DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.07.022

优化溃结方通过抑制PI3K/AKT信号通路治疗溃疡性结肠炎作用及机制研究

舒郁平[1,2],余丹琪[1],荣越[1],唐丽利[1],孟凡艳[3],陶弘武[4],李娜[5],柳越冬[6]
(1.辽宁中医药大学,辽宁 沈阳 110847;2.福建中医药大学附属人民医院,福建 福州 350000;
3.中国医科大学附属第一医院,辽宁 沈阳 110001;4.辽宁中医药大学附属第二医院,辽宁 沈阳 110034;
5.咸阳市中心医院,陕西 咸阳 712000;6.辽宁中医药大学附属第三医院,辽宁 沈阳 110003)

摘要:目的 观察优化溃结方对溃疡性结肠炎(ulcerative colitis,UC)大鼠结肠组织磷酸磷脂酰肌醇-3羟基激酶和丝苏氨酸蛋白激酶(phosphatidylinositol 3-kinase and serthreonine protein kinase,PI3K/AKT)信号通路的影响。方法 应用三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid,TNBS)构建大鼠UC模型,随机分为空白组、模型组、优化溃结方组、柳氮磺吡啶(salicylazosulfapyridine,SASP)组、优化溃结方+柳氮磺胺砒啶组,优化溃结方给药浓度为0.738 g/mL,SASP给药浓度为0.024 g/mL。空白组和模型组每日以蒸馏水3 mL/次,每日2次灌胃,其余各组均以相应药物灌胃早晚各1次。造模成功后连续给药21 d,采用苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining,HE)染色切片观察各组大鼠结肠组织形态,酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)方法检测各组大鼠结肠血清中白细胞介素(Interleukin,IL)-1β、IL-10的表达水平,免疫组化法检测结肠组织中PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT蛋白表达水平。蛋白质印迹(Western blot,WB)检测结肠组织PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT蛋白表达。结果 与空白组相比,模型组结肠HE染色切片中结肠黏膜结构严重受损,排列紊乱,隐窝细胞丢失,黏膜肌层遍布炎症细胞,PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT蛋白表达增加($P<0.05$),血清IL-1β含量增加($P<0.05$),IL-10含量减少($P<0.05$)。与模型组相比,优化溃结方组、SASP组、优化溃结方+SASP组干预后结肠组织PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT蛋白($P<0.05$),血清IL-1β含量减少($P<0.05$),IL-10含量增加($P<0.05$),其中优化溃结方+SASP组效果最佳。结论 优化溃结方可能通过抑制PI3K/AKT信号通路,减少IL-1β分泌,增加IL-10表达,从而改善溃疡性结肠炎大鼠结肠损伤,重塑结肠结构,减轻炎症反应而发挥保护作用。

关键词:优化溃结方;溃疡性结肠炎;PI3K/AKT信号通路;IL-1β;IL-10
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)07-0098-09

Effect and Mechanism of Youhua Kuijie Formula(优化溃结方) on Ulcerative Colitis by PI3K/AKt Signaling Pathway

SHU Yuping[1,2],YU Danqi[1],RONG Yue[1],TANG Lili[1],MENG Fanyan[3],TAO Hongwu[4],LI Na[5],LIU Yuedong[6]
(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Shenyang 110847,Liaoning,China;
2. The Affiliated People's Hospital of Fujian University of Chinese Medicine,Fuzhou 350000,Fujian,China;
3. The First Affiliated Hospital of China Medical University,Shenyang 110001,Liaoning,China;
4. The Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Shenyang 110034,Liaoning,China;
5. Xianyang Central Hospital,Xianyang 712000,Shaanxi,China;
6. The Third Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Shenyang 110003,Liaoning,China)

Abstract:*Objective* To observe the effect of Youhua Kuijie Formula(优化溃结方) on phosphatidylinositol 3-kinase and serthreonine protein kinase(PI3K/AKT) signaling pathway in colon tissues of rats with ulcerative colitis(UC). *Method* A rat UC model was constructed by applying trinitrobenzene sulfonic acid(2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid,TNBS),and was randomly divided into a blank group,a model group,an Youhua Kuijie Formula group,a salicylazosulfapyridine(SASP) group,and an You-

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82074449);陕西省中医药管理局秦创原中药创新研发项目(2022-QCYZH-015);陕西省自然科学基础研究计划项目(2022JM-489);咸阳市创新服务能力支撑计划-科技创新人才项目(L2023-CXNL-CXRC-018)
作者简介:舒郁平(1990-),男,湖南怀化人,主治医师,博士在读,研究方向:中医药防治炎症性肠病、肛肠、胃肠疾病。
通讯作者:柳越冬(1970-),女,辽宁沈阳人,教授、主任医师,博士研究生导师,博士,研究方向:中医药防治炎症性肠病、肛肠、胃肠疾病。E-mail:13998359002@126.com。
李娜(1978-),女,河北秦皇岛人,副主任医师,硕士研究生导师,博士,研究方向:中医防治炎症性肠病等肛肠科疾病。E-mail:newlife0517@qq.com。

hua Kuijie Formula + SASP group. The concentration of the Youhua Kuijie Formula was 0.738 g/mL, and the concentration of SASP was 0.024 g/mL. Except for the blank group and the model group, which were gavaged twice daily with 3 mL of distilled water, the other groups were gavaged with the corresponding drugs once in the morning and once in the evening. After successful modeling, the drugs were administered continuously for 21 days, and the morphology of the colon tissue of rats in each group was observed by hematoxylin – eosin staining (HE), the expression levels of IL – 1β and IL – 10 in the colon serum of rats in each group were detected by Enzyme – Linked Immunosorbent Assay (ELISA), and the protein expression levels of PI3K, p – PI3K, AKT and p – AKT were detected by immunohistochemistry, and the expression levels of PI3K, p – PI3K, p – PI3K, AKT and p – PI3KT were detected by western blot (WB) in the colon. *Result* Compared with those in the blank group, the colonic HE stained sections in the model group showed severe damage to the colonic mucosal structure, disordered arrangement, loss of crypt cells, inflammatory cells all over the mucosal muscularis layer, increased protein expressions of PI3K, p – PI3K, AKT and p – AKT ($P < 0.05$), increased serum IL – 1β content ($P < 0.05$), and decreased IL – 10 content ($P < 0.05$). Compared with those in the model group, PI3K, p – PI3K, AKT and p – AKT proteins and serum IL – 1β contents decreased ($P < 0.05$) and IL – 10 contents increased ($P < 0.05$) in the Youhua Kuijie Formula group, the SASP group and Youhua Kuijie Formula + SASP group, with the best effect in the Youhua Kuijie Formula + SASP group. *Conclusion* Youhua Kuijie Formula may play a protective role by inhibiting PI3K/AKT signaling pathway, decreasing IL – 1β secretion and increasing IL – 10 expression, which may improve the colonic injury, remodel the colonic structure and attenuate the inflammatory response in rats with ulcerative colitis.

