

基于 mTOR/p-S6K1 探讨加味附子理中汤干预 UC 大鼠 肠黏膜炎症反应的效应机制

郝彦伟, 张怡*, 周雪雷*, 喻俊榕, 曾进浩, 郭宇
(成都中医药大学附属医院, 成都 610075)

[摘要] 目的:探讨加味附子理中汤治疗溃疡性结肠炎(UC)模型大鼠的疗效及相关作用机制。方法:选用72只雄性SD大鼠,分为正常组,模型组,柳氮磺胺嘧啶组($0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),加味附子理中汤高、中、低剂量组($23.62, 11.81, 5.91\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。运用2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)-乙醇复合造模法复制UC大鼠模型,连续灌胃治疗2周,观察各组大鼠一般情况,大鼠麻醉后腹主动脉采血,取结肠组织。运用结肠黏膜损伤指数(CMDI)半定量评分,苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠结肠组织病理学改变,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测大鼠血清白细胞介素(IL)-4, IL-6, IL-10, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量;免疫组化和蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测结肠黏膜组织哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)及磷酸化核糖体蛋白S6激酶1(p-S6K1)蛋白表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠CMDI评分显著升高($P<0.01$),血清IL-4, IL-10含量显著下降, IL-6, TNF- α 含量显著上升($P<0.01$),结肠黏膜组织mTOR, p-S6K1蛋白表达水平显著上调($P<0.01$);与模型组比较,加味附子理中汤高剂量组大鼠CMDI评分明显下降($P<0.05$),高、中剂量组大鼠血清促炎因子IL-6, TNF- α 显著降低($P<0.01$),抗炎因子IL-4, IL-10明显升高($P<0.05, P<0.01$);加味附子理中汤高剂量大鼠mTOR, p-S6K1的蛋白表达水平明显下调($P<0.05, P<0.01$)。结论:加味附子理中汤高剂量组可显著减轻UC结肠黏膜充血水肿、炎性细胞浸润、腺体扭曲、排列紊乱等病理表现,其机制可能与其下调mTOR/p-S6K1信号、调控炎症因子的分泌有关。

[关键词] 加味附子理中汤; 溃疡性结肠炎; 炎症因子; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR); 磷酸化核糖体蛋白S6激酶1(p-S6K1)

[中图分类号] R2-0; R285.5; R318.14 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2020)13-0059-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201340

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200420.1406.001.html>

[网络出版日期] 2020-4-20 16:10

Exploring Mechanism of Modified Fuzi Lizhongtang in Intervening Inflammatory Response of Intestinal Mucosa in Rats with Ulcerative Colitis Based on mTOR/p-S6K1

HAO Yan-wei, ZHANG Yi*, ZHOU Xue-lei*, YU Jun-rong, ZENG Jin-hao, GUO Yu
(Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

[Abstract] **Objectives:** To investigate the therapeutic effect and mechanism of modified Fuzi Lizhongtang on ulcerative colitis (UC) model rats. **Method:** The 72 male SD rats were randomly divided into normal group, model group, sulfasalazine group ($0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), modified Fuzi Lizhongtang high, medium and low-dose group ($23.62, 11.81, 5.91\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). These rats were used to replicate the UC rat model by 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-ethanol composite modeling and treated by gavage for 2 weeks. The general condition of rats in each group was observed. After anesthesia, blood was collected from abdominal aorta and colonic tissue was taken. Semi quantitative evaluation by the colon mucosa damage index (CMDI), the pathological changes of colonic tissue were observed by the hematoxylin and eosin (HE) staining. The contents

[收稿日期] 20191226(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81973821);四川省中医药管理局项目(2018JC014);成都中医药大学附属医院基金项目(18ZL06)

[第一作者] 郝彦伟,在读硕士,从事中医脾胃系病证研究, E-mail: 1584712988@qq.com

[通信作者] *张怡,教授,硕士生导师,从事中医脾胃系疾病的防治与研究, E-mail: zhangyi2288@163.com;

