

• 论 著 • DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2025. 09. 005

青赤散通过 RIP1/RIP3/NLRP3 信号通路干预溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群及免疫功能的研究^{*}

苏 傲, 许淑娟[△], 李珠林, 缪志伟

河北省衡水市人民医院消化内科, 河北衡水 053000

摘 要:目的 探讨青赤散通过调控受体作用相互蛋白激酶 1(RIP1)/受体作用相互蛋白激酶 3(RIP3)/NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)信号通路对溃疡性结肠炎(UC)大鼠肠道菌群及免疫功能的影响。方法 将 50 只大鼠随机分为正常组、模型组、西药组、青赤散低剂量组、青赤散高剂量组,每组 10 只。除正常组外,各组均建立 UC 大鼠模型。建模成功后,西药组以 0.31 g/(kg·d)美沙拉嗪灌胃,青赤散低、高剂量组分别以 19.50、38.99 g/(kg·d)生药量青赤散药液灌肠,正常组、模型组以等剂量无菌水灌肠,2 次/d,各组均持续治疗 7 d。采用酶联免疫吸附试验检测各组大鼠血清白细胞介素-4(IL-4)、干扰素 γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平,应用 16S rDNA 检测肠道菌群变化,采用流式细胞仪检测 CD4⁺、CD8⁺T 细胞百分比,通过 HE 染色观察结肠组织形态变化,采用免疫印迹法检测结肠组织 RIP1、RIP3、NLRP3 蛋白水平。结果 与正常组比较,模型组、西药组、青赤散低剂量组、青赤散高剂量组大鼠血清 IL-4、TNF- α 水平及结肠组织 RIP1、RIP3、NLRP3 蛋白水平均升高($P<0.05$),血清 IFN- γ 水平及 CD4⁺、CD8⁺T 细胞百分比均降低($P<0.05$);与模型组比较,西药组、青赤散低剂量组、青赤散高剂量组大鼠血清 IL-4、TNF- α 水平及结肠组织 RIP1、RIP3、NLRP3 蛋白水平均降低($P<0.05$),IFN- γ 水平及 CD4⁺、CD8⁺T 细胞百分比均升高($P<0.05$);与西药组、青赤散低剂量组比较,青赤散高剂量组血清 IL-4、TNF- α 水平及结肠组织 RIP1、RIP3、NLRP3 蛋白水平均降低($P<0.05$),血清 IFN- γ 水平及 CD4⁺、CD8⁺T 细胞百分比均升高($P<0.05$);西药组与青赤散低剂量组的血清 IL-4、TNF- α 、IFN- γ 水平,CD4⁺、CD8⁺T 细胞百分比,以及结肠组织 RIP1、RIP3、NLRP3 蛋白水平比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。与正常组比较,模型组、西药组、青赤散低剂量组、青赤散高剂量组大鼠乳杆菌属丰度均降低($P<0.05$),双歧杆菌属丰度均升高($P<0.05$);与模型组比较,西药组、青赤散低剂量组、青赤散高剂量组大鼠乳杆菌属丰度均升高($P<0.05$),青赤散高剂量组双歧杆菌属丰度降低($P<0.05$);与西药组、青赤散低剂量组比较,青赤散高剂量组乳杆菌属丰度均升高($P<0.05$);西药组、青赤散低剂量组乳杆菌属、双歧杆菌属丰度比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。结肠组织 HE 染色结果显示:与正常组比较,模型组、西药组、青赤散低剂量组、青赤散高剂量组大鼠结肠组织形态明显异常;与模型组比较,西药组、青赤散低剂量组、青赤散高剂量组结肠组织形态有明显改善,且青赤散高剂量组形态最佳,肠黏膜较为完整,腺体排列较为整齐,炎症细胞浸润大大减少。结论 青赤散可有效平衡 UC 大鼠肠道菌群,改善其免疫功能,且呈现剂量依赖性,推测其作用机制可能与抑制 RIP1/RIP3/NLRP3 信号通路有关。

关键词:青赤散; 溃疡性结肠炎; 受体作用相互蛋白激酶 1; 受体作用相互蛋白激酶 3; 肠道菌群

中图分类号:R285.5;R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2025)09-1178-06

Qingchi Powder intervenes intestinal flora and immune function in ulcerative colitis rats by regulating RIP1/RIP3/NLRP3 signaling pathway^{*}