Keywords: Youhua Kuijie Formula (优化溃结方); ulcerative colitis; PI3K/AKT signaling pathway; IL – 1β; IL – 10

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)属于炎症性肠病中的一种,是以腹泻、便血、腹痛及里急后重感等为临床表现的肠道疾病,病变范围可蔓延至整个结肠,病理特征是肠道黏膜及黏膜下层的持续性炎症,具有较高的癌变率,与结肠癌的发生关系密切[1-4]。欧美发达国家的发病率较亚洲地区高,而亚洲国家的青壮年发病率呈现增高趋势,发病率为 7.6/10 万 ~ 14.3/10 万[5]。目前临床治疗主要以抗炎和生物免疫制剂治疗,长期使用不良反应大,费用昂贵,停药后易复发成为治疗的难点[6-7]。因此,对于经济、高效、安全的治疗药物的探索具有重要意义。

中医学并无 UC 的病名,多将其归属于“肠澼”“痢疾”等范畴,认为发病多与肝脾肾等脏器功能失调相关,气血瘀滞、肠道失司,《景岳全书》《杂病源流犀烛·诸血源流》《医林改错》等也指出 UC 的发生与“虚、湿、热、瘀”等病理因素相关,现代医学认为与免疫失调、肠道菌群紊乱、炎症反应、遗传等因素相关[8]。磷脂酰肌醇 – 3 – 激酶(phosphoinositide 3 – kinase, PI3K)/汇丝氨酸/苏氨酸激酶(serthreonine protein kinase, AKT),又名蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB)信号通路是一条与炎症、肿瘤进展关系密切的生物学通路,参与了细胞凋亡、存活、炎症等生物进程,大量研究表明 PI3K/AKT 信号通路与 UC 的病程进展有着重大关系[9-11]。优化溃结方是辽宁中医药大学附属第三医院柳越冬教授团队依据多年临床经验基于健脾益气、清热解毒、化瘀通络的治法思路化裁而来,且课题组前期研究显示优化溃结方能够降低 UC 患者炎症水平,参与细胞免疫调控,调节肠道菌群达到治疗 UC 的作用[12-15],本研究进一步探究优化溃结方调控 PI3K/AKT 信号通路治疗 UC 的生物机制。

1 材料与仪器

1.1 *动物* 购买自辽宁长生生物技术有限公司雄性健康 SD 大鼠 60 只,体质量 200 ~ 240 g,实验动物许可证号:SYXK(辽)2019 – 0004,动物实验中心温度、湿度适宜条件下分笼饲养,自由饮食普通饲料和水,定期更换垫料,实验经辽宁中医药大学实验动物伦理委员会批准,审查编号 21000042022101。

1.2 *药物* 优化溃结方(药物组成:黄芪 20 g,当归 15 g,炒白术 15 g,苍术 15 g,青黛 3 g,败酱草 20 g,白头翁 15 g,胡黄连 10 g,红花 10 g),由四川新绿色药业科技发展有限公司生产,辽宁中医药大学附属第三医院药房提供;柳氮磺吡啶肠溶片购自上海信谊天平药业有限公司,国药准字 H31020557。

1.3 *主要试剂* TNBS(北京偶合科技有限公司,批号:20220705);白细胞介素(interleukin, IL) – 1β ELISA 试剂盒(上海酶联生物公司,ML037361 – Z);IL – 10 ELISA 试剂盒(上海酶联生物公司,ML002813 – Z);辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(北京索莱宝科技有限公司,SE134);一抗稀释液(北京索莱宝科技有限公司,A1810);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,P0012);超敏显影液(ECL – WB 显影液)(上海天能科技有限公司,180 – 501);电泳转移缓冲液(索莱宝,D1060);通用 SP 检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,SP0041);增强型 DAB 显色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,DA1016);β – actin 抗体(弗德生物,FD0060);PI3K(ab191606)、p – PI3K(ab182651)、AKT(10176 – 1 – AP)、p – AKT(ab38449)抗体购自英国 abcam 公司等。

1.4 *主要仪器* 石蜡包埋机(德国 Leica 公司);恒温水浴箱(常州国华电器公司);可调微量移液枪(美国 Eppendorf 公司);光学显微镜(德国 Leica 公司);医用低温离心机(安徽嘉文仪器公司);恒温干燥箱(力辰科技公司);WB 电泳仪(美国 BIO – RAD 公司);WB 发光分析仪(上海天能科技公司);多功能酶标仪(美谷分子仪器公司)等。

2 方法

2.1 *实验动物分组* 适应性喂养 1 周后,采用随机数字表法将健康雄性 60 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、优化溃结方组、柳氮磺砒啶(salicylazosulfapyridine, SASP)组、优化溃结方 + SASP 组共 5 组,每组 12 只。

2.2 *溃疡性结肠炎模型建立* 实验动物适应性喂养 1 周后,禁食不禁水过夜,腹腔注射异戊巴比妥麻醉大鼠后,截取长约 12 cm 的静脉输液管石蜡润滑后,自大鼠肛门插入 6 ~ 8 cm,其中模型组、优化溃结方组、SASP 组、优化溃结方 + SASP 组将 TNBS∶乙醇按 1∶2 以 60 mg/kg 缓慢灌入大鼠肠道内,将大鼠

斜放 45°并轻揉腹部 1 ~ 2 min,使药液充分混合吸收,待大鼠苏醒后置入鼠笼,自由饮食饮水。空白组上述同样操作,给予等量的生理盐水灌肠[16]。

2.3 给药并观察 造模成功后,药物干预于造模后第 3 天开始,各组大鼠灌胃给药 21 d。实验所需药物均按照人与大鼠间等效剂量换算[17],优化溃结方组灌胃浓度为 0.738 g/mL,SASP 组灌胃浓度为 0.024 g/mL,优化溃结方 + SASP 组灌胃浓度优化溃结方为 1.476 g/mL,SASP 浓度为 0.048 g/mL。空白组和模型组每日以蒸馏水 3 mL/次,每日 2 次灌胃,其余各组均以相应药物灌胃早晚各 1 次,每组灌胃量 3 mL。

2.4 标本采集 灌胃过程中每日观察大鼠的一般情况,包括大鼠的精神状态、毛发色泽、饮食及体质量变化、大便性状等。在实验最后一天,于异戊巴比妥麻醉后,沿腹中线剪开大鼠腹部,腹主动脉采血,并分离血清,取上清于 -80 ℃保存备用。颈椎脱臼法处死大鼠取出结肠组织,在流动清水下冲洗干净,截取少段组织至于 4% 多聚甲醛进行固定,备苏木素 - 伊红(hematoxylin - eosin,HE)染色用,剩余部分放于 -80 ℃冰箱保存。

2.5 免疫组化法检测结肠组织 PI3K、p - PI3K、AKT、p - AKT 蛋白表达 将白片备好后进行烤片,脱蜡复水,清洗后进行抗原修复,内源性过氧化物酶阻断,山羊血清封闭,加一抗、二抗,DAB 染色达到微黄后终止染色,苏木素复染,脱水封片等步骤后置于显微镜下进行结果判读,DAB 显出的阳性表达为棕黄色。

