, $P<0.05$ ;c:与芍药苷高剂量组比较, $P<0.01$ 。

#### 3.4 芍药苷对小鼠结肠组织病理学形态的影响

对照组小鼠结肠组织上皮完整,杯状细胞排列整齐,隐窝结构完整;模型组、抑制剂组小鼠结肠组织有不同程度的损伤,可见黏膜水肿、上皮增生、大量炎症细胞浸润、结肠上皮溃疡明显且隐窝受损严重;经药物干预后,芍药苷各剂量组小鼠结肠各层次结构均有明显改善,杯状细胞未见明显减少,隐窝结构基本正常,仅有少量炎症细胞浸润;而芍药苷高+抑制剂组小鼠结肠组织病理改变较芍药苷高剂量组严重。结果见图3A~3G。

与对照组比较,模型组小鼠的组织病理学评分显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,芍药苷各剂量组小鼠的组织病理学评分显著降低( $P<0.05$ ),而抑制剂组的组织病理学评分显著升高( $P<0.05$ );与芍药苷高剂量组比较,芍药苷高+抑制剂组小鼠的组织病理学评分显著升高( $P<0.01$ )。结果见图3I。

#### 3.5 芍药苷对小鼠结肠组织中肠上皮细胞间紧密连接的影响

对照组小鼠结肠组织中肠上皮细胞间紧密连接结构完整,肠上皮细胞表面的微绒毛排列整齐,细胞间隙狭窄。模型组、抑制剂组小鼠结肠组织中肠上皮细胞间紧密连接结构松散且不完整,微绒毛稀疏、排列杂乱无章、长度缩短,细胞间隙增宽,细胞通透性增加。芍药苷各剂量组小鼠结肠组织中肠上皮细胞间紧密连接的受损情况均有不同程度改善,连接紧密度有所增加,细胞间隙有所缩窄,微绒毛排列整齐。芍药苷高+抑制剂组小鼠结肠组织中肠上皮细胞间紧密连接的受损情况较芍药苷高剂量组严重。结果见图4。

#### 3.6 芍药苷对小鼠结肠组织中AMPK、Nrf2 mRNA表达的影响

与对照组比较,模型组小鼠结肠组织中AMPK、Nrf2 mRNA的表达均显著下调( $P<0.01$ );与模型组比

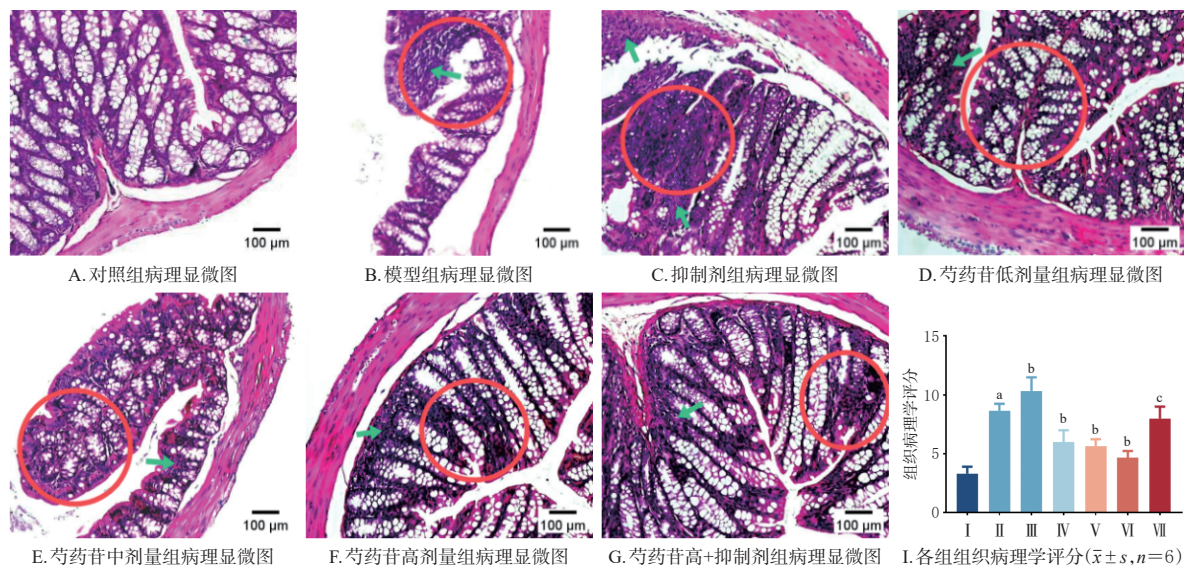
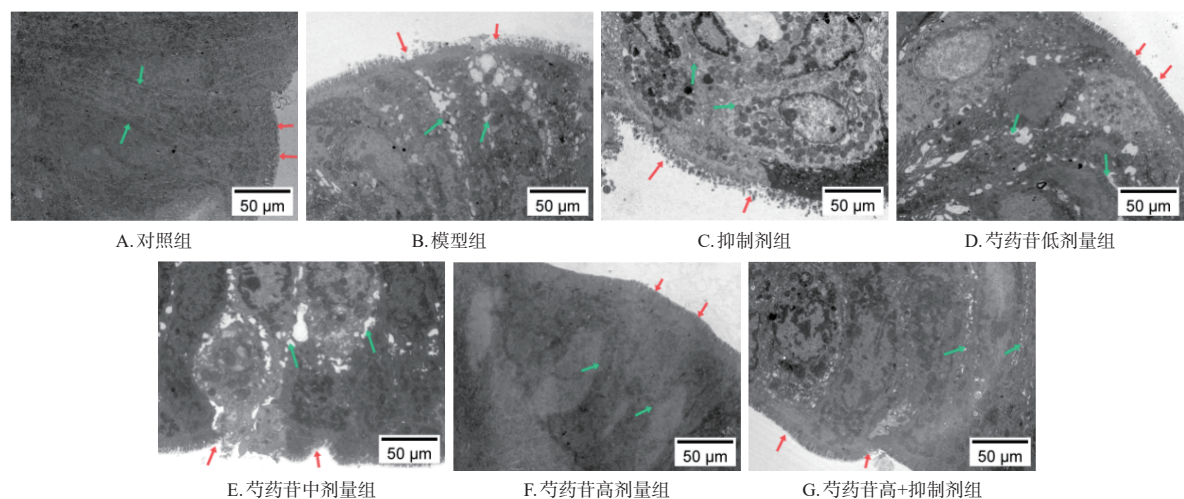