*周雪雷,副主任医师,硕士生导师,从事中医脾胃系疾病的防治与研究, E-mail: 48478111@qq.com

of serum interleukin-4 (IL-4), IL-6, IL-10 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expressions of mammalian target of rapamycin (mTOR) and phosphorylated ribosomal protein S6 kinase 1 (p-S6K1) in colonic mucosa were detected by immunohistochemistry (IHC) and Western blot. **Result:** Compared with normal group, the CMDI score of the model group rats was significantly increased ($P < 0.01$). The contents of IL-4 and IL-10 in serum were significantly decreased, the contents of IL-6 and TNF- α were significantly increased ($P < 0.01$). The expression levels of mTOR and p-S6K1 in colonic mucosa were up-regulated ($P < 0.01$). Compared with model group, the CMDI score of the modified Fuzi Lizhongtang high dose group was significantly decreased ($P < 0.05$). In modified Fuzi Lizhongtang high and medium dose group, the contents of IL-6 and TNF- α were significantly decreased ($P < 0.01$) and the contents of IL-4 and IL-10 in serum were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In the modified Fuzi Lizhongtang high dose group, the expression level of mTOR and p-S6K1 protein was down-regulated significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Modified Fuzi Lizhongtang high dose group can significantly reduce the congestion and edema, inflammatory cell infiltration, gland distortion, disorder of arrangement and other pathological manifestations of UC colon mucosa, and its mechanism may be related to its down-regulation of mTOR/p-S6K1 signal and the regulation of inflammatory factors secretion.

[Key words] modified Fuzi Lizhongtang; ulcerative colitis; inflammatory factors; mammalian target of rapamycin(mTOR); phosphorylated ribosomal protein S6 kinase 1(p-S6K1)

溃疡性结肠炎(UC)是以肠黏膜连续弥漫性充血、水肿、糜烂及溃疡为病理特征的肠道慢性炎症性疾病,病变主要累及直肠和乙状结肠,具有高发病率、高复发率的特点^[1-2]。随着UC病程的延长,结肠癌的发病率也逐年上升^[3-4],UC的早期干预治疗是降低结肠癌发病率的重要措施。氨基水杨酸制剂、糖皮质激素、免疫抑制剂为治疗UC的传统药物,但缓解期反复发作和长期大量服用产生的药物不良反应仍困扰着临床。中医药治疗本病有一定优势,远期疗效好、复发率低,且相对安全^[5]。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是磷酸酰肌醇-3激酶(PI3K)相关激酶家族中一种高度保守的蛋白激酶,参与了从核糖体合成、蛋白质翻译、到细胞凋亡等多种生物学过程的调控。有研究指出,过度激活的mTOR信号干扰上皮细胞的正常分化,从而通过改变结肠上皮炎症细胞因子的分泌促进结肠炎^[6]。核糖体蛋白S6激酶1(S6K1)作为mTOR的下游靶,是蛋白质翻译起始的关键蛋白,其磷酸化被激活可加速mTOR蛋白的合成和细胞生长。mTOR/磷酸化(p-)S6K1信号通路与细胞因子的调控密切相关,且在肠道炎症反应中发挥着重要作用^[7-8]。白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等多种促炎细胞因子的分泌受mTOR调节^[9],而IL-4,IL-10作为重要的抗炎细胞因子,能够减轻炎症对结肠黏膜的损伤,对UC患者起到保护作用。研究表明,mTOR/p-S6K1信号通路的异常激

活促进结直肠癌的发生进展^[10-11],但鲜见中医药调节mTOR/p-S6K1治疗UC的相关研究,其是否通过调控mTOR/p-S6K1信号通路发挥作用也未见报道。附子理中汤出自《三因极一病证方论》,具有温肾散寒,暖脾补土的功效。自宋代以来,附子理中汤在临床各科的诸多病证中都有广泛应用,且疗效确切。前期实验研究发现,该方灌肠可抑制UC模型大鼠肠黏膜核转录因子- κ B(NF- κ B)的含量表达及炎症因子释放,对肠黏膜具有抗炎和修复作用^[12-13]。本研究通过观察加味附子理中汤对UC大鼠IL-4,IL-6,IL-10,TNF- α 等炎症因子以及mTOR/p-S6K1信号的干预作用,旨在揭示加味附子理中汤缓解UC大鼠肠黏膜炎症反应的效应机制。

1 材料

1.1 动物 雄性SD大鼠72只,体质量(200 \pm 10)g,由成都达硕生物科技有限公司提供,合格证号SCXK(川)2015-030,于成都中医药大学中医脏腑病证实验室动物房饲养。本研究所有动物获成都中医药大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 药物与试剂 加味附子理中汤组成:生黄芪20g,附子10g,干姜10g,党参15g,炒白术15g,防风10g,地榆炭15g,仙鹤草20g,血竭5g,炙甘草5g。所有饮片均购自成都中医药大学附属医院药剂科,并经成都中医药大学药学院中药资源与鉴定系陈江副教授鉴定为正品。柳氮磺胺嘧啶肠溶片(上海信谊天平药业,批号H310020557);2,4,6-三硝基苯

