

## 研究论著

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2023.03.007

# ERK1/2 通过调控 NADPH 氧化酶和线粒体分裂在结肠炎中的作用

翟晓明 谭嗣伟 易玉君 刘慧玲 郭佳翔 吴淑云 陶金

**【摘要】** 目的 研究细胞外信号调节激酶 1 和 2 (ERK1/2) 通过调控 NADPH 氧化酶 (Nox) 和线粒体分裂在结肠炎中的作用。方法 3% 葡聚糖硫酸钠 (DSS) 诱导小鼠急性结肠炎。将 30 只 C57BL/6J 小鼠用随机数表法分为 6 组: Control 组、3%DSS 组、1% 二甲亚砜 (DMSO) 组、ERK1/2 抑制剂 (PD98059) 组、3%DSS+1%DMSO 组、3%DSS+PD98059 组, 每组 5 只。评估 Control 组和 3%DSS 组小鼠体重变化、结肠长度改变、疾病活动指数和结肠组织病理学改变, 检测小鼠结肠黏膜 ERK1/2、磷酸化 (p)-ERK1/2、Nox1 和 Nox2 表达水平。1%DMSO 组、3%DSS+1%DMSO 组给予腹腔注射 1%DMSO; PD98059 组、3%DSS+PD98059 组小鼠给予腹腔注射 PD98059。评估 4 组小鼠结肠组织病理学改变, 检测 Nox1、Nox2、动力相关蛋白 1 (DRP1)、p-DRP1-S616 和 p-DRP1-S637 等线粒体分裂相关蛋白表达水平的改变。透射电镜观察 Control 组和 3%DSS 组小鼠结肠上皮细胞线粒体分裂情况。免疫荧光双染分析 2 组小鼠结肠黏膜中 Nox2 与线粒体外膜转位酶 TOM 复合物 (TOMM20) 共定位情况。分析 2 组小鼠结肠黏膜 DRP1 与 Nox2 mRNA 相对表达量的相关性。**结果** 与 Control 组相比, 3%DSS 组小鼠体重下降、结肠长度缩短、疾病活动指数增加和结肠组织病理学评分升高, 结肠黏膜 p-ERK1/2、Nox1 和 Nox2 表达增加 ( $P$  均  $< 0.05$ )。结肠炎小鼠结肠上皮细胞中的线粒体分裂增加, 结肠黏膜的 DRP1 和 Nox2 共定位增加, 两者 mRNA 相对表达呈正相关 ( $r = 0.678$ ,  $P < 0.05$ )。ERK1/2 抑制剂 PD98059 改善结肠炎小鼠结肠组织病理学变化, 并且下调结肠黏膜 Nox1、Nox2、DRP1、p-DRP1-S616 的表达。**结论** 抑制 ERK1/2 可能通过减轻 Nox 表达和线粒体分裂, 改善结肠炎。

**【关键词】** 溃疡性结肠炎; 细胞外信号调节激酶 1 和 2; NADPH 氧化酶; 线粒体分裂

**The role of ERK1/2 in colitis through regulation of NADPH oxidase and mitochondrial fission** Zhai Xiaoming, Tan Siwei, Yi Yujun, Liu Huiling, Guo Jiexiang, Wu Shuyun, Tao Jin. Department of Gastroenterology, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China

Corresponding author, Tao Jin, E-mail: taojin3@mail.sysu.edu.cn

**【Abstract】** **Objective** To investigate the role of extracellular signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2) in colitis through the regulation of NADPH oxidase and mitochondrial fission. **Methods** Mice models of acute colitis were induced by 3% dextran sulfate sodium (DSS). Thirty C57BL/6J mice were randomly divided into six groups by random number table method: control group, 3%DSS group, 1% dimethyl sulfoxide (DMSO) group, ERK1/2 inhibitor (PD98059) group, 3%DSS+1%DMSO group and 3%DSS+PD98059 group, with five mice in each group. The changes of body weight, colonic length, disease activity index and colonic histopathological changes of mice in the control and 3%DSS groups were evaluated, and the expression levels of ERK1/2, p-ERK1/2, Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 1 (Nox1) and Nox2 in colonic mucosa of mice were detected. Mice in 1%DMSO and 3%DSS+1%DMSO groups were intraperitoneally injected with 1%DMSO. Mice in the PD98059 and 3%DSS+PD98059 groups were intraperitoneally injected with PD98059. The colonic histopathological changes were evaluated among four groups, and the expression levels of Nox1, Nox2, Dynamin related protein 1 (DRP1), p-DRP1-S616 and p-DRP1-S637 mitochondrial fission related proteins were detected. Mitochondrial fission of colonic epithelial cells in the control and 3%DSS groups was observed by transmission electron microscopy. The co-localization of Nox2 and mitochondrial outer membrane translocator enzyme TOM complex (TOMM20) in colonic mucosa of mice in two groups was analyzed by double-immunofluorescence staining. The correlation between relative expression levels of DRP1 and Nox2 mRNA in mouse colonic mucosa was analyzed in two groups. **Results** Compared with the control group, mice in the 3%DSS group exhibited body weight loss, shortened colonic length, increased disease activity index and increased colonic

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81800458); 国家自然科学基金面上项目 (82170569)

作者单位: 510630 广州, 中山大学附属第三医院消化内科

通信作者, 陶金, E-mail: taojin3@mail.sysu.edu.cn

histopathological score. The expression levels of p-ERK1/2, Nox1, Nox2 in colonic mucosa of mice were significantly up-regulated in the 3%DSS group (all  $P < 0.05$ ). In mice with colitis, mitochondrial fission in colonic epithelial cells was increased, and the colonic mucosa co-localization of DRP1 and Nox2 was elevated, and the relative mRNA expression levels of both target genes were positively correlated ( $r = 0.678$ ,  $P < 0.05$ ). ERK1/2 inhibitor PD98059 improved colonic histopathological changes in mice with colitis, and down-regulated the expression levels of Nox1, Nox2, DRP1, p-DRP1-S616 in colonic mucosa. **Conclusion** Inhibition of ERK1/2 may ameliorate colitis by down-regulating NADPH oxidase expression and alleviating mitochondrial fission.