2.6 免疫印迹(Western blot)法检测结肠组织 PI3K、p - PI3K、AKT、p - AKT 蛋白表达 采用免疫印迹法测定结肠组织 PI3K、p - PI3K、AKT、p - AKT 表达。从 -80 ℃冰箱取出结肠组织,在液氮作用下粉碎匀浆结肠组织,离心抽取上清液,使用 BCA 测定标准品浓度并绘制标准曲线,计算出样本浓度后,煮蛋白后分装样品备用;跑胶时按照说明书上层胶电压 80 V,下层胶电压 150 V,电泳以彩虹 Marker 跑至胶底结束,转膜时先将 PVDF 膜浸入甲醇中醒膜激活,电转按照目标蛋白分子量大小控制转膜时间,转膜结束后实验用 BSA 封闭 1 h,TBST 摇床洗膜 5 次,5 min/次,目的蛋白(PI3K、p - PI3K、AKT、p - AKT)及内参蛋白(β - actin)一抗按照说明书比例稀释后将 PVDF 膜置于孵育盒中 4 ℃孵育过夜,次日 TBST 洗膜后,二抗以 1∶10 000 稀释后室温孵育 2 h,再次洗膜后显影,用 Image J 1.8.0 分析条带灰度值,计算 PI3K、p - PI3K、AKT、p - AKT 相对表达量(PI3K、p - PI3K、AKT、p - AKT/β - actin 灰度值 × 100%)。

2.7 酶联免疫(enzyme - linked immunosorbent assay,ELISA)法测定血清 IL - 1β/IL - 10 水平 从 -80 ℃冰箱取出大鼠血清,置入 1.5 mL EP 管中,严格按照试剂盒所示步骤,做 5 个重复,测定大鼠血清 IL - 1β、IL - 10 水平,酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值,绘制标准曲线后,计算最后的各样品浓度。

2.8 统计学方法 采用 SPSS 23.0、Adobe Illustrator 2021、ImageJ 1.8.0、GraphPad Prism 8.0.2 等软件对数据进行整理与分析。定量资料以均数 ± 标准差表示,多组间比较方差齐采用方差分析,方差不齐采用秩和检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

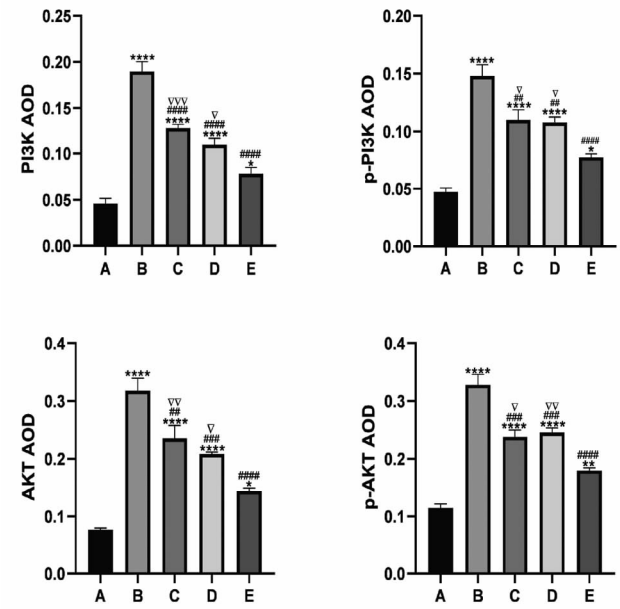
3.1 一般情况 实验期间,大鼠因造模、灌胃、病情严重等导致死亡,最终空白组剩余 12 只、模型组剩余 8 只、优化溃结方组和 SASP 组 9 只,优化溃结方 + SASP 组剩余 10 只。模型组出现体质量减轻,食欲减退,大便稀溏、便血,皮毛枯槁污浊,精神萎靡,反应迟钝等现象,给药组大鼠精神逐渐好转,活动及饮食增加,大便成形,便血好转或无便血,优化溃结方 + SASP 组改善最明显。

3.2 优化溃结方对 UC 大鼠结肠组织炎症反应的影响 HE 染色示空白组大鼠结肠黏膜形态、隐窝结构正常,无水肿表现。模型组结肠黏膜结构严重受损,排列紊乱,隐窝细胞丢失,黏膜肌层遍布炎症细胞,黏膜下层水肿严重,呈现典型的炎症样改变。优化溃结方组以及 SASP 组病理损伤较模型组减轻,而优化溃结方 + SASP 合并干预后,对于 TNBS 诱导的溃疡性结肠炎结肠黏膜的损伤显著降低,炎性细胞的浸润显著减少。如插页 XXXVI 图 1。

3.3 免疫组化法检测优化溃结方对 UC 大鼠 PI3K、p - PI3K、AKT、p - AKT 蛋白表达的影响 图片经 Image J 分析处理后得到相应蛋白染色的平均光密度值(average optical density,AOD),经数据分析后发现,与空白组相比,模型组 PI3K、p - PI3K、AKT、p - AKT 蛋白平均光密度值显著升高($P < 0.05$)。与模型组相比,PI3K、p - PI3K、AKT、p - AKT 蛋白平均光密度值在优化溃结方组、SASP 组、优化溃结方 + SASP 组均有不同程度下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与优化溃结方 + SASP 组比较,优化溃结方组、SASP 组的 PI3K、p - PI3K、AKT、p - AKT 蛋白平均光密度值显著高于优化溃结方 + SASP 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),优化溃结方组的 PI3K、p - PI3K、AKT 蛋白平均光密度值高于 SASP 组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。优化溃结方组 p - AKT 蛋白平均光密度值低于 SASP 组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。如插页 XXXVII 图 2、图 3。

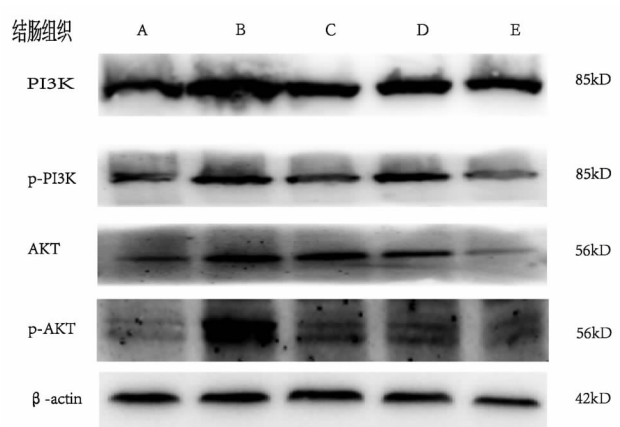
3.4 Western blot 检测优化溃结方对 UC 大鼠 PI3K、p - PPI3K、AKT、PAKT 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠结肠 PI3K、p - PI3K、AKT、p - AKT 蛋白表达升高。与模型组比较,PI3K、p - PI3K、AKT、p - AKT 蛋白表达水平在优化溃结方组、SASP 组、优化溃结方 + SASP 组均有不同程度下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与优化溃结方 + SASP 组比较,优化溃结方组、SASP 组的 PI3K、p - PI3K、AKT、p - AKT 蛋白表达水平显著高于优化溃结方 + SASP 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。优化溃结方组的 PI3K、p - PI3K 蛋白表达水平低于 SASP 组,但无显著差异。优化溃结方组的 AKT、p - AKT 蛋白表达水平高于 SASP 组,AKT 蛋白表达水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$),p - AKT 表达水平差异有统计学意义($P < 0.05$)。如图 4、图 5。