SU Ao, XU Shujuan[△], LI Zhulin, MIAO Zhiwei

Department of Gastroenterology, Hengshui Municipal People's Hospital, Hengshui, Hebei 053000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of Qingchi Powder on the intestinal flora and immune function in rats with ulcerative colitis (UC) by regulating the receptor-interacting protein kinase 1 (RIP1)/receptor-interacting protein kinase3 (RIP3)/NOD-like receptor protein3 (NLRP3) signaling pathway. **Methods** Fifty rats were randomly divided into the five groups: normal group, model group, western medicine group, Qingchi Powder low-dose group and Qingchi Powder high-dose group, 10 in each group. The UC rat models were established except the normal group. After successfully modeling, the western medicine group received 0.31 g/(kg·d) mesalazine by gavage. The Qingchi Powder low- and high-dose groups were given 19.50 g/(kg·d) and 38.99 g/(kg·d)

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(82104792)。

作者简介:苏傲,女,主治医师,主要从事消化系统疾病方向的研究。[△] 通信作者, E-mail: xushujuan@163.com。

crude drug quantity of Qingchi Powder via enema, respectively. The normal group and the model group received an equivalent dose of sterile water via enema twice daily. The various groups were continuously treated for 7 d. The serum interleukin-4 (IL-4), interferon- γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels were measured by using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The 16S rDNA was used to detect the changes in intestinal flora. The flow cytometry was employed to detect the percentages of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. The hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to observe the colonic histopathologic changes. Western blotting was used to detect the RIP1, RIP3 and NLRP3 protein levels in colon tissues. **Results** Compared with the normal group, the serum IL-4 and TNF- α levels, and the RIP1, RIP3 and NLRP3 protein levels of colon tissues in the model group, western medicine group, Qingchi Powder low-dose group and Qingchi Powder high-dose group were elevated ($P < 0.05$), serum IFN- γ level and CD4⁺ and CD8⁺ T cell percentages were decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the serum IL-4 and TNF- α levels, and the colon tissues RIP1, RIP3 and NLRP3 protein levels in the western medicine group, Qingchi Powder low-dose group and Qingchi Powder high-dose group were decreased ($P < 0.05$), and the IFN- γ levels and CD4⁺, CD8⁺ T cell percentages were increased ($P < 0.05$). Compared with the western medicine group and Qingchi Powder low-dose group, the serum IL-4 and TNF- α levels, and the colon tissues RIP1, RIP3 and NLRP3 protein levels in the Qingchi Powder high-dose group were decreased ($P < 0.05$), serum IFN- γ levels and CD4⁺, CD8⁺ T cell percentages were increased ($P < 0.05$). The serum IL-4, TNF- α and IFN- γ levels, and CD4⁺, CD8⁺ T cell percentages as well as the colon tissue RIP1, RIP3 and NLRP3 protein levels had no statistical difference between the western medicine group and Qingchi Powder low-dose group ($P > 0.05$). Compared with the normal group, the Lactobacillus abundance in the model, western medicine group, Qingchi Powder low-dose group and Qingchi Powder high-dose group was decreased ($P < 0.05$), while the Bifidobacterium abundance was increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the Lactobacillus abundance in the western medicine group, Qingchi Powder low-dose group and Qingchi Powder high-dose group was increased ($P < 0.05$), while the Bifidobacterium abundance in the Qingchi Powder high-dose group was decreased ($P < 0.05$). Compared with the western medicine group and Qingchi Powder low-dose group, the Lactobacillus abundance in the Qingchi Powder high-dose group was increased ($P < 0.05$). The Lactobacillus abundance and Bifidobacterium abundances had no statistically significant differences between the western medicine group and Qingchi Powder low-dose group ($P > 0.05$). HE staining of colon tissue showed that compared with the normal group, the rat colonic tissue morphologic abnormality in the model group, western medicine group, Qingchi Powder low-dose group and Qingchi Powder high-dose group was significant; compared with the model group, the colonic tissue morphology in the western medicine group, Qingchi Powder low-dose group and Qingchi Powder high-dose group was significantly improved, moreover which in the Qingchi Powder high-dose group was optimal, the intestinal mucosa was relatively intact, the glands are arranged more neatly and the inflammatory infiltration was greatly reduced. **Conclusion** Qingchi Powder could effectively balance the intestinal flora and improve the immune function, moreover showing the dose-dependent manner, it is speculated that the mechanism may be related with the inhibition of RIP1/RIP3/NLRP3 signaling pathway.

