

• 论 著 •

柴胡皂苷 A 调节 MLCK/MLC2 信号通路对 SAP 大鼠肠损伤的影响

孙 兵¹, 陶 韬^{2△}

重庆大学附属涪陵医院:1. 重症医学科;2. 呼吸与危重症医学科, 重庆 408000

摘 要:**目的** 探讨柴胡皂苷 A 调节肌球蛋白轻链激酶(MLCK)/肌球蛋白轻链 2(MLC2)信号通路对重症急性胰腺炎(SAP)大鼠肠损伤的影响。**方法** 随机选择 10 只大鼠作为假手术组,其余大鼠注射牛磺胆酸钠溶液构建 SAP 大鼠模型。将造模成功的 SAP 大鼠模型随机平分为 SAP 组、柴胡皂苷 A 组(腹腔注射 10.0 mg/kg 的柴胡皂苷 A)、iE-DAP 组(腹腔注射 3.5 mg/kg MLCK/MLC2 通路激活剂 iE-DAP)、柴胡皂苷 A+iE-DAP 组(腹腔注射 10.0 mg/kg 柴胡皂苷 A+3.5 mg/kg iE-DAP),每组均 10 只大鼠,每天 1 次,连续注射 1 周,假手术组和 SAP 组注射等量生理盐水。酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各组大鼠血清淀粉酶(AMY)、脂肪酶(LIP)、二胺氧化酶(DAO)、白细胞介素(IL)-1β、IL-6 和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平;HE 染色检测各组大鼠回肠组织病理形态变化。ELISA 检测各组大鼠回肠组织中氧化应激指标水平。蛋白质免疫印迹检测肠道屏障相关蛋白及 MLCK/MLC2 通路相关蛋白表达。**结果** 与 SAP 组相比,柴胡皂苷 A 组 AMY、LIP、DAO、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平显著降低,而 iE-DAP 组 AMY、LIP、DAO、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 SAP 组相比,柴胡皂苷 A 组大鼠回肠组织结构得到改善,回肠组织病理评分显著降低($P<0.05$)。与 SAP 组相比,柴胡皂苷 A 组谷胱甘肽、超氧化物歧化酶水平显著升高,丙二醛水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 SAP 组相比,柴胡皂苷 A 组 MLCK、p-MLC2/MLC2 蛋白水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 柴胡皂苷 A 可能通过下调 MLCK/MLC2 信号通路对 SAP 大鼠肠损伤起到改善作用。

关键词:柴胡皂苷 A; 肌球蛋白轻链激酶/肌球蛋白轻链 2 信号通路; 重症急性胰腺炎; 肠损伤
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2024.04.015 **中图法分类号:**R285.5
文章编号:1673-4130(2024)04-0462-05 **文献标志码:**A

Effect of saikosaponin A regulating MLCK/MLC2 signaling pathway
on intestinal injury in SAP rats
SUN Bing¹, TAO Tao^{2△}

1. Department of Critical Care Medicine; 2. Department of Respiratory and Critical
Care Medicine, Fuling Hospital Affiliated to Chongqing University, Chongqing 408000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of saikosaponin A regulating myosin light chain kinase (MLCK)/myosin light chain 2 (MLC2) signaling pathway on intestinal injury in rats with severe acute pancreatitis (SAP). **Methods** A total of 10 rats were randomly selected as sham operation group, and the other rats were injected with sodium taurine cholate solution to construct SAP rat model. SAP rat models were randomly divided into SAP group, saikosaponin A group (10.0 mg/kg intraperitoneal injection of saikosaponin A) and iE-DAP group (3.5 mg/kg intraperitoneal injection of MLCK/MLC2 pathway activator iE-DAP), saikosaponin A+iE-DAP group (intraperitoneally injected with 10.0 mg/kg saikosaponin A+3.5 mg/kg iE-DAP), 10 rats in each group were injected once a day for 1 week, sham operation group and SAP group were injected with the same amount of normal saline. The serum levels of amylase (AMY), lipase (LIP), diamine oxidase (DAO), interleukin (IL)-1β, IL-6 and tumor necrosis factor-α (TNF-α) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). HE staining was used to detect the pathological morphology of ileum tissue in each group. The levels of oxidative stress indexes in ileum tissue were detected by ELISA. Intestinal barrier related proteins and MLCK/MLC2 pathway related proteins were detected by western blot. **Results** Compared with SAP group, the levels of AMY, LIP, DAO, IL-1β, IL-6 and TNF-α in saikosonin A group were significantly decreased, while the levels of AMY, LIP, DAO, IL-1β, IL-6 and TNF-α in iE-DAP group were significantly increased, with statistical significance ($P<0.05$). Compared with SAP group, the structure of ileum tissue was improved and the pathological score of ileum tissue was significantly decreased in SA group ($P<0.05$). Com-