**【Key words】** Ulcerative colitis; Extracellular signal regulated kinase 1/2; NADPH oxidase; Mitochondrial fission

溃疡性结肠炎(UC)是一种病因未明,主要累及结肠和直肠黏膜的慢性炎症性肠病<sup>[1]</sup>。Ordás等(2012年)认为肠道上皮屏障破坏、肠道微生物改变、免疫功能紊乱、遗传异质性和环境等因素可能参与UC的发生发展,具体机制尚未明确。细胞外信号调节激酶1和2(ERK1/2)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,属于丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族成员,可介导胞外信号向细胞内传导,具有调节细胞增殖、分化、凋亡及蛋白质磷酸化等作用<sup>[2]</sup>。Waetzig等(2002年)研究显示与正常对照相比,UC患者炎性结肠黏膜组织的ERK1/2活化增强。在葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导小鼠结肠炎模型中,人脐带间充质干细胞通过抑制中性粒细胞ERK1/2磷酸化改善肠道炎症<sup>[3]</sup>。这些研究提示ERK1/2可能参与UC的发生发展。肠道中过量活性氧(ROS)的产生是肠道黏膜屏障损伤的重要因素。NADPH氧化酶(Nox)是肠道黏膜组织ROS的关键来源,其家族成员有NOX1-5、DUOX1和DUOX2(小鼠中被称为Nox1-4、Duox1和Duox2,其中小鼠Nox5基因缺失)。动力蛋白相关蛋白1(DRP1)是参与线粒体分裂的主要蛋白,DRP1中S616位点的磷酸化可以促进线粒体碎片化,而DRP1中S637位点的磷酸化则抑制线粒体分裂。研究发现,ERK1/2可以促进DRP1介导的线粒体分裂<sup>[4]</sup>。ERK1/2调控Nox表达和线粒体分裂在结肠炎中尚未见报道。

## 材料与方法

### 一、材料

#### 1. 实验动物

无特定病原体(SPF)级别的C57BL/6J小鼠30只,雌雄各半,6~8周龄,体重20~25g,购自广东药康公司。本动物实验伦理经华南农业大学实验动物伦理委员会审批通过(2022d028)。

### 2. 主要试剂与抗体

DSS(MP Biomedicals,美国)、PD98059(MCE,US)、DAB显色液(Vector)、HE染液(北京雷根生物技术有限公司)、 $\beta$ -actin抗体(Santa Cruz,美国)、ERK1/2和磷酸化(p)-ERK1/2抗体(CST,美国)、Nox1抗体(Abcam,美国)、Nox2/gp91phox抗体(武汉爱博泰克生物)、DRP1抗体(CST,美国)、p-DRP1-S616抗体和p-DRP1-S637抗体(武汉爱博泰克生物)、环保组织固定液(北京雷根生物技术有限公司)。

### 3. 主要仪器

显微镜(Leica,德国)、SDS-PAGE电泳槽(BIO-RAD,美国)、半干转膜仪(BIO-RAD,美国)。

## 二、方法

### 1. 小鼠模型构建

将30只C57BL/6J小鼠用随机数表法分为6组:Control组、3%DSS组、1%Dimethyl sulfoxide(DMSO)组、ERK1/2抑制剂(PD98059)组、3%DSS+1%DMSO组、3%DSS+PD98059组,每组5只。Control组和3%DSS组小鼠分别自由饮用双蒸水和含3%DSS的双蒸水7d。1%DMSO组和PD98059组小鼠自由饮用双蒸水7d,第1~6日1%DMSO组小鼠给予腹腔注射0.2mL的1%DMSO溶液,而PD98059组小鼠给予腹腔注射10mg/(kg·d)PD98059溶液。3%DSS+1%DMSO组和3%DSS+PD98059组小鼠饮用含3%DSS的双蒸水7d,第1~6日3%DSS+1%DMSO组小鼠给予腹腔注射0.2mL的1%DMSO溶液,而3%DSS+PD98059组小鼠给予腹腔注射10mg/(kg·d)PD98059溶液。在第7日处死小鼠。

### 2. 疾病活动指数评估

造模的第1日起,每日记录小鼠的体重、粪便性状和粪便潜血情况,计算小鼠疾病活动指

数。评分标准如下：体重正常为0分，体重下降1%~5%为1分，下降6%~10%为2分，下降11%~20%为3分，下降大于20%为4分；粪便成形为0分，呈糊状或半成形为1分，稀便为4分；粪便潜血阴性为0分，粪便潜血阳性为2分，肉眼血便为4分。