Key words: Qingchi Powder; ulcerative colitis; receptor-interacting protein kinase 1; receptor-interacting protein kinase 3; intestinal flora

近年来,溃疡性结肠炎(UC)的发病率逐渐增加,已成为全球范围内的常见疾病,其发病遍布各个年龄段,但随年龄的增长以及机体各器官功能衰退, ≥ 50 岁人群患病率偏高^[1-2]。UC的病因尚不完全清楚,但免疫系统异常反应和肠道菌群失衡被认为是其主要发生机制之一。

UC患者往往伴随肠道菌群失调、免疫功能紊乱等,包括菌群多样性降低、某些具有益生菌特性的菌群减少、免疫细胞异常激活、调节性T细胞功能失衡、免疫耐受机制紊乱等^[3]。受体作用相互蛋白激酶1(RIP1)/受体作用相互蛋白激酶3(RIP3)信号通路在

自噬通量中起重要作用,能够控制细胞凋亡、坏死和炎症反应等生物学过程^[4]。目前已有研究发现RIP1/RIP3信号通路参与了心脑血管疾病、肠道炎症等的发生与发展^[5]。有研究发现在炎症性病变的结肠组织中,RIP1、RIP3、NOD样受体蛋白3(NLRP3)呈现高表达状态^[6]。在中医学领域,UC属于“泄泻”“腹痛”“肠风”“肠僻”的病症范畴,治疗时应以清热解毒、燥湿止痢为主^[7]。青赤散组方中包括赤石脂、炉甘石、苦参、黄柏、青黛、白及、三七粉、儿茶8味中药,具有燥湿解热、化腐生肌的功效。目前青赤散在UC治疗方面已取得一定效果,但其治疗机制尚不明确,因此本研

究通过建立 UC 大鼠模型研究青赤散抗 UC 的具体作用机制,进一步揭示 UC 的发病机制,为 UC 及其他相关炎症性肠道疾病的治疗提供借鉴和参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物 50 只健康 SD 成年 Wistar 雄性大鼠,体质量(200 ± 15)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物许可证号:SCXK(湘)2020-0002。5 只大鼠 1 个笼子,温度在(23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 50%~60%,动物饲养环境恒温、恒湿,条件光照(12 h),饮水与摄食自由,所有大鼠适应性喂养 3 d 后进行实验。实验过程中对动物处理均符合动物伦理标准。本实验委托河北医科大学动物实验室完成,实验经河北医科大学动物伦理委员会批准(HB20230179)。

1.2 药物制备 青赤散:赤石脂 60 g,炉甘石、苦参、黄柏各 30 g,青黛、白及各 10 g,三七粉、儿茶各 6 g。加水没过赤石脂、炉甘石后煎 30 min,加入黄柏、苦参浓煎 30 min 后去渣加入青黛、白及、三七粉、儿茶继续水煎,制备成生药量 2.5 g/mL 的青赤散药液。上述各药材取自本院中药房,由中医药鉴定室鉴定。

1.3 主要仪器与试剂 仪器:荧光酶标仪(美国 Molecular Device 公司,型号:SpectraMax Gemini EM);全自动生化分析仪(山东博科公司,型号:BK-1200);酶标分析仪(Rayto RT-6100);TDZ4-WS 型低速离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);流式细胞仪(德祥科技有限公司,型号:CytoQuant);LED 数显圆周摇床(美国赛洛捷克公司,型号:SLK-O3000-S);DYCP-31E 型电泳仪(上海新诺仪器设备有限公司);旋转蒸发器(德国 INNOTECH 公司,型号:ScienceOne Vap Smart)。试剂:戊巴比妥钠(上海上药新亚药业有限公司,生产批号:国药准字 H31021725);白细胞介素-6(IL-6)、干扰素 γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司,货号:EK306HS、70-EK380、70-EK382HS-48);磷酸盐缓冲液(PBS, MyBioSource 公司,货号:MBS545501-C);5% 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)溶液(上海源叶生物科技有限公司,货号:R41119);红细胞裂解液(北京伊塔生物科技有限公司,货号:SY0720);RIP1 一抗(北京百奥创新科技有限公司,货号:603351)、RIP3(武汉菲恩生物科技有限公司,货号:FNab07312;1:1 000)、NLRP3 一抗(美国 GeneTex 公司,货号:GTX133569;1:1 000)、 β -action 一抗(美国艾美捷科技有限公司,货号:BS8467);辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 二抗(碧云天生物科技有限公司,货号:A0208);BCA 定量试剂盒(Pierce 公司,货号:23225);HE 试剂盒(北京伊塔生物科技有限公司,货号:C0105S)。

1.4 动物分组建模、治疗及标本收集 将 50 只大鼠随机分为正常组、模型组、西药组、青赤散低剂量组、青赤散高剂量组 5 组。除正常组外,其他各组大鼠均建立 UC 大鼠模型^[8]。戊巴比妥钠(40 mg/kg,浓度