作者简介:孙兵,男,主治医师,主要从事重症脓毒血症研究。△ 通信作者,E-mail:taotao19870221@163.com。

pared with SAP group, the levels of glutathione and superoxide dismutase in SA group were significantly increased, and the levels of malondialdehyde were significantly decreased in SA group, with statistical significance ($P < 0.05$). Compared with SAP group, the protein levels of MLCK, p-MLC2/MLC2 in SA group were significantly decreased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Saikosaponin A may improve intestinal injury in SAP rats by down-regulating the MLCK/MLC2 signaling pathway.

Key words: saikosaponin A; myosin light chain kinase/myosin light chain 2 signaling pathway; severe acute pancreatitis; intestinal injury

急性胰腺炎(AP)是胃肠道疾病的主要并发症, 15%~20% AP 患者会发生重症急性胰腺炎(SAP), SAP 会引发和加剧全身炎症反应^[1]。SAP 发展会导致炎症细胞因子的释放, 从而导致肠屏障损伤, 除此之外, 还增加肠道通透性, 促进细菌感染, 导致肠道屏障受损^[2]。因此, 防治 SAP 诱导的肠损伤对于治疗 SAP 具有重要意义。柴胡皂苷 A 是一种三萜类皂苷, 具有许多药理学特性, 包括抗炎和抗氧化作用^[3]。柴胡皂苷 A 是清一汤的主要成分, 而清一汤在中国用于 SAP 的治疗已有数十年, 近期发现, 清一汤可以对 SAP 引起的肠黏膜损伤发挥保护作用^[4]。LI 等^[5]研究发现, 柴胡皂苷 A 可以通过调节肠道微生物群变化减缓大鼠 SAP 进展的作用, 但是关于柴胡皂苷 A 在 SAP 大鼠肠损伤上的作用机制鲜少报道。肌球蛋白轻链激酶(MLCK)/肌球蛋白轻链 2(MLC2)信号通路是肠道炎症损伤研究的重要通路之一, 有研究报道, 下调 MLCK/MLC2 信号通路可以减轻炎症, 改善肠道屏障损伤进而治疗肠易激综合征大鼠^[6]。本研究旨在探讨柴胡皂苷 A 调节 MLCK/MLC2 信号通路对 SAP 大鼠肠损伤的影响。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6 周龄雄性 SPF 级 SD 雄性大鼠 (220±20)g, 生产许可证号: SCXK(粤)2021-0059, 购自广州锐格生物科技有限公司, 本研究严格遵循动物实验学的 3R 原则。