图3 芍药苷对小鼠结肠组织病理学形态及组织病理学评分的影响  
 红色圆圈:受损的隐窝;绿色箭头:炎症细胞浸润; I:对照组; II:模型组; III:抑制剂组; IV:芍药苷低剂量组; V:芍药苷中剂量组; VI:芍药苷高剂量组; VII:芍药苷高+抑制剂组;a:与对照组比较, $P<0.01$ ;b:与模型组比较, $P<0.05$ ;c:与芍药苷高剂量组比较, $P<0.01$ 。

图3 芍药苷对小鼠结肠组织病理学形态及组织病理学评分的影响



红色箭头:细胞间隙;绿色箭头:微绒毛。

图4 芍药苷对小鼠结肠组织中肠上皮细胞间紧密连接影响的显微图

较,芍药苷各剂量组小鼠结肠组织中 AMPK、Nrf2 mRNA 的表达均显著上调( $P<0.05$ ),而抑制剂组上述 mRNA 的表达均显著下调( $P<0.05$ );与芍药苷高剂量组比较,芍药苷高+抑制剂组小鼠结肠组织中 AMPK、Nrf2 mRNA 的表达均显著下调( $P<0.01$ )。结果见图5。

### 3.7 芍药苷对小鼠结肠组织中 p-AMPK、AMPK、Nrf2、HO-1、occludin、claudin-1 蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组小鼠结肠组织中 AMPK 蛋白的磷酸化水平和 Nrf2、HO-1、occludin、claudin-1 蛋白的表达均显著降低或下调( $P<0.01$ );与模型组比较,芍药苷各剂量组小鼠结肠组织中 AMPK 蛋白的磷酸化水平和 Nrf2、HO-1、occludin、claudin-1 蛋白的表达均显著升高或上调( $P<0.01$ ),而抑制剂组上述蛋白的磷酸化水平和表达均显著降低或下调( $P<0.01$ );与芍药苷高剂

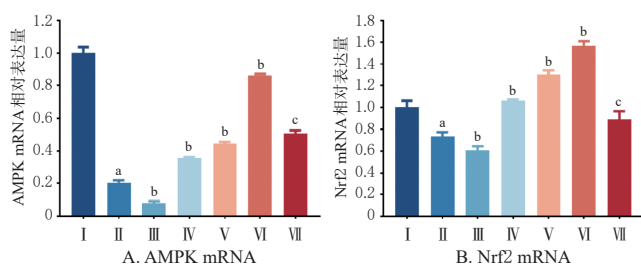
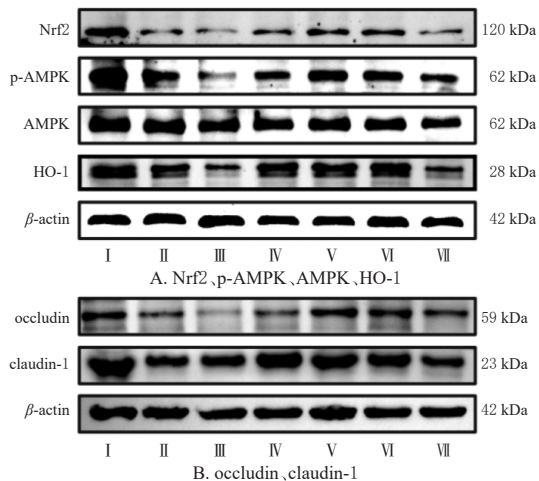