1%)麻醉大鼠并固定后,通过灌肠管于大鼠肛门 7 cm 处灌入灌肠液(100 mg/kg TNBS+等容积 50%乙醇),捏紧肛门后倒置 3 min,1 次/d,持续 7 d。造模过程中各组大鼠禁水不禁食。造模 7 d 后,大鼠出现明显的腹泻、便血,体质量下降,UC 疾病活动指数(DAI)^[9]增加,表明 UC 模型建立成功。

建模成功后,参考临床青赤散(灌肠 3.12 g/kg 生药)及美沙拉嗪(口服 3 g/d)剂量^[10],根据人与大鼠等效剂量换算,西药组以 0.31 g/(kg·d)美沙拉嗪灌胃,青赤散低、高剂量组分别以 19.50、38.99 g/(kg·d)生药量青赤散药液灌肠,正常组、模型组以等剂量无菌水灌肠,2 次/d,各组均持续治疗 7 d。

末次给药 12 h 后,留取大鼠新鲜粪便低温保存备用,使用戊巴比妥钠(40 mg/kg,浓度 1%)麻醉大鼠并固定后,取腹部主动脉血 4 mL,低温保存。大鼠处死后分离结肠,冲洗后纵向剖开,切取下距肛缘 8 cm 处病变结肠组织分成 2 份,一份固定于甲醛中,另一份于液氮中低温保存备用。

1.5 炎症因子检测 取 2 mL 低温保存的血液,离心(3 000 r/min $\times$ 10 min)后采用 ELISA 分别检测各组大鼠血清 IL-4、IFN- γ 、TNF- α 水平。

1.6 16S rDNA 检测肠道菌群 用 DNA 试剂盒提取各组粪便中的基因组 DNA,以 341F 和 805R 为引物,对 V3~V4 区域进行 PCR 扩增后将其产物电泳并引入 Illumina 桥式 PCR 兼容引物再次扩增,纯化后回收目标进行数据库测序对比。341F: 5'-CCCTACAC-GACGCTCTTCCGATCTG (barcode) CCTACGG-GNGGCWGCAG-3'; 805R: 5'-GACTGGAGTTCC-TTGGCAGCCGAGAATTCCAGACTACHVGGGT-ATCTAATCC-3'。

1.7 免疫功能检测 将 CD4⁺、CD8⁺ 单克隆抗体 10 μL 加入 120 μL 血液中于室温下孵育 20 min。加入红细胞裂解液裂解 10 min 后离心(1 500 r/min $\times$ 5 min),弃上清液,PBS 冲洗后加入 1% 甲醛溶液固定,流式细胞仪检测 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞百分比。

1.8 结肠组织 HE 染色 取出甲醛中固定的各组结肠组织标本,48 h 后以常规方法进行石蜡包埋切片(5 μm),HE 染色后在光学显微镜(100 $\times$)下观察结肠组织形态变化。

1.9 结肠组织 RIP1、RIP3、NLRP3 蛋白表达 取出保存在液氮中的各组结肠组织标本并提取组织总蛋白,采用 BCA 法测蛋白浓度。取 50 μg 蛋白,电泳后分离,半干转膜,室温下摇床孵育 1 h 后,加入相应的一抗 RIP1(1:1 000)、RIP3(1:1 000)、NLRP3(1:1 000)、 β -action(1:2 000),低温摇床孵育 12 h。室温下 TBST 洗膜(10 min/次 $\times$ 3 次),加入二抗(1:5 000),室温摇床孵育 1 h 后,TBST 洗涤(10 min/次 $\times$ 3 次),ECL 化学发光法显影,以 β -action 为内参,ImageJ 软件分析蛋白表达。

1.10 统计学处理 采用 GraphPad Prism8 进行数

据处理,呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 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 LSD-*t* 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠血清 IFN- γ 、IL-4、TNF- α 水平比较
与正常组比较,模型组、西药组、青赤散低剂量组、青赤散高剂量组大鼠血清 IL-4、TNF- α 水平均升高 ($P < 0.05$),IFN- γ 水平均降低 ($P < 0.05$);与模型组