磺酸(TNBS)5%水溶液,苏木素染液(美国Sigma公司,批号分别为P2297, H9627);IL-4, IL-6, IL-10酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特公司,批号分别为E-EL-R0014c, E-EL-R0015c, E-EL-R0016c);TNF- α 试剂盒(北京华美生物技术有限公司,批号CSB-E11987r);兔多克隆抗体p-S6K1, mTOR抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab59208, Ab2732);兔多克隆抗体甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH, 杭州贤至生物公司,批号AB-P-R001);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程有限公司,批号BA1054);BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号P0010);伊红染液(国药集团化学试剂有限公司,批号71014544)。

1.3 仪器 FlexStation 3型多功能酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司];RM 2016型轮转式切片机(德国Lecai公司);BX53型生物显微镜(日本Olympus公司);DYY-7C型电泳仪, DYCZ-24DN型垂直电泳槽(北京六一仪器厂);JK-6型生物组织摊烤片机(武汉俊杰电子有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组与造模 大鼠适应性喂养1周,按随机数字表法分为正常组12只,造模组60只,将造模后的60只大鼠再随机分为模型组,加味附子理中汤高、中、低剂量组及柳氮磺胺嘧啶组,每组12只。采用苦寒泻下的大黄煎剂合并TNBS-乙醇复合法诱导制作UC大鼠模型,具体方法如下:各造模组先给予大黄煎剂连续灌胃14 d,每天1次,每次 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$;第15天禁食不禁水,16日上午于大鼠腹腔注射20%乌拉坦溶液麻醉后,取长约12 cm的硅胶管抽取 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ TNBS与60%无水乙醇配比的混合溶液,涂石蜡油后缓慢从肛门插入,深度为7~8 cm。注射完成后注入大约0.2 mL空气,并将大鼠倒置约1 min,确保溶液不会溢出。成模标准:大鼠出现便溏或伴脓血便、精神萎靡、反应迟钝、毛色黯淡少泽、蜷卧少动等行为学改变^[14],从造模组随机选取5只进行结肠组织病理切片,进行模型病理评价。

2.2 药物制备及给药 给药标准参照人与大鼠体表系数折算法^[15],各造模组大鼠以大黄 $13.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,正常组与模型组大鼠每日予生理盐水,柳氮磺胺嘧啶组将柳氮磺胺嘧啶肠溶片研碎成粉末,制成混悬液以 $0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,相当于临床成人日用剂量的6倍;加味附子理中汤高、中、低剂量组分别按23.62, 11.81, $5.91\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,相当于临床成人日

用剂量的12, 6, 3倍。灌胃容积均为 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,连续灌胃治疗2周。

2.3 标本采集及指标观察 观察并记录每组大鼠每日的精神及活动状态、毛发光泽、体质量、进食量、大便性状和便血情况。

造模及给药完成后,乌拉坦溶液腹腔注射麻醉,腹主动脉取血,以 $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,提取上清液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱贮藏备用。分离全结肠,沿肠系膜剪开,预冷生理盐水反复冲洗后平铺于滤纸上,进行结肠黏膜损伤指数(CMDI)评分,评分标准^[16]:黏膜无损伤,0分;轻度充血、水肿,表面光滑,无糜烂和溃疡,1分;黏膜充血、水肿,表面粗糙如颗粒状,或伴溃疡,2分;黏膜充血、水肿,表面有糜烂坏死及溃疡形成,溃疡最大纵径 $<1\text{ cm}$,3分;黏膜充血、水肿,糜烂,有多处溃疡,溃疡最大纵径 $>1\text{ cm}$ 或大鼠死亡,4分。剪取肛门以上6~10 cm处结肠组织2份,约 $1\text{ cm}\times 2\text{ cm}$ 。一份放入4%的多聚甲醛固定液中,常温保存;另一份置于冻存管放入液氮中,最后转至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.4 苏木素-伊红(HE)染色观察 各组大鼠结肠组织病理学改变 将多聚甲醛固定液中的结肠标本放入梯度乙醇中脱水处理,二甲苯透明,石蜡包埋,切片 $4\ \mu\text{m}$,进行HE染色。光镜下观察结肠组织形态学变化。

2.5 ELISA检测大鼠血清IL-4, IL-6, IL-10和TNF- α 含量 取大鼠血清,ELISA测定大鼠血清IL-4, IL-6, IL-10和TNF- α 的含量,按照试剂盒说明书提供的步骤进行操作,最后将孔板置于FlexStation 3多功能酶标仪,测定波长为450 nm处各孔吸光度A。

