

基于药理学与转录组学整合探究托里消毒散治疗 溃疡性结肠炎的作用机制

马珑珂¹, 李林珍¹, 杨海媚¹, 王娟², 温旭东³, 马一菡³, 王晓翔³, 鲁法庭¹, 叶俏波^{1*}
(1. 成都中医药大学基础医学院, 成都 611137; 2. 成都中医药大学公共卫生学院, 成都 611137;
3. 成都市中西医结合医院, 成都 610084)

[摘要] 目的: 基于转录组学、网络药理学及实验验证, 探究托里消毒散治疗溃疡性结肠炎(UC)的物质基础及作用机制。方法: 网络药理学初步筛选托里消毒散治疗UC的活性成分和潜在机制; 采用葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导建立UC小鼠模型, 设正常组, 模型组, 托里消毒散高(11.3 g·kg⁻¹)、低剂量组(5.7 g·kg⁻¹)和阳性药物美沙拉嗪组(0.4 g·kg⁻¹), 从造模第1天开始灌胃给药, 连续7 d, 每日评估疾病活动指数(DAI)。苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠结肠病理变化, 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测小鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)水平。对小鼠结肠组织进行转录组测序, 结合网络药理学结果深入分析托里消毒散治疗UC的潜在机制。采用蛋白免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测关键信号通路中相关mRNA和蛋白表达。结果: 网络药理学和转录组学结果联合分析表明, 以磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路为核心的多条通路网络为托里消毒散治疗UC的关键机制。与模型组比较, 托里消毒散给药可减轻UC小鼠体质量、腹泻及便血症状, DAI评分明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 结肠组织病理评分显著降低($P < 0.01$), 改善结肠短缩($P < 0.01$), 血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平明显下调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。分子生物学实验验证表明, 与模型组比较, 托里消毒散可显著抑制结肠组织中PI3K、Akt、p65的mRNA及蛋白表达和磷酸化水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 托里消毒散可通过多成分协同作用, 调控以PI3K/Akt为核心的多通路网络, 从而减轻结肠炎症损伤, 发挥治疗UC疾病的作用。

[关键词] 溃疡性结肠炎; 托里消毒散; 网络药理学; 转录组学; 磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路

[中图分类号] R364.5; R285; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)14-0205-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251316

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20260120.1539.002>

[网络出版日期] 2026-01-21 08:50:09 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Exploring Mechanism of Action of Tuoli Xiaodu San in Treating Ulcerative Colitis Based on Integrated Pharmacology and Transcriptomics

MA Longke¹, LI Linzhen¹, YANG Haimei¹, WANG Juan², WEN Xudong³, MA Yihan³,
WANG Xiaoxiang³, LU Fating¹, YE Qiaobo^{1*}

(1. School of Basic Medical Sciences, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China; 2. School of Public Health, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 3. Chengdu Integrated TCM and Western Medicine Hospital, Chengdu 610084, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the material basis and mechanism of action of Tuoli Xiaodu San in treating ulcerative colitis (UC) by integrating transcriptomics, network pharmacology, and experimental validation. **Methods:** Network pharmacology was initially employed to screen the active components and potential mechanisms of Tuoli Xiaodu San for treating UC. A UC mouse model was established by dextran sulfate sodium (DSS) induction. The mice were divided into the following groups: normal, model, high-dose (11.3 g·kg⁻¹) Tuoli Xiaodu San, low-dose (5.7 g·kg⁻¹) Tuoli Xiaodu San, and positive control

[收稿日期] 2025-07-29

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81973742); 四川省自然科学基金项目(2023NSFSC0686); 成都中医药大学校院联合创新基金(医院专项 LH202402022)

[第一作者] 马珑珂, 在读硕士, 从事脾胃病证的方剂配伍理论与临证运用研究, E-mail: malongke@stu.cdutcm.edu.cn

[通信作者] * 叶俏波, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事脾胃病证的方剂配伍理论与临证运用研究, E-mail: yeqiaobo@cdutcm.edu.cn

(mesalazine, 0.4 g·kg⁻¹). Intra-gastric administration commenced on day 1 of modeling and continued for 7 consecutive days. The disease activity index (DAI) was assessed daily. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe colonic pathological changes. Serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 beta (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Transcriptome sequencing was performed on mouse colonic tissues, and the results were integrated with network pharmacology findings for in-depth analysis of Tuoli Xiaodu San's potential mechanisms in treating UC. Finally, the expression of key genes and proteins in the identified signaling pathways were detected using Western blot and Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Results:** The combined analysis of network pharmacology and transcriptomics results showed that the multi-pathway network with phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway as its core was the key mechanism of Tuoli Xiaodu San in the treatment of UC. Tuoli Xiaodu San administration significantly ameliorated weight loss, diarrhea, and bloody stools in UC mice, reduced the DAI scores ($P<0.05$, $P<0.01$), lowered the colonic histopathological scores ($P<0.01$), alleviated colon shortening ($P<0.01$), and downregulated serum levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 ($P<0.05$, $P<0.01$). Molecular biology experiments confirmed that Tuoli Xiaodu San significantly inhibited the mRNA and protein expression, as well as the phosphorylation levels, of PI3K, Akt, and p65 in colonic tissues ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** Tuoli Xiaodu San can regulate the multi-pathway network with PI3K/Akt as its core through multi-component synergy, thereby reducing colonic inflammatory damage and exerting a therapeutic effect on UC.

[Keywords] ulcerative colitis; Tuoli Xiaodu San; network pharmacology; transcriptomics; phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway

溃疡性结肠炎(UC)是一种慢性非特异性结肠炎性疾病,起始于直肠,延伸至结肠近端,症状涉及腹痛、腹泻、黏液脓血便、里急后重^[1-2]等,以反复发作的黏膜炎症为主要病理特征,严重影响患者生活,并导致长期负担性并发症。UC的病因尚未完全明确,但与遗传易感、环境因素、免疫紊乱及肠道菌群失调等因素密切相关。当下用于治疗UC的药物主要有氨基水杨酸类、类固醇和免疫抑制剂等,但诸类药物仍疗效欠佳,且价格高昂、疗程长、不良反应大,新的治疗方法亟待发掘^[3]。

根据症状及证候,UC归属于中医学中的“肠澼”“久痢”“泄泻”“肠痛”等范畴^[4-5]。“溃疡”实则是肠黏膜之“溃烂”也,乃痼疽因积毒在脏腑,可谓之广义之肠痈。根据所在病位,UC当属内痈^[6-8]。托里透毒法是古代医家总结出来的、用于体表慢性疮疡、溃疡的外科治疗方法,体现了治疗疮疡的“消、补、托”思想^[9]。托里消毒散“异病同治”是中医学的鲜明特色及优势所在;根据整体观念,体表皮肤为人体“一身之表”,而结肠黏膜为在里的“肠腑之表”,溃疡生于肌表则为表中之表,生于肠腑则为里中之表。因此,UC的治疗原则可与皮肤疮疡类同^[10-11]。

UC是一种慢性复发性疾病。根据《溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识》(2017),UC病性为本虚标实,以脾胃虚弱为本,湿邪(热)、瘀热、热毒、痰浊、气滞、瘀血等为标,发病以脾胃虚弱为先导,继而内外邪气侵袭机体,最终导致虚实夹杂的病理状态。正气难以抗邪,邪毒内陷,留滞不去,最终导致气血同病,瘀血内生^[4]。“脾虚”和“血瘀”是UC缠绵难愈的关键^[9]。托里消毒散出自明代陈实功的《外科正

