

## 四神丸对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎模型大鼠结肠组织 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响

柳荣, 王燕, 朱向东\*, 高艳奎, 王欢, 钟兴腾  
(甘肃中医药大学, 兰州 730000)

**[摘要]** 目的:探讨四神丸对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎(UC)模型大鼠结肠组织磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B/雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)信号通路相关基因 mRNA 和蛋白以及血清中细胞因子白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), 白细胞介素-10(IL-10)表达水平的影响。方法:将120只SPF级Wistar大鼠在SPF级实验室适应性喂养7d后分为空白组和造模组,造模组大鼠采用二硝基苯磺酸盐(DNBS)/乙醇溶液灌肠+皮下注射氢化可的松+番泻叶灌胃法建立脾肾阳虚型UC大鼠模型。将成功建立模型的大鼠随机分为5组,分别为模型组,美沙拉嗪(0.36 g·kg<sup>-1</sup>)组,四神丸高、中、低剂量(3.2, 1.6, 0.8 g·kg<sup>-1</sup>)组,灌胃体积均为10 mL·kg<sup>-1</sup>,模型组和空白组灌服等体积蒸馏水,1次/d,连续21 d。每日观察大鼠一般情况,并记录小鼠体质量、粪便性状及隐血情况进行疾病活动指数(DAI)评分。取大鼠结肠组织,观察大体形态及结肠损伤情况,进行结肠黏膜损伤指数(CMDI)评分。采用苏木素-伊红(HE)染色观察各组大鼠结肠组织病理改变,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测结肠组织PI3K, Akt, mTOR mRNA 的表达水平,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清IL-1 $\beta$ , IL-10的含量,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测结肠组织PI3K, 磷酸化(p-)PI3K, Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR蛋白的表达。结果:与空白组比较,模型组大鼠一般生存状况相对较差,DAI评分,CMDI评分显著升高( $P<0.01$ );大鼠病理切片见肠黏膜部分消失,腺体消失,有大量的炎性细胞浸润,聚集于黏膜层和基层;PI3K, Akt, mTOR mRNA 表达水平显著升高( $P<0.01$ );IL-1 $\beta$ 含量显著升高,IL-10含量显著降低( $P<0.01$ );p-PI3K, p-Akt, p-mTOR蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,四神丸高、中剂量组及美沙拉嗪组大鼠DAI评分明显下降( $P<0.05$ );四神丸高、中、低剂量组及美沙拉嗪组大鼠CMDI评分显著降低( $P<0.01$ );大鼠病理切片显示各给药组炎性细胞减少,黏膜层结构不同程度的恢复正常,美沙拉嗪组和四神丸中剂量组效果最好,黏膜结构接近空白组;四神丸高、中剂量组及美沙拉嗪组大鼠PI3K, Akt, mTOR mRNA 及四神丸低剂量组Akt mRNA 表达水平明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),四神丸低剂量组PI3K, mTOR mRNA 的表达水平虽有降低,但差异无统计学意义;四神丸高、中剂量组及美沙拉嗪组IL-1 $\beta$ 含量明显降低,IL-10含量明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),四神丸低剂量组IL-1 $\beta$ 含量降低,IL-10含量升高,但差异无统计学意义;四神丸高、中、低剂量组及美沙拉嗪组p-PI3K, p-Akt, p-mTOR蛋白表达水平均有不同程度下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论:四神丸具有改善脾肾阳虚型UC模型大鼠的一般情况和肠黏膜损伤的作用,其机制可能与抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路有关。

**[关键词]** 溃疡性结肠炎; 温肾健脾法; 四神丸; 磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B/雷帕霉素靶蛋白信号通路

**[中图分类号]** R2-0;R289;R574.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)04-0016-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20210437

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210105.0900.001.html>

**[网络出版日期]** 2021-1-5 13:27

### Effect of Sishenwan on PI3K/Akt/mTOR Signal Pathway in Colonic Tissue of Rats with Ulcerative Colitis Model of Spleen Kidney Yang Deficiency

LIU Rong, WANG Yan, ZHU Xiang-dong\*, GAO Yan-kui, WANG Huan, ZHONG Xing-teng  
(Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To discuss the effect of Sishenwan on phosphatidylinositol-3 kinase/protein