图5 芍药苷对小鼠结肠组织中 AMPK、Nrf2 mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )  
 I:对照组; II:模型组; III:抑制剂组; IV:芍药苷低剂量组; V:芍药苷中剂量组; VI:芍药苷高剂量组; VII:芍药苷高+抑制剂组;a:与对照组比较, $P<0.01$ ;b:与模型组比较, $P<0.05$ ;c:与芍药苷高剂量组比较, $P<0.01$ 。

图5 芍药苷对小鼠结肠组织中 AMPK、Nrf2 mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

量组比较,芍药苷高+抑制剂组小鼠结肠组织中 AMPK 蛋白的磷酸化水平和 Nrf2、occludin、claudin-1 蛋白的表达均显著降低或下调( $P<0.01$ )。结果见图6、表4。



I: 对照组; II: 模型组; III: 抑制剂组; IV: 芍药苷高+抑制剂组; V: 芍药苷高剂量组; VI: 芍药苷中剂量组; VII: 芍药苷低剂量组。

图6 芍药苷对小鼠结肠组织中 p-AMPK、AMPK、Nrf2、HO-1、occludin、claudin-1 蛋白表达影响的电泳图

表4 芍药苷对小鼠结肠组织中 p-AMPK、AMPK、Nrf2、HO-1、occludin、claudin-1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	p-AMPK/AMPK	Nrf2/ $\beta$ -actin	HO-1/ $\beta$ -actin	occludin/ $\beta$ -actin	claudin-1/ $\beta$ -actin
对照组	0.93 ± 0.02	1.28 ± 0.10	1.41 ± 0.04	1.30 ± 0.04	1.46 ± 0.04
模型组	0.45 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.57 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.95 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.89 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.74 ± 0.01 <sup>a</sup>
抑制剂组	0.26 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.32 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.51 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.46 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.61 ± 0.02 <sup>b</sup>
芍药苷低剂量组	0.64 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.65 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.04 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.24 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.06 ± 0.05 <sup>b</sup>
芍药苷中剂量组	0.76 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.65 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.25 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.24 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.97 ± 0.02 <sup>b</sup>
芍药苷高剂量组	0.84 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.78 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.38 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.42 ± 0.07 <sup>b</sup>	1.27 ± 0.02 <sup>b</sup>
芍药苷高+抑制剂组	0.50 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.63 ± 0.02 <sup>c</sup>	1.38 ± 0.09	1.06 ± 0.05 <sup>c</sup>	1.18 ± 0.03 <sup>c</sup>

a: 与对照组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.01$ ; c: 与芍药苷高剂量组比较,  $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

UC 是一种常见的消化系统疾病,近年来随着人们饮食结构的变化,其患病率逐年增加。由于 UC 具有病因复杂和病情反复发作的特征,现有药物难以将其有效治愈,因此迫切需要开发安全有效的新药物。本研究基于 AMPK/Nrf2 信号通路初步探讨了芍药苷对 UC 小鼠氧化应激的影响及潜在机制,旨在为芍药苷的应用和 UC 治疗药物的研发提供参考。

DSS 自由饮用法具有操作简便、重复性好、成功率高、病变与人类 UC 相似的优点,已被广泛应用于 UC 相关研究领域<sup>[9]</sup>。研究指出,DSS 可通过损伤肠上皮细胞间的紧密连接和基底膜,从而增加肠道渗透性,使病原体进入肠道壁内,激活免疫炎症反应,最终诱导 UC<sup>[2]</sup>。研究证实,肠道上皮功能障碍是 UC 发生和复发的重要因素,而紧密连接则是决定肠道上皮屏障功能能否正常发挥的关键<sup>[9]</sup>。紧密连接涉及 occludin、claudin-1、闭锁小带蛋白及连接黏附分子等结构蛋白。其中,occludin 是一种跨膜蛋白,不仅参与肠上皮渗透性屏障的形成、小分子物质运输的调节、细胞极性的维持,而且参与细