### 3. 小鼠结肠标本采集

造模结束后，对小鼠给予腹腔注射10%水合氯醛0.1 mL，深度麻醉后行颈椎脱臼处死。剖开腹部暴露腹腔，游离小鼠全结肠，沿肠系膜对面纵行剖开结肠，用预冷的生理盐水冲洗结肠内容物。部分结肠组织置于环保组织固定液中后续制成石蜡标本，部分结肠组织用玻片刮取肠黏膜后置于-80℃冰箱中保存，用于蛋白质提取。

### 4. HE染色和组织病理学评分

石蜡切片经HE染色及中性树胶封片后，观察拍照。染好的切片在显微镜下进行组织病理学评分。每张切片在200倍镜下随机选取15个视野，根据文献[5]的标准进行评分，炎症细胞浸润：黏膜层轻度浸润为1分，黏膜层及黏膜下层中度浸润为2分，透壁中度浸润为3分；肠上皮结构：上皮局部糜烂为1分，小于50%的局部溃疡形成为2分，广泛溃疡形成和（或）肉芽组织形成和（或）假息肉形成为3分。总分为0~6分。

### 5. 免疫组织化学染色和免疫荧光染色

免疫组织化学染色：石蜡切片经处理，孵育好二抗后用磷酸盐缓冲液清洗切片，显微镜下用DAB显色、苏木素染核后，切片用中性树胶封片后显微镜下观察拍片。免疫荧光染色：石蜡切片经处理，孵育好二抗后用磷酸盐缓冲液清洗切片，滴加DAPI溶液染核1 min，用双蒸水冲洗干净后将切片置于显微镜调至荧光通道进行观察并拍照，此步骤全程避光。

### 6. 结肠黏膜组织总蛋白提取及蛋白免疫印迹

根据总蛋白提取裂解液说明书按步骤操作提取结肠黏膜组织总蛋白，并进行BCA蛋白浓度定量，应用Image J图像分析软件进行灰度分析。

### 7. 结肠组织RNA提取

根据组织RNA提取试剂盒的说明对组织样品进行总RNA提取。提取组织总RNA，用逆转录试

剂盒逆转录为cDNA，用无酶水将所得的cDNA稀释5倍后进行荧光定量PCR的检测。应用SYBR Green方法对目的基因及内参基因 $\beta$ -actin进行特异性扩增。特异性引物序列见表1。

### 8. 透射电镜检测

Control组和3%DSS组结肠炎造模结束后，处死小鼠剖腹迅速取出结肠，将其置于冰盒上，沿肠系膜对面纵行剪开，快速漂洗干净后，剪成1~2 mm的肠段后，置于4℃预冷的2.5%的戊二醛溶液中，固定24 h。将标本送至中山医学院电镜室进行包埋、切片及拍摄，观察结肠上皮细胞线粒体分裂情况。

### 三、统计学处理

数据应用GraphPad Prism 9.0软件进行统计学分析和作图。正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，2组间比较采用两独立样本 $t$ 检验。Pearson相关系数用于相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、DSS诱导小鼠急性结肠炎

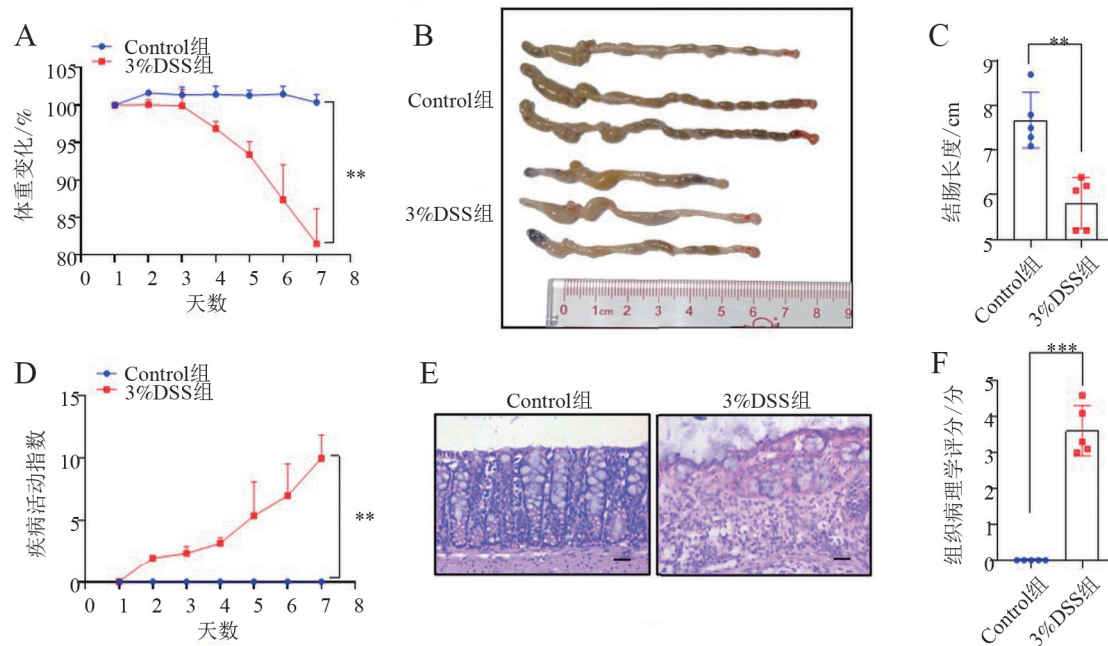
与Control组比较，3%DSS组小鼠出现严重急性结肠炎症状，具体表现为体重下降（ $t_{第7日} = 8.760$ ， $P < 0.01$ ）、结肠长度缩短（ $t = 4.888$ ， $P < 0.01$ ）、疾病活动指数升高（ $t_{第7日} = 11.950$ ， $P < 0.01$ ）、结肠组织病理学评分增加（ $t = 11.599$ ， $P < 0.001$ ），2组比较差异均有统计学意义（图1A~D、F）。结肠组织切片HE染色显示，Control组小鼠结肠黏膜上皮完整，腺体排列规则，未见中性粒细胞浸润；3%DSS组小鼠结肠黏膜上皮糜烂，腺体缺失，溃疡形成，黏膜层及黏膜下层大量炎症细胞浸润（图1E）。以上结果均表明，DSS诱导小鼠急性结肠炎造模成功。