**[收稿日期]** 20200930(011)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81760833)

**[第一作者]** 柳荣,在读博士,从事中医不同治法防治糖尿病的效应机制研究,E-mail:2240065473@qq.com

**[通信作者]** \*朱向东,博士,教授,从事中医药防治糖尿病和溃疡性结肠炎研究,E-mail:zhuxiangdong33@163.com

kinase B/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) signaling pathway related genes and proteins in colon tissue and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and interleukin-10 (IL-10) expression levels in serum of ulcerative colitis (UC) model rats with spleen kidney Yang deficiency. **Method:** The 120 SPF Wistar rats were randomly divided into normal group and model group after 7 days of adaptive feeding in SPF laboratory. The model group were given dinitrobenzene sulfonate (DNBS)/ethanol solution enema+hydrocortisone subcutaneously injection+senna leaf gavage to establish UC model of spleen kidney yang deficiency. The rats who successfully established the model were randomly divided into five groups: model group, mesalazine (0.36 g·kg<sup>-1</sup>) group, and Sishenwan high, medium and low dose (3.2, 1.6, 0.8 g·kg<sup>-1</sup>) groups, the volume of which was 10 mL·kg<sup>-1</sup>. The model group and the blank group were given distilled water of the same volume. Once a day for 21 days. Observe the general conditions of the rats daily, and record the weight, fecal traits and occult blood of the mice for disease activity index (DAI) scoring. Take the rat colon tissue to observe the gross morphology and colon injury, and score the colon mucosal injury index (CMDI). Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe pathological changes. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the expression level of PI3K, Akt, mTOR mRNA in colon tissue. The levels of IL-1 $\beta$  and IL-10 in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blot was used to detect the expression level of PI3K, phosphorylation (p)-PI3K, Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR protein in colon tissue. **Result:** Compared with blank group, the general survival status of the rats in model group was relatively poor, the DAI score and the CMDI index were significantly increased ( $P<0.01$ ). The intestinal mucosa partially disappears, the glands disappear, and a large number of inflammatory cells infiltrate and gather in the mucosal layer and the base layer in the pathological sections of the model group. The expression levels of PI3K, Akt, and mTOR mRNA were significantly increased ( $P<0.01$ ). The IL-1 $\beta$  content was significantly increased and the IL-10 content was significantly decreased ( $P<0.01$ ). The expression levels of p-PI3K, p-Akt and p-mTOR protein were significantly increased ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the DAI scores of Sishenwan high and medium dose groups and mesalazine group decreased ( $P<0.05$ ). The CMDI index of mesalazine group and the high, middle and low dose groups of Sishenwan was significantly reduced ( $P<0.01$ ). Pathological sections of rats showed that the inflammatory cells in the drug group decreased, and the mucosal layer structure returned to normal to varying degrees. The mesalazine group and the Sishenwan medium-dose group had the best effects, and the mucosal structure was close to the blank control group. The expression levels of PI3K, Akt, mTOR mRNA in the high and medium dose groups of Sishenwan, mesalazine group and Akt mRNA in low dose group of Sishenwan were significantly reduced ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). The expression levels of PI3K and mTOR mRNA in low-dose group of Sishenwan decreased, but the difference was not statistically significant. The IL-1 $\beta$  content was significantly reduced and the IL-10 content was significantly increased in high, medium dose groups of Sishenwan and mesalazine groups ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). The level of IL-1 $\beta$  decreased and the level of IL-10 increased in the low-dose group of Sishenwan, but the difference was not statistically significant. The expression levels of p-PI3K, p-Akt and p-mTOR protein in the high, medium, and low dose groups of Sishenwan and mesalazine group decreased to varying degrees, and the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion:** Sishenwan has the effect of improving the general condition and intestinal mucosal damage of ulcerative colitis model rats with spleen and kidney Yang deficiency. The mechanism may be related to the inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

**[Key words]** ulcerative colitis; warming the kidney and strengthening the spleen method; Sishenwan; phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin signaling pathway

溃疡性结肠炎(UC)是一种以大肠黏膜与黏膜下炎症为主要特征的慢性非特异性炎症性疾病,其

病因病机研究至今尚不完全明确,病程漫长,常反复发作,为现代难治病之一。研究发现通过调控磷

脂酰肌醇-3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路可抑制炎症介质的释放<sup>[1-2]</sup>。通过抑制PI3K/Akt信号通路中相关蛋白磷酸化水平,可减少炎症因子及蛋白的表达,抑制炎症小体激活,缓解肠组织炎症症状,改善肠组织损伤<sup>[3]</sup>。炎症因子在UC发病机制中也起着重要作用,其中促炎细胞因子白细胞介素-1(IL-1)能介导UC发病,研究发现mTOR信号通路可调节炎症因子白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )<sup>[4]</sup>,而抗炎细胞因子白细胞介素-10(IL-10)可维持肠道免疫功能、维持机体肠道稳态<sup>[5-6]</sup>。研究发现IL-10通过激活PI3K/Akt信号通路可抑制干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )诱导的自噬<sup>[7]</sup>。因此,研究PI3K/Akt/mTOR信号通路影响UC的相关机制,对明确UC的病因病机及探索治疗UC的新靶点等研究具有重要意义。

UC归属于中医“久痢”“休息痢”和“肠澼”等范畴<sup>[8]</sup>。中医学认为本病以脾虚为本,病久及肾,遂致脾肾两虚,而其病理因素多为湿、热、瘀、虚,故“脾肾阳虚”证是UC重要证型之一。现代常用四神丸出自明·王肯堂《证治准绳》卷六<sup>[9]</sup>,四神丸为治疗脾肾阳虚之肾泄证(五更泻)经典方剂,由肉豆蔻、补骨脂、五味子、吴茱萸4味中药组成。临床研究已证实四神丸加减治疗UC疗效确切,可使UC临床症状减轻或消失,肠黏膜病变有明显改善或恢复正常<sup>[10-11]</sup>。实验研究亦证实,四神丸可调整抗炎、抑炎症因子的平衡,调节肠道免疫反应,改善肠道黏膜损伤<sup>[12]</sup>。目前,四神丸治疗脾肾阳虚型UC的具体分子机制尚不完全清楚,本实验通过研究四神丸对脾肾阳虚型UC大鼠一般生存状况,结肠组织大体形态评分,结肠组织中PI3K, Akt, mTOR mRNA, 蛋白磷酸化水平以及血清中细胞因子IL-1 $\beta$ , IL-10表达水平的影响,来探讨四神丸治疗脾肾阳虚型UC的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 120只SPF级Wistar大鼠,购于甘肃中医药大学科研实验动物中心,雌雄各半,体质量(180 $\pm$ 20)g,实验动物质量合格证号SCXK(甘)2015-0002。大鼠饲养于甘肃中医药大学实验动物中心SPF级屏障实验室,实验动物使用许可证号SYXK(甘)2015-0005;实验室温度21~25℃,相对湿度50%~60%,光照12h/12h明暗交替。本实验经甘肃中医药大学动物实验伦理委员会批准,批准编号2018-081。