2.6 免疫组化法检测大鼠结肠组织中mTOR和p-S6K1的表达 取待检结肠黏膜组织,常规脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋,将蜡块连续切片,片厚 $4\ \mu\text{m}$ 。采用SP法进行mTOR, p-S6K1(抗体稀释倍数1:100)免疫组化检测,病理图像分析仪对切片进行拍照。细胞质和(或)细胞核中见棕黄色或棕褐色颗粒定义为mTOR, p-S6K1染色阳性。每组取6例,每例于200倍光镜下随机选取3个视野进行观察。采用Image-Pro Plus 6.0进行图像分析,计算每张切片阳性着色平均积分吸光度AA。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠结肠组织中mTOR和p-S6K1蛋白的表达 称取结肠组织50 mg置于2 mL离心管中,每管加入含有PMSF $2\ \mu\text{L}$ 和磷酸酶抑制剂 $2\ \mu\text{L}$ 的裂解液 $200\ \mu\text{L}$,冰上

裂解 30 min, 12 000 r·min⁻¹, 4 °C 离心 10 min, 取上清液。BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 蛋白变性后, 将制备好的蛋白样品加入上样孔, 电泳分离后转膜, 封闭。加入 mTOR, p-S6K1 一抗(1:1 000, 1:800)以及内参 GAPDH(1:1 000), 4 °C 孵育过夜, 次日 HRP 标记二抗(1:5 万)孵育 2 h, 洗膜后显色曝光, 使用 BandScan 软件分析胶片灰度值。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 23.0 进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对数据进行方差齐性检验。多组间比较采用单因素方差分析, 若方差齐时, 组间均值两两比较采用 SNK 法; 方差不齐时, 改用 Dunnett T3 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠一般情况 正常组大鼠活泼好动、反应灵敏、毛色光泽、饮食饮水和二便均无异常, 体重呈规律增加。造模组大鼠从造模第 2 周起逐渐出现饮食及活动减少, 弓背蜷缩, 毛发枯槁, 大便稀软, 第 3 周使用 TNBS-乙醇造模后出现精神萎靡, 体重显著下降, 大便清稀, 个别大鼠可见黏液血便, 次数明显增多, 且肛周污秽。至实验结束前大鼠死亡情况为模型组、加味附子理中汤低剂量组各死亡 3 只, 高、中剂量组各死亡 2 只, 死亡大鼠体型消瘦, 腹胀大, 经解剖发现结肠黏膜糜烂坏死, 大量食物停积, 系因溃疡严重死亡。其余大鼠在给药后, 症状均有不同程度的缓解, 大便逐渐成形, 粪便次数减少。

3.2 对 UC 大鼠 CMDI 肉眼评分的影响 与正常组比较, 模型组大鼠结肠黏膜充血、水肿明显, 有多处溃疡病灶, CMDI 评分指数显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 治疗后的各组大鼠结肠黏膜损伤有不同程度好转, 其中柳氮磺胺嘧啶组和加味附子理中汤高剂量组 CMDI 评分明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

表 2 加味附子理中汤对 UC 大鼠血清 IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α 含量变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- α
正常	-	143.46±36.04	89.24±16.96	135.43±26.32	50.54±7.70
模型	-	80.07±16.54 ²⁾	229.12±40.47 ²⁾	65.90±28.15 ²⁾	140.10±20.67 ²⁾
加味附子理中汤	23.62	128.97±24.29 ³⁾	141.85±22.53 ⁴⁾	113.88±15.24 ⁴⁾	102.35±11.59 ⁴⁾
	11.81	117.58±22.95 ³⁾	154.62±23.69 ⁴⁾	104.61±16.74 ³⁾	112.19±11.02 ⁴⁾
	5.91	98.85±22.72	170.00±18.52 ⁴⁾	79.99±14.46	127.12±19.50
柳氮磺胺嘧啶	0.35	130.79±20.89 ³⁾	134.01±24.22 ⁴⁾	114.70±23.14 ⁴⁾	89.39±11.32 ⁴⁾

3.5 对 UC 大鼠结肠组织 mTOR, p-S6K1 表达的影响 与正常组比较, 模型组黏膜上皮细胞质黄染明显加深, 提示 mTOR 和 p-S6K1 表达显著增高