### 二、急性结肠炎小鼠结肠黏膜组织p-ERK1/2蛋白表达增加

蛋白免疫印迹结果显示，与Control组相比，3%DSS组小鼠结肠黏膜组织ERK1/2蛋白表达没有明显变化，p-ERK1/2表达上调，2组p-ERK1/2

表1 目的基因引物序列

基 因	来源	上游引物	下游引物
DRP1	鼠	5'-GCCGAACCTTAGAATCTGTGGACC-3'	5'-CAGGCACAAATAAAGCAGGACGG-3'
Nox2	鼠	5'-TGGCGATCTCAGCAAAAGGTGG-3'	5'-GTACTGTCCCACCTCCATCTTG-3'



注: A 为 Control 组与 3%DSS 组小鼠体重变化 ( $n = 5$ ); B 为 2 组小鼠结肠长度; C 为 2 组小鼠结肠长度比较 ( $n = 5$ ); D 为 2 组小鼠疾病活动指数变化 ( $n = 5$ ); E 为 2 组小鼠结肠 HE 染色 (标尺:  $50 \mu\text{m}$ ); F 为 2 组小鼠结肠组织病理学评分比较 ( $n = 5$ )。\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图 1 DSS 诱导小鼠急性结肠炎

蛋白相对表达量比较差异具有统计学意义 ( $t = 3.400$ ,  $P < 0.05$ , 见图 2A、B)。免疫组织化学染色显示, 与 Control 组相比, 3%DSS 组小鼠结肠黏膜 p-ERK1/2 表达水平明显增加, 主要在结肠上皮细胞中表达 (见图 2C)。

### 三、急性结肠炎小鼠结肠黏膜组织 Nox 蛋白表达增加

免疫组织化学染色结果显示, 与 Control 组相比, 3%DSS 组小鼠结肠黏膜 Nox1、Nox2 蛋白表达水平明显增加 (图 3A、D)。Nox1 主要在结肠上皮细胞刷状缘和胞质中表达, Nox2 主要在浸润的中性粒细胞和吞噬细胞中表达, 少量在结肠上皮细胞刷状缘和胞质中表达。蛋白免疫印迹结果显示, 3%DSS 组小鼠结肠黏膜 Nox1 和 Nox2 表达水平均高于 Control 组, 2 组蛋白相对表达量比较差异均有统计学意义 ( $t_{\text{Nox1}} = 3.518$ ,  $t_{\text{Nox2}} = 3.390$ ,  $P$  均  $< 0.05$ , 见图 3B、C、E、F)。