**1.2 药物** 四神丸由补骨脂149.2g,吴茱萸37.3g,

肉豆蔻74.6g,五味子74.6g,生姜298.4g,大枣100枚组成,均购自兰州惠仁堂大药房,由甘肃中医药大学杨扶德教授鉴定为正品,制备方法:先煎煮生姜、大枣,大枣煮熟后去姜取枣肉,并将枣肉捣成枣泥,其余药物研为细末,与枣泥混合后搓成梧桐子大的水丸,使用时将四神丸水丸打粉,加蒸馏水混合为含生药0.5g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>的药液备用;番泻叶购自兰州惠仁堂大药房,由甘肃中医药大学杨扶德教授鉴定为正品,制备方法:取一定量番泻叶,加10倍水浸泡0.5h后煎煮,浓缩成含生药1g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>的药液备用;美沙拉嗪购自葵花药业集团佳木斯鹿灵制药有限公司,批号170804,制备方法:将美沙拉嗪肠溶片打粉,加蒸馏水混合为含生药0.5g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>的药液备用。

**1.3 试剂** 氢化可的松注射液(国药集团容生制药有限公司,批号1708201);二硝基苯磺酸盐(DNBS,上海梯希爱化成工业发展有限公司,批号FHB01-NRAJ);trizol(美国Ambion公司,批号190906);PMSF蛋白酶抑制剂,4 $\times$ 蛋白上样缓冲液,苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为20181212,20190701,G1120);反转录试剂盒,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(日本TaKaRa公司,批号分别为AIF2269A,AJ20704A);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号ZB2301);磷酸化(p)-PI3K抗体,Akt抗体, $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(英国Abcam公司,批号分别为GR194710-78,GR3192605-21,GR3255609-1);PI3K抗体,p-Akt抗体,mTOR抗体,p-mTOR抗体(美国CST公司,批号分别为4292S,4060S,2983S,5536S);鼠IL-1 $\beta$ ,IL-10酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号均为05/2019)。

**1.4 仪器** H1650R型台式高速冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);FTC-8000P型Real-time PCR仪(加拿大枫岭国际有限公司);BIOMATE 3S型核酸蛋白测定仪,ChemiDoc<sup>TM</sup> Touch型化学发光成像系统,Power Pac<sup>TM</sup> Basic型垂直电泳仪,iMark型酶标仪(美国Bio-Rad公司);RM2016型轮转式切片机(德国Leica公司);KDBM型生物组织包埋机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司)。

## 2 方法

**2.1 动物造模** 采用病证结合法,使用DNBS/乙醇

溶液灌肠+皮下注射氢化可的松+番泻叶灌胃建立脾肾阳虚型UC大鼠模型<sup>[13]</sup>。将SPF级Wistar大鼠正常饲养7 d后,进行番泻叶灌胃(10 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),配合氢化可的松皮下注射(10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),1次/d,连续21 d。21 d后,禁食不禁水1 d,用10%水合氯醛(3 mL·kg<sup>-1</sup>)腹腔麻醉后,使用灌胃针经肛门插入结肠8~10 cm到达结肠部位,将DNBS/乙醇溶液(25 mg/只DNBS+50%乙醇0.25 mL)注入大鼠肠腔内,完全注入药液后再注入空气1 mL,捏紧肛门,使大鼠保持倒立状态1 min,待麻醉清醒后继续正常喂养。模型评价标准<sup>[14]</sup>为观察造模期间大鼠粪便、体质量、毛发、精神状态等一般状况结合大鼠疾病活动指数(DAI)评分评定脾肾阳虚型UC模型是否成功;造模结束后3 d,随机抽取5只大鼠使用10%水合氯醛溶液腹腔注射麻醉后处死,取结肠组织肉眼观察肠黏膜组织糜烂、充血、水肿、溃疡、出血等情况,对结肠黏膜损伤指数(CMDI)进行评分,以确认模型复制成功。

**2.2 分组与给药** 造模成功后,将大鼠随机分为模型组,美沙拉嗪组,四神丸高、中、低剂量组,以及空白组。美沙拉嗪组按0.36 g·kg<sup>-1</sup>剂量灌胃,四神丸高、中、低剂量组分别按3.2, 1.6, 0.8 g·kg<sup>-1</sup>剂量灌胃,用药剂量参照人与动物体表面积换算,相当于体质量为70 kg成人每日用量2, 0, 0.5倍,空白组和模型组灌服等体积蒸馏水(10 mL·kg<sup>-1</sup>),各组灌胃1次/d,连续21 d。

**2.3 标本采集** 大鼠给药治疗21 d结束后,各组大鼠禁食24 h,水合氯醛(3 mL·kg<sup>-1</sup>)腹腔注射麻醉,将大鼠腹部剖开,抽取大鼠腹主动脉血4~6 mL。取血后静置20 min后3 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min(离心半径13.5 cm),吸取上层血清置于离心管中,放置于-20℃冰箱冻存,用于ELISA检测相关指标。颈椎脱臼法处死大鼠,用组织剪剪下大鼠结肠组织,肉眼观察大鼠结肠黏膜大体形态,纵剪剖开,截取大鼠结肠病变最严重处组织,用冰生理盐水冲洗干净,用滤纸吸干液体,然后纵剪结肠组织将其分为两部分,一部分置于冻存管内于-80℃冰箱冻存,用于Real-time PCR和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测;另一部分置于装有4%多聚甲醛溶液的玻璃瓶中固定保存,用于HE染色。