3.5 ELISA 法测定优化溃结方对血清 IL - 1β、IL - 10 水平的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清 IL - 1β 明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,优化溃结方组、SASP 组、优化溃结方 + SASP 组均有不同程度下降($P < 0.05$)。与优化溃结方 + SASP 组比较,优化溃结方组、SASP 组的 IL - 1β 水平显著高于优化溃结方 + SASP 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),优化溃结方组的 IL - 1β 水平高于 SASP 组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。与正常组比较,模型组大鼠血清 IL - 10 明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,优化溃结方组、SASP 组、优化溃结方 + SASP 组均有不同程度升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



注：A. 空白组，B. 模型组，C. 优化溃结方组，D. SASP 组，E. 优化溃结方 + SASP 组；* 与空白组比较，$P<0.05$；* * 与空白组比较，$P<0.01$；* * * * 与空白组比较，$P<0.000\ 1$；## 与模型组比较，$P<0.01$；### 与模型组比较，$P<0.001$；#### 与模型组比较，$P<0.000\ 1$；▽与优化溃结方 + SASP 组比较，$P<0.05$；▽▽与优化溃结方 + SASP 组比较，$P<0.01$；▽▽▽与优化溃结方 + SASP 组比较，$P<0.001$。

图 3 各组大鼠结肠组织 PI3K、p－PI3K、AKT、p－AKT 蛋白表达的平均光密度值分析



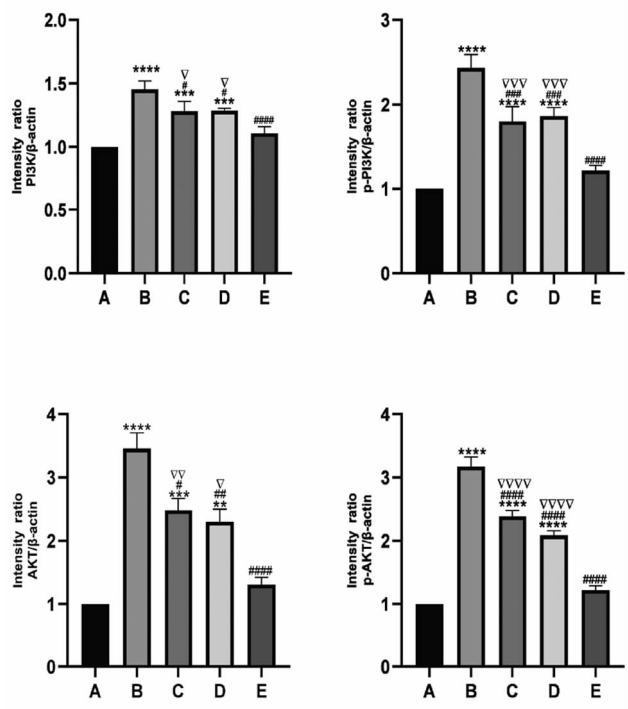
注：A. 空白组，B. 模型组，C. 优化溃结方组，D. SASP 组，E. 优化溃结方 + SASP 组。

图 4 各组大鼠结肠组织 PI3K、p－PI3K、AKT、p－AKT 蛋白免疫印迹

与优化溃结方 + SASP 组比较，优化溃结方组、SASP 组的 IL－10 水平显著低于优化溃结方 + SASP 组，差异有统计学意义（$P<0.05$），优化溃结方组的 IL－10 水平低于 SASP 组，但差异无统计学意义（$P>0.05$）。如图 6。

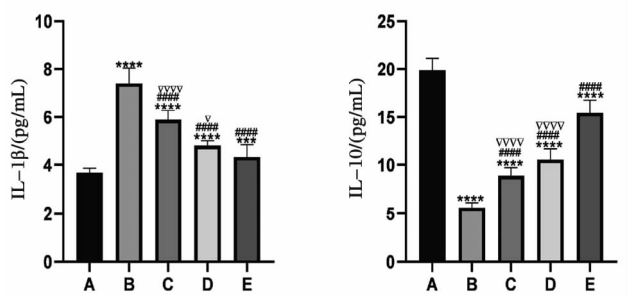
4 讨论

中医学中虽无“溃疡性结肠炎”病名，但对其相关症状的认知历来已久，可依据临床表现将本病归属于“肠澼”“痢疾”等范畴。《素问·太阴阳明论篇》曰：“下为飧泄，久为肠澼。”《证治汇补·下窍门》中记载：“肠澼者，谓湿热积于肠中。”“起居不时……闭塞滞下，为飧泻……谓气食滞于下焦，即今之痢



注：A. 空白组，B. 模型组，C. 优化溃结方组，D. SASP 组，E. 优化溃结方 + SASP 组；* * 与空白组比较，$P<0.01$；* * * 与空白组比较，$P<0.001$；* * * * 与空白组比较，$P<0.000\ 1$；#与模型组比较，$P<0.05$；##与模型组比较，$P<0.01$；###与模型组比较，$P<0.001$；####与模型组比较，$P<0.000\ 1$；▽与优化溃结方 + SASP 组比较，$P<0.05$；▽▽与优化溃结方 + SASP 组比较，$P<0.01$；▽▽▽与优化溃结方 + SASP 组比较，$P<0.001$；▽▽▽▽与优化溃结方 + SASP 组比较，$P<0.000\ 1$。

图 5 各组大鼠结肠组织 PI3K、p－PI3K、AKT、p－AKT 蛋白表达情况



注：A. 空白组，B. 模型组，C. 优化溃结方组，D. SASP 组，E. 优化溃结方 + SASP 组；* * * 与空白组比较，$P<0.001$；* * * * 与空白组比较，$P<0.000\ 1$；#与模型组比较，$P<0.05$；####与模型组比较，$P<0.000\ 1$；▽与优化溃结方 + SASP 组比较，$P<0.05$；▽▽▽▽与优化溃结方 + SASP 组比较，$P<0.000\ 1$。

图 6 各组大鼠血清 IL－1β/IL－10 含量比较

疾也，……湿热食积三者蕴结成痢。”张锡纯在《医学衷中参西录》中指出“肠中脂膜腐败，由腐败而至于溃烂，是以纯下血水杂以脂膜，即西人所谓肠溃疡也”，提倡“不可但以痢治，宜半从疮治”。中医认为本病病位在肝脾肾大肠，脾胃虚弱是发病的根本，湿热瘀邪是病理因素。本病病情缠绵难愈责之病理过程之复杂。脾阳不足，清阳不升则生内湿，肠道传导失司则见大便稀溏；湿性黏滞，重浊趋下，湿邪困阻日久易伤脾肾；脾肾