胞黏附的调节和细胞信号的接收、传递;claudin-1 与 occludin 结构类似,也是一种跨膜蛋白,参与构成肠道渗透性屏障,两者均是肠道上皮屏障完整性的标志物<sup>[10]</sup>。本研究结果显示,与对照组比较,模型组小鼠结肠长度显著缩短,体重有所减轻,结肠组织病理学评分显著升高,结肠组织中 occludin、claudin-1 蛋白的表达均显著下调;经芍药苷干预后,小鼠结肠长度有所恢复,体重有所增加,结肠病理学损伤得以减轻且组织病理学评分显著降低,occludin、claudin-1 蛋白的表达均显著上调。透射电子显微镜观察结果也显示,经芍药苷干预后,小鼠肠上皮细胞间紧密连接的受损情况得以明显改善,连接紧密度增加,细胞间隙缩窄,微绒毛排列整齐,提示芍药苷能修复结肠组织中肠上皮细胞的紧密连接。

AMPK/Nrf2 是调控机体氧化还原稳态的重要信号通路。当机体发生氧化应激时,作为氧化还原感应器的 Nrf2 与 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 迅速解离,然后转移至细胞核并与抗氧化相应元件结合,促进抗氧化分子(HO-1、SOD 和 GSH-Px 等)的合成和释放<sup>[11]</sup>。其中,HO-1 作为抗氧化酶类的重要一员,主要参与催化血红素的分解代谢,由此产生的胆绿素、胆红素具有清除活性氧的作用;MDA 是脂质过氧化产物,其水平的高低可反映细胞氧化应激损伤的严重程度;SOD 作为一种重要的内源性抗氧化剂,可保护组织免受活性氧的损伤;GSH-Px 作为一种体内广泛存在的过氧化物分解酶,其能催化有毒的谷胱甘肽转变为无毒的氧化型谷胱甘肽,从而使细胞膜的结构和功能免受过氧化物的损伤<sup>[12-13]</sup>。本研究结果显示,与对照组比较,模型组小鼠结肠组织中 MDA 含量显著升高,SOD、GSH-Px 活性均显著降低,Nrf2、HO-1 蛋白及 Nrf2 mRNA 的表达均显著下调;经芍药苷干预后,小鼠结肠组织中 MDA 含量显著降低,SOD、GSH-Px 活性均显著升高,Nrf2、HO-1 蛋白和 Nrf2 mRNA 的表达均显著上调,提示芍药苷可增加 UC 小鼠的抗氧化能力,减轻氧化应激。相关研究表明,激活 Nrf2、HO-1 等抗氧化应激蛋白可有效缓解 UC 的病情进展<sup>[2]</sup>,本研究上述结果也支持这一观点。

AMPK 是细胞能量稳态的调节器,参与代谢、氧化应激、炎症、凋亡和自噬等生理病理过程的调节。已有研究表明,芹菜素、芍药苷等多种活性成分可通过激活 AMPK (即使其磷酸化)来促进 Nrf2 核易位,增加核内 Nrf2 的积累,促进抗氧化酶的表达,减轻氧化应激,从而治疗哮喘和脓毒症等多种疾病<sup>[14]</sup>。基于此,本研究采用 AMPK 抑制剂 Compound C 进行干预,考察芍药苷缓解 UC 小鼠氧化应激的作用是否与调节 AMPK/Nrf2 通路有关。结果显示,当腹腔注射抑制剂后,小鼠结肠组织病理改变、肠上皮细胞间紧密连接程度及各定量指标与模型组相当或更差;在灌胃高剂量芍药苷的基础上联用抑制剂后,芍药苷对 UC 小鼠氧化应激的改善作用则被

抑制剂显著逆转,提示芍药苷可通过激活 AMPK/Nrf2 通路来抑制氧化应激,从而改善小鼠 UC。

综上所述,芍药苷可修复小鼠的肠上皮细胞损伤,改善肠上皮细胞间紧密连接,并上调相关蛋白、促抗氧化分子的表达和释放,从而改善 UC;其作用机制可能与激活 AMPK/Nrf2 抗氧化通路有关。但芍药苷对 UC 的干预作用可能涉及其他通路,尚需进一步完善。

### 参考文献

[1] SEGAL J P, LEBLANC J F, HART A L. Ulcerative colitis: an update[J]. *Clin Med(Lond)*, 2021, 21(2):135-139.

[2] 张雪侠, 金建闻, 刘长河, 等. Nrf2/HO-1 通路在四神丸保护溃疡性结肠炎小鼠模型肠道损伤中的作用[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(16):4187-4192.

