

# 白头翁合理中汤加减通过调控 AMPK/mTOR/p70S6K 信号通路介导的自噬对小鼠溃疡性结肠炎的改善作用

张亚粉<sup>1</sup>, 左振魁<sup>2\*</sup>, 菅洪磊<sup>1</sup>, 王琳<sup>1</sup>, 刘天瑞<sup>1</sup>, 任兰鑫<sup>1</sup>  
(1. 河南中医药大学第二临床医学院, 河南 郑州 450046; 2. 河南省中医院肛肠科, 河南 郑州 450002)

**摘要:** **目的** 研究白头翁合理中汤加减对小鼠溃疡性结肠炎 (UC) 的影响。**方法** 3% 葡聚糖硫酸钠 (DSS) 诱导建立小鼠 UC 模型。C57BL/6 小鼠随机分为空白组, 模型组, 白头翁合理中汤加减低、中、高剂量组 (3、6、12 g/kg), 柳氮磺吡啶组 (300 mg/kg), 每组 10 只, 灌胃给予相应药物, 连续 7 d, 计算疾病活动指数 (DAI) 和结肠黏膜损伤指数 (CMDI), 测量结肠长度和单位结肠质量, HE 染色观察结肠组织形态学变化, 超氧化物阴离子荧光探针和试剂盒检测结肠组织 ROS、MDA 水平及 GSH-Px、SOD 活性, ELISA 法检测结肠组织 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  水平, 免疫荧光法检测结肠组织 LC3 表达, Western blot 法检测结肠组织 AMPK、mTOR、p70S6K 蛋白表达。**结果** 与空白组比较, 模型组小鼠 DAI 评分, CMDI 评分, 单位结肠质量, 病理学评分, ROS、MDA、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  水平, mTOR、p70S6K 蛋白表达升高 ( $P<0.01$ ), 结肠长度, GSH-Px、SOD 活性, LC3 水平, AMPK 蛋白表达降低 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 白头翁合理中汤加减各剂量组和柳氮磺吡啶组小鼠 DAI 评分, CMDI 评分, 单位结肠质量, 病理学评分、ROS、MDA、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  水平, mTOR、p70S6K 蛋白表达降低 ( $P<0.01$ ), 结肠长度, GSH-Px、SOD 活性, LC3 水平, AMPK 蛋白表达升高 ( $P<0.01$ ), 且相关的症状有明显改善。**结论** 白头翁合理中汤加减可能通过调节 AMPK/mTOR/p70S6K 信号通路来减轻 UC 小鼠炎症反应和氧化损伤。

**关键词:** 白头翁合理中汤; 溃疡性结肠炎; AMPK/mTOR/p70S6K 信号通路; 自噬

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2025)07-2198-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.07.010

## Effects of Modified Baitouweng Decoction and Lizhong Decoction on the improvement of mouse ulcerative colitis through autophagy regulation via AMPK/mTOR/p70S6K signaling pathway

ZHANG Ya-fen<sup>1</sup>, ZUO Zhen-kui<sup>2\*</sup>, JIAN Hong-lei<sup>1</sup>, WANG Lin<sup>1</sup>, LIU Tian-rui<sup>1</sup>, REN Lan-xin<sup>1</sup>  
(1. The Second Clinical Medical College of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Department of Anorectal Diseases, Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To investigate the effects of Modified Baitouweng Decoction and Lizhong Decoction on mouse ulcerative colitis (UC). **METHODS** The mouse model of UC was established by 3% dextran sulfate sodium (DSS) induction. The C57BL/6 mice were randomly divided into the blank group, the model group, the low, medium and high dose Modified Baitouweng Decoction and Lizhong Decoction groups (3, 6, 12 g/kg), and sulfasalazine group (300 mg/kg), for 7 days gavage of the appropriate drugs, with 10 mice in each group. The mice had their disease activity index (DAI) and colonic mucosal damage index (CMDI) calculated; their colonic