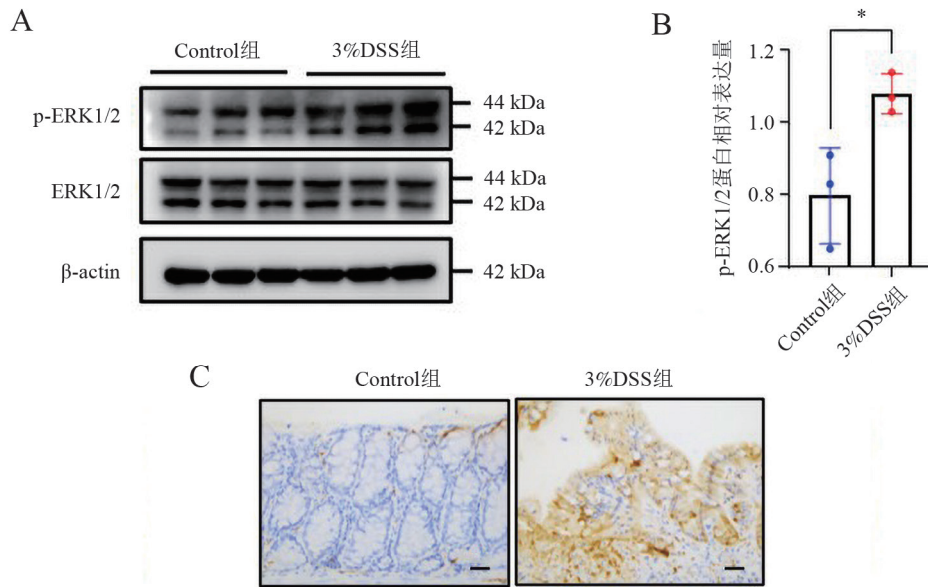
### 四、抑制 ERK1/2 可通过下调 Nox 表达减轻小鼠急性结肠炎

1%DMSO 组、PD98059 组、3%DSS+1%DMSO

组和 3%DSS+PD98059 组小鼠结肠组织 HE 染色结果显示, 与 1%DMSO 组相比, 单纯注射 PD98059 对小鼠结肠黏膜没有影响, 未见结肠黏膜结构破坏或炎症浸润, 组织病理学评分没有改变; 经 3%DSS 诱导结肠炎后, 与 1%DMSO 组相比, 注射 PD98059 减轻小鼠结肠炎表现, 结肠黏膜上皮糜烂、隐窝缺失和溃疡形成减少, 组织病理学评分下降, 2 组比较差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 图 4A、B)。蛋白免疫印迹结果显示, 3%DSS 诱导结肠炎后, 与 1%DMSO 组相比, PD98059 组小鼠结肠黏膜组织 Nox1、Nox2 蛋白表达水平降低 (图 4C)。免疫组织化学染色结果显示, 3%DSS 诱导结肠炎后, 与 1%DMSO 组相比, PD98059 组小鼠结肠黏膜 Nox2 蛋白表达减少 (图 4D)。以上结果表明, 抑制 ERK1/2 可通过下调 Nox 的表达减轻小鼠急性结肠炎。

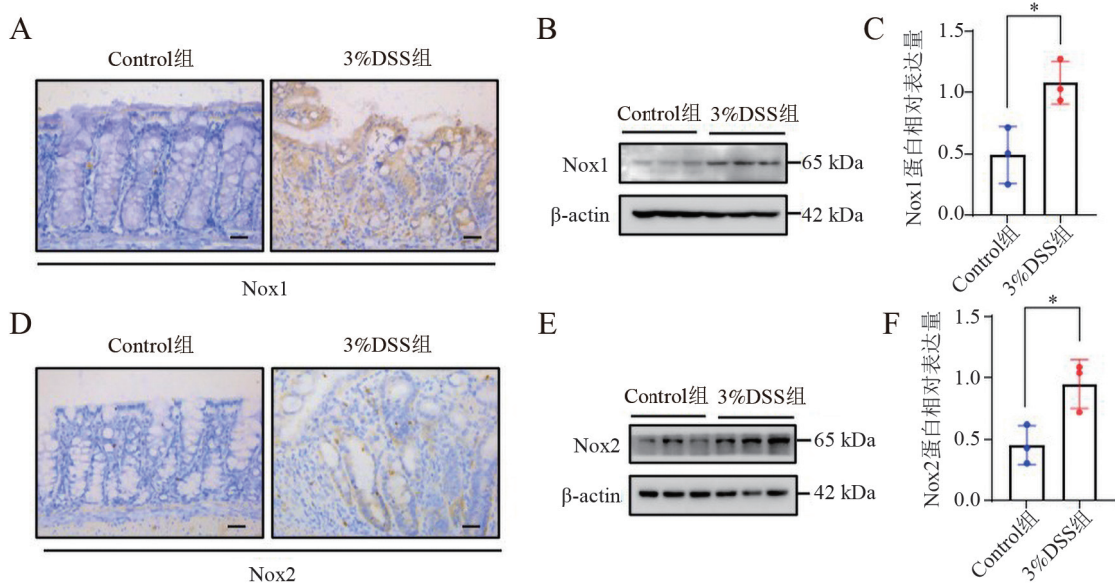
### 五、抑制 ERK1/2 对急性结肠炎小鼠结肠黏膜组织的线粒体分裂的影响

小鼠结肠黏膜透射电镜图显示, 与 Control 组中数量及形态正常的线粒体相比, 3%DSS 组小鼠结肠上皮细胞中的线粒体数量明显增加, 出



注：A 为 Control 组与 3%DSS 组小鼠结肠黏膜组织蛋白免疫印迹电泳图；B 为 2 组小鼠结肠黏膜组织 p-ERK1/2 蛋白相对表达量 ( $n = 3$ )；C 为 2 组小鼠结肠黏膜 p-ERK1/2 免疫组织化学染色 (标尺：50  $\mu\text{m}$ )。\* $P < 0.05$ 。