宗》,位于《古代经典名方目录(第一批)》中第65首,是托里透毒法的代表方剂^[12],全方由人参、白术、茯苓、甘草、黄芪、当归、白芍、川芎、白芷、桔梗、金银花、皂角刺组成。其中黄芪、人参、白术、茯苓、甘草可益气扶正,托毒外出,当归、川芎、白芍养血扶正、活血化瘀,金银花、白芷、桔梗、皂角刺清热解毒、消肿排脓,全方集扶正、托毒、祛瘀于一身,功能益气养血、托毒生肌,契合UC缠绵难愈的关键病机。临床上研究也已证实托里消毒散对UC具有良好疗效^[13-14]。但其治疗UC的药理学机制尚未阐明。

中医药复方治疗疾病具有多成分、多靶点、多途径协同起效的特点^[15-16]。网络药理学可通过构建“药物-成分-靶点-疾病”网络模型,系统地分析中药复方的作用机制^[17]。转录组学广泛用于基因表达定量,可揭示不同生理或病理条件下的差异表达基因,深入阐释生物学过程的调控机制。转录组学在中医药领域具有独特优势,能动态捕捉中药复方干预下全基因组表达谱的变化,提供高通量、系统性的基因调控信息,揭示多成分协同作用的多靶点、多通路机制,尤其适合阐释中医“整体观”和“异病同治”的现代生物学基础。网络药理学和转录组学的整合不仅用于识别单一通路,还能揭示多通路交互网络,体现中医复方的整体调控特色,避免单一路径研究的局限性。二者联合运用,能够为研究中医药复方多成分、多靶点、多途径治疗疾病的复杂生物过程提供有力的支撑^[18-19]。因此,本研究通过网络药理学结合转录组学分析,探索托里消毒散治疗UC的作用机制,并进一步通过动物实验进行验证,以期对托里消毒散治疗UC提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 采用无特定病原体(SPF)级7周龄健康C57BL/6J雄性小鼠40只,体质量18~22 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,合格证号SYXK(川)2020-124;小鼠饲养于成都中医药大学动物实验中心,环境温度20~23℃、湿度50%~60%,光/暗循环12 h。

1.2 伦理 所有实验动物及操作均按照国际动物实验护理和使用指南进行,并由成都中医药大学动物实验伦理审查批准,伦理号2026009。

1.3 药物 按托里消毒散原方比例^[12]配置饮片,人参18 g、川芎18 g、白芍18 g、黄芪18 g、当归18 g、白术18 g、茯苓18 g、金银花18 g、白芷9 g、甘草9 g、皂角针9 g、桔梗9 g,共180 g(批号分别为2408085、D2407059、2408130、2407087、2408181、2408200、2407179、2408189、2408041、2407203、2405022、2407219),均购自四川新荷花中药饮片公司。美沙拉嗪肠溶片(葵花药业集团股份有限公司,批号H19980148,规格0.25 g×24/盒)。

1.4 试剂 小鼠白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,批号分别为042928202680427、042928184420427、042928104840427);葡聚糖硫酸钠(DSS, M.W40000)(上海麦克林生化科技股份有限公司,批号C17143790);Total RNA Extraction Kit、RNA提取辅助试剂、中性树胶、Protease inhibitor 100 \times 、苯甲基磺酰氟(PMSF)、磷酸酶抑制剂100 \times 、二辛可宁酸法(BCA)蛋白浓度测定试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液(5 \times)、彩色预染蛋白Marker(10~180 kDa)、聚山梨酯-20、牛血清白蛋白(BSA)、增强化学发光法(ECL)化学发光底物(特超敏)(Biosharp 生物技术有限公司,批号分别为BL1365A、BL1665A、BL704A、BL612A、BL507A、BL615A、BL521C、BL502A、BL712、BS100、Bs-114、BL520B);PrimeScript RT reagent Kit、TB GreenTM Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus)(北京宝日生物技术有限公司,批号分别为RR047A、RR820A);无水乙醇分析纯(AR)级(上海国药集团化学试剂有限公司,批号100092680);Cell lysis buffer for Western and IP(上海碧云天生物有限公司,批号P0013);自动制胶仪配套试剂盒、脱脂奶粉、苏木素染液(湖北赛维尔生物科技有限公司,批

号分别为G2180-2L、GC310001、G1004); Immobilon-PSQ 聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(上海Sigmaaldrich公司,批号ISEQ00010);伊红染液(合肥博美生物科技有限责任公司,批号YE2080);脱蜡剂/透明剂(无锡市江原实业技贸总公司,批号240131);甘氨酸、Tris(广州赛国生物科技有限责任公司,批号分别为1275KG2P5、1115KG001);CH₃OH、无水乙醇(四川西陇科学有限公司,批号分别为67-56-1、64-17-5);HCl(成都市科隆化学品有限公司,批号7647-01-0);膜再生液(强)(北京索莱宝科技有限公司,批号SW3022);羊抗兔免疫球蛋白(IgG)(H+L)辣根过氧化物酶(HRP)、 β -肌动蛋白(β -actin)、蛋白激酶B(Akt)、核转录因子- κ B p65 亚基(NF- κ B p65)抗体(武汉爱博泰克生物技术有限公司,批号分别为AS014、AC026、A17909、A19653);磷酸化(p)-Akt、p-磷脂酰肌醇3-激酶(p-PI3K)抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司,批号分别为AF0016、AF3242);PI3K抗体(上海Abcam公司,批号ab191606);p-p65抗体(北京Bioworld公司,批号BS4138)。引物均交由生工生物工程(上海)有限公司设计合成, β -actin上游(5'-CTACCTCATGAAGATCCTGACC-3'),下游(5'-CACAGCTTCTCTTTGATGTCAC-3'),长度90 bp;Akt上游(5'-CGCTTCTATGGTGCGGAGAT-3'),下游(5'-GTTCTCCAGCTTCAGGTCCC-3'),长度87 bp;p65上游(5'-CTGGTCACCAAGGGATCCACC-3'),下游(5'-AATGGCTTGCTCCAGGTC TC-3'),长度165 bp;PI3K上游(5'-GAGGATTTGCCCCACCATGA-3'),下游(5'-CCACTACGGAGCAGGCATAG-3'),长度148 bp。TRIzol、oligo(dT)磁珠、dUTP Solution(美国Thermo Fisher公司,批号分别为15596018、25-61005、R0133);镁离子打断试剂盒、RNase H、*E. coli* DNA polymerase I、尿嘧啶-DNA糖基化酶(UDG酶)(美国NEB公司,批号分别为E6150S、m0297、m0209、m0280);逆转录酶(美国Invitrogen公司,批号1896649)。

1.5 仪器 BioTek FLx800型酶标仪(美国伯腾仪器有限公司),H2050R型离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),PPT-A+100型电子天平(上海力辰仪器科技有限公司),TU-10型电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司),Leica 2016型转轮式切片机(德国徕卡公司),JT-12S型自动脱水机(武汉俊杰电子有限公司),BMI-A型组织包埋机、PHY-M11型病理组织漂烘仪(常州市中威电子仪器有限