表 1 加味附子理中汤对 UC 大鼠 CMDI 评分的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of modified Fuzi Lizhongtang on CMDI score of UC rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	CMDI 评分/分
正常	-	12	0.08±0.29
模型	-	8	3.58±0.67 ²⁾
加味附子理中汤	23.62	9	2.75±0.75 ³⁾
	11.81	9	3.08±0.79
	5.91	8	3.33±0.65
柳氮磺胺嘧啶	0.35	11	2.42±0.67 ⁴⁾

注: 与正常组比较 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较 ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2, 3 同)。

3.3 对 UC 大鼠结肠组织病理形态学的影响 正常组结肠黏膜被覆柱状上皮、固有层及黏膜肌层结构完好, 肠腺规则, 未见变性炎症渗出, 黏膜下层未见充血水肿、炎症浸润。模型组黏膜上皮细胞有明显坏死脱落, 固有层腺体明显减少, 杯状细胞及隐窝减少或消失, 黏膜下层水肿、出血与溃疡灶并见, 可见大量炎性细胞浸润。柳氮磺胺嘧啶组及加味附子理中汤干预组大鼠黏膜各层结构较好, 腺体结构及排列均较模型组改善, 炎细胞浸润程度有所减轻。各药物干预组以柳氮磺胺嘧啶组及加味附子理中汤高剂量组的改善效果为好。见图 1。

3.4 对 UC 大鼠血清 IL-4, IL-6, IL-10 和 TNF- α 含量的影响 与正常组比较, 模型组血清 IL-4, IL-10 含量显著下降, IL-6, TNF- α 含量显著上升 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 加味附子理中汤高、中剂量组及柳氮磺胺嘧啶组大鼠血清 IL-4, IL-10 含量明显上升 ($P < 0.05, P < 0.01$), IL-6, TNF- α 含量显著下降 ($P < 0.01$)。见表 2。

($P < 0.01$); 与模型组比较, 加味附子理中汤高、中剂量与柳氮磺胺嘧啶组阳性细胞染色数量减少、变浅, mTOR, p-S6K1 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$,

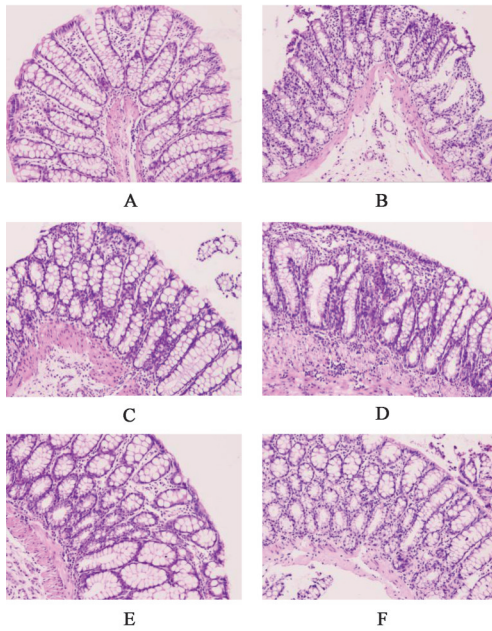


图1 加味附子理中汤对UC大鼠结肠组织病理学的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of modified Fuzi Lizhongtang on colon tissue sections of UC rats (HE, ×200)

$P < 0.01$)。见图2, 3, 表3。

3.6 对UC大鼠结肠组织mTOR, p-S6K1蛋白表达的影响

与正常组比较, 模型组mTOR和p-S6K1蛋

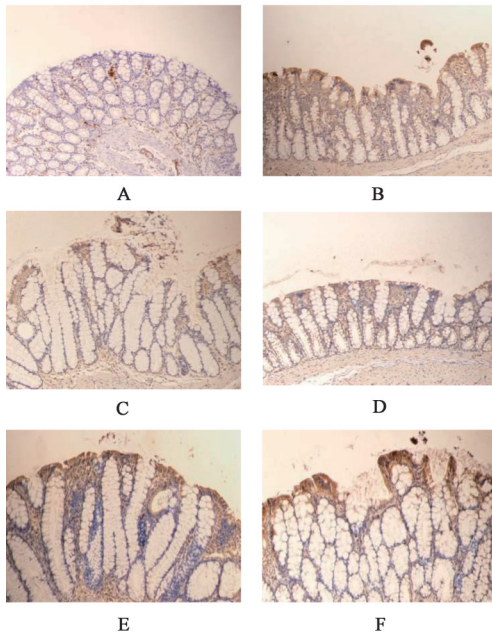


图2 加味附子理中汤对UC大鼠结肠组织mTOR表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 2 Effect of modified Fuzi Lizhongtang on expression of mTOR in colon tissue of UC rats (IHC, ×200)