**2.4 大鼠一般状况观察** 每日观察大鼠进食饮水、精神活动、毛发、大便性状和便血情况,定时监测大鼠体质量改变,并进行DAI评分<sup>[15]</sup>。评分标准为体质量无下降,大便性状正常,隐血阴性,0分;体质量

下降1%~5%,大便性状正常,隐血阴性,1分;体质量下降6%~10%,半稀便,隐血阳性,2分;体质量下降11%~15%,半稀便,隐血阳性,3分;体质量下降>15%,稀便,肉眼血便,4分。DAI总分=(体质量下降百分比得分+大便性状得分+大便带血情况得分)/3。

**2.5 大鼠结肠组织观察** 观察肠黏膜组织糜烂、充血、水肿、溃疡、出血等情况,对结肠黏膜CMDI进行评分<sup>[16]</sup>。评分标准:无损伤,0分;局部充血,无溃疡,1分;充血且肠壁增厚但不伴溃疡,2分;1处溃疡,直径<1 cm,3分;溃疡直径约1~2 cm,但肠管与外周无粘连,4分;溃疡直径约1~2 cm,肠管增厚,与外周脏器粘连,5分。

**2.6 HE染色观察结肠组织病理变化** 将固定在4%多聚甲醛中的结肠组织取出,用磷酸盐缓冲液(PBS)进行冲洗,乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡包埋后制成石蜡切片后,依次进行脱蜡,水化,苏木素染色,伊红染色,脱水封片,显微镜进行下拍照观察。

**2.7 Real-time PCR检测PI3K, Akt, mTOR mRNA表达** 取UC大鼠结肠组织0.08 g加入trizol 1 mL提取总RNA。用超微量分光光度计检测RNA纯度、浓度,将RNA反转录成cDNA。以 $\beta$ -actin作为内参基因,同基因每组设4个重复孔,进行6次平行实验。PCR反应体系20  $\mu$ L,反应条件为95℃预变性30 s,95℃变性5 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s,重复40个循环。反应结束后,观察扩增曲线、溶解曲线,以2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup>数据分析法对各基因mRNA表达进行相对定量计算。各引物由宝日医生物技术有限公司设计合成,引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Sequence primers

引物	序列(5'-3')	长度/bp
PI3K	上游 CTGGAGAGCTTGGAGGACGA	110
	下游 TCGCAAGAACCAGAATAAGAAGTG	
Akt	上游 ATGGACTTCCGGTCAGGTTCA	126
	下游 GCCCTTGCCAGTAGCTTCA	
mTOR	上游 GCTTATCAAGCAAGCGACATCTCA	136
	下游 TCCACTGGAAGCACAGACCAAG	
$\beta$ -actin	上游 GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA	127
	下游 GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG	

**2.8 ELISA检测大鼠血清中IL-1 $\beta$ , IL-10的含量** 采用大鼠IL-1 $\beta$ , IL-10 ELISA试剂盒对脾肾阳虚型UC大鼠血清中炎性因子IL-1 $\beta$ , IL-10进行含量检测,按照相应指标ELISA试剂盒说明书进行,布板,

加样,加样孔做3个重复,加酶,温育后洗涤,加入显色剂,15 min 显色后终止反应。实验完毕后 450 nm 波长测量各孔吸光度 A,以空白孔进行调零。依据所测标准品 A 制作标准曲线,然后计算出直线回归方程式,最后计算出各样品浓度。

**2.9 Western blot 检测 PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR 蛋白表达** 将冻存的结肠组织解冻,组织剪剪取 0.05~0.1 g,倒入液氮,进行研磨,普通蛋白加入 RIPA 蛋白裂解液和苯甲基磺酰氟,磷酸化蛋白加入 RIPA 蛋白裂解液、苯甲基磺酰氟、磷酸酶抑制剂,充分裂解后 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min (离心半径 13.5 cm)取上清。使用 BCA 蛋白定量试剂盒,对蛋白提取液进行定量分析,随后准确上样。根据待测蛋白分子量大小配胶,电泳,转膜后进行封闭,稀释各一抗(PI3K 1:1 000, p-PI3K 1:500, Akt 1:1 000, p-Akt 1:2 000, mTOR 1:1 000, p-mTOR 1:1 000, β-actin 1:1 000),放入条带,室温下摇匀 2 h 后 4 °C 过夜,洗膜加入二抗(1:5 000)孵育 2 h,将 ECL 超敏发光液滴在膜上,使用化学发光成像系统曝光,显影后用 Quantity one 图像分析软件进行扫描分析,并使用 Image J 软件进行数据分析。

**2.10 统计学分析** 采用 SPSS 21.0 软件进行统计处理,若数据符合正态分布以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 One-way ANOVA,方差齐时组间比较采用最小显著性差异法(LSD)检验,方差不齐选用 Tamhane's T2 检验,以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 UC 大鼠一般状况及 DAI 评分的影响** 与空白组比较,造模组大鼠皮毛逐渐脏污且暗淡少光