阳虚者易受外邪,邪郁久成热,湿热食积蕴结肠道,气血运行受阻瘀滞,腐肉成脓,可见黏液血便或脓血;瘀血停滞不去,又成为新的病理因素,新血不生,周而复始。正气足则邪不可干,正气不足则邪实病胜,故本病在临床上多见急性期与缓解期交替发生。

优化溃结方是柳越冬教授临床经验总结,对于 UC 的治疗重在调气和血、化瘀通络、荡涤积滞,清解蕴留肠腑间的湿热积滞之邪,才能使肠腑运输传导功能正常,清阳得升,腑气得降,饮食水谷正常吸收,湿邪得化,依附湿邪而生的热、瘀等才能消除,病邪去除,则腹痛、便下脓血等症状可除;调气和血重在顾护脾胃后天之本,升脾阳,行气血,得以活血通络。柳越冬教授组方中黄芪与白术、苍术共用,能够燥湿健脾,并补益脾气,顾护后天之本;青黛咸寒,有清热解毒、凉血泻火之功;败酱草味辛、苦、微寒,亦有清热解毒之功,是治疗腹痛肠痈、湿热泻痢、热毒血痢之妙药;白头翁苦寒,别名野丈人、胡王使者等,能清热解毒,止痢,历来是治疗痢疾的良药;当归补血活血,胡黄连凉血燥湿,红花活血祛瘀,气为血之帅,在健脾益气的前提下,气血充盛则运行通畅,热毒血瘀积滞能除。现代药理研究也表明[18-19]黄芪有效成分为黄芪甲苷、黄芪多糖、黄酮类、酚酸、氨基酸、微量元素等,能够抗菌、加强毛细血管抵抗力、调节免疫力,抗炎,促进白细胞生长,调节肠道菌群,对 UC 的治疗具有很好的作用;白术的有效成分是挥发油、多糖、氨基酸、内酯等,能够调节免疫力,抗炎抗菌,调节激素水平,抗氧化作用[20-21];苍术有效成分包括挥发油类和非挥发油类,主要是倍半萜类、聚乙烯炔类、黄酮类、有机酸类等,能够抗炎抗菌、抗过敏、调节免疫、改善胃肠功能[22-23]。青黛的主要成分是靛红玉和靛蓝,本课题组前期研究证实青黛可通过抑制 PI3K/AKT 通路的激活而发挥抗炎作用[24-25]。方中其余诸药现代药理也证实具有抗炎抗菌、调节免疫的功效[26-27]。九药合用,共奏调气和血,化瘀通络,荡涤积滞,清热解毒之功,既能顾护脾胃后天之本,解决本病本虚的根本问题,又能清解湿热瘀滞之邪,对于本病的治疗贯穿始终。

本研究采用 TNBS 造模形成的 UC 大鼠模型,模型组大鼠结肠组织结构严重受损,排列紊乱,隐窝细胞丢失,黏膜肌层遍布炎症细胞,血清 IL-1β 升高,IL-10 水平降低,说明模型组建立成功。柳氮磺胺吡啶经口服吸收后,在肠道内分解,能够减少大肠埃希菌和梭状芽孢杆菌,并减少炎症介质的产生,发挥抗炎抗菌,调节免疫的作用,主要用于炎症性肠病的治疗及预防 UC 的复发,临床应用广泛,不良反应相对较少,本次研究作为西药对照组用药[28]。本研究结果显示,优化溃结方+柳氮磺胺吡啶组显著降低了 UC 大鼠结肠黏膜结构受损程度,排列较整齐,黏膜肌层炎症细胞浸润明显减少,黏膜下层水肿情况改善明显。

PI3K/AKT 细胞通路在炎症和细胞凋亡中发挥重要作用。PI3K 分为 3 种类型,Ⅰ型、Ⅱ型以及Ⅲ型,Ⅰ型又具有两种亚型;AKT 分为 3 种亚型,以 AKT1 最为广泛。生理情况下,PI3K 可被激素、细胞因子等细胞外信号刺激激活磷酸化,通过生物学作用与 AKT 的 PH(pleckstrin homology)结构域结合促进其磷酸化从而激活 AKT,AKT 激活以后,促进 Caspase-3、mTOR、Bcl-2 等下游底物磷酸化发挥与凋亡、炎症、氧化应激等生物学效应的作用[29-31]。研究表明 UC 结肠组织中 PI3K/AKT 蛋白表达增加,进而影响促凋亡蛋白 Bcl-2 升高、抗凋亡蛋白 Caspase-3 降低[32]。柳荣等[33]发现 UC 模型鼠结肠黏膜中 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR 基因及其蛋白表达上调,IL-1β 水平升高,IL-10 水平降低,证明 PI3K/AKT/mTOR 信号通路过度活化在 UC 中起重要作用。此外,实验还发现通过抑制 PI3K/AKT 通路,抑制促炎因子 IL-6、IL-17、IL-1β 和 INF-γ 的释放,减轻 UC 的肠道炎症反应[34-35]。WANG B Y 等[36]发现 UC 小鼠 PI3K/AKT/mTOR 通路激活,炎性因子分泌增加,肠上皮屏障功能障碍。研究也表明通过抑制 PI3K/AKT 信号通路活性,可以改善 UC 大鼠结肠黏膜结构及肠道菌群[37]。IL-1β 主要由活化的单核巨噬细胞与淋巴细胞等合成,属于生物体先天免疫系统的监督者,能及时发现生物体非正常代谢活动,是常见的细胞因子,可通过自分泌、内分泌、旁分泌等多种方式发挥效应,在炎症反应、免疫、组织修复、发热等生理学活动中起重要作用,对于 UC 的发生能够起到直接介导作用[38-39]。UC 患者中,IL-1β 与 IL-10 表达水平会出现失衡。IL-10 在体内最重要的来源是单核巨噬细胞和 T 辅助细胞,是机体免疫应答中重要的细胞因子,在IL-10 相对或绝对缺乏的疾病,如慢性炎性肠病,银屑病,类风湿关节炎等,会存在持续的免疫激活。IL-10 还可以激活 PI3K 及其下游底物,尽管 IL-10 的抗炎作用不是通过 PI3K 介导的,但 IL-10 发挥作用取决于 PI3K 的激活[40-41]。

溃疡性结肠炎发生时,伴有不同程度的肠道炎症和结肠黏膜损害,PI3K/AKT 信号通路的激活,引起结肠组织黏膜下层水肿,炎症细胞浸润明显,导致结肠组织黏膜结构紊乱,发生溃疡,提示该通路的激活加速了结肠细胞凋亡、加重了炎症程度。本研究结果显示,UC 模型组大鼠结肠组织 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 蛋白表达显著升高,大鼠血清中炎性因子 IL-1β 表达增加,IL-10 水平降低,应用优化溃结方联合柳氮磺胺吡啶干预,较仅应用优化溃结方、柳氮磺胺吡啶后的大鼠结肠组织 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 蛋白表达显著降低,IL-10 水平增高,IL-1β 水平降低,其机制见插页ⅩⅩⅩⅦ图 7。