图 2 急性结肠炎小鼠结肠黏膜组织 p-ERK1/2 蛋白表达增加

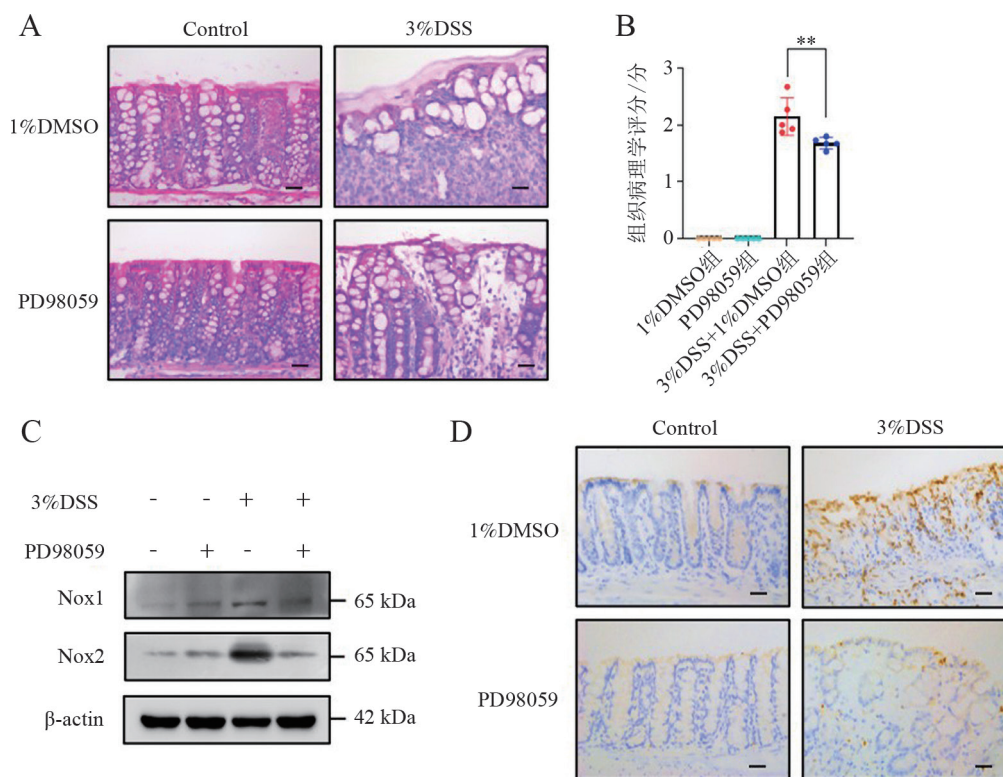


注：A、D 为 Control 组与 3%DSS 组小鼠结肠黏膜 Nox1、Nox2 免疫组织化学染色 (标尺：50  $\mu\text{m}$ )；B、E 为 2 组小鼠结肠黏膜组织 Nox1、Nox2 蛋白免疫印迹电泳图；C、F 为 2 组小鼠结肠黏膜组织 Nox1、Nox2 蛋白相对表达量 ( $n = 3$ )。\* $P < 0.05$ 。

图 3 急性结肠炎小鼠结肠黏膜组织 Nox 蛋白表达增加

现线粒体肿胀、空泡样变等形态异常，提示结肠炎小鼠的结肠上皮细胞中的线粒体分裂增加 (图 5A)。免疫组化染色结果显示，与 1%DMSO 组和 PD98059 组相比，3%DSS+1%DMSO 组和 3%DSS+ PD98059 组小鼠结肠黏膜线粒体分裂相关蛋白 DRP1 和 p-DRP1-S616 蛋白表达增加。经 3%DSS 诱导结肠炎后，与 1%DMSO 组相比，注

射 PD98058 组小鼠结肠黏膜 DRP1 和 p-DRP1-S616 蛋白表达降低 (图 5B、C)。蛋白免疫印迹结果与之相对应，4 组小鼠结肠黏膜组织 p-DRP1-S637 蛋白表达水平未见明显差异 (图 5D)。小鼠结肠黏膜免疫荧光双染结果显示，与 Control 组相比，3%DSS 组小鼠结肠上皮细胞中线粒体外膜标志物 TOMM20 和 Nox2 蛋白表达增加，两者共定位增加



注：A 为 1%DMSO 组、PD98059 组、3%DSS+1%DMSO 组和 3%DSS+PD98059 组小鼠结肠 HE 染色（标尺：50  $\mu\text{m}$ ）；B 为 4 组小鼠结肠组织病理学评分比较（ $n = 5$ ）；C 为 4 组小鼠结肠黏膜组织 Nox1、Nox2 蛋白免疫印迹电泳图；D 为 4 组小鼠结肠黏膜 Nox2 免疫组织化学染色（标尺：50  $\mu\text{m}$ ）。\*\* $P < 0.01$ 。