泽,精神萎靡,反应迟钝、活动减少、喜扎堆、反抗力减弱,饮食量减少,出现稀便,腹部皮毛潮湿污浊,期间死亡 22 只;给 DNBS/乙醇混合液肛门灌注后出现明显血便、肛周污浊,并在几日内大鼠死亡 5 只,其后陆续死亡 8 只;大鼠体质量有所下降,造模后期有所回升,但差异无统计学意义,见表 2。与模型组比较,四神丸低剂量组症状稍有缓解,皮毛状态略有恢复但仍缺乏光泽,大鼠精神仍低迷、活动少、喜扎堆,稀便稍好转,整体症状改善不明显,治疗过程中死亡 3 只。四神丸中、高剂量组及美沙拉嗪组症状明显改善,大鼠皮毛逐渐恢复干净顺滑,反应逐渐灵敏,精神逐渐活跃,食量逐渐增加,体质量增长明显( $P < 0.05$ ),见表 3。大便逐渐成形,肛周清洁无污浊,后期部分大鼠恢复正常颗粒便,治疗过程中死亡 2 只。其中,药物治疗后,四神丸中、高剂量组抓取时挣扎逐渐有力,治疗后期挣扎反应激烈,美沙拉嗪组此方面改变不明显。

与空白组比较,模型组大鼠 DAI 评分在造模结束时显著升高( $P < 0.01$ ),且在药物干预结束时明显高于空白组( $P < 0.05$ );与模型组比较,药物干预结束时各治疗组 DAI 评分均有所下降,其中美沙拉嗪组及四神丸高、中剂量组下降明显( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 2 造模对大鼠体质量变化的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 2 Effect of modeling on changes of body mass in rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	第 0 天	第 11 天	第 21 天
空白	175.0±16.0	205.6±12.4	233.4±11.7
模型	176.7±12.5	172.0±14.0	186.7±23.7

表 3 四神丸对 UC 大鼠体质量和 DAI 评分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 3 Effect of Sishenwan on body weight and DAI score of UC rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	体质量/g		DAI 评分/分	
		药物干预 0 d	药物干预 21 d	造模结束	药物干预结束
空白		233.4±11.7	265.7±16.3	0	0
模型		186.7±23.7	230.2±29.3 <sup>1)</sup>	2.52±0.93 <sup>2)</sup>	2.04±1.09 <sup>1)</sup>
美沙拉嗪	0.36	187.3±17.7	248.3±20.7 <sup>1)</sup>	-	0.41±0.49 <sup>3)</sup>
四神丸	3.2	189.6±19.1	255.0±31.0 <sup>1)</sup>	-	0.62±0.49 <sup>3)</sup>
	1.6	183.5±20.1	256.2±24.8 <sup>1)</sup>	-	0.29±0.56 <sup>3)</sup>
	0.8	181.3±24.2	239.1±37.8	-	1.65±0.89

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ 。

**3.2 对 UC 大鼠结肠组织大体形态及 CMDI 评分的影响** 取材后肉眼观察各组大鼠结肠组织大体形态,空白组大鼠肠黏膜光滑,无充血、溃疡等异常表

现。模型组大鼠肠管增厚肥大,肠黏膜充血、水肿、糜烂,可见明显溃疡面,部分肠管与周围脏器严重粘连甚至坏死。四神丸低剂量组大鼠肠壁增厚,肠

黏膜仍可见充血、水肿,无大溃疡面,肠管与周围脏器偶有粘连、坏死。四神丸中、高剂量组及美沙拉嗪组大鼠肠道黏膜损伤明显恢复,溃疡少见,少部分仍有轻度充血、水肿,与周围脏器无粘连。与空白组比较,模型组 CMDI 评分显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,美沙拉嗪组及四神丸高、中、低剂量组 CMDI 评分显著降低 ( $P < 0.01$ )。见表 4。

表 4 四神丸对 UC 大鼠结肠黏膜 CMDI 评分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )  
Table 4 Effect of Sishenwan on colonic mucosal CMDI score of UC rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	CMDI 评分/分
空白		0
模型		3.00±0.76 <sup>1)</sup>
美沙拉嗪	0.36	0.75±0.71 <sup>2)</sup>
四神丸	3.2	1.63±0.74 <sup>2)</sup>
	1.6	0.88±0.64 <sup>2)</sup>
	0.8	2.25±0.71 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

**3.3 对 UC 大鼠结肠组织病理形态变化的影响** 空白组大鼠结肠组织结构如常,肠黏膜层结构完整,腺体分布均匀。与空白组比较,肠黏膜部分消失,腺体消失,有大量的炎性细胞浸润,聚集于黏膜层和基层;与模型组比较,药物组炎性细胞减少,黏膜层结构不同程度的恢复正常,美沙拉嗪组和四神丸中剂量组效果最好,黏膜结构接近空白组。四神丸低剂量组与模型组比较,炎性细胞稍有减少,可见少量的腺体结构,黏膜层虽被炎性细胞浸润,损伤严重但腺体结构可见。见图 1。

**3.4 对 UC 大鼠结肠组织中 PI3K, Akt, mTOR mRNA 表达的影响** 与空白组比较,模型组大鼠 PI3K, Akt, mTOR mRNA 表达显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,四神丸高、中剂量组及美沙拉嗪组 PI3K, Akt, mTOR mRNA 及四神丸低剂量组 Akt mRNA 的表达水平均明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),四神丸低剂量组 PI3K, mTOR mRNA 的表达水平虽有降低,但差异无统计学意义。见表 5。