1.2 仪器与试剂 柴胡皂苷 A 购自成都瑞芬思德丹生物科技有限公司; MLCK/MLC2 通路激活剂 iE-DAP 购自北京达科为生物技术有限公司; 白细胞介素(IL)-1 β 试剂盒、IL-6 试剂盒、脂肪酶(LIP)试剂盒、二胺氧化酶(DAO)试剂盒、谷胱甘肽(GSH)试剂盒购自博辉生物科技(广州)有限公司; 淀粉酶(AMY)试剂盒购自上海江莱生物科技有限公司; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 丙二醛(MDA)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒购自上海广锐生物科技有限公司; 紧密连接蛋白-1(Zo-1)、闭锁蛋白(occludin)、MLCK、磷酸化 MLC2(p-MLC2)、MLC2 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)等抗体均购自 Abcam 公司。

1.3 动物模型及分组 随机选择 10 只大鼠作为假手术组, 其他大鼠参考文献^[7]建立 SAP 大鼠模型, 脱毛后, 用 2% 戊巴比妥钠腹腔内麻醉大鼠, 剂量为

30.0 mg/kg, 并固定在手术台上。剖腹手术后, 将 1 mL 注射器缓慢插入胰胆管, 注入 5% 牛磺胆酸钠溶液, 以 0.1 mL/min 的注射速率注入大鼠胰腺组织。然后, 拔出针头, 逐层封闭腹腔。当大鼠出现毛发暗淡、呼吸急促、喘息、肺部听诊杂音、血清 AMY 水平明显升高等症状时, 表明 SAP 大鼠模型构建成功。假手术组除不注射牛磺胆酸钠溶液到胰胆管外, 其他步骤相同。将构建成功的 SAP 大鼠模型随机平分为 SAP 组、柴胡皂苷 A 组(腹腔注射 10.0 mg/kg 的柴胡皂苷 A)、iE-DAP 组(腹腔注射 3.5 mg/kg MLCK/MLC2 通路激活剂 iE-DAP)、柴胡皂苷 A+iE-DAP 组(腹腔注射 10.0 mg/kg 柴胡皂苷 A+3.5 mg/kg iE-DAP), 每组均 10 只大鼠^[5,8-9]。假手术组和 SAP 组注射等量生理盐水。每天 1 次, 连续注射 1 周。

1.4 标本采集 药物处理结束 12 h 后, 将大鼠麻醉, 通过腹主动脉收集 3 mL 血液, 经离心机 3 000 r/min 离心 20 min, 获得血清用于酶联免疫吸附试验(ELISA)检测。随后, 将大鼠处死收集回肠组织, 一部分回肠组织固定于 4% 多聚甲醛中用于 HE 染色, 一部分回肠组织保存在-80℃冰箱用于 ELISA 检测及蛋白质免疫印迹(Western blot)检测。

1.5 各组血清 AMY、LIP、DAO、炎症因子水平检测 使用 ELISA 试剂盒检测各组血清 AMY、LIP、DAO 水平及 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平。

1.6 HE 染色检测各组大鼠回肠组织病理变化 将固定在 4% 多聚甲醛的各组大鼠回肠组织标本包埋在石蜡中, 用旋转切片机切成 4 μ m 薄片, 切片用 1% 苏木精和 1% 伊红染料染色后在光学显微镜下观察各组大鼠回肠组织病理形态。各组大鼠回肠组织病理评分采用 Chiu 评分法, 最高评分为 5 分, 具体评分标准: 0 分为黏膜绒毛正常; 1 分为出现充血堵塞现象; 2 分为上皮间隙延伸, 上皮层从固有层适度抬起; 3 分为绒毛侧面有大量上皮隆起; 4 分为绒毛脱落, 固有层和扩张的毛细血管暴露; 5 分为固有层消化和崩解, 出血和溃疡^[10]。