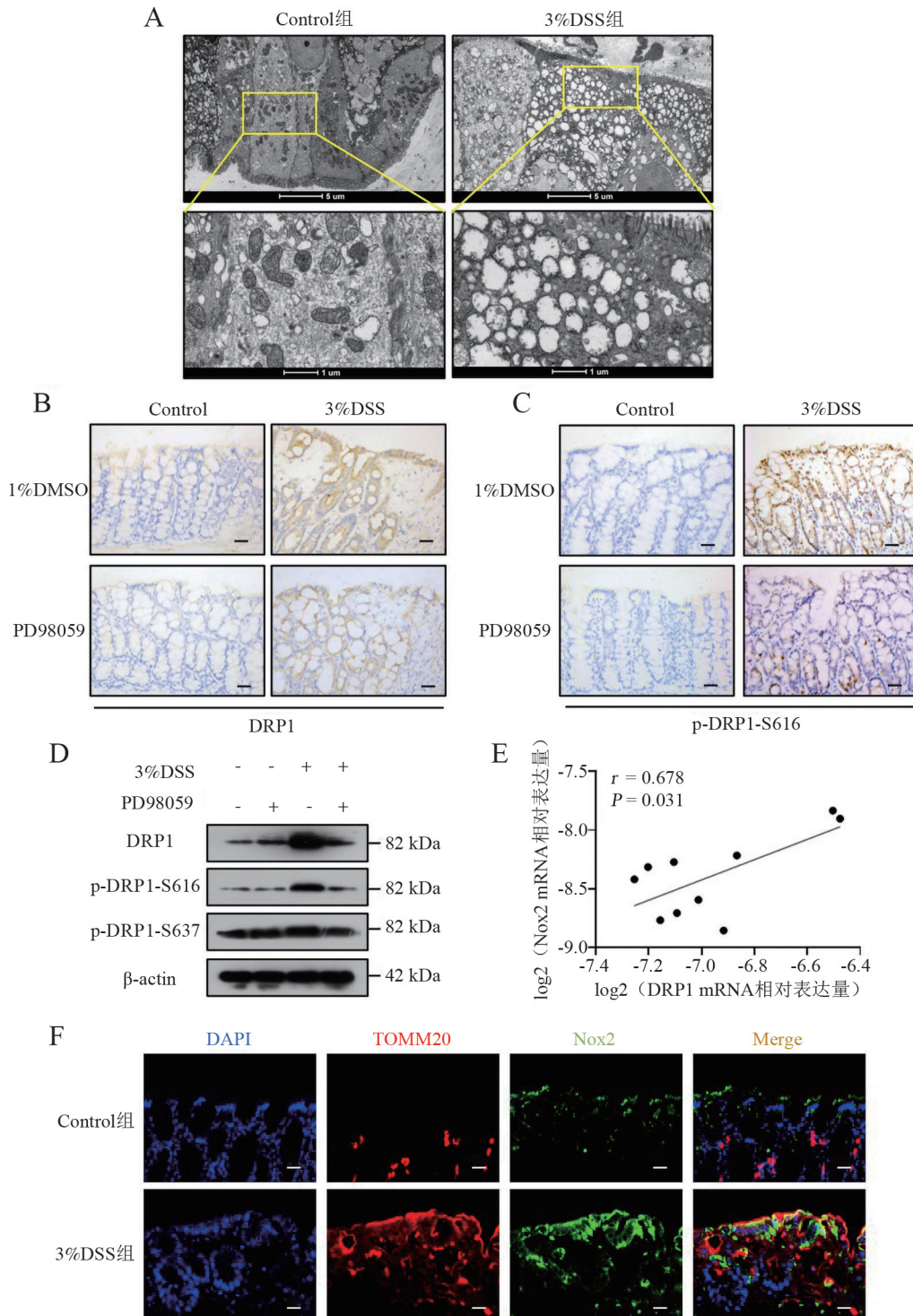
图 4 抑制 ERK1/2 可通过下调 Nox 表达减轻小鼠急性结肠炎

(图 5F)。相关性分析显示，3%DSS 组小鼠结肠黏膜的 DRP1 与 Nox2 mRNA 相对表达变化呈正相关关系（ $r = 0.678$ ,  $P < 0.05$ , 图 5E）。以上结果表明，抑制 ERK1/2 可减轻急性结肠炎小鼠结肠黏膜组织的线粒体分裂，Nox2 与其中的线粒体分裂存在关联。

## 讨 论

UC 是一类病因未明的慢性非特异性肠道炎症疾病，目前认为肠道上皮屏障破坏、肠道微环境、免疫功能紊乱、遗传、环境和氧化应激等因素可能参与 UC 的发生发展<sup>[1]</sup>。Waetzig 等（2002 年）研究发现，UC 患者结肠炎性黏膜 ERK1/2 激活增加。ERK1/2 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，属于经典 MAPK 家族成员，多种胞外刺激因素可激活 ERK/MAPK 信号通路，进而调节细胞增殖、分化、凋亡及蛋白质合成<sup>[2]</sup>。郭灿璨等（2015 年）认为 ERK1/2 可以调节血管活性胺、花生四烯酸代谢产物、细胞因子、一氧化氮等细胞来源炎性介

质及补体系统，进而参与 UC 的发生发展。氧化应激是肠道黏膜损伤的重要因素。Circo 等（2013 年）认为氧化应激是指机体内产生过量 ROS 和活性氮，不能被抗氧化物所清除，进而导致组织细胞损伤的病理生理过程。ROS 可诱导组织细胞脂质过氧化，脂质过氧化终产物如丙二醛可以引起蛋白质损伤，进一步损伤结肠组织。结肠上皮细胞和吞噬细胞中的线粒体和 Nox 是结肠组织 ROS 的主要来源<sup>[6]</sup>。研究发现，UC 患者结肠黏膜组织中 Nox1 和 Nox2 蛋白表达明显增加，在 UC 发病初期发挥一定作用<sup>[7]</sup>。本实验中，急性结肠炎小鼠结肠黏膜组织 p-ERK1/2、Nox1 和 Nox2 蛋白表达增加，与过往研究中 UC 患者结肠黏膜组织相应蛋白表达趋势一致。但抑制 ERK1/2 能否改善结肠炎，以及 ERK1/2 在结肠炎中能否调控 NADPH 氧化酶表达尚未见报道。PD98059 是 ERK1/2 抑制剂，在肺损伤和自身免疫性脑脊髓炎动物模型中的应用广泛<sup>[8]</sup>。故本研究在 3%DSS 诱导小鼠急性结肠炎过程中，给予小鼠 ERK1/2 抑制剂 PD98059 腹腔注射处理，以研究 ERK1/2 在结肠炎中的作用。结



注：A 为 Control 组和 3%DSS 组小鼠结肠上皮细胞透射电镜图；B、C 为 1%DMSO 组、PD98059 组、3%DSS+1%DMSO 组和 3%DSS+PD98059 组小鼠结肠黏膜 DRP1、p-DRP1-S616 免疫组织化学染色（标尺：50 μm）；D 为 4 组小鼠结肠黏膜组织 DRP1、p-DRP1-S616 和 p-DRP1-S637 蛋白免疫印迹电泳图；E 为 3%DSS 组小鼠结肠黏膜 DRP1 和 Nox2 mRNA 相对表达量的相关性分析（ $n = 10$ ）；F 为 Control 组和 3%DSS 组小鼠结肠黏膜 Nox2 和 TOMM20 免疫荧光共定位（标尺：50 μm）。

图 5 抑制 ERK1/2 对急性结肠炎小鼠结肠黏膜组织的线粒体分裂的影响

果表明，抑制 ERK1/2 后，急性结肠炎小鼠结肠黏膜组织 Nox1、Nox2 蛋白表达降低，肠道黏膜损伤减轻。抑制 ERK1/2 可以通过下调 Nox 改善肠道