**3.5 对 UC 大鼠血清中 IL-1 $\beta$ , IL-10 含量的影响** 与空白组比较,模型组 IL-1 $\beta$  含量显著升高,IL-10 含量显著降低 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,四神丸高、中剂量组及美沙拉嗪组 IL-1 $\beta$  含量显著降低,IL-10 含量明显升高 ( $P < 0.01, P < 0.05$ ),四神丸低剂量组大鼠血清 IL-1 $\beta$  含量降低,IL-10 含量升高,但差异无统计学意义。见表 6。

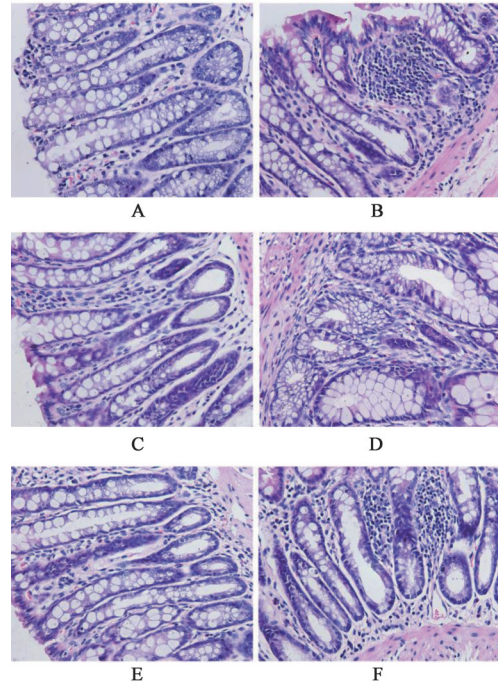


图 1 四神丸对 UC 大鼠大鼠结肠病理变化的影响 (HE, ×200)  
A. 空白组; B. 模型组; C. 美沙拉嗪组; D. 四神丸高剂量组; E. 四神丸中剂量组; F. 四神丸低剂量组 (图 2 同)

Fig. 1 Effect of Sishenwan on pathological changes of colon in UC rats (HE, ×200)

表 5 四神丸对 UC 大鼠结肠组织中 PI3K, Akt, mTOR mRNA 表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 5 Effect of Sishenwan on expression levels of PI3K, Akt and mTOR mRNA in UC rats colon ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	PI3K	Akt	mTOR
空白		1.00±0.09	1.00±0.04	1.00±0.07
模型		2.36±0.14 <sup>1)</sup>	2.43±0.11 <sup>1)</sup>	1.67±0.14 <sup>1)</sup>
美沙拉嗪	0.36	1.26±0.41 <sup>3)</sup>	1.37±0.12 <sup>3)</sup>	1.10±0.05 <sup>3)</sup>
四神丸	3.2	1.59±0.10 <sup>2)</sup>	1.73±0.10 <sup>2)</sup>	1.48±0.08 <sup>2)</sup>
	1.6	1.37±0.02 <sup>3)</sup>	1.46±0.07 <sup>3)</sup>	1.38±0.15 <sup>2)</sup>
	0.8	2.29±0.08	1.91±0.26 <sup>2)</sup>	1.58±0.31

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ (表 6, 7 同)。

表 6 四神丸对 UC 大鼠血清中 IL-1 $\beta$ , IL-10 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )  
Table 6 Effect of Sishenwan on contents of IL-1 $\beta$  and IL-10 in serum of UC rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-1 $\beta$	IL-10
空白		1.41±0.22	13.37±1.62
模型		4.10±0.76 <sup>1)</sup>	4.97±0.27 <sup>1)</sup>
美沙拉嗪	0.36	2.00±0.43 <sup>3)</sup>	12.64±1.08 <sup>3)</sup>
四神丸	3.2	2.69±0.58 <sup>2)</sup>	10.50±0.30 <sup>2)</sup>
	1.6	2.48±0.54 <sup>2)</sup>	11.44±1.05 <sup>2)</sup>
	0.8	3.29±0.91	8.09±2.17

3.6 对UC大鼠结肠组织PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR蛋白表达的影响 与空白组比较, 模型组 p-PI3K, p-Akt, p-mTOR 蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较, 四神丸高、中、低剂量组及美沙拉嗪组 p-PI3K, p-Akt, p-mTOR 蛋白表达水平均明显下降( $P<0.05, P<0.01$ )。见图2, 表7。

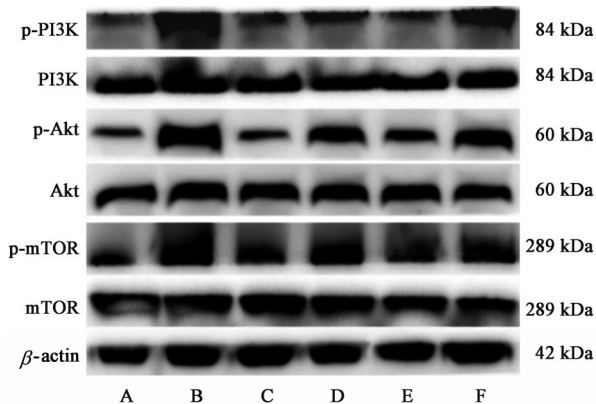


图2 大鼠结肠组织中PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR蛋白表达电泳

Fig 2 Electrophoretic of PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR protein expression in colon tissues of rats