1.7 ELISA 法检测各组大鼠回肠组织氧化应激指标水平 收集上述保存在-80℃冰箱的各组大鼠回肠组织, 经研磨仪研磨后按照 ELISA 试剂盒说明书检测各组大鼠回肠组织 GSH、MDA 及 SOD 水平。

1.8 Western blot 检测肠道屏障相关蛋白及 MLCK/MLC2 通路相关蛋白表达 收集回肠组织在 RI-

PA 裂解缓冲液中匀浆提取总蛋白。蛋白质样品(40 μg)在预制的 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶上分离。电泳后,将蛋白质转移到聚偏二氟乙烯膜中,用 5% 脱脂牛奶封闭后,将膜与一抗 Zo-1(1 : 1 000)、occludin(1 : 1 000)、MLCK(1 : 1 000)、p-MLC2(1 : 1 000)、MLC2(1 : 1 000)和 GAPDH(1 : 1 000)抗体,4 ℃ 孵育一夜;次日加入二抗,室温孵育 1 h,加入电化学发光显色试剂显影后。使用 Image J 软件分析目的蛋白的灰度值。

1.9 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 进行数据分析,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 SNK-*q* 检验。 $P <$

0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 柴胡皂苷 A 组对各组大鼠 AMY、LIP、DAO 及炎症因子水平的影响 与假手术组相比,SAP 组 AMY、LIP、DAO、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 SAP 组相比,柴胡皂苷 A 组 AMY、LIP、DAO、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平显著降低,而 iE-DAP 组 AMY、LIP、DAO、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与柴胡皂苷 A 组相比,柴胡皂苷 A+iE-DAP 组 AMY、LIP、DAO、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠 AMY、LIP、DAO 及炎症因子水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	AMY(U/L)	LIP(U/mL)	DAO(U/L)	IL-1β(pg/mL)	IL-6(pg/mL)	TNF-α(pg/mL)
假手术组	10	32.79±3.28	0.19±0.02	23.38±1.59	112.40±12.03	61.79±6.19	11.79±2.58
SAP 组	10	82.47±9.56 ^a	1.87±0.16 ^a	63.59±5.94 ^a	160.86±17.07 ^a	113.87±13.49 ^a	54.87±6.46 ^a
柴胡皂苷 A 组	10	48.62±6.35 ^b	0.72±0.83 ^b	31.39±2.95 ^b	121.49±14.06 ^b	72.28±9.08 ^b	22.12±3.35 ^b
iE-DAP 组	10	98.14±10.74 ^b	3.24±0.34 ^b	97.63±8.78 ^b	211.44±23.13 ^b	165.12±20.69 ^b	84.54±9.34 ^b
柴胡皂苷 A+iE-DAP 组	10	75.67±8.64 ^c	1.37±0.14 ^c	52.37±6.25 ^c	154.79±16.06 ^c	93.18±9.33 ^c	43.67±4.64 ^c

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与 SAP 组比较,^b $P < 0.05$;与柴胡皂苷 A 组比较,^c $P < 0.05$ 。

2.2 柴胡皂苷 A 对各组大鼠回肠组织病理评分的影响 各组大鼠回肠组织病理形态见图 1。假手术组、SAP 组、柴胡皂苷 A 组、iE-DAP 组、柴胡皂苷 A+iE-DAP 组大鼠回肠组织病理评分依次为(0.03±0.01)、(2.24±0.35)、(0.88±0.09)、(3.97±0.58)、(2.09±0.20)分。假手术组大鼠回肠组织结构正常,与假手术组相比,SAP 组大鼠病理检查显示回肠组织水肿、出血、绒毛顶点缺失、绒毛两侧上皮隆起,回肠组织病理评分显著升高($P < 0.05$);与 SAP 组相比,

柴胡皂苷 A 组大鼠回肠组织结构得到改善,回肠组织病理评分显著降低($P < 0.05$),而 iE-DAP 组加重了上述病理表现,回肠组织绒毛脱落,固有层和扩张的毛细血管暴露,固有层消化和崩解,出血和溃疡,回肠组织病理评分显著升高($P < 0.05$);柴胡皂苷 A+iE-DAP 组回肠组织损伤程度与 SAP 组相似,柴胡皂苷 A+iE-DAP 组较柴胡皂苷 A 组回肠组织病理评分显著升高($P < 0.05$)。