比较,西药组、青赤散低剂量组、青赤散高剂量组大鼠血清 IL-4、TNF- α 水平均降低 ($P < 0.05$),IFN- γ 水平均升高 ($P < 0.05$);与西药组、青赤散低剂量组比较,青赤散高剂量组 IL-4、TNF- α 水平均降低 ($P < 0.05$),IFN- γ 水平均升高 ($P < 0.05$);与青赤散低剂量组比较,西药组血清 IL-4、TNF- α 、IFN- γ 水平差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠血清 IFN- γ 、IL-4、TNF- α 水平比较 ($n = 10, \bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	IFN- γ	IL-4	TNF- α
正常组	54.58 $\pm$ 5.74	8.74 $\pm$ 0.82	27.52 $\pm$ 4.63
模型组	21.52 $\pm$ 2.69 ^a	43.73 $\pm$ 4.69 ^a	112.85 $\pm$ 5.87 ^a
西药组	30.24 $\pm$ 3.28 ^{ab}	26.88 $\pm$ 3.58 ^{ab}	86.49 $\pm$ 4.75 ^{ab}
青赤散低剂量组	31.17 $\pm$ 3.55 ^{ab}	27.16 $\pm$ 3.70 ^{ab}	87.53 $\pm$ 5.06 ^{ab}
青赤散高剂量组	45.69 $\pm$ 4.91 ^{abcd}	17.05 $\pm$ 4.08 ^{abcd}	44.19 $\pm$ 4.27 ^{abcd}
<i>F</i>	100.300	130.300	497.900
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.05$;与西药组相比,^c $P < 0.05$;与青赤散低剂量组相比,^d $P < 0.05$ 。

2.2 各组大鼠肠道菌群丰度比较
与正常组比较,模型组、西药组、青赤散低剂量组、青赤散高剂量组大鼠乳杆菌属丰度均降低 ($P < 0.05$),双歧杆菌属丰度均升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,西药组、青赤散低剂量组、青赤散高剂量组大鼠乳杆菌属丰度均升高 ($P < 0.05$),青赤散高剂量组双歧杆菌属丰度降低 ($P < 0.05$);与西药组、青赤散低剂量组比较,青赤散高剂量组乳杆菌属丰度均升高 ($P < 0.05$);西药组、青赤散低剂量组乳杆菌属、双歧杆菌属丰度比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠肠道菌群丰度比较 ($n = 10, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	乳杆菌属	双歧杆菌属
正常组	55.08 $\pm$ 8.14	0.21 $\pm$ 0.04
模型组	23.65 $\pm$ 4.96 ^a	5.57 $\pm$ 1.21 ^a
西药组	30.78 $\pm$ 5.14 ^{ab}	4.58 $\pm$ 1.46 ^a
青赤散低剂量组	31.25 $\pm$ 5.28 ^{ab}	4.49 $\pm$ 1.74 ^a
青赤散高剂量组	40.66 $\pm$ 7.53 ^{abcd}	3.69 $\pm$ 1.02 ^{ab}
<i>F</i>	36.390	27.850
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:与正常组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.05$;与西药组相比,^c $P < 0.05$;与青赤散低剂量组相比,^d $P < 0.05$ 。

2.3 各组大鼠免疫功能比较
与正常组比较,模型组、西药组、青赤散低剂量组、青赤散高剂量组大鼠血清 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞百分比均降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,西药组、青赤散低剂量组、青赤散高剂量组大鼠 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞百分比均升高 ($P < 0.05$);与西药组、青赤散低剂量组比较,青赤散高剂量组 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞百分比升高 ($P < 0.05$);西

药组 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞百分比与青赤散低剂量组比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠免疫功能比较 ($n = 10, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	CD4 ⁺ T 细胞	CD8 ⁺ T 细胞
正常组	69.78 $\pm$ 7.42	30.15 $\pm$ 2.69
模型组	26.14 $\pm$ 5.83 ^a	15.82 $\pm$ 1.84 ^a
西药组	42.45 $\pm$ 5.16 ^{ab}	23.69 $\pm$ 2.06 ^{ab}
青赤散低剂量组	42.39 $\pm$ 5.28 ^{ab}	23.45 $\pm$ 2.14 ^{ab}
青赤散高剂量组	57.39 $\pm$ 4.81 ^{abcd}	26.71 $\pm$ 2.62 ^{abcd}
<i>F</i>	82.640	53.440
<i>P</i>	<0.001	<0.001

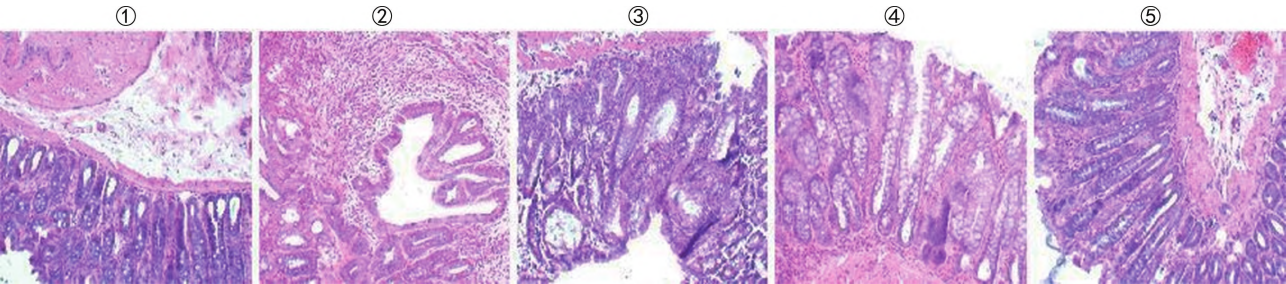
注:与正常组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.05$;与西药组相比,^c $P < 0.05$;与青赤散低剂量组相比,^d $P < 0.05$ 。