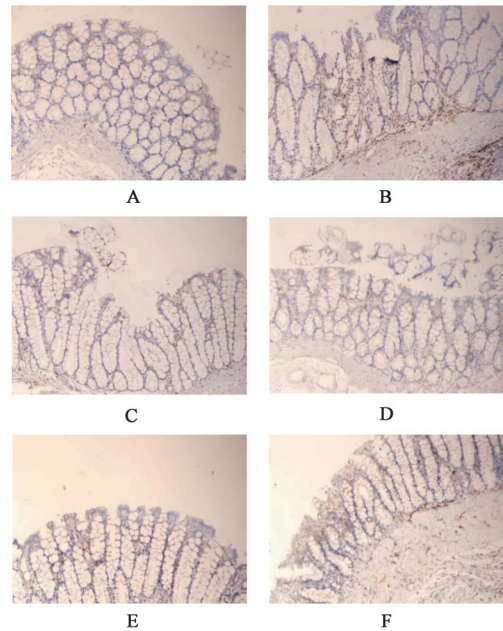


图3 加味附子理中汤对UC大鼠结肠组织p-S6K1表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 3 Effect of modified Fuzi Lizhongtang on expression of p-S6K1 in colon tissue of UC rats (IHC, ×200)

表3 加味附子理中汤对UC大鼠结肠组织mTOR, p-S6K1表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of modified Fuzi Lizhongtang on expression of mTOR and p-S6K1 in colon tissue of UC rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	mTOR	p-S6K1
正常	-	0.28±0.04	0.23±0.03
模型	-	0.64±0.08 ²⁾	0.53±0.05 ²⁾
加味附子理中汤	23.62	0.40±0.06 ⁴⁾	0.33±0.05 ⁴⁾
	11.81	0.53±0.07 ³⁾	0.41±0.08 ³⁾
	5.91	0.59±0.07	0.47±0.07
柳氮磺胺嘧啶	0.35	0.36±0.06 ⁴⁾	0.31±0.04 ⁴⁾

白表达均显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 加味附子理中汤高、中剂量组与柳氮磺胺嘧啶组mTOR蛋白表达明显降低($P < 0.05, P < 0.01$); 加味附子理中汤高剂量组与柳氮磺胺嘧啶组p-S6K1蛋白明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。见图4, 表4。

4 讨论

中医将UC归属“久痢”“休息痢”范畴, 认为久泻久痢, 耗伤气血, 损及脾肾, 命门火衰, 关门不固以致痢下无度, 故UC在慢性持续期以脾肾阳虚为基本病机。临床上以附子理中汤为代表的温肾暖脾治法与方剂在缓解UC病证方面较单纯西医疗效更好^[17]。加味附子理中汤是在附子理中汤基础上加黄芪、防风、地榆炭、仙鹤草、血竭而成, 方中黄芪性温, 补气生血, 生肌敛疮, 仙鹤草增强健脾补

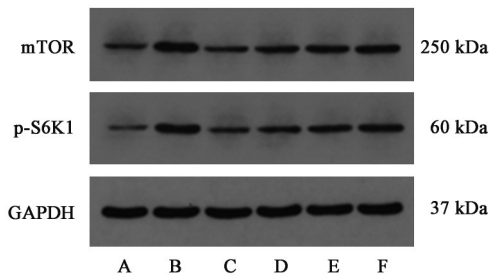


图4 大鼠结肠组织 mTOR, p-S6K1 蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of mTOR and p-S6K1 protein in colon tissue of rats

表4 加味附子理中汤对 UC 大鼠结肠组织 mTOR, p-S6K1 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of modified Fuzi Lizhongtang on expression of mTOR and p-S6K1 protein in colon tissue of UC rats($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	mTOR /GAPDH	p-S6K1 /GAPDH
模型	-	4.65±0.79 ²⁾	4.97±0.55 ²⁾
加味附子理中汤	23.62	2.55±0.16 ⁴⁾	2.86±0.98 ³⁾
	11.81	3.30±0.37 ³⁾	3.62±0.60
	5.91	4.00±0.66	4.27±0.80
柳氮磺胺嘧啶	0.35	1.78±0.23 ⁴⁾	1.91±1.10 ⁴⁾