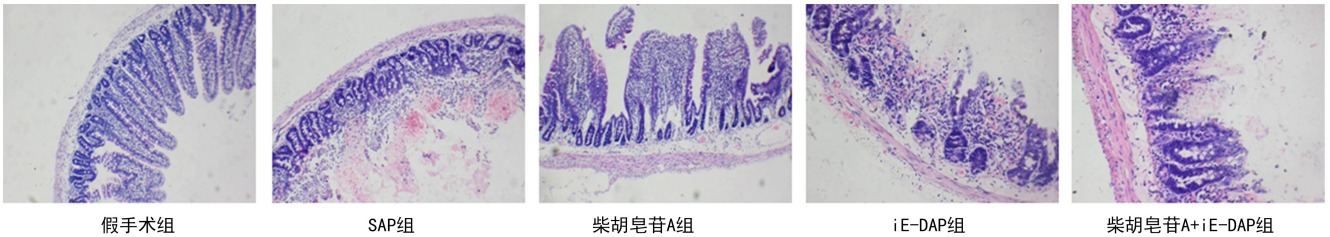


图 1 各组大鼠回肠组织病理形态(×100)

2.3 柴胡皂苷 A 对各组大鼠回肠组织 GSH、MDA 及 SOD 水平的影响 与假手术组相比,SAP 组大鼠 GSH、SOD 水平显著降低,MDA 水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 SAP 组相比,柴胡皂苷 A 组 GSH、SOD 水平显著升高,MDA 水平显著降低,而 iE-DAP 组 GSH、SOD 水平显著降低,MDA 水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与柴胡皂苷 A 组相比,柴胡皂苷 A+iE-DAP 组 GSH、SOD 水平显著降低,MDA 水平显著升高,差异有统计学意义

($P < 0.05$)。见表 2。

2.4 柴胡皂苷 A 对各组大鼠 Zo-1、occludin 蛋白水平的影响 与假手术组相比,SAP 组 Zo-1、occludin 蛋白水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 SAP 组相比,柴胡皂苷 A 组 Zo-1、occludin 蛋白水平显著升高,而 iE-DAP 组 Zo-1、occludin 蛋白水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与柴胡皂苷 A 组相比,柴胡皂苷 A+iE-DAP 组 Zo-1、occludin 蛋白水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表

3、图 2。

表 2 各组大鼠回肠组织 GSH、MDA 及 SOD 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	SOD (U/mg)	MDA (nmol/mg)
假手术组	10	81.79 $\pm$ 9.58	73.43 $\pm$ 9.76	2.90 $\pm$ 0.43
SAP 组	10	44.87 $\pm$ 5.46 ^a	43.32 $\pm$ 5.88 ^a	4.56 $\pm$ 0.68 ^a
柴胡皂苷 A 组	10	72.12 $\pm$ 8.35 ^b	71.54 $\pm$ 8.76 ^b	3.24 $\pm$ 0.58 ^b
iE-DAP 组	10	24.54 $\pm$ 3.34 ^b	27.64 $\pm$ 3.12 ^b	6.54 $\pm$ 0.83 ^b
柴胡皂苷 A + iE-DAP 组	10	53.67 $\pm$ 6.64 ^c	52.46 $\pm$ 6.45 ^c	4.13 $\pm$ 0.64 ^c

注：与假手术组比较，^a*P*<0.05；与 SAP 组比较，^b*P*<0.05；与柴胡皂苷 A 组比较，^c*P*<0.05。

表 3 柴胡皂苷 A 对各组大鼠 Zo-1、occludin 蛋白水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	Zo-1	occludin
假手术组	10	0.67 $\pm$ 0.08	0.92 $\pm$ 0.13
SAP 组	10	0.32 $\pm$ 0.02 ^a	0.69 $\pm$ 0.08 ^a
柴胡皂苷 A 组	10	0.64 $\pm$ 0.07 ^b	0.88 $\pm$ 0.09 ^b
iE-DAP 组	10	0.13 $\pm$ 0.01 ^b	0.41 $\pm$ 0.05 ^b
柴胡皂苷 A + iE-DAP 组	10	0.45 $\pm$ 0.05 ^c	0.73 $\pm$ 0.08 ^c