炎症。小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎的研究发现，PD98059 治疗可以减少脂质过氧化和谷胱甘肽氧化<sup>[8]</sup>。考虑到 Nox 在氧化应激中的作用，抑制

ERK1/2 可能通过下调 Nox 导致脂质过氧化和谷胱甘肽氧化等氧化应激相关损伤减少, 进而改善肠道炎症。

正常结肠黏膜组织细胞中的线粒体融合和分裂处于动态平衡, 以维持细胞能量供应以及生理功能。过量 ROS 的产生和 ATP 耗尽可以诱导线粒体动力学异常, 线粒体过度分裂、碎片化, 异常的线粒体分裂反过来加剧 ROS 产生和 ATP 耗竭, 形成恶性循环, 最终导致细胞功能障碍, 促进细胞死亡<sup>[9]</sup>。参与线粒体分裂的蛋白有 DRP1、p-DRP1-S616、p-DRP1-S637、线粒体分裂 1 蛋白、线粒体分裂因子、线粒体动力蛋白 MiD49 和 MiD51。DRP1 参与认知功能障碍等疾病的发生发展<sup>[10]</sup>。研究发现, DSS 诱导小鼠结肠炎的结肠黏膜组织 DRP1 和促进线粒体分裂的 p-DRP1-S616 蛋白表达增加, 而且线粒体分裂抑制剂 P110 可以减轻结肠炎小鼠肠道炎症<sup>[11]</sup>。不少研究报道, ERK1/2 可以调控 DRP1 介导的线粒体分裂<sup>[4]</sup>。通过透射电镜观察小鼠结肠上皮细胞的线粒体, 我们发现, 结肠炎小鼠结肠上皮细胞中的线粒体分裂增加, 线粒体肿胀膨大、呈空泡样变。同时我们检测小鼠结肠黏膜组织中与线粒体分裂相关的蛋白表达, 结果显示, 与 1%DMSO 组和 PD98059 组相比, 3%DSS+1%DMSO 组和 3%DSS+PD98059 组小鼠结肠黏膜 DRP1、p-DRP1-S616 蛋白表达增加。同时, 与 3%DSS+1%DMSO 组相比, 3%DSS+PD98059 组小鼠结肠对应蛋白表达减少。提示抑制 ERK1/2 可能通过减轻线粒体分裂改善急性结肠炎小鼠的肠道炎症。小鼠结肠黏膜免疫荧光双染结果显示, 与 Control 组相比, 3%DSS 组结肠上皮细胞线粒体外膜标志物 TOMM20 表达增加, 并与 Nox2 共定位增加。相关性分析显示, 3%DSS 组小鼠结肠黏膜的 DRP1 与 Nox2 mRNA 相对表达变化呈正相关。Nox2 可能通过诱导 ROS 生成影响线粒体的形态及功能, 功能障碍的线粒体也有可能影响 Nox2 的表达, 需进一步研究探索。

综上所述, 抑制 ERK1/2 可能通过下调 Nox 表

达和减轻线粒体分裂来缓解肠道炎症, 为 UC 发病机制研究和治疗提供新依据。

## 参 考 文 献

- [1] Kobayashi T, Siegmund B, Le Berre C, et al. Ulcerative colitis. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6 (1): 74.
- [2] Niu Y, Ji H. Current developments in extracellular-regulated protein kinase (ERK1/2) inhibitors. *Drug Discov Today*, 2022, 27 (5): 1464-1473.
- [3] Wang G, Joel M D M, Yuan J, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate inflammatory bowel disease by inhibiting ERK phosphorylation in neutrophils. *Inflammopharmacology*, 2020, 28 (2): 603-616.
- [4] Ansari M Y, Novak K, Haqqi T M. ERK1/2-mediated activation of DRP1 regulates mitochondrial dynamics and apoptosis in chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 2022, 30 (2): 315-328.
- [5] Erben U, Loddenkemper C, Doerfel K, et al. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7 (8): 4557-4576.
- [6] Lu J, Jiang G, Wu Y, et al. NADPH oxidase 1 is highly expressed in human large and small bowel cancers. *PLoS One*, 2020, 15 (5): e0233208.
- [7] 轩青霞, 戴发亮, 陈攀, 等. NADPH 氧化酶 NOX1、NOX2 和 DUOX2 在溃疡性结肠炎中的表达分析. *首都医科大学学报*, 2017, 38 (2): 220-226.
- [8] Attia S M, Ahmad S F, Nadeem A, et al. The MAP kinase inhibitor PD98059 reduces chromosomal instability in the autoimmune encephalomyelitis SJL/J-mouse model of multiple sclerosis. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2021, 861-862: 503278.
- [9] Ren L, Chen X, Chen X, et al. Mitochondrial dynamics: fission and fusion in fate determination of mesenchymal stem cells. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 580070.
- [10] 朱国松, 唐富东, 王开伟. 线粒体动力相关蛋白 Drp1 在大鼠术后认知功能障碍中的作用. *新医学*, 2021, 52 (10): 739-744.
- [11] Mancini N L, Goudie L, Xu W, et al. Perturbed mitochondrial dynamics is a novel feature of colitis that can be targeted to lessen disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2020, 10 (2): 287-307.

(收稿日期: 2022-11-09)

(本文编辑: 杨江瑜)