2.4 各组大鼠结肠组织 HE 染色
结肠组织 HE 染色结果显示:正常组肠黏膜形态完整,腺体排列有序;模型组肠壁纤维化严重,腺体排列紊乱,细胞间可见大量炎症浸润;与正常组比较,模型组、西药组、青赤散低剂量组、青赤散高剂量组大鼠结肠组织形态明显异常;与模型组比较,西药组、青赤散低剂量组、青赤散高剂量组结肠组织形态有明显改善,且青赤散高剂量组形态最佳,肠黏膜较为完整,腺体排列较为整齐,炎症细胞浸润大大减少。见图 1。

2.5 各组大鼠结肠组织 RIP1、RIP3、NLRP3 蛋白水平比较
与正常组比较,模型组、西药组、青赤散低剂量组、青赤散高剂量组大鼠结肠组织 RIP1、RIP3、NLRP3 蛋白水平均升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,西药组、青赤散低剂量组、青赤散高剂量组大鼠结肠组织 RIP1、RIP3、NLRP3 蛋白水平均降低 ($P <$

0.05);与西药组、青赤散低剂量组比较,青赤散高剂量组结肠组织 RIP1、RIP3、NLRP3 蛋白水平均降低($P<0.05$);西药组大鼠结肠组织 RIP1、RIP3、NL-

RP3 蛋白水平与青赤散低剂量组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 4 和图 2。

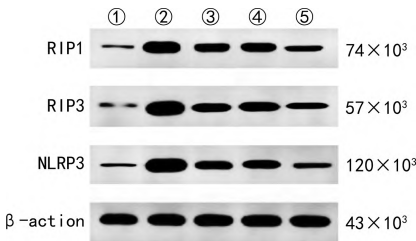


注:①正常组;②模型组;③西药组;④青赤散低剂量组;⑤青赤散高剂量组。
图 1 各组大鼠结肠组织 HE 染色(100×)

表 4 各组大鼠结肠组织 RIP1、RIP3、NLRP3 蛋白水平比较($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	RIP1 蛋白	RIP3 蛋白	NLRP3 蛋白
正常组	0.29±0.07	0.37±0.08	0.20±0.07
模型组	0.63±0.14 ^a	0.68±0.09 ^a	0.81±0.16 ^a
西药组	0.52±0.13 ^{ab}	0.59±0.08 ^{ab}	0.60±0.10 ^{ab}
青赤散低剂量组	0.51±0.11 ^{ab}	0.58±0.10 ^{ab}	0.62±0.12 ^{ab}
青赤散高剂量组	0.40±0.09 ^{abcd}	0.48±0.12 ^{abcd}	0.43±0.09 ^{abcd}
F	13.600	15.510	41.720
P	<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与西药组相比,^c $P<0.05$;与青赤散低剂量组相比,^d $P<0.05$ 。



注:①正常组;②模型组;③西药组;④青赤散低剂量组;⑤青赤散高剂量组。
图 2 各组大鼠结肠组织 RIP1、RIP3、NLRP3 蛋白表达

3 讨 论

UC 是一种常见的慢性非特异性炎症性肠病,其特点是结肠黏膜的慢性炎症,具有病程迁延、反复发作等特征,严重影响患者日常生活和身心健康,流行病学调查显示,我国 UC 发病率约为 11.6/10 万人,且有逐年升高的趋势^[11]。青赤散中的青黛、儿茶等成分具有消炎抗菌等作用,通过灌肠的形式直接接触病灶,有利于 UC 患者康复,以下着重探讨其作用机制。

在本研究中,经过青赤散干预的 UC 大鼠血清 IFN- γ 、IL-4、TNF- α 等炎症因子显著减少,免疫功能得到有效改善,且青赤散高剂量组效果最佳,说明青赤散具有抗炎、平衡免疫功能的作用。UC 与免疫系统的异常反应、肠道菌群失调等因素有关。由于大量炎症细胞浸润、炎症介质的过度堆积等,导致 UC 患者血清中炎症因子水平异常升高,巨噬细胞的吞噬能力增强,细胞毒性 T 细胞活性增加,B 细胞免疫功能异常。CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞是免疫系统中 2