公司), Panoramic 250型数字切片扫描仪(匈牙利3DHISTECH公司), QuantStudio™ 3型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪、TCA0096型热循环仪、NanoDrop ND-1000型紫外-可见分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific公司), KZ-III-F型高速低温组织研磨仪、PW-600型电泳电源、T-20型制胶仪、DS-H200型数显水平摇床(武汉塞维尔科技有限公司), HT165R型低温离心机(湖南湘仪实验仪器厂), XH-B型旋涡混合器(江苏康健医疗用品有限公司), UPH-II-10T型超纯水制造系统(成都超纯科技有限公司), SYQ-DSX-280B型手提式不锈钢压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂), JY-SCZ4+型垂直电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司), 80241ES05型迷你垂直电泳转印槽(上海雅酶生物技术有限公司), S1010E型掌上离心机(美国 SCIOLOGEX公司), JY92-IIN型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司), HT165R型高速台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司), TU-10型恒温金属浴(上海一恒科技有限公司), 5200 Multi型全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司), Bioanalyzer 2100型生物分析仪(美国安捷伦科技有限公司), Illumina Novaseq 6000型测序仪(中国杭州联川生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 托里消毒散潜在活性成分及靶点获取 使用传统中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)来筛选中药配方的活性化合物。检索对象被限定为“中药”, 关键词为“人参”“白术”“茯苓”“甘草”“黄芪”“当归”“川芎”“白芍”“桔梗”“白芷”“金银花”“皂角刺”。筛选标准为口服生物利用度(OB)≥30%和药物相似性(DL)≥0.18。符合筛选标准的化合物被选为潜在的活性成分, 并进一步用于靶点预测。从UniProt数据库将所得托里消毒散靶点的蛋白质名称与基因名称进行转换, 获得靶点基因。

2.1.2 UC潜在靶点获取 使用基因名片数据库(GeneCards)以“溃疡性结肠炎”为关键词筛选与疾病相关的基因。根据相关性得分对筛选得到的基因进行排序, 并选择高相关性的基因用于后续分析。

2.1.3 药物-成分-靶点-疾病网络构建 将托里消毒散主要成分及交集靶点数据导入 Cytoscape

3.10.0, 构建“药物-成分-靶点-疾病”网络图。

2.1.4 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建与核心靶点筛选 将2.1.3中所获得的药物与疾病的交集靶点导入蛋白互作网络分析数据库(String), 设置相互作用阈值>0.400进行PPI分析, 再利用Cytoscape 3.10.0对分析结果的网络介数中间性、紧密中间性和节点度值进行分析, 筛选出核心靶点。

2.1.5 基因本体(GO)功能富集分析与京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 将2.1.1项中通过TCMSP数据库筛选的化合物潜在靶标与2.1.2项中通过GeneCards数据库筛选出的UC相关基因进行交集分析, 以识别共同的靶标基因。使用DAVID数据库对这些交集基因进行GO和KEGG富集分析, 物种选项设置为“人类”(Homo sapiens), 设定经错误发现率校正的P值(P_{adj})<0.05作为显著性阈值, 来确保富集结果具有统计学意义和生物学相关性。

2.2 动物实验

2.2.1 托里消毒散水提液制备 按照料液比1:10, 采用蒸馏水浸泡药物30 min, 随后煎煮30 min, 400目滤布过滤, 分离药汁和药渣; 再按同样的方法进行2次煎煮, 并将2次所得药液混合后进行浓缩, 浓缩后得水煎液180 mL(生药量 $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 4°C 保存^[20]。

2.2.2 实验分组 40只C57BL/6J雄性小鼠适应性喂养7 d后, 随机分为空白组、模型组、托里消毒散高、低剂量组及美沙拉嗪组, 每组8只小鼠。分组后, 各给药组进行7 d预给药^[21]。按实验动物与人体表面积比所得等效剂量比率, 换算治疗药物的给药剂量^[22]: 托里消毒散高剂量组给药剂量为 $11.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 托里消毒散低剂量组给药剂量为 $5.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 美沙拉嗪组给药剂量为 $0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。预给药结束后, 空白组小鼠继续饮用纯水, 模型组、托里消毒散高剂量组、托里消毒散低剂量组及美沙拉嗪组通过小鼠连续自由饮用7 d 3%DSS溶液构建UC动物模型^[23-24]。造模第2天开始, 实验小鼠的粪便性状分数、便隐血分数均上调, 造模第4天开始出现体质量丢失表示造模成功。

从造模当天开始, 托里消毒散组、美沙拉嗪组通过灌胃给药, 每日灌胃1次, 连续7 d。每天记录每只小鼠的精神、饮食、饮水、体质量、毛发, 进行疾病活动指数(DAI)评分^[25]。各组小鼠DAI评分按照表1所示的评分标准, 计算公式 $\text{DAI}=(\text{体质量下降率分数}+\text{大便性状分数}+\text{便血分数})/3$ 。

表1 小鼠DAI评分标准

Table 1 DAI scoring criteria of mice

评分/分	体质量下降率/%	大便性状	隐血情况
0	无	正常	隐血(-)
1	1~5	松散	隐血(+)
2	6~10	松散	隐血(++)
3	11~15	稀便	隐血(+++)
4	>15	水样便	肉眼血便

2.2.3 样本采集与处理 末次给药后,各组小鼠禁食不禁水24 h后,以舒泰50 mg·kg⁻¹肌内注射麻醉。所有小鼠进行眼球取血,将收集到的血液室温静置30 min,3 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径8 cm),分离血清存于-80 °C冰箱中备用。取血完成后颈椎脱臼法处死小鼠,收集小鼠结肠。结肠一部分固定于4%多聚甲醛中,一部分存于-80 °C冰箱中备用。

2.2.4 小鼠结肠组织病理苏木素-伊红(HE)染色

经固定后的小鼠结肠组织进行脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、脱蜡、HE染色、脱水、透明、封片流程后在光学显微镜下观察小鼠组织病理状况。按照文献的标准进行结肠组织病理学评分,最高分数为10分^[26]。

2.3 转录组测序分析 用TRIzol,根据厂商提供的操作方案对总样品的RNA进行分离和纯化。然后用NanoDrop ND-1000对总RNA的量与纯度进行质控并通过Bioanalyzer 2100对RNA的完整性进行检测;质量浓度>50 mg·L⁻¹,RNA完整性指数(RIN)值>7.0, total RNA>1 μg满足下游实验。使用oligo(dT)磁珠通过两轮纯化对其中的带有多聚腺苷酸(PolyA)的信使RNA(mRNA)进行特异性捕获。将捕获到的mRNA在高温条件下利用镁离子打断试剂盒进行片段化,94 °C、5~7 min。将片段化的RNA通过逆转录酶的作用下合成互补DNA(cDNA)。然后使用*E. coli* DNA polymerase I与RNase H进行二链合成,将这些DNA与RNA的复合双链转化成DNA双链,同时在二链中掺入dUTP Solution,将双链DNA的末端补齐为平末端,再在其两端各加上一个A碱基,使其能够与末端带有T碱基的接头进行连接,并利用磁珠对其片段大小进行筛选和纯化。以UDG酶消化二链,再通过PCR预变性95 °C保持3 min,98 °C变性总计8个循环,每次15 s,退火到60 °C保持15 s,72 °C下延伸30 s,最后延伸72 °C保持5 min,使其形成片段大小为(300±50) bp的文库(链特异性文库)。最后,使用illumina Novaseq™