注:设空白组各蛋白表达量均为1。

虚,止痢敛疮之功,防风善祛湿醒脾,散寒止痛,地榆炭止血敛疮,血竭化瘀止痛。药理研究显示血竭可通过调控 mTOR 信号通路抑制炎症反应,修复黏膜损伤^[18]。全方温补并行,散敛结合,邪正兼顾,符合 UC 慢性持续期正虚邪恋的病机特点。本研究中,HE 染色可见模型组大鼠结肠黏膜腺体和隐窝数量减少,结构缺损,形态不规则,排列紊乱,胞核深染、增大,腺上皮与黏膜肌层间隙增宽,成功复制了 UC 的大鼠模型。经加味附子理中汤治疗后,大鼠结肠黏膜腺体形态扭曲、黏膜和黏膜下层炎症细胞浸润、水肿等病理表现均有不同程度改善,说明加味附子理中汤能有效缓解 TNBS 诱导的 UC 炎症,对 UC 大鼠结肠黏膜有一定的改善和修复作用。

UC 的发病机制与炎症因子的产生相关^[19],炎症是 UC 发病过程中的重要病理反应,促炎和抑炎因子的失衡是导致肠道炎症反应的病理基础。IL-6, TNF- α 是重要的促炎细胞因子,一系列研究表明,IL-6 和 TNF- α 在 UC 患者和实验模型大鼠中的表达明显升高,在 UC 及 UC 相关结肠癌发病机制中起着重要作用^[20-22]。相对应的是,IL-4 和 IL-10 作为抗炎因子,可下调炎症介质,减轻炎症损伤,对结肠具有免疫抑制作用^[23]。本实验中模型大鼠血清 IL-6,

TNF- α 的水平较正常组明显升高,IL-4, IL-10 的含量较正常组显著减少,经加味附子理中汤治疗后的各组大鼠 IL-6, TNF- α 水平显著下降,IL-4, IL-10 含量均有上升,提示加味附子理中汤具有改善肠道炎症反应,减轻肠道炎症损伤的确定疗效。

mTOR 信号通路是近年来的研究热点,其在链接免疫损伤和炎症因子释放中发挥了重要的桥梁作用,同时对 UC 诱导的结肠癌有重要影响。因此,在 UC 发病过程中,有效调节 mTOR 信号通路的异常激活可能是 UC 治疗的新思路。mTOR 作为该信号通路的关键蛋白,其过度激活常与炎症相关。雷帕霉素已在多种疾病中表明有抗炎作用,通过抑制 mTOR 可减缓哺乳动物的多种相关病理,减轻慢性炎症反应。有证据显示,免疫细胞特异性 mTOR 参与了各种炎症性疾病^[7],使用 mTOR 抑制剂减轻了实验性 UC 的炎症反应及相应的严重程度^[24-25]。S6K1 是 mTOR 的下游靶点,也是目前研究最广泛的 mTOR 的底物。mTOR 激活后,磷酸化其下游分子 S6K1,进而增强蛋白质合成,促进细胞生长代谢和增殖。因此,mTOR/p-S6K1 被认为是炎症和肿瘤发生发展的重要分子靶标,其异常表达与活化是促炎和促癌的关键因素。本研究结果显示,mTOR 和 p-S6K1 在 UC 模型大鼠中高表达,而加味附子理中汤高剂量组能显著下调结肠黏膜组织 mTOR, p-S6K1 的过度表达,提示加味附子理中汤可能通过 mTOR/p-S6K1 信号抑制蛋白合成、细胞代谢,减轻黏膜炎症损伤,从而起到修复肠道黏膜的作用。

综上所述,运用加味附子理中汤治疗可显著改善 UC 模型大鼠的一般情况及病理状况,其机制可能是通过抑制 mTOR 信号通路,下调 mTOR, p-S6K1 的过度表达,减轻结肠炎症反应,从而达到治疗 UC 的作用。这一发现为进一步探索 UC 的发病机制提供了有效的实验依据。然而本研究只是检测了结肠黏膜组织中 mTOR, p-S6K1 蛋白及相关炎症因子的表达,且样本量相对较少,下一步还需完善 mTOR 信号通路相关指标检测,增加实验样本量,进一步验证 UC 发病是否通过 mTOR 信号通路的异常激活引起肠道炎症反应,并为加味附子理中汤在临床上的应用提供更为完善的理论依据和实验基础。

[参考文献]

[1] ZENG Z, ZHU Z, CHEN M, et al. Incidence and clinical characteristics of inflammatory bowel disease