个重要的细胞亚群,对于维持免疫系统的平衡起着重要的调节作用。王海燕等^[12]的研究发现结肠炎小鼠外周血中 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞百分比均降低。青赤散中的药物成分能够抑制免疫细胞的活化、增殖和分泌细胞因子的过程,恢复免疫系统的平衡。冀建斌等^[13]对 UC 大鼠进行中西医结合治疗,分别给予青赤散与美沙拉嗪灌肠液,发现二者治疗效果相当,研究中所用的青赤散剂量为生药量 19 g/kg,与本研究青赤散低剂量组用药剂量[19.50 g/(kg·d)]接近,研究结果与本研究类似。而本研究中青赤散低剂量组与西药组治疗效果相当,提示高剂量青赤散治疗效果或更佳。

一项关于青赤散保留灌肠治疗 UC 的网络药理学研究表明,青赤散保留灌肠治疗 UC 的 27 个核心靶点涉及抑制炎症反应、保护肠黏膜屏障、平衡肠道菌群等多个方面^[14]。周正华等^[15]观察了青赤散对 UC 模型大鼠肠道菌群及免疫平衡的影响,发现青赤散灌肠干预后,大鼠肠道中菌群多样性明显提升,调节性 T 细胞/辅助性 T 细胞 17 平衡有明显改善。李宣泽^[16]的研究中同样证实了青赤散的抗炎作用,证实青赤散灌肠对于 UC 的治疗效果佳。

RIP1/RIP3/NLRP3 信号通路的持续激活会导致肠道屏障功能受损。RIP1、RIP3 是细胞内重要的信号分子,UC 过程中 RIP1 和 RIP3 相互作用,激活下游信号 NLRP3 蛋白,刺激炎症介质生成。本研究发现,高剂量的青赤散灌肠可有效改善 UC 大鼠肠道菌群平衡,降低结肠组织中 RIP1、RIP3、NLRP3 蛋白水

平。UC 过程中,炎症介质大量堆积导致肠道菌群失衡,有益菌减少。周正华等^[17]的研究结果表明青赤散灌肠有利于减轻 UC 大鼠炎症反应,认为青赤散灌肠具有活血化瘀、敛疮生肌的功效,有助于修复肠道黏膜屏障,为肠道有益菌提供有利的生存环境。有研究表明 RIP1/RIP3/NLRP3 通路活化与 UC 的发生、发展密切相关^[18]。在本研究中,经过青赤散灌肠干预后,UC 大鼠结肠组织形态明显改善,结肠组织中 RIP1、RIP3、NLRP3 蛋白表达水平显著降低,且青赤散高剂量组效果最佳,推测青赤散可能通过抑制 RIP1/RIP3/NLRP3 信号通路改善 UC 大鼠肠道菌群平衡以及免疫功能,减轻炎症反应,进而起到治疗 UC 的作用,且呈现剂量依赖性。马玲玲等^[19]的研究中发现青赤散可通过平衡 UC 大鼠肠道菌群改善其肠黏膜的通透性,进而起到肠道保护作用,认为青赤散可能通过调节肠道的巨噬细胞、树突状细胞等免疫细胞的表型和功能,改善肠黏膜通透性,进而间接抑制 RIP1/RIP3/NLRP3 信号通路激活。青赤散中的有效成分也可能直接作用于 RIP1、RIP3 或 NLRP3,抑制其活性,减少炎症介质的释放,减轻肠道炎症反应。有研究表明经过青赤散治疗后的 UC 大鼠 NLRP3 蛋白表达降低,炎症反应被抑制^[20]。若青赤散能够有效地调控 RIP1/RIP3/NLRP3 信号通路,那么它将成为一种新的治疗 UC 的药物,与传统的治疗药物相比,青赤散可能具有多成分、多靶点的作用优势,能够更全面地调节肠道的免疫功能和抑制炎症反应,提高治疗的有效性和针对性,对于 UC 治疗、复发预防及改善预后均有积极作用。

综上所述,青赤散灌肠能有效改善 UC 模型大鼠的免疫功能及肠道菌群,减轻炎症反应并抑制结肠组织中 RIP1、RIP3、NLRP3 蛋白表达,对 UC 大鼠结肠组织存在保护作用,且呈现剂量依赖性,推测其作用机制可能是通过调节 RIP1/RIP3/NLRP3 信号通路保护 UC 大鼠结肠组织。