表7 四神丸对UC大鼠结肠组织中p-PI3K, p-Akt, p-mTOR蛋白相对表达水平的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 7 Effect of Sishenwan on relative expression levels of p-PI3K, p-Akt and p-mTOR proteins in UC rats colon ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt	p-mTOR/mTOR
空白		1.00±0.08	1.00±0.04	1.00±0.07
模型		1.79±0.29 <sup>1)</sup>	2.02±0.13 <sup>1)</sup>	1.94±0.14 <sup>1)</sup>
美沙拉嗪	0.36	1.10±0.06 <sup>3)</sup>	1.41±0.34 <sup>3)</sup>	1.31±0.08 <sup>3)</sup>
四神丸	3.2	1.21±0.13 <sup>3)</sup>	1.82±0.13 <sup>2)</sup>	1.73±0.08 <sup>2)</sup>
	1.6	1.15±0.10 <sup>3)</sup>	1.57±0.08 <sup>3)</sup>	1.48±0.19 <sup>3)</sup>
	0.8	1.58±0.12 <sup>2)</sup>	1.90±0.08 <sup>2)</sup>	1.81±0.08 <sup>2)</sup>

#### 4 讨论

UC是一种临床表现为腹痛腹泻和黏液脓血便的慢性非特异性炎性肠病。脾肾阳虚是UC的重要病机, 四神丸为脾肾阳虚型UC的代表方剂。四神丸方中补骨脂为君, 其性味辛苦温, 归肾、脾二经, 可温补脾肾, 奏“入肾以治水”之功。肉豆蔻为臣, 其药性辛苦而温, 归脾、胃、大肠经。可补肾助阳, 温脾止泻。补骨脂和肉豆蔻二药相伍, 温肾暖脾, 固涩止泻。吴茱萸为佐, 其药性辛苦温, 归肝、胃二经, 能入少阴、厥阴气分而补火, 具有温中止痛、理气燥湿之功效。五味子为佐药, 药性酸温, 归肺、心、肾三经, 能收敛固涩, 补肾宁心。生姜暖胃, 大枣补土, 二药共为使药。诸药合用, 温热与酸涩并

用, 而以温补治本为主, 使脾肾得温, 运化得复, 符合本研究之脾肾阳虚型UC大鼠模型的治疗。

PI3K/Akt/mTOR信号通路影响细胞增殖、分化和凋亡, 在肠道炎症及肿瘤反应中起着重要作用, 认为PI3K/Akt信号通路可能同时参与了UC的炎症及癌变过程<sup>[2, 17]</sup>。有学者发现通过激活PI3K/Akt通路抑制肠黏膜核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)p65, 进而降低肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ 的表达, 可缓解肠道炎症, 使UC小鼠的疾病活动指数降低<sup>[18-19]</sup>。SALEM等<sup>[20]</sup>发现对患有难治性肠道炎症性疾病的患者使用mTOR通路的抑制剂雷帕霉素治疗, 可显著改善症状并愈合黏膜。方培植等<sup>[21]</sup>发现UC相关癌变模型鼠结肠黏膜中p110, p85, p-Akt, mTOR基因及其蛋白表达上调, 证明PI3K/Akt/mTOR信号通路过度活化在UC中起重要作用。本实验结果显示, 与空白组比较, 模型组大鼠结肠组织中p-PI3K, p-Akt, p-mTOR蛋白表达水平及PI3K, Akt, mTOR mRNA的表达水平显著升高。与模型组比较, 四神丸干预后大鼠结肠组织中p-PI3K, p-Akt, p-mTOR蛋白表达水平均有不同程度的下降, 以四神丸中剂量组最为显著, 说明四神丸能够抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路的传导。

血清中促炎细胞因子能介导UC发病由单核细胞和巨噬细胞产生, 如IL-1, IL-6, IL-8, IL-17, IL-22, TNF- $\alpha$ 等; 抗炎细胞因子可维持肠道免疫功能、维持机体肠道稳态, 主要由T细胞产生, 如IL-4, IL-10, IL-13, 转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )等<sup>[5-6]</sup>。IL-1 $\beta$ 属于Th1分泌的细胞因子, 可由巨噬细胞、内皮细胞诱导产生, 促进炎症反应, 刺激T淋巴细胞活化和B淋巴细胞抗体的分泌, 直接介导UC患者炎症的发生<sup>[22-23]</sup>。IL-1 $\beta$ 与IL-1受体的失衡是UC发生的重要环节<sup>[24]</sup>。IL-10为Th2表达的细胞因子, 是黏膜免疫中重要的细胞因子调节剂, 可通过抑制激活的单核细胞, 巨噬细胞, 粒细胞, T细胞发挥免疫调节作用, 在肠道黏膜内环境稳定中起重要作用<sup>[25]</sup>。本研究结果显示, 与空白组比较, 模型组大鼠血清IL-1 $\beta$ 含量显著升高, IL-10含量显著降低。与模型组比较, 四神丸高、中剂量组及美沙拉嗪组IL-1 $\beta$ 含量显著降低, IL-10含量显著升高, 四神丸低剂量组IL-1 $\beta$ 含量降低, IL-10含量升高, 但差异无统计学意义, 其中美沙拉嗪组和四神丸中剂量组改变最为明显, 说明四神丸和美沙拉嗪都能够控制炎症的发生。