- in a developed region of Guangdong province, China: a prospective population-based study [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28(7): 1148-1153.
- [2] YANG H, LI Y, WU W, et al. The incidence of inflammatory bowel disease in Northern China: a prospective population-based study [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101296.
- [3] STEINHART A H, FERNANDES A. Clinical practice guidelines for the medical management of nonhospitalized ulcerative colitis: the patient perspective [J]. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2015, 29(6): 294-296.
- [4] BRESSLER B, MARSHALL J K, BERNSTEIN C N, et al. Clinical practice guidelines for the medical management of nonhospitalized ulcerative colitis: the Toronto consensus [J]. *Gastroenterol*, 2015, 148(5): 1035-1058.
- [5] 张声生, 赵鲁卿. 溃疡性结肠炎的中医治疗策略和思考[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2016, 24(6): 411-413.
- [6] LYONS J, GHAZI P C, STARCHENKO A, et al. The colonic epithelium plays an active role in promoting colitis by shaping the tissue cytokine profile [J]. *PLoS Biol*, 2018, 16(3): e2002417.
- [7] JOHNSON S C, RABINOVITCH P S. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease [J]. *Nature*, 2013, 493(7432): 338-345.
- [8] LAPLANTE M, SABATINI D M. MTOR signaling in growth control and disease [J]. *Cell*, 2012, 149(2): 274-293.
- [9] JIANG Z, CHEN Z, CHEN Y, et al. Involvement of pro-inflammatory cytokines in diabetic neuropathic pain via central PI3K/Akt/mTOR signal pathway [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2019, doi: 10.1080/13813455.2019.1651869.
- [10] JIANG W, HAN Y P, HU M, et al. A study on regulatory mechanism of miR-223 in ulcerative colitis through PI3K/Akt-mTOR signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(11): 4865-4872.
- [11] 张少华, 毕经旺. 结直肠癌组织中S6K1及4EBP1蛋白的表达及其与临床病理特征的关系[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2015, 22(6): 747-753.
- [12] 姬培震, 张怡, 李雪萍, 等. 附子理中汤灌肠对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠NF- κ B, TNF- α , IL-1 β 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(14): 124-128.
- [13] 张艳晓, 方锐洁, 白少玉, 等. 附子理中汤灌肠调控溃疡性结肠炎大鼠IL-6、IL-8及ICAM-1的实验研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2016, 22(3): 351-354.
- [14] 王隰需, 朱莹, 王璇. 溃疡性结肠炎(脾肾阳虚模证)大鼠模型的实验研究[J]. *中国中医急症*, 2015, 24(8): 1332-1334, 1391.
- [15] 陈奇. *中药药理研究方法学*[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 18.
- [16] CROMER W E, GANTA C V, PATEL M, et al. VEGF-A isoform modulation in an preclinical TNBS model of ulcerative colitis: protective effects of a VEGF164b therapy [J]. *J Transl Med*, 2013, 11(1): 207.
- [17] 赵广刚. 附子理中汤治疗溃疡性结肠炎的临床疗效及其安全性[J]. *临床合理用药杂志*, 2019, 12(24): 28-29.
- [18] 崔晓娟, 奉建芳, 陈颖, 等. 基于网络药理学分析龙血竭缓解实验性溃疡性结肠炎小鼠结肠黏膜损伤的作用机制[J]. *中草药*, 2019, 50(16): 3872-3879.
- [19] GYORGYI M, BÉLA M, ZSOLT T, et al. Changes of the cytokine profile in inflammatory bowel diseases [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(41): 5848-5861.
- [20] 王彤, 王骁, 范焕芳, 等. 白头翁汤对溃疡性结肠炎模型小鼠结肠黏膜及血清TNF- α , IL-6影响[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2017, 19(2): 32-35.
- [21] 李婷, 朱向东, 杨意, 等. 痛泻要方对溃疡性结肠炎大鼠下丘脑中IL-6, IL-6R表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(11): 103-108.
- [22] LI Y, DE HAAR C, CHEN M, et al. Disease-related expression of the IL6/STAT3/SOCS3 signalling pathway in ulcerative colitis and ulcerative colitis-related carcinogenesis [J]. *Gut*, 2010, 59(2): 227-235.
- [23] NIELSEN O H, KØPPEN T, RÜDIGER N, et al. Involvement of interleukin-4 and -10 in inflammatory bowel disease [J]. *Dig Dis Sci*, 1996, 41(9): 1786-1793.
- [24] HU S, CHEN M, WANG Y, et al. MTOR inhibition attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis by suppressing T cell proliferation and balancing TH1/TH17/Treg profile [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0154564.
- [25] BHONDE M R, GUPTE R D, DADARKAR S D, et al. A novel mTOR inhibitor is efficacious in a murine model of colitis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, 295(6): 1237-1245.

[责任编辑 孙丛丛]