参考文献

- [1] 吴美玉,黄永德,陈建兴,等. 康复新液、地衣芽孢杆菌及美沙拉嗪联合对活动期溃疡性结肠炎疗效及对 IL-23、IL-17、氧自由基、肠道菌群的改善作用[J]. 解放军医药杂志, 2020, 32(2): 79-83.
- [2] HE S, ZHANG T, WANG Y Y, et al. Isofraxidin attenuates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis through inhibiting pyroptosis by upregulating Nrf2 and reducing reactive oxidative species [J]. Int Immunopharmacol, 2024, 128: 111570.
- [3] PABLA B S, SCHWARTZ D A. Assessing severity of disease in patients with ulcerative colitis [J]. Gastroenterol Clin North Am, 2020, 49(4): 671-688.
- [4] SHI K Y, ZHANG J F, ZHOU E D, et al. Small-Molecule Receptor-Interacting protein 1 (RIP1) inhibitors as therapeutic agents for multifaceted diseases: current medicinal chemistry insights and emerging opportunities [J]. J Med Chem, 2022, 65(22): 14971-14999.
- [5] LIU Y P, LIU T, LEI T T, et al. RIP1/RIP3-regulated necroptosis as a target for multifaceted disease therapy [J]. Int J Mol Med, 2019, 44(3): 771-786.
- [6] WU C, YANG H J, HAN C P, et al. Quyu shengxin decoction alleviates DSS-induced ulcerative colitis in mice by suppressing RIP1/RIP3/NLRP3 signalling [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 6682233.
- [7] 顾世坦,周正华,赵帅. 从痢疾论治溃疡性结肠炎 [J]. 天津中医药大学学报, 2023, 42(3): 292-296.
- [8] 唐逢雨,仇坤,周利梅,等. 土木香内酯生物黏附微球的制备及其对溃疡性结肠炎模型大鼠的药效评价 [J]. 中国药理学杂志, 2023, 58(19): 1759-1768.
- [9] 牟永旭,闵冬雨,李室箕,等. 半夏泻心汤对溃疡性结肠炎大鼠 PI3K/Akt 信号通路及炎症因子表达的影响与分子机制 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(9): 29-32.
- [10] 周正华,岳妍,王威,等. 青赤散保留灌肠联合口服美沙拉嗪治疗溃疡性结肠炎临床观察 [J]. 天津中医药, 2016, 33(12): 719-722.
- [11] VOSKENS C, STOICA D, ROSENBERG M, et al. Autologous regulatory T-cell transfer in refractory ulcerative colitis with concomitant primary sclerosing cholangitis [J]. Gut, 2023, 72(1): 49-53.
- [12] 王海燕,葛巍,刘素萍,等. 左金丸对结肠炎小鼠外周血 CD45RA⁺ CD62L⁺ CCR7⁺ T 细胞及其 CD4⁺、CD8⁺ 亚群的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(5): 2384-2388.
- [13] 冀建斌,周正华,李琳,等. 青赤散灌肠对溃疡性结肠炎大鼠血清 LPS、TNF- α 及结肠上皮细胞凋亡的影响 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2017, 25(12): 939-942.
- [14] 赵帅,周正华. 青赤散保留灌肠治疗左半结肠型溃疡性结肠炎的网络药理学研究 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2021, 21(12): 1425-1433.
- [15] 周正华,冀建斌,康洪昌,等. 青赤散对溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群及 Treg/Th17 免疫平衡的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(8): 4438-4442.
- [16] 李宜泽. 青赤散灌肠对溃疡性结肠炎小鼠 IL-1 β 、IL-6 的影响研究及周正华从“毒”论治溃疡性结肠炎 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2021.
- [17] 周正华,冀建斌. 中医药整体与局部相结合辨治溃疡性结肠炎 [J]. 北京中医药, 2020, 39(3): 196-199.
- [18] 吴闯,韩昌鹏,汪庆明,等. 基于 RIP1/RIP3/NLRP3 信号通路探讨祛瘀生新方治疗溃疡性结肠炎小鼠的作用机制 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2021, 29(2): 117-123.
- [19] 马玲玲,冀建斌. 青赤散灌肠对溃疡性结肠炎小鼠肠黏膜通透性的改善作用及其机制 [J]. 山东医药, 2021, 61(33): 24-29.
- [20] ZHENG HUA Z, JIANBIN J I, HONGXIA W, et al. Qingchi San treats ulcerative colitis in mice by inhibiting the nuclear factor-kappa B signaling pathway and Nucleotide-binding oligomerization domain, leucine-rich repeat and pyrin domain-containing 3 inflammasome formation [J]. J Tradit Chin Med, 2023, 43(1): 68-77.

(收稿日期: 2024-06-27 修回日期: 2025-03-21)