注：与假手术组比较，^a*P*<0.05；与 SAP 组比较，^b*P*<0.05；与柴胡皂苷 A 组比较，^c*P*<0.05。

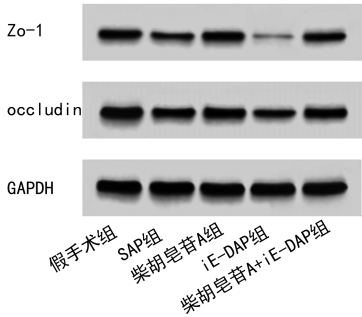


图 2 Western blot 检测各组 Zo-1、occludin 蛋白水平

2.5 柴胡皂苷 A 对各组大鼠 MLCK/MLC2 信号通路蛋白水平的影响 与假手术组相比，SAP 组 MLCK、p-MLC2/MLC2 蛋白水平显著升高，差异有统计学意义(*P*<0.05)；与 SAP 组相比，柴胡皂苷 A 组 MLCK、p-MLC2/MLC2 蛋白水平显著降低，而 iE-DAP 组 MLCK、p-MLC2/MLC2 蛋白水平显著升高，差异有统计学意义(*P*<0.05)；与柴胡皂苷 A 组相比，柴胡皂苷 A + iE-DAP 组 MLCK、p-MLC2/MLC2 蛋白水平显著升高，差异有统计学意义(*P*<0.05)，见表 4、图 3。

表 4 柴胡皂苷 A 对各组大鼠 MLCK/MLC2 信号通路蛋白水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	MLCK	p-MLC2/MLC2
假手术组	10	0.46 $\pm$ 0.05	0.31 $\pm$ 0.02
SAP 组	10	0.95 $\pm$ 0.15 ^a	0.66 $\pm$ 0.07 ^a

续表 4 柴胡皂苷 A 对各组大鼠 MLCK/MLC2 信号通路蛋白水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	MLCK	p-MLC2/MLC2
柴胡皂苷 A 组	10	0.53 $\pm$ 0.06 ^b	0.35 $\pm$ 0.04 ^b
iE-DAP 组	10	1.51 $\pm$ 0.17 ^b	0.91 $\pm$ 0.08 ^b
柴胡皂苷 A + iE-DAP 组	10	0.89 $\pm$ 0.07 ^c	0.60 $\pm$ 0.05 ^c