收稿日期: 2024-03-13  
基金项目: 河南省中医拔尖人才培养项目 (2022ZYBJ11); 河南省中医药科学研究专项课题 (2019ZY2022); 河南省研究生教育改革与质量工程项目 (YJS2021AL059)  
作者简介: 张亚粉 (1990—), 女, 硕士, 住院医师, 从事中医药防治肛肠疾病研究。Tel: 15238050100, E-mail: 1069893039@qq.com  
\* 通信作者: 左振魁 (1975—), 男, 主任医师, 从事肛肠疾病临床治疗、基础理论研究。Tel: (0371) 60979725, E-mail: zuozhenkui3524@sina.com  
网络出版日期: 2024-07-01  
网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20240628.1710.004.html>.

length and unit colonic weight measured; their histopathologic changes of colon observed by HE; their colonic ROS, MDA levels and GSH-Px, SOD activities detected by superoxide anion fluorescent probes and kits; their colonic levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  detected by ELISA; their colonic LC3 expression detected by immunofluorescence method; and their colonic AMPK, mTOR and p70S6K protein expressions detected by Western blot method. **RESULTS** Compared with the blank group, the model group displayed significantly higher DAI score, CMDI score, unit colon weight, pathology score, ROS and MDA content, TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  levels, and mTOR and p70S6K protein expression ( $P<0.01$ ); and significantly lower colon length, GSH-Px and SOD activity, LC3 level, and phosphorylated AMPK protein expression ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the groups intervened with Modified Baitouweng Decoction and Lizhong Decoction or sulfasalazine shared decreased DAI score, CMDI score, unit colon mass, pathology score, ROS, MDA, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  levels, mTOR, p70S6K protein expressions ( $P<0.01$ ); and significantly improved symptoms in terms of the elevated colonic length, GSH-Px, SOD activities, LC3 level, AMPK protein expression ( $P<0.01$ ). **CONCLUSION** Modified Baitouweng Decoction and Lizhong Decoction may attenuate inflammatory response and oxidative damage in UC mouse models *via* AMPK/mTOR/p70S6K signaling pathway.

**KEY WORDS:** Baitouweng Decoction and Lizhong Decoction; ulcerative colitis; AMPK/mTOR/p70S6K signaling pathway; autophagy

血性腹泻、身体消瘦等炎症症状是溃疡性结肠炎（ulcerative colitis, UC）主要临床表现<sup>[1]</sup>，近年来在全球范围内的发病率逐渐升高，但本病因尚不明确，缺乏特效治疗药物。慢性黏膜炎症反应和氧化损伤为 UC 主要特征，而自噬与包括 UC 在内多种疾病的发生发展密切相关<sup>[2]</sup>，并且肠黏膜修复障碍、炎症反应和氧化损伤与其失调有紧密关系<sup>[3]</sup>，故针对自噬的调控有望成为未来相关治疗与防控的新靶点。

白头翁汤和理中汤均出自《伤寒论》，本研究将二方进行组合加减，包括白头翁、黄连、黄柏、秦皮、党参、干姜、白术、炙甘草，临床治疗消化系统疾病效果良好<sup>[4-5]</sup>，并且它们对胃肠道疾病均有抗炎、镇痛作用，可调节免疫，促进溃疡愈合<sup>[6-9]</sup>。腺苷酸活化蛋白激酶（adenylate activated protein kinase, AMPK）/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin, mTOR）/p70 核糖体蛋白 S6 激酶（p70 ribosomal protein S6 kinase, p70S6K）通路调控的自噬在多种炎性相关疾病中发挥关键的抗炎、抗氧化作用<sup>[10-11]</sup>，故本研究以 UC 模型小鼠为对象，探究白头翁合理中汤加减对结肠组织炎症因子水平、氧化应激及 AMPK/mTOR/p70S6K 自噬信号通路相关蛋白表达的影响，阐明二方发挥防治本病的作用机制，以期对相关临床应用提供理论依据。

**1 材料**

**1.1 动物** C57BL/6 小鼠 60 只，雌雄各半，6~8

周龄，体质量（20 $\pm$ 3）g，购自郑州大学实验动物中心 [实验动物生产许可证号 SCXK（豫）2020-0008]。在标准的实验室条件下进行饲养，12 h/12 h 明暗交替，相对湿度（55 $\pm$ 5）%，温度（23 $\pm$ 2）℃，自由进食饮水。实验操作均按照《国立卫生研究院实验动物护理与使用指南》进行，并经河南中医药大学第二附属医院动物伦理委员会批准（伦理号 HNSZYY-20211005）。