综上所述,优化溃结方通过抑制 PI3K/AKT 信号通路激活,减少肠道中的炎性因子 IL-1β 分泌,并能促进 IL-10 的分泌,减轻了结肠黏膜结构的损伤,减轻炎症水平,抑制结肠上皮细胞凋亡,维持肠道的正常功能,从而发挥保护 TNBS 诱导的肠道炎症的作用。中医药治疗溃疡性结肠炎的具体应用和相关机制和通路等仍在探索阶段,未来持续的进一步研究证实有助于丰富中医现代化的内涵,亦有益于从中医药角度精准化防治 UC。

参考文献

[1] 中华中医药学会脾胃病分会, 沈洪, 唐志鹏, 等. 消化系统常见病溃疡性结肠炎中医诊疗指南(基层医生版)[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(9): 4155-4160.
[2] EDER P, ŁODYGA M, GAWRON-KISZKA M, et al. Guidelines for the management of ulcerative colitis. recommendations of the Polish society of gastroenterology and the Polish national consultant in gastroenterology[J]. Prz Gastroenterol, 2023, 18(1): 1-42.
[3] KUCHARZIK T, KOLETZKO S, KANNENGIESSER K, et al. Ulcerative colitis-diagnostic and therapeutic algorithms[J]. Dtsch Arztebl Int, 2020, 117(33-34): 564-574.
[4] 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.
[5] SAFARPOUR A R, MEHRABI M, KESHTKAR A, et al. Systemat-

ic review and meta - analysis of the incidence and prevalence and 30 - year trend of inflammatory bowel diseases in Asia: a study protocol[J]. BMJ Open, 2019, 9(11): e031854.

[6] 刘兴隆,张培旭,熊珮宇,等. 基于 PI3K/Akt/NF - κB 通路探讨人参败毒散、榆瑞灌肠液内外合治干预溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜损伤的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2023,29 (19): 42 - 51.

[7] 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.

[8] SANDBORN W J, SU C, SANDS B E, et al. Tofacitinib as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis[J]. N Engl J Med, 2017, 376(18): 1723 - 1736.

[9] 雷娜, 雷兰平, 吴容, 等. 芍药汤合龙血竭对溃疡性结肠炎大鼠的效应机制[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(9): 53 - 58.

[10] WANG X H, LI D, ZHANG Y, et al. *Costus* root granules improve ulcerative colitis through regulation of TGF - β mediation of the PI3K/AKT signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(5): 4477 - 4484.

[11] ERSAHIN T, TUNCBAG N, CETIN - ATALAY R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway[J]. Mol Biosyst, 2015, 11(7): 1946 - 1954.

[12] 王磊, 罗瑞娟, 李娜, 等. 优化溃结方对溃疡性结肠炎临床疗效及血清炎症因子 CRP、TNF - α 的影响[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(4): 89 - 92.

[13] 张帅, 李娜, 沈江立, 等. 优化溃结方对溃疡性结肠炎气滞血瘀模型大鼠的影响及其作用机制研究[J]. 中国全科医学, 2024, 27(11): 1356 - 1362.

[14] 李娜, 沈江立, 柳越冬, 等. 基于 16S rDNA 测序技术探索优化溃结方治疗溃疡性结肠炎的机制[J]. 河北医药, 2023, 45(23): 3529 - 3534.

[15] 柳越冬, 陶弘武, 王长洪. 优化溃结方对溃疡性结肠炎大鼠模型结肠组织表皮生长因子影响的实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(2): 240 - 242.

[16] 周欣欣,刘茜茜,任珍,等. 溃疡性结肠炎动物模型的特点及应用分析[J]. 中国实验动物学报,2023,31 (7): 896 - 904.

[17] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 203.

[18] 张梅儇, 刘海龙, 王瑞琼, 等. 黄芪化学成分和药理作用及Q - marker 预测分析[J]. 中国新药杂志, 2023, 32(4): 410 - 419.

[19] ZHAO J, WANG L, CAO A L, et al. Huangqi decoction attenuates renal interstitial fibrosis transforming growth factor - β1/mitogen - activated protein kinase signaling pathways in 5/6 nephrectomy mice[J]. J Tradit Chin Med, 2022, 42(5): 723 - 731.

[20] 李亚飞, 汤璐璐, 唐瑞, 等. 基于 UPLC - Q - TOF - MS 法分析麸炒白术炮制前后差异性化学成分[J]. 中成药, 2023, 45(8): 2774 - 2781.

[21] LUO Y T, ZHU F Y, WU J Q, et al. Effect of Shenling Baizhu San on intestinal flora in a rat model of ulcerative colitis with spleen deficiency and dampness[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 9985147.

[22] 曹阳, 戴国梁, 王一清, 等. 基于 UPLC - Q - TOF - MS/MS 和 HPLC 的苍术 - 香附醇提液主要化学成分分析[J]. 中国药学杂志, 2023, 58(19): 1736 - 1743.

[23] XIA Y G, YANG B Y, WANG Q H, et al. Species classification and quality assessment of Cangzhu (atractylodis rhizoma) by high - performance liquid chromatography and chemometric methods[J]. J Anal Methods Chem, 2013, 2013: 497532.

[24] 姜莎莎, 臧思源, 柳越冬, 等. 青黛对溃疡性结肠炎体外炎症模型的抗炎作用及机制[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(2): 1101 - 1104.

[25] 张尔馨, 郝微微, 王珠环, 等. 青黛及其有效成分靛玉红通过 NF - κB 信号传导调控溃疡性结肠炎小鼠细胞焦亡的作用机制[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(10): 4704 - 4710.

[26] 徐丽科, 邓瑞雪, 冯义毫, 等. 白头翁化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(20): 5550 - 5555.

[27] 刘芳, 王俊杰, 黄建华, 等. 高效液相色谱法同时测定胡黄连中 6 种环烯醚萜苷类成分含量[J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(8): 1113 - 1117.

[28] 杨振斌, 王庆娜, 杨超, 等. 榆范方对大肠湿热型溃疡性结肠炎大鼠 Pxr、NF - κB 及炎症因子水平影响和黏膜修复作用研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(8): 1 - 4.

[29] WINKELMANN P, UNTERWEGER A L, KHULLAR D, et al. The PI3K pathway as a therapeutic intervention point in inflammatory bowel disease[J]. Immun Inflamm Dis, 2021, 9(3): 804 - 818.

[30] ALZAHRANI A S. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: At the bench and bedside[J]. Semin Cancer Biol, 2019, 59: 125 - 132.

[31] 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.

[32] CHEN Q Y, DUAN X Y, FAN H, et al. Oxymatrine protects against DSS - induced colitis *via* inhibiting the PI3K/AKT signaling pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2017, 53: 149 - 157.

[33] 柳荣, 王燕, 朱向东, 等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(4): 16 - 23.