6000按照标准操作对其进行双端测序,测序模式为双端(PE)150。转录组测序由杭州联川生物技术股份有限公司协助完成。

2.4 小鼠结肠组织蛋白免疫印迹法(Western blot)检测

取各组小鼠结肠组织,并立即投入液氮以实现快速冷冻。之后,转移到含有磷酸酶抑制剂与蛋白酶抑制剂的放射免疫沉淀分析(RIPA)裂解液中进行处理。裂解完成后,用4 °C 12 000 r·min⁻¹,离心15 min(离心半径10 cm),以分离出所需的蛋白质。按BCA试剂盒说明书配置蛋白检测工作液及蛋白标准品。采用酶标仪在562 nm处测定蛋白样品的吸光度A,同时计算样品的蛋白浓度。对蛋白质行凝胶电泳,并转移到PVDF膜上。室温下5%脱脂奶粉封闭1 h后,在4 °C下加入一抗(1:1 000),孵育过夜。一抗孵育结束,在室温下用二抗孵育1 h。三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水含聚山梨酯(TBST)洗膜3次,放入凝胶成像分析仪中,化学光敏模式进行曝光显影。最后使用Image J 1.53软件对条带进行灰度值分析,以内参β-actin对目的蛋白的表达量进行标准化,分析各组间蛋白表达量的差异情况。

2.5 Real-time PCR分析 将小鼠结肠组织,用液氮研磨混匀后,加入RNA裂解液中进行总RNA提纯,以基因β-actin为内参。反转录使用PrimeScript RT reagent Kit进行,反应体系包括5×PrimeScript Buffer、PrimeScript RT Enzyme Mix I、Oligo dT Primer和Random 6 mers,反应条件为37 °C、15 min逆转录,85 °C、5 s灭活逆转录酶,得到cDNA。PCR扩增,95 °C预变性1 min,94 °C变性10 s,55 °C退火30 s,循环变性(40次),72 °C延伸10 s。绘制溶解曲线,运用2^{-ΔΔC_t}法进行数据分析。

2.6 小鼠血清炎症因子ELISA检测 按试剂盒说明书进行操作,检测各组小鼠血清中TNF-α、IL-1β、IL-6的水平。

2.7 统计学分析 采用GraphPad Prism 10软件进行统计分析,实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行多组间数据比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学分析

3.1.1 药物-成分-靶点-疾病网络分析 创建成分-靶标-疾病网络是为了了解成分和可能靶标之间的微妙相互作用,通过专业数据库共确定了托里消毒散的152个主要组成部分。TCMSP数据库和GeneCards数据库提供了272个预测靶点、1 456个

UC相关靶点和128个共同靶点,并构建了药物-成分-靶点-疾病网络。网络拓扑学分析结果显示Degree排名前5的活性成分,分别为槲皮素、山柰酚、木犀草素、漆黄素和毛蕊异黄酮,见增强出版附加材料。

3.1.2 PPI网络构建与核心靶点分析 将128个交集靶点导入STRING数据库,设置相互作用阈值>0.400成PPI网络,该网络共包含128个节点和3 296条边。利用Cytoscape软件对PPI网络图进行优化, Degree值与靶点面积及颜色呈正相关进行排序。筛选 Betweenness unDir>78.469, Closeness unDir>0.005, Degree unDir>51.5后得到34个潜在的核心靶点。见增强出版附加材料。

3.1.3 GO功能富集分析与KEGG通路富集分析

将128个已确定的靶标输入DAVID数据库中进行GO富集分析,以研究托里消毒散缓解UC的生物学过程。共获得3 977种富集元件,包括268种细胞成分(CC)、454种分子活性(MF)和3 977个生物过程(BP)。分别取前20条绘制GO途径气泡图。使用KEGG数据库的通路富集研究显示,257条通路可能参与托里消毒散的作用,包括PI3K/Akt信号通路、脂质和动脉粥样硬化、TNF信号通路、白细胞介素-17(IL-17)信号通路、Toll样受体(TLR)信号通路等,分别取前20条绘制KEGG通路气泡图。其中PI3K/Akt信号通路是调控免疫炎症应答、细胞存活与屏障功能的核心枢纽。在UC中,该通路常因肠道菌群紊乱、损伤信号刺激而异常激活,通过磷酸化级联反应上调激活NF- κ B等转录因子,驱动TNF- α 、IL-1 β 等促炎因子过量释放,加剧结肠黏膜的炎症损伤与屏障破坏。其富集特征与UC病理的高度契合,为后续聚焦PI3K/Akt信号通路开展机制验证提供了关键依据。见增强出版附加材料。

托里消毒散治疗UC的核心基因中Akt1能驱动磷酸化级联,促进细胞生长和存活;信号转导及转录激活因子(STAT)3能整合下游信号,调控炎症因子表达并放大PI3K/Akt信号通路的效应;肿瘤蛋白p53(TP53)能调控细胞凋亡,与PI3K/Akt信号通路交互抑制UC相关癌变;表皮生长因子受体(EGFR)上游激活PI3K/Akt信号通路,促进上皮修复但异常时加剧炎症;TNF能触发上游信号,激活PI3K/Akt信号通路并诱导NF- κ B介导的促炎响应。这些提示PI3K/Akt信号通路在托里消毒散治疗UC过程中的关键作用。同时,GO-BP分析显示这些基因涉及炎症响应和基因表达正调控。GO-MF分析显示这

些基因具有酶结合活性和蛋白同源二聚化活性。这些基因功能表明托里消毒散通过调控这些核心基因发挥多靶点作用,并提示PI3K/Akt信号通路作为UC机制中心的地位。KEGG通路富集分析显示这些基因分布于257条通路中,前20条通路包括PI3K/Akt信号通路、癌症通路、脂质和动脉粥样硬化、糖尿病并发症中的高级糖基化终末产物/受体(AGE/RAGE)信号通路、流体剪切应力和动脉粥样硬化等。这些通路相互关联,形成炎症-免疫调控网络。TNF通路能激活PI3K/Akt信号通路,导致NF- κ B活化并促进TNF- α 、IL-6等促炎因子释放,放大UC的炎症损伤^[27]。IL-17通路可通过辅助性T细胞17(Th17)介导黏膜炎症,增强PI3K/Akt信号通路蛋白的磷酸化水平,形成正反馈循环,加剧结肠上皮破坏^[28]。TLR信号通路响应肠道微生物刺激,可激活下游PI3K/Akt信号通路,促进免疫细胞募集和屏障功能失调^[29]。这些交互提示PI3K/Akt信号通路是托里消毒散治疗UC的关键信号通路,其直接参与炎症因子释放和细胞存活调控,并作为TNF和TLR等上游信号的整合点,在托里消毒散治疗UC中发挥关键调控作用^[30]。抑制PI3K/Akt信号通路可缓解TNF和IL-17诱导的炎症级联。这些结果揭示托里消毒散多靶点的协同调控潜力,通过靶向PI3K/Akt信号通路及其关联通路的网络发挥疗效。

3.2 托里消毒散对UC小鼠的疗效

3.2.1 托里消毒散对UC小鼠体质量和DAI评分的影响 实验前各组小鼠体质量比较差异无统计学意义。造模后,与空白组比较,模型组体质量自第2天起明显下降($P<0.05$, $P<0.01$),至第7天达到最低值(15.87 ± 0.54)g;DAI评分从第3天起显著升高($P<0.01$),并于第7天达到峰值(3.67 ± 0.21)分。空白组体质量平稳,DAI评分始终处于低位。各给药组均能缓解上述趋势。与模型组比较,托里消毒散高剂量组第3、4、6、7天DAI评分明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),体质量自第5天起显著升高($P<0.01$);托里消毒散低剂量组体质量在第5~7天明显改善($P<0.05$, $P<0.01$),DAI评分在第3、6、7天明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);美沙拉嗪组体质量在第5天后显著升高($P<0.01$),DAI评分在第3、6天明显降低($P<0.05$)。见表2、表3。