**1.2 试剂、药材与药物** 白术、白头翁、黄连、炙甘草、黄柏、秦皮、干姜、党参（批号 220204、220101、211103、220905、211201、220301、221003、220101）均购自康美（亳州）世纪国药有限公司，经河南省中医院焦伟杰副主任药师鉴定为正品。多聚甲醛组织固定液（美国 Sigma 公司，批号 21200490）；葡聚糖硫酸钠（dextran sulfate sodium, DSS）（美国 MP Biomedicals 公司，批号 Q9358）；柳氮磺吡啶片（上海信谊天平药业有限公司，国药准字 H31020557）；BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Alexa Fluor 555 标记驴抗兔 IgG 荧光二抗、谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase, GSH-Px）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）、丙二醛（malondialdehyde, MDA）检测试剂盒（上海碧云天生物技术股份有限公司，批号 P0012S、A0453、S00056、S0109、S0131S）；二氢乙啶（dihydroethidium, DHE）探针（北京百奥莱博科技有限公司，批号 HR9069）；苏木素-伊红（HE）染液（北京兰杰柯科技有限公司，批号

70121100); 肿瘤坏死因子- $\alpha$  ( tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  )、白细胞介素 ( interleukin, IL)-6、IL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司, 批号 mlC50536-1、ml098430、ml098416); 兔源磷酸化 AMPK (p-AMPK) 单克隆抗体、磷酸化 mTOR (p-mTOR) 单克隆抗体、磷酸化 70S6K (p-p70S6K) 单克隆抗体、微管相关蛋白 1A/1B-轻链 3 (LC3) 单克隆抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号 50081、2971、9234、4108S); 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白二抗 (美国 APExBIO 公司, 批号 K1223)。

1.3 仪器 RM2245 石蜡切片机、CM1850 冰冻切片机 (德国 Lecia 公司); Shandon Citadel 2000 全自动脱水机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 5427R 低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); SilverUVIpro 凝胶数字成像分析仪 (英国 UVItec 公司); BX53 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); Spectra MaxM3 酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); Pannoramic 250 切片扫描系统 (匈牙利 3D HISTECH 公司)。

2 方法

2.1 药物制备 分别取白术 9 g、白头翁 15 g、黄连 9 g、炙甘草 9 g、黄柏 9 g、秦皮 9 g、干姜 9 g、党参 9 g, 加 8 倍量纯水浸泡 2 h 后煎煮 2 次, 每次 30 min, 合并煎煮液过滤、混合, 浓缩至生药量 1 g/mL, 即得, 4 ℃ 保存。

2.2 分组、造模与给药 随机数字表法将小鼠分为空白组, 模型组, 白头翁合理中汤加减低、中、高剂量组, 柳氮磺吡啶 (阳性药物) 组, 每组 10 只, 适应性喂养 7 d, 空白组小鼠给予正常饮用水, 其余各组小鼠给予含 3% DSS 的饮用水, 隔 1 d 更换 1 次, 出现体质量降低和便血时提示造模成功。白头翁合理中汤加减低、中、高剂量组小鼠分别灌胃给予 3、6、12 g/kg 药物, 柳氮磺吡啶组小鼠灌胃给予 300 mg/kg 药物<sup>[12]</sup>, 空白组和模型组小鼠

灌胃给予等体积生理盐水, 每天 1 次, 连续 7 d, 给药剂量根据人和实验动物体表面积比值等效剂量换算。

2.3 疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 测定 末次给药后, 依据相关标准<sup>[13]</sup> 进行评分, 记录小鼠体质量、粪便性状及隐血、便血情况, 取平均值, 见表 1。

表 1 DAI 评分标准  
Tab. 1 DAI scoring criteria

| 评分/分 | 体质量降低率/% | 粪便性状      | 隐血情况      |
|------|----------|-----------|-----------|
| 0    | <1       | 正常        | (-) 隐血    |
| 1    | 1~5      | 介于稀便和正常之间 | (+) 隐血    |
| 2    | 5~10     | 稀便        | (++) 隐血   |
| 3    | 10~15    | 介于腹泻和稀便之间 | (+++ ) 隐血 |
| 4    | ≥15      | 腹泻        | 肉眼可见便血    