[34] 牟永旭, 闵冬雨, 李室箕, 等. 半夏泻心汤对溃疡性结肠炎大鼠 PI3K/Akt 信号通路及炎症因子表达的影响与分子机制[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(9): 29 - 32.

[35] 钟友宝, 黄佳琦, 黄莉, 等. 补脾益肠丸干预 Notch 信号重塑 Th17/Treg 细胞平衡治疗溃疡性结肠炎的作用机制[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(7): 3072 - 3079.

[36] WANG B Y, GONG Z Q, ZHAN J Y, et al. Xianglian pill suppresses inflammation and protects intestinal epithelial barrier by promoting autophagy in DSS induced ulcerative colitis mice[J]. Front Pharmacol, 2021, 11: 594847.

[37] LIU J Q, LIU J, TONG X L, et al. Network pharmacology prediction and molecular docking - based strategy to discover the potential pharmacological mechanism of Huai Hua San against ulcerative colitis[J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 3255 - 3276.

[38] 陈凤英, 苗新普. 细胞焦亡相关蛋白 NLRP3、IL - 1β、Caspase - 1 在溃疡性结肠炎黏膜中的表达及意义[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2023, 32(1): 49 - 52.

[39] 刘雯, 侯晨辉, 李江. 芩柏汤通过调节 TLR2/IκB - α/IL - 1β 通路保护溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜的研究[J]. 中成药, 2022, 44(8): 2659 - 2663.

[40] 沈科婷, 胡波, 陈新胜. 加味白头翁汤对溃疡性结肠炎模型大鼠血清 IL - 5、IL - 10 影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(5): 43 - 46.

[41] 郑安锐, 齐云, 王品发, 等. 薏苡附子败酱散加味联合美沙拉嗪治疗溃疡性结肠炎寒湿瘀结型证的临床研究[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(11): 2702 - 2704.