3.2.2 托里消毒散对UC小鼠结肠长度的影响 与空白组比较,模型组小鼠结肠长度显著缩短($P<0.01$);与模型组比较,托里消毒散给药组和美沙拉嗪给药组

表2 托里消毒散对UC小鼠体质量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Tuoli Xiaodu San on body weight of UC mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
空白组		22.55±0.97	22.70±0.92	22.77±1.14	22.93±0.99	22.77±0.84	22.65±0.63	22.97±1.07
模型组		21.65±0.86	20.18±0.86 ²⁾	21.25±1.13 ¹⁾	21.25±0.89 ²⁾	19.67±0.85 ²⁾	17.80±0.60 ²⁾	15.87±0.54 ²⁾
托里消毒散高剂量组	11.3	20.38±1.25	21.00±0.51	21.90±0.73	21.70±0.76	21.40±0.61 ⁴⁾	20.82±0.95 ⁴⁾	19.63±0.87 ⁴⁾
托里消毒散低剂量组	5.7	20.63±1.38	19.63±0.81	20.98±0.74	20.90±0.88	21.07±0.74 ³⁾	19.78±0.75 ⁴⁾	19.65±0.83 ⁴⁾
美沙拉嗪组	0.4	21.50±1.48	19.80±1.52	21.22±1.32	21.55±1.28	21.98±1.08 ⁴⁾	21.13±0.72 ⁴⁾	19.73±0.68 ⁴⁾

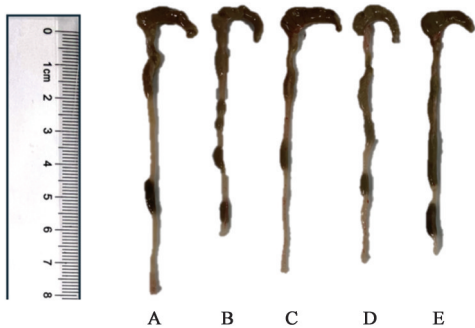
注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01(表3-表8同)

表3 托里消毒散对UC小鼠DAI分数的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Tuoli Xiaodu San on DAI score of UC mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
空白组		0.11±0.17	0.39±0.14	0.06±0.14	0.11±0.17	0.28±0.25	0.28±0.25	0.00±0.00
模型组		0.44±0.27	0.89±0.5	1.17±0.35 ²⁾	1.83±0.62 ²⁾	2.28±0.71 ²⁾	3.44±0.46 ²⁾	3.67±0.21 ²⁾
托里消毒散高剂量组	11.3	0.76±0.66	0.66±0.23	0.22±0.27 ³⁾	0.73±0.48 ⁴⁾	1.53±1.18	1.90±1.13 ⁴⁾	1.88±0.90 ⁴⁾
托里消毒散低剂量组	5.7	0.47±0.26	0.65±0.20	0.27±0.39 ³⁾	1.23±1.25	1.52±1.04	1.93±0.71 ⁴⁾	2.59±0.21 ³⁾
美沙拉嗪组	0.4	0.61±0.33	0.78±0.27	0.28±0.39 ³⁾	1.28±1.44	1.94±0.98	2.56±0.54 ³⁾	2.89±0.58

小鼠结肠显著延长,差异有统计学意义(P<0.01)。见图1、表4。



注:A.空白组;B.模型组;C.托里消毒散高剂量组;D.托里消毒散低剂量组;E.美沙拉嗪组(图2和图3同)

图1 托里消毒散对UC小鼠结肠长度的影响

Fig. 1 Representative image of effect of Tuoli Xiaodu San on colon length in UC mice

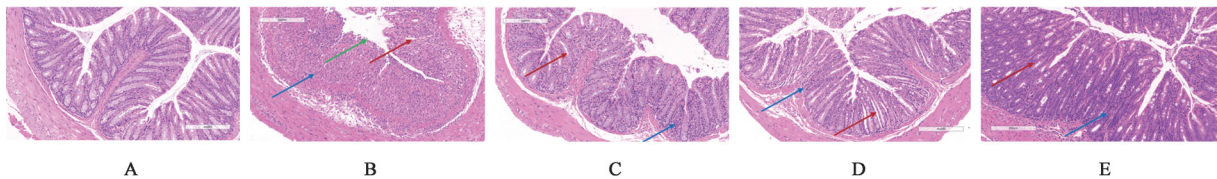
3.2.3 组织病理学评估 空白组小鼠结肠组织结构清晰,上皮细胞排列整齐,无炎症表征;模型组小

表4 托里消毒散对UC小鼠结肠长度的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Tuoli Xiaodu San on colon length of UC mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	结肠长度/cm
空白组		8.12±0.16
模型组		4.93±0.25 ²⁾
托里消毒散高剂量组	11.3	6.17±0.29 ⁴⁾
托里消毒散低剂量组	5.7	5.70±0.35 ⁴⁾
美沙拉嗪组	0.4	5.50±0.32 ⁴⁾

鼠结肠见炎性细胞大量浸润,伴有黏膜水肿、出血、上皮细胞脱落或坏死,隐窝和杯状细胞大量消失,黏膜下层增厚。与空白组比较,模型组病理评分显著升高,差异有统计学意义(P<0.01)。与模型组比较,托里消毒散给药组和美沙拉嗪组结肠组织损伤明显减轻,病理评分显著降低,差异有统计学意义(P<0.01)。托里消毒散对UC小鼠结肠组织变化的影响见图2、表5。



注:蓝色箭头炎性细胞浸润;绿色箭头上皮破坏;红色箭头隐窝破坏

图2 托里消毒散对UC小鼠结肠组织变化的影响(HE,×200)

Fig. 2 Effect of Tuoli Xiaodu San on colonic tissue changes in UC mice (HE,×200)

3.2.4 托里消毒散对UC小鼠炎症因子TNF-α、IL-6、IL-1β水平的影响 与空白组比较,模型组小鼠

TNF-α、IL-1β、IL-6水平明显升高(P<0.05, P<0.01);与模型组比较,托里消毒散高剂量组TNF-α、IL-6、IL-1β

表5 托里消毒散对UC小鼠结肠病理评分的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Tuoli Xiaodu San on colon pathological score of UC mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	组织病理学评分/分
空白组		0.33±0.52
模型组		2.50±0.55 ²⁾
托里消毒散高剂量组	11.3	1.17±0.41 ⁴⁾
托里消毒散低剂量组	5.7	1.33±0.52 ⁴⁾
美沙拉嗪组	0.4	1.50±0.54 ⁴⁾

表6 托里消毒散对UC小鼠炎症因子TNF-α、IL-6、IL-1β水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Tuoli Xiaodu San on levels of inflammatory factors TNF-α, IL-6 and IL-1β in UC mice ($\bar{x}\pm s, n=3$) ng·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF-α	IL-1β	IL-6
空白组		21.46±15.31	35.63±4.32	531.96±56.89
模型组		135.65±74.93 ¹⁾	83.34±11.10 ²⁾	1 303.76±164.10 ²⁾
托里消毒散高剂量组	11.3	28.53±11.32 ³⁾	38.75±13.34 ⁴⁾	975.83±66.76 ³⁾
托里消毒散低剂量组	5.7	47.25±39.22	49.81±4.07 ³⁾	949.31±43.40 ³⁾
美沙拉嗪组	0.4	15.19±10.57 ³⁾	51.26±23.77	784.46±175.58 ⁴⁾