ZHANG X X, JIN J W, LIU C H, et al. Effect of Nrf2/HO-1 signaling pathway in intestinal protection by Sishen pills against ulcerative colitis in mice[J]. *China J Chin Mater Med*, 2021, 46(16):4187-4192.

[3] 叶雪珂, 单国顺, 付郁, 等. 溃疡性结肠炎发病机制及中西医结合治疗的研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(9):158-162, 281.

YE X K, SHAN G S, FU Y, et al. Research progress on pathogenesis and traditional Chinese and western medicine treatment of ulcerative colitis[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2022, 40(9):158-162, 281.

[4] 曾勇, 朱楷, 刘煌. 芍药苷对溃疡性结肠炎小鼠 Treg/Th17 平衡、氧化应激反应的调节作用[J]. *药品评价*, 2021, 18(21):1306-1310.

ZENG Y, ZHU K, LIU H. Regulation effect of paeoniflorin on Treg/Th17 balance and oxidative stress response in ulcerative colitis mice[J]. *Drug Eval*, 2021, 18(21):1306-1310.

[5] 代鑫, 李柔, 胡洋, 等. 基于 AMPK/mTOR 自噬通路探讨芍药苷保护溃疡性结肠炎小鼠的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(3):45-53.

DAI X, LI R, HU Y, et al. Protective mechanism of paeoniflorin on mice with ulcerative colitis based on AMPK/mTOR autophagy pathway[J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2024, 30(3):45-53.

[6] 张晓蕾, 张凯, 秦永亭, 等. 木犀草素调控 AMPK/NLRP3 轴介导的细胞焦亡对病毒性心肌炎的保护作用[J]. *中国病原生物学杂志*, 2022, 17(5):514-519.

ZHANG X L, ZHANG K, QIN Y T, et al. Protective effect of luteolin on viral myocarditis by regulating AMPK/NLRP3 axis-mediated pyroptosis[J]. *J Pathog Biol*, 2022, 17(5):514-519.

[7] 成宁宁, 郑晨曦, 代鑫, 等. 黄芩素对葡聚糖硫酸钠诱导

的溃疡性结肠炎小鼠的改善作用[J]. *中国新药杂志*, 2023, 32(3):276-282.

CHENG N N, ZHENG C X, DAI X, et al. Protective effect of baicalein on mice with ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium salt[J]. *Chin J New Drugs*, 2023, 32(3):276-282.

[8] 张晓梅, 黄木圣, 范春娇, 等. 近十年溃疡性结肠炎动物模型的研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2022, 28(1):157-160.

ZHANG X M, HUANG M S, FAN C J, et al. Recent advances in animal models of ulcerative colitis[J]. *J Basic Chin Med*, 2022, 28(1):157-160.

[9] 赵颖, 张小琴. 中医药修复肠黏膜屏障治疗溃疡性结肠炎的研究进展[J]. *中国中医急症*, 2021, 30(5):936-940.

ZHAO Y, ZHANG X Q. Research progress of traditional Chinese medicine in repairing intestinal mucosal barrier in the treatment of ulcerative colitis[J]. *J Emerg Tradit Chin Med*, 2021, 30(5):936-940.

[10] WANG J, ZHANG C L, GUO C M, et al. Chitosan ameliorates DSS-induced ulcerative colitis mice by enhancing intestinal barrier function and improving microflora[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22):5751.

[11] WU W C, WANG S S, LIU Q, et al. Metformin protects against LPS-induced intestinal barrier dysfunction by activating AMPK pathway[J]. *Mol Pharm*, 2018, 15(8):3272-3284.

[12] LI B L, GUO Y X, JIA X M, et al. Luteolin alleviates ulcerative colitis in rats via regulating immune response, oxidative stress, and metabolic profiling[J]. *Open Med (Wars)*, 2023, 18(1):20230785.

[13] 王会沙. 化浊解毒愈疡煎对溃疡性结肠炎大鼠 GSH、GSH-Px、IFN- $\gamma$  表达的影响[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2018.

WANG H S. Effect of Huazhuo Jiedu Yuyang decoction on the expression of GSH, GSH-Px and IFN- $\gamma$  in ulcerative colitis rats[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2018.

[14] 邓文娟. 黄芪汤通过 AMPK/Nrf2 信号通路抑制氧化应激改善 C57 小鼠糖尿病肾病足细胞损伤[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2019.

DENG W J. Huangqi decoction inhibits oxidative stress through AMPK/Nrf2 signaling pathway and improves podocyte injury in C57 mice with diabetic nephropathy [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2019.

(收稿日期:2024-06-18 修回日期:2024-10-25)

(编辑:张元媛)