注：与假手术组比较，^a*P*<0.05；与 SAP 组比较，^b*P*<0.05；与柴胡皂苷 A 组比较，^c*P*<0.05。

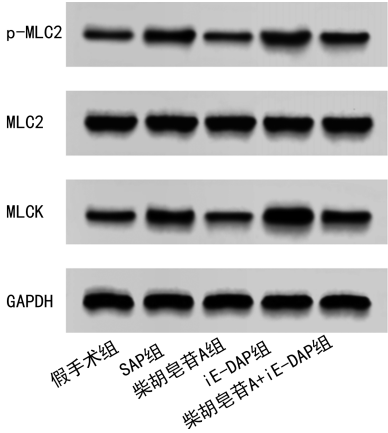


图 3 Western blot 检测 MLCK/MLC2 信号通路蛋白水平

3 讨 论

有研究发现 SAP 主要起源于无菌性局部炎症，可迅速升级为全身炎症反应综合征和器官衰竭^[11]。已发现天然产物可有效预防 SAP，清一汤是一种中草药，主要用于治疗 SAP，已被证实可以通过保护肠道屏障发挥治疗 SAP 的效果^[4]。清一汤的主要活性成分是柴胡皂苷 A，LI 等^[5]研究证实，柴胡皂苷 A 可以通过促进有益菌的增殖，抑制有害菌的增殖来改善肠道屏障进而改善大鼠 SAP。但是关于柴胡皂苷 A 在 SAP 大鼠肠损伤中的作用机制尚未明确。本研究结果发现，SAP 组大鼠病理检查显示回肠组织水肿、出血、绒毛顶点缺失、绒毛两侧上皮隆起，回肠组织病理评分显著升高，提示 SAP 大鼠造模成功；与 SAP 组相比，柴胡皂苷 A 组大鼠回肠组织结构得到改善，表明柴胡皂苷 A 可能对 SAP 大鼠肠损伤起到改善效果。

IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 在 SAP 的发病机制中起着至关重要的作用，TNF- α 是炎症反应中最早和主要的内源性介质^[12]。SOD、MDA 和 GSH 是用于评估人体氧化应激反应和抗氧化能力的 3 种物质。有研究表明，当身体经历氧化应激反应时，MDA 水平增加，而 SOD 和 GSH 水平降低^[13]。SAP 中胰腺滤泡破坏导致的血清 LIP、AMY 水平升高是 SAP 的重要表现之一^[7]。本研究结果提示，柴胡皂苷 A 可能通过抑制氧化应激及炎症反应，抑制胰腺滤泡分泌 LIP、AMY，来改善 SAP 大鼠肠道炎症损伤。

Zo-1 在紧密连接和肠道通透性中发挥着不可或缺的作用，缺乏 Zo-1 导致肠道上皮细胞无法形成紧密连接^[14-15]。本研究结果发现，柴胡皂苷 A 治疗后大

鼠回肠组织 Zo-1、occludin 蛋白水平显著升高,表明柴胡皂苷 A 可能通过增加 Zo-1、occludin 蛋白水平,改善肠道紧密连接进而改善肠道屏障。小肠通透性增加和细菌易位被认为是 SAP 相关肠道损伤的特征。作为一种有效的生物标志物,DAO 反映了小肠的完整性和黏膜功能。血清中 DAO 的活性可以作为评估肠道屏障功能的一种方法。此外,有研究表明,肠黏膜机械屏障的破坏导致大量 DAO 释放^[16]。本研究结果发现,与 SAP 组相比,柴胡皂苷 A 组 DAO 水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),表明柴胡皂苷 A 可能通过改善肠道完整性进而改善 SAP 大鼠肠道屏障。

MLCK/MLC2 信号通路是肠道炎症的关键通路,XIE 等^[6]研究报道,通过抑制 MLCK/MLC2 途径调节肠道炎症和肠道屏障,可以缓解大鼠肠易激综合征。HUANG 等^[17]发现,通过下调 MLCK/MLC2 途径可以通过防止肠道屏障功能障碍来缓解小鼠结肠炎。由此可见,MLCK/MLC2 是研究肠道损伤的重要通路。本研究结果发现,与 SAP 组相比,柴胡皂苷 A 组 MLCK、p-MLC2/MLC2 蛋白水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),提示柴胡皂苷 A 可能通过下调 MLCK/MLC2 通路起到治疗大鼠 SAP 的效果。本研究结果还发现,iE-DAP 加重了肠道损伤,且 iE-DAP 消除了柴胡皂苷 A 对 SAP 大鼠肠道损伤的治疗效果。

综上所述,柴胡皂苷 A 可能通过下调 MLCK/MLC2 信号通路改善 SAP 大鼠肠道屏障及炎症反应,从而对 SAP 大鼠肠道损伤起到改善作用。然而,关于柴胡皂苷 A 的最佳治疗剂量,以及是否可以调控其他通路起到相同治疗效果还需要研究者进一步探索。

参考文献

[1] PORTELLI M, JONES C D. Severe acute pancreatitis: pathogenesis, diagnosis and surgical management [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2017, 16(2): 155-159.