3.3.2 GO功能富集分析与KEGG通路富集分析
将460个核心差异基因输入到DAVID数据库中进行富集分析,得到BP 1 237条、MF 352条、CC 459条,分别选取前20条,绘制了GO途径柱状图,见增强出版附加材料。KEGG通路富集分析结果显示,共得到182条通路,包括PI3K/Akt信号通路、细胞外基质(ECM)-受体相互作用通路、蛋白质消化吸收通路、肌肉细胞中的细胞骨架通路等。选取前20条通路绘制了KEGG分类柱状图,见增强出版附加材料。

托里消毒散差异基因中整合素β6亚基(ITGB6)编码,通过结合ECM激活PI3K/Akt信号通路,促进肠道上皮黏附和屏障修复,在UC中异常表达导致炎症持续;COL1A2编码胶原I α2链,是PI3K/Akt信号通路下游靶点,在纤维化过程中调控代谢失调,加剧屏障破坏;H2-AA编码组织相容性复合体(MHC)Ⅱ抗原α链,参与抗原呈递,与PI3K/Akt信号通路交互激活Th17细胞诱导IL-17炎症响应;基质金属蛋白酶(MMP)3编码是PI3K/Akt信号通路下游效应器,通过降解ECM放大炎症级联^[31-32]。KEGG通路富集分析显示这些基因分布于182条通路中,前20条通路包括ECM-受体相互作用、蛋白质消化吸收、肌肉细胞骨架和松弛素信号通路等。这些通路相互关联,形成屏障修复-代谢调控网络。ECM-受体相互作用通路可通过整合素激活PI3K/Akt信号通路,促进肠道上皮修复^[33]。蛋白

水平明显降低($P<0.05, P<0.01$);托里消毒散低剂量组IL-1β、IL-6水平明显降低($P<0.05$);美沙拉嗪组TNF-α、IL-6水平明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表6。

3.3 转录组测序分析

3.3.1 差异表达基因(DEGs)分析 模型组与空白组比较,共鉴定出4 709个差异基因,托里消毒散高剂量组与模型组共鉴定出900个差异基因,将两组差异基因取交集,共得到460个托里消毒散治疗UC的差异基因,结果见增强出版附加材料。

质消化吸收通路涉及胶原降解,与PI3K/Akt信号通路调控的代谢失调相关,加剧UC屏障破坏^[34]。这些交互表明PI3K/Akt信号通路是UC转录网络中的中心枢纽,直接参与屏障功能和代谢调控,在结肠炎发病中发挥关键调控作用。这些结果共同揭示托里消毒散的整体调控潜力,通过靶向PI3K/Akt信号通路及其关联通路的网络改善UC转录景观。

综上,网络药理学和转录组学整合分析揭示托里消毒散治疗UC的机制以PI3K/Akt信号通路为中心。网络药理学强调炎症-免疫网络,PI3K/Akt信号通路作为整合枢纽放大促炎响应。转录组学则突出屏障修复和代谢调控,如基因ITGB6、COL1A2和MMP3通过ECM-受体相互作用和蛋白质消化吸收通路及PI3K/Akt信号通路关联。二者共同支持托里消毒散通过多靶点网络抑制炎症、修复屏障的整体机制,同时提示PI3K/Akt信号通路在多通路网络中的核心地位。

3.4 托里消毒散对UC小鼠结肠组织PI3K/Akt通路相关基因表达的影响 与空白组比较,模型组小鼠结肠组织PI3K、p65、Akt的mRNA均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,托里消毒散高、低剂量组和美沙拉嗪组PI3K、p65、Akt的mRNA表达均明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表7。

3.5 托里消毒散对UC小鼠结肠组织PI3K/Akt通路相关蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组小鼠结肠PI3K、p-PI3K、p65、p-p65、Akt、p-Akt的蛋白表

表7 托里消毒散对UC小鼠结肠组织PI3K/Akt通路相关mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Tuoli Xiaodu San on mRNA expression of PI3K/Akt pathway related genes in colon tissue of UC mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PI3K	p65	Akt
空白组		1.03±0.33	1.04±0.35	1.01±0.14
模型组		3.93±0.77 ²⁾	3.08±0.10 ²⁾	3.00±0.23 ²⁾
托里消毒散高剂量组	11.3	2.07±0.71 ⁴⁾	1.13±0.18 ⁴⁾	1.12±0.24 ³⁾
托里消毒散低剂量组	5.7	1.60±0.72 ⁴⁾	1.40±0.81 ⁴⁾	1.42±0.46 ⁴⁾
美沙拉嗪组	0.4	0.96±0.06 ⁴⁾	1.04±0.22 ⁴⁾	1.16±0.08 ⁴⁾

达均明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,托里消毒散高剂量组PI3K、p-PI3K、p65、p-p65、Akt、p-Akt的蛋白表达均明显降低($P<0.05, P<0.01$);托里消毒散低剂量组给药后PI3K、p65、Akt的蛋白表达明显降低($P<0.05, P<$

0.01)。见图3、表8。

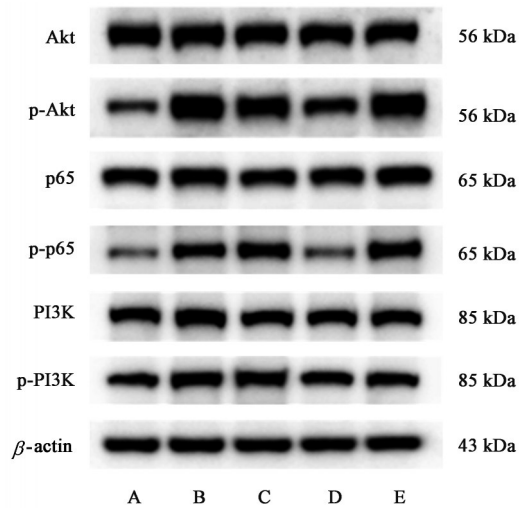


图3 各组小鼠结肠组织相关蛋白电泳

Fig. 3 Electrophoresis of protein expression in colon tissue of mice in each group

表8 托里消毒散对UC小鼠结肠组织PI3K/Akt通路相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8 Effect of Tuoli Xiaodu San on expression of PI3K/Akt pathway-related proteins in colon tissue of UC mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PI3K/ β -actin	p-PI3K/ β -actin	p65/ β -actin	p-p65/ β -actin	Akt/ β -actin	p-Akt/ β -actin
空白组		1.06±0.12	0.79±0.07	0.97±0.08	0.49±0.10	1.06±0.09	0.67±0.16
模型组		1.27±0.12 ¹⁾	1.19±0.16 ²⁾	1.31±0.24 ²⁾	1.07±0.16 ²⁾	1.29±0.14 ²⁾	1.39±0.21 ²⁾
托里消毒散高剂量组	11.3	0.99±0.12 ⁴⁾	0.95±0.17 ³⁾	0.98±0.17 ⁴⁾	0.77±0.19 ³⁾	1.02±0.13 ⁴⁾	1.00±0.13 ⁴⁾
托里消毒散低剂量组	5.7	1.03±0.15 ³⁾	1.24±0.13	0.99±0.12 ⁴⁾	1.11±0.11	1.00±0.13 ⁴⁾	1.24±0.21
美沙拉嗪组	0.4	1.02±0.13 ⁴⁾	1.07±0.17	1.04±0.12 ³⁾	1.15±0.20	0.98±0.07 ⁴⁾	1.24±0.18