本实验造模后大鼠体质量降低, 腹泻便血, DAI评分及CMDI评分显著升高, 病理切片见肠黏膜部

分消失,腺体消失,有大量炎性细胞浸润,聚集于黏膜层和基层,符合脾肾阳虚型UC模型大鼠的特点。模型组大鼠结肠组织中 p-PI3K, p-Akt, p-mTOR 蛋白表达水平及 PI3K, Akt, mTOR mRNA 的表达水平显著升高, IL-1 $\beta$  含量显著升高, IL-10 含量显著降低,这可能是脾肾阳虚型UC发生的重要因素之一。经四神丸及美沙拉嗪干预后,大鼠一般生存状况改善,DAI评分及CMDI评分降低,病理切片见给药组炎性细胞减少,黏膜层结构不同程度的恢复正常。四神丸各剂量组及美沙拉嗪组 p-PI3K, p-Akt, p-mTOR 蛋白表达水平均有不同程度的下降;四神丸高、中剂量组及美沙拉嗪组 PI3K, Akt, mTOR mRNA 及四神丸低剂量组 Akt mRNA 表达显著降低,四神丸低剂量组 PI3K, mTOR mRNA 的表达水平虽有降低,但差异无统计学意义;四神丸高、中剂量组及美沙拉嗪组 IL-1 $\beta$  含量显著降低,IL-10 含量显著升高,四神丸低剂量组 IL-1 $\beta$  含量降低,IL-10 含量升高,但差异无统计学意义。其中以美沙拉嗪组和四神丸中剂量组改变最为明显,这可能因为美沙拉嗪和中剂量四神丸有效抑制了 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的激活,进而调控促炎细胞因子 IL-1 $\beta$  和抗炎细胞因子 IL-10,缓解炎症反应,调节机体免疫,促进肠道黏膜损伤修复,从而改善了UC症状。

[参考文献]

[1] CONG L H, LI T, WANG H, et al. IL-17A-producing T cells exacerbate fine particulate matter-induced lung inflammation and fibrosis by inhibiting PI3K/Akt/mTOR-mediated autophagy[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(15):8532-8544.

[2] 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.

[3] 李望. 猴头菌丝体多糖对小鼠溃疡性结肠炎的影响及其抗炎机制研究[D]. 无锡:江南大学, 2017.

[4] 何敏红. mTORC1 信号通路参与炎症性肠病的发生发展[D]. 广州:南方医科大学, 2015.

[5] 饶希午,程海波,孙东东,等. 溃疡性结肠炎的常用中药及其单体成分的研究进展[J]. *环球中医药*, 2019, 12(1):154-158.

[6] 崔畅婉,孙峥嵘. 溃疡性结肠炎发病机制研究进展[J]. *现代免疫学*, 2019, 39(1):77-81.

[7] DICKINSON J D, ALEEVY Y, MALVIN N P, et al. IL13 activates autophagy to regulate secretion in airway epithelial cells[J]. *Autophagy*, 2016, 12(2):397-409.

[8] 屈映,张书信,周璐,等. 荆芥、防风治疗溃疡性结肠炎的网络药理学研究[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44

(24):5465-5472.

[9] 韩林. 四神丸方源及古今应用探析[D]. 成都:成都中医药大学, 2009.

[10] 杜波,王婧. 四神丸合理中汤加味治疗溃疡性结肠炎76例[J]. *中医杂志*, 2011, 52(20):1778-1779.

[11] 王萍,蒋翔,闫清海. 闫清海教授治疗慢性溃疡性结肠炎临床经验[J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(10):2585-2587.

[12] 王燕,朱向东,段永强,等. 四神丸对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织病理形态及血清抗炎、促炎因子平衡的影响[J]. *中医研究*, 2014, 27(1):53-56.

[13] 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- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(14):124-128.

[14] 吴玉泓,许雅清,李海龙,等. 脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠模型的建立[J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(2):116-119.

[15] 易文,覃慧林,石孟琼,等. 四逆散对溃疡性结肠炎小鼠 NF- $\kappa$ B 激活及 MIF 和细胞因子表达的影响[J]. *中药材*, 2015, 38(7):1476-1480.

[16] 郝彦伟,张怡,周雪雷,等. 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[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(13):59-65.

[17] 肖佑,肖超,肖戈,等. 复方苓柏颗粒剂通过靶向干预 miR-199-3p 对溃疡性结肠炎的改善作用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(9):1100-1103.

[18] STEINKAMP M, GUNDEL H, SCHULTE N, et al. GDNF protects enteric glia from apoptosis: evidence for an autocrine loop [J]. *BMC Gastroenterol*, 2012, 12(1):6.

[19] ZHANG D K, HE F Q, LI T K, et al. Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and is therapeutic for murine colitis [J]. *J Pathol*, 2010, 222(2):213-222.

[20] SALEM M, AMMITZBOELL M, NYS K, et al. ATG16L1: a multifunctional susceptibility factor in Crohn disease [J]. *Autophagy*, 2015, 11(4):585-594.

[21] 方培植,黄会云,张涛,等. PI3K/Akt-mTOR 信号通路介导溃疡性结肠炎相关癌变的实验研究[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2015, 24(7):802-806.

[22] STROBER W, FUSS I J. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases [J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(6):1756-1767.

[23] LEE Y S, YANG H, YANG J Y, et al. Interleukin-1 (IL-1) signaling in intestinal stromal cells controls KC/CXCL1 secretion, which correlates with recruitment of IL-22-secreting neutrophils at early stages of *Citrobacter rodentium* infection [J]. *Infect Immun*, 2015, 83(8):3257-3267.

[24] 曹秀红,张学彦,张晓娜. 白介素在溃疡性结肠炎发病机制中的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2011, 19(30):3143-3148.

[责任编辑 孙丛丛]