[2] LI X Y, HE C, ZHU Y, et al. Role of gut microbiota on intestinal barrier function in acute pancreatitis[J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(18): 2187-2193.

[3] CHEN R J, GUO X Y, CHENG B H, et al. Saikosaponin a inhibits cigarette smoke-induced oxidant stress and inflammatory responses by activation of Nrf2[J]. *Inflammation*, 2018, 41(4): 1297-1303.

[4] WANG G Y, SHANG D, ZHANG G X, et al. Qingyi decoction attenuates intestinal epithelial cell injury via the calcineurin/nuclear factor of activated T-cells pathway [J]. *World J Gastroenterol*, 2022, 28(29): 3825-3837.

[5] LI J, HAN J, LV J, et al. Saikosaponin a-induced gut microbiota changes attenuate severe acute pancreatitis through the activation of Keap1/Nrf2-ARE antioxidant

signaling[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020(1): 9217219.

[6] XIE Y, ZHAN X, TU J, et al. Atractylodes oil alleviates diarrhea-predominant irritable bowel syndrome by regulating intestinal inflammation and intestinal barrier via SCF/c-kit and MLCK/MLC2 pathways[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 272(2): 113925-113933.

[7] HU Y, YANG W. Paeoniflorin can improve acute lung injury caused by severe acute pancreatitis through Nrf2/SAPE pathway[J]. *Comput Math Methods Med*, 2022, 2022(1): 5712219-5712229.

[8] WANG Y, LI X, HAN Z, et al. iE-DAP induced inflammatory response and tight junction disruption in bovine mammary epithelial cells via NOD1-dependent NF- κ B and MLCK signaling pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7): 6263-6275.

[9] ZHANG J, FANG B, SUN L, et al. Roles of NOD1/Rip2 signal pathway in cSAPotid SAPtery remodelling in spontaneous hypertensive rats[J]. *Gen Physiol Biophys*, 2022, 41(1): 31-42.

[10] SU Y R, HONG Y P, MEI F C, et al. High-fat diet aggravates the intestinal barrier injury via TLR4-RIP3 pathway in a rat model of severe acute pancreatitis[J]. *Mediators Inflamm*, 2019, 2019(1): 2512687.

[11] ZHOU Q, XIANG H, LIU H, et al. Emodin alleviates intestinal barrier dysfunction by inhibiting apoptosis and regulating the immune response in severe acute pancreatitis[J]. *Pancreas*, 2021, 50(8): 1202-1211.

[12] FANG L, PANG Z, SHU W, et al. Anti-TNF therapy induces CD4⁺ T-cell production of IL-22 and promotes epithelial repairs in patients with Crohn's disease[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2018, 24(8): 1733-1744.

[13] Omayone T P, Ijomone O M, Oloyede S B, et al. Modulatory action of Moringa oleifera Lam. on L-arginine induced acute pancreatitis[J]. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2021, 4(1): 49-58.

[14] SHI J, ZHAO X H. Influence of the maillard-type caseinate glycation with lactose on the intestinal barrier activity of the caseinate digest in IEC-6 cells[J]. *Food Funct*, 2019, 10(4): 2010-2021.

[15] ZHAO X, XU X X, LIU Y, et al. The in vitro protective role of bovine lactoferrin on intestinal epithelial barrier [J]. *Molecules*, 2019, 24(1): 148-161.

[16] DENG W, ABLIZ A, XU S, et al. Severity of pancreatitis associated intestinal mucosal barrier injury is reduced following treatment with the NADPH oxidase inhibitor apocynin[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(4): 3525-3534.

[17] HUANG S, FU Y, XU B, et al. Wogonoside alleviates colitis by improving intestinal epithelial barrier function via the MLCK/pMLC2 pathway[J]. *Phytomedicine*, 2020, 68(1): 153179-153189.