4 讨论

作为一种难治性非特异性炎症性肠病,UC全球流行,且患病率持续增高。2023年,全球UC患病率估计为500万例,且其发病率在全世界范围呈上升趋势^[35]。1990—2016年间,亚洲人群UC患病率为(2.42~21)/10万人,预计到2035年,患病率将增加4倍^[36]。2016年,我国UC患病率约为17.24/10万人,且持续上升^[37]。UC日益成为一项严峻的公共卫生挑战,给全世界和我国人民带来了沉重的经济负担^[38]。西医的治疗方法常伴随不良反应,患者往往需要长期甚至终身服药,停药后易复发,且部分药物价格昂贵。高医药具有整体调节、多靶点治疗等特点,在解决UC复杂病理机制交错方面具有卓越的优势^[39-41]。中药复方可通过调节肠道菌群(增加有益菌、抑制致病菌)、修复受损肠黏膜、调节免疫,对UC显示出潜在的治疗效果^[42-43]。基于“异病同治”的中医理论,外科托里透毒法已逐渐应用于UC的治疗和研究。作为托里透毒法的代表方剂,临床研究显示托里消毒散对UC具有良好的疗效^[13-14]。

本研究证实,托里消毒散能够显著改善UC小鼠稀(血)便、体质量下降、精神萎靡、毛发粗糙、结肠缩短等症状,降低UC小鼠DAI评分,改善UC小鼠病理损伤,并显著降低炎症因子TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平,证实了托里消毒散治疗UC的疗效。但托里消毒散治疗UC的具体机制尚不清楚。

本研究对网络药理学和转录组学的结果进行联合分析,初步揭示出托里消毒散治疗UC的物质基础和潜在作用机制。网络药理学发现,托里消毒散治疗UC的主要成分包括槲皮素、山柰酚、木犀草素、漆黄素和毛蕊异黄酮;网络药理学与转录组学同时提示,PI3K/Akt信号通路是托里消毒散治疗UC的关键信号通路。该通路的激活与UC发生发展密切相关。TNF通过结合其受体激活PI3K/Akt信号通路,导致NF- κ B核转位和下游IL-1 β 、TNF- α 、IL-6等促炎因子表达,在UC中加剧黏膜损伤^[27];IL-17刺激Th17细胞激活PI3K/Akt信号通路,促进促炎介质如TNF- α 的产生,增强黏膜炎症^[28];肠道微生物刺激TLR4激活PI3K/Akt和NF- κ B路径,促

进免疫细胞募集和屏障功能失调,在UC中放大炎症级联^[29]。因此抑制PI3K/Akt信号通路可缓解UC炎症反应,同时改善屏障破坏和代谢失调等。网络药理学和转录组学结果揭示托里消毒散多靶点协同调控潜力,通过调控PI3K/Akt信号通路及其关联通路发挥疗效。本研究中,Western blot和Real-time PCR的结果显示,与空白组比较,模型组小鼠的PI3K、Akt、p65 mRNA和蛋白的表达及蛋白磷酸化水平均明显升高,而经托里消毒散干预后,PI3K、Akt、p65mRNA和蛋白的表达及蛋白磷酸化水平均明显降低。结果证实了网络药理学和转录组学的分析。尽管本研究通过网络药理学和转录组学揭示了多靶点、多通路网络,但实验验证主要聚焦于PI3K/Akt信号通路,多通路机制网络中其他靶点和通路验证有限,未来研究需要通过更全面的分子实验验证这些靶点和通路,以阐明托里消毒散治疗UC的机制全景。

综上,托里消毒散能通过抑制PI3K/Akt信号通路的活化,显著减轻DSS诱导的UC症状及结肠组织病理损伤,机制图见增强出版附加材料。本研究为托里消毒散的临床合理应用提供科学依据,并为后续研究提供实验基础与参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] VOELKER R. What is ulcerative colitis?[J]. JAMA, 2024, 331(8):716.
- [2] WANGCHUK P, YESHI K, LOUKAS A. Ulcerative colitis: Clinical biomarkers, therapeutic targets, and emerging treatments [J]. Trends Pharmacol Sci, 2024, 45(10):892-903.
- [3] AL-HORANI R, SPANUDAKIS E, HAMAD B. The market for ulcerative colitis [J]. Nat Rev Drug Discov, 2022, 21(1):15-16.
- [4] 张声生,沈洪,郑凯,等. 溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识意见(2017)[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(8):3585-3589.
- ZHANG S S, SHEN H, ZHENG K, et al. Expert consensus on traditional Chinese medicine diagnosis and treatment of ulcerative colitis (2017)[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 32(8):3585-3589.
- [5] 周志文,李姗,禄保平. 内外科互参论治溃疡性疾病[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(2):778-780.
- ZHOU Z W, LI S, LU B P. Integrated internal and external medicine approaches in treating ulcerative diseases[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2023, 38(2):778-780.
- [6] 李宝乐,郝海蓉,刘竺华,等. 任顺平从“疡”论治溃疡性结肠炎的经验总结[J]. 中国民间疗法, 2019, 27(4):1-3.
- LI B L, HAO H R, LIU Z H, et al. Summary of REN Shunping's experience in treating ulcerative colitis from the perspective of "ulcer"[J]. Chin Naturopathy, 2019, 27(4):1-3.

- [7] 冀建斌. 周正华从痈疡论治溃疡性结肠炎经验介绍[J]. 新中医, 2017, 49(12):210-212.
- JI J B. Introduction to ZHOU Zhenghua's experience in treating ulcerative colitis from the perspective of abscess and ulcer[J]. J New Chin Med, 2017, 49(12):210-212.
- [8] 米刘悦,张双喜,陈双,等. 薏苡附子败酱散治疗溃疡性结肠炎的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(10):254-263.
- MI L Y, ZHANG S X, CHEN S, et al. Research progress on Yi Yi Fu Zi Bai Jiang San in the treatment of ulcerative colitis[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2023, 29(10):254-263.
- [9] 张永,胡志鹏,叶俏波. 托里透毒法在溃疡性结肠炎中的运用[J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(2):341-343.
- ZHANG Y, HU Z P, YE Q B. Application of Tuoli Toudou method in the treatment of ulcerative colitis[J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2018, 45(2):341-343.
- [10] 宋兴. 托里透毒法治疗慢性消化性溃疡初探[J]. 成都中医药大学学报. 1999, 22(1):4-6, 65.
- SONG X. Preliminary study on the Tuoli Toudou method in treating chronic peptic ulcer[J]. J Chengdu Univ Tradit Chin Med, 1999, 22(1):4-6, 65.
- [11] 安慎富,高宗跃,杨娅娟. 疮疡理论在溃疡性结肠炎治疗中的应用[J]. 河南中医, 2024, 44(11):1660-1664.
- AN S F, GAO Z Y, YANG Y J. Application of sore and ulcer theory in the treatment of ulcerative colitis[J]. Henan Tradit Chin Med, 2024, 44(11):1660-1664.
- [12] 王顺喜,牛蔚露,刘学伟,等. 经典名方托里消毒散的古籍文献与现代临床应用分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(8):176-186.
- WANG S X, NIU W L, LIU X W, et al. Analysis of classical prescription Tuoli Xiaodu San in ancient literature and modern clinical applications[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2024, 30(8):176-186.
- [13] 胡丽芳. 托里消毒散治疗溃疡性结肠炎31例[J]. 安徽中医临床杂志, 2000, doi:10.16448/j.cjctm.2000.05.037.
- HU L F. Tuoli Xiaodu San in the Treatment of 31 Cases of Ulcerative Colitis[J]. Clin J Tradit Chin Med, 2000, doi:10.16448/j.cjctm.2000.05.037.
- [14] 黄木宝. 托里消毒散治疗溃疡性结肠炎17例[J]. 新中医, 1998(4):49-50.
- HUANG M B. Tuoli Xiaodu San in the Treatment of 17 Cases of Ulcerative Colitis[J]. J New Chin Med, 1998(4):49-50.
- [15] SHANG L, WANG Y, LI J, et al. Mechanism of Sijunzi decoction in the treatment of colorectal cancer based on network pharmacology and experimental validation [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 302(Pt A):115876.
- [16] DUAN Z L, WANG Y J, LU Z H, et al. Wumei Wan attenuates angiogenesis and inflammation by modulating RAGE signaling pathway in IBD: Network pharmacology analysis and experimental evidence[J]. Phytomedicine, 2023, 111:154658.
- [17] 张照,杨菊,王加伟,等. 左金丸对DSS诱导的溃疡性结肠炎的作用及其机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(16):1-11.
- ZHANG Z, YANG J, WANG J W, et al. Effects and mechanisms