优化溃结方通过抑制 PI3K/AKT 信号通路治疗溃疡性结肠炎作用及机制研究

（正文见 98－103 页）

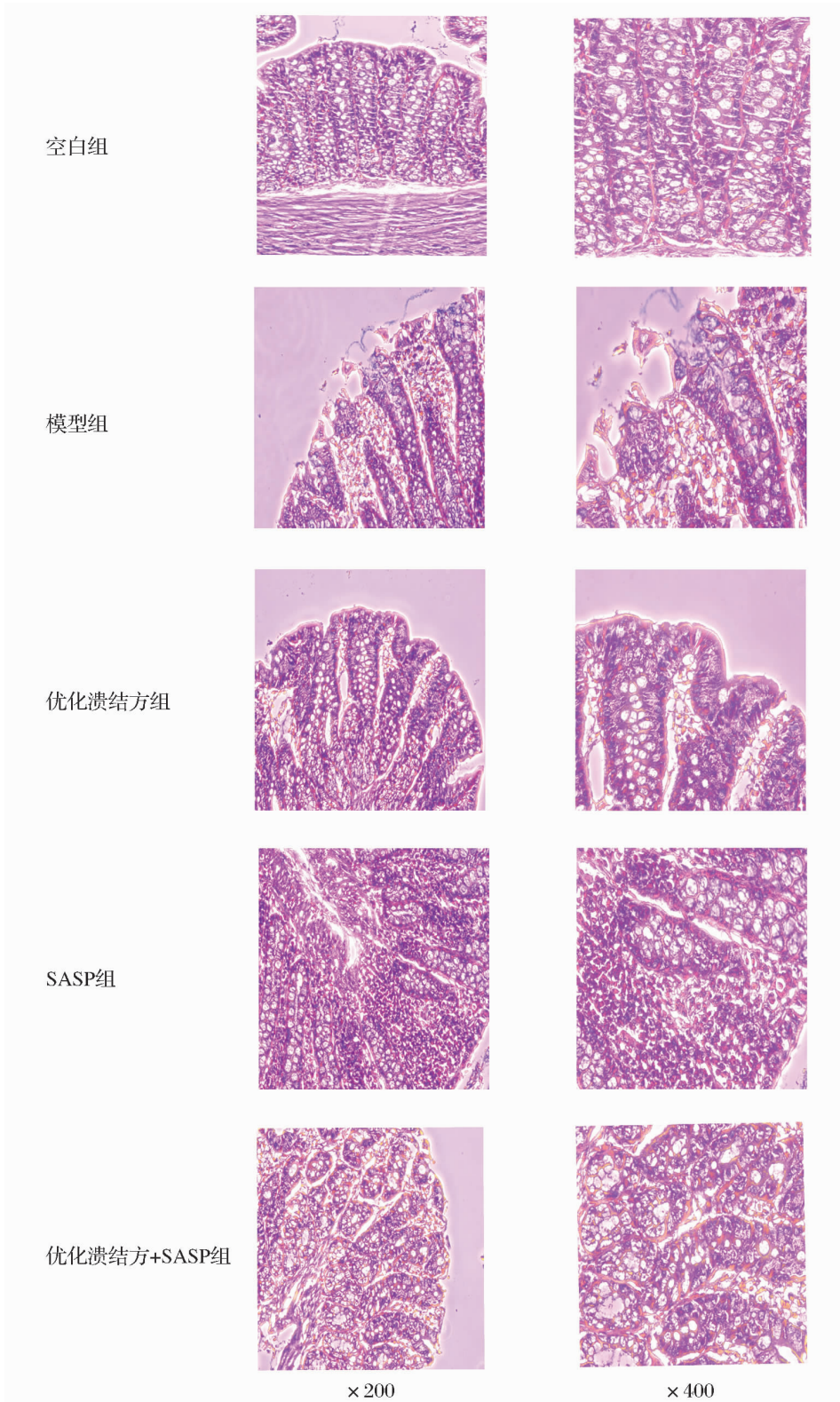


图 1　各组大鼠结肠组织形态（HE 染色）

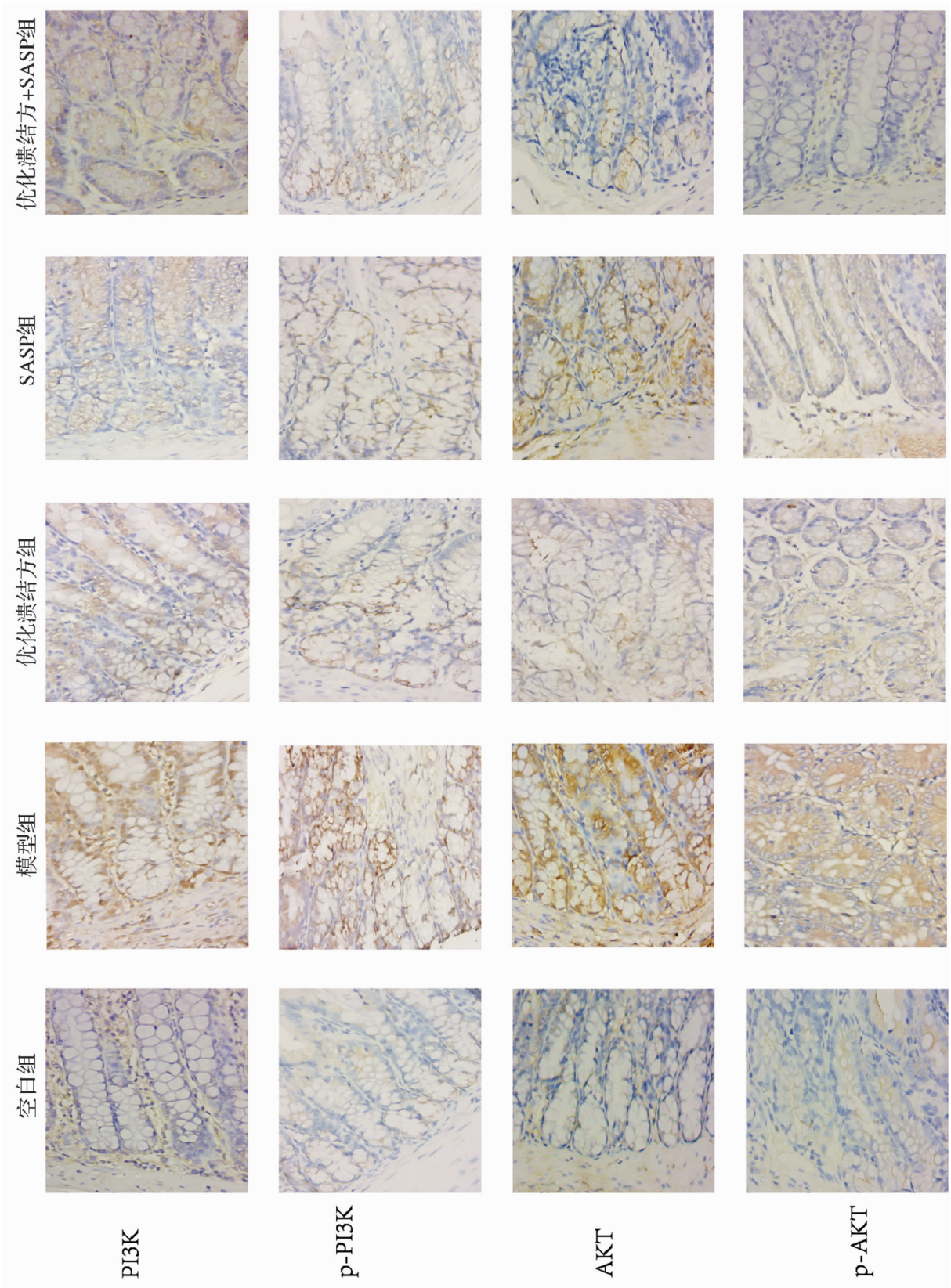
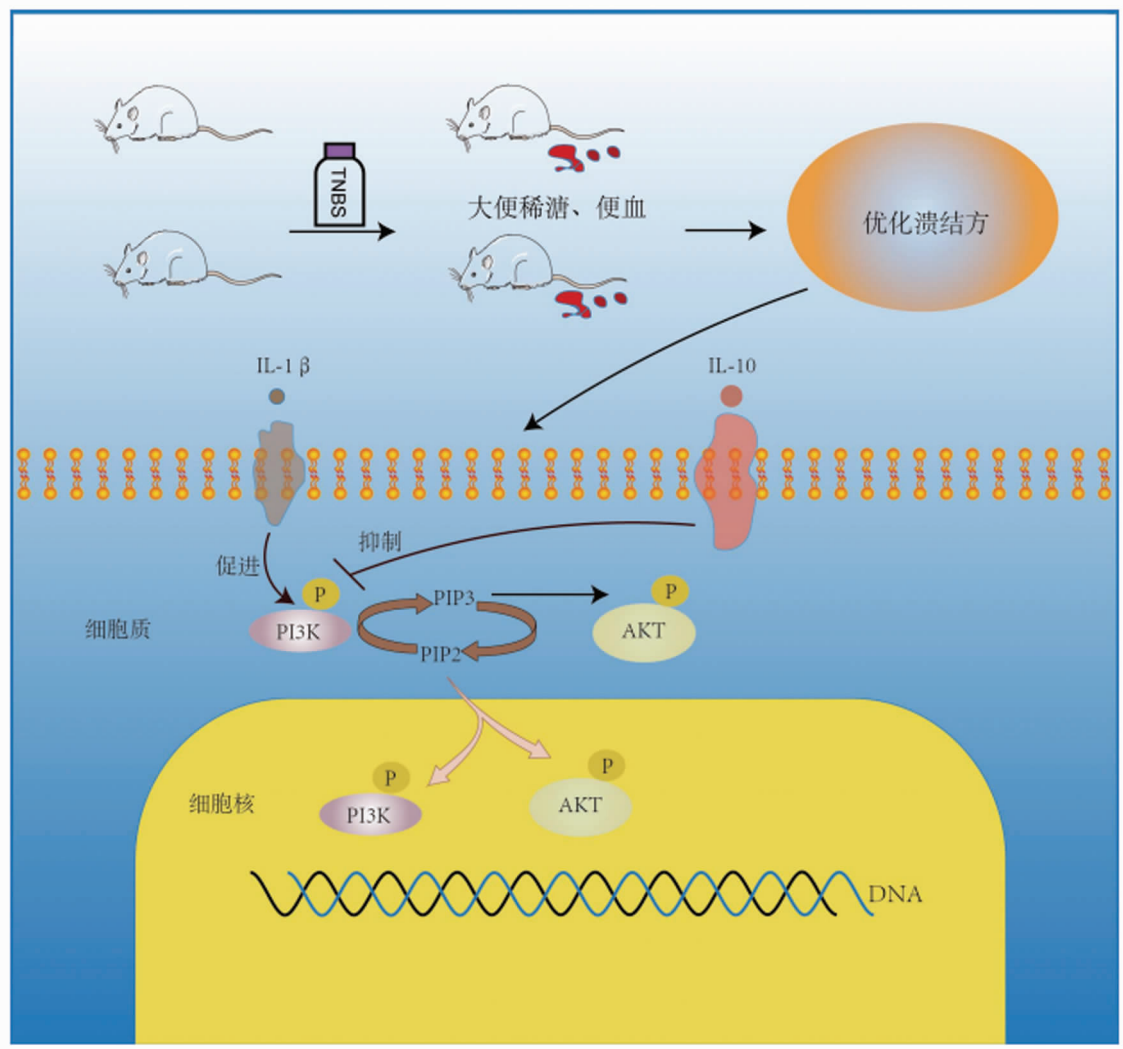


图 2　各组大鼠结肠组织免疫组化结果



注：IL－1β. 白细胞介素－1β；IL－10. 白细胞介素－10；PI3K. 磷脂酰肌醇－3－激酶；AKT. 汇丝氨酸/苏氨酸激酶；P. 磷酸化。

图 7　优化溃结方干预 PI3K/AKT 信号通路机制