- of Zuojin Wan on DSS-induced ulcerative colitis[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2023, 29(16): 1-11.
- [18] 李芳, 陈正君, 葛俊李, 等. 党参经 PI3K/Akt 干预溃疡性结肠炎黏膜细胞铁死亡-线粒体动力学失衡的机制研究[J]. 中草药, 2023, 54(12): 3865-3877.
- LI F, CHEN Z J, GE J L, et al. Mechanism study of *codonopsis pilosula* in intervening ferroptosis and mitochondrial dynamics imbalance in ulcerative colitis mucosal cells via PI3K/Akt pathway[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(12): 3865-3877.
- [19] 王磊, 潘蕴, 万利花, 等. 基于 PI3K/Akt 通路探讨黄连知母汤治疗 2 型糖尿病的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(21): 168-177.
- WANG L, PAN Y, WAN L H, et al. Exploring the mechanism of Huanglian Zhimu decoction in treating type 2 diabetes based on the PI3K/Akt pathway[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025, 31(21): 168-177.
- [20] YE Z, LI L, LI Y, et al. Tou Nong powder obstructs ulcerative colitis through the regulation of NF- κ B/NLRP3/Caspase-1/GSDMD inflammasome pyroptotic pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 317: 116846.
- [21] YE Z, LI Y, SHE Y, et al. Renshen Baidu powder protects ulcerative colitis via inhibiting the PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 880589.
- [22] 陈奇, 张伯礼. 中药药效研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016.
- CHEN Q, ZHANG B L. Methodology of Chinese medicine efficacy studies[M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2016.
- [23] WANG Y, ZHANG J, ZHANG B, et al. Modified Gegen Qinlian decoction ameliorated ulcerative colitis by attenuating inflammation and oxidative stress and enhancing intestinal barrier function *in vivo* and *in vitro*[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 313: 116538.
- [24] EICHELE D D, KHARBANDA K K. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(33): 6016-6029.
- [25] DAI Y, LU Q, LI P, et al. Xianglian pill attenuates ulcerative colitis through TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 300: 115690.
- [26] COOPER H S, MURTHY S N, SHAH R S, et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis[J]. Lab Invest, 1993, 69(2): 238-249.
- [27] ZHANG Z, CHONG W, XIE X, et al. *Hedysarum multijugum* Maxim treats ulcerative colitis through the PI3K-Akt and TNF signaling pathway according to network pharmacology and molecular docking[J]. Ann Transl Med, 2022, 10(20): 1132.
- [28] LI Q, ZHENG S, NIU K, et al. Paeoniflorin improves ulcerative colitis via regulation of PI3K-Akt based on network pharmacology analysis[J]. Exp Ther Med, 2024, 27(4): 125.
- [29] CHEN L, ZHANG L, HUA H, et al. Interactions between toll-like receptors signaling pathway and gut microbiota in host homeostasis[J]. Immun Inflamm Dis, 2024, 12(7): e1356.
- [30] HUANG X L, XU J, ZHANG X H, et al. PI3K/Akt signaling pathway is involved in the pathogenesis of ulcerative colitis[J]. Inflamm Res, 2011, 60(8): 727-734.
- [31] WEICHHART T, SÄEMANN M D. The PI3K/Akt/mTOR pathway in innate immune cells: Emerging therapeutic applications[J]. Ann Rheum Dis, 2008, 67(Suppl 3): iii70-74.
- [32] XIE H, JIAO Y, ZHOU X, et al. Integrin α V β 6 contributes to the development of intestinal fibrosis via the FAK/Akt signaling pathway[J]. Exp Cell Res, 2022, 411(2): 113003.
- [33] LEE J W, JULIANO R L. α 5 β 1 integrin protects intestinal epithelial cells from apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B-dependent pathway[J]. Mol Biol Cell, 2000, 11(6): 1973-1987.
- [34] LI Q, WANG J. The effect of protein nutritional support on inflammatory bowel disease and its potential mechanisms[J]. Nutrients, 2024, doi: 10.3390/nu17121986.
- [35] LE BERRE C, HONAP S, PEYRIN-BIROULET L. Ulcerative colitis[J]. Lancet, 2023, 402(10401): 571-584.
- [36] UNGARO R, MEHANDRU S, ALLEN P B, et al. Ulcerative colitis[J]. Lancet, 2017, 389(10080): 1756-1770.
- [37] XU L, HE B, SUN Y, et al. Incidence of inflammatory bowel disease in urban China: A nationwide population-based study[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2023, 21(13): 3379-3386.
- [38] ADAMS S M, CLOSE E D, SHREENATH A P. Ulcerative colitis: Rapid evidence review[J]. Am Fam Physician, 2022, 105(4): 406-411.
- [39] 李媛媛, 胡艺丽, 杨勤. 从“消托补”论治溃疡性结肠炎[J]. 中国中医急症, 2019, 28(1): 98-101.
- LI Y Y, HU Y L, YANG Q. Treating ulcerative colitis from the perspective of "clearing, supporting, and tonifying"[J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2019, 28(1): 98-101.
- [40] 包科颖, 王邦才. 王邦才从痢论治溃疡性结肠炎经验介绍[J]. 新中医, 2020, 52(12): 228-229.
- BAO K Y, WANG B C. Introduction to WANG Bangcai's experience in treating ulcerative colitis from the perspective of abscess[J]. J New Chin Med, 2020, 52(12): 228-229.
- [41] 王春霞, 葛俊李, 李芳, 等. 中药治疗溃疡性结肠炎作用及机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(2): 270-282.
- WANG C X, GE J L, LI F, et al. Research progress on the effects and mechanisms of Chinese medicine in treating ulcerative colitis [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2023, 29(2): 270-282.
- [42] WU Y, ZHENG Y, WANG X, et al. Ginseng-containing Sijunzi decoction ameliorates ulcerative colitis by orchestrating gut homeostasis in microbial modulation and intestinal barrier integrity[J]. Am J Chin Med, 2023, 51(3): 677-699.
- [43] WANG M, FU R, XU D, et al. Traditional Chinese medicine: A promising strategy to regulate the imbalance of bacterial flora, impaired intestinal barrier and immune function attributed to ulcerative colitis through intestinal microecology [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 318(Pt A): 116879.

[责任编辑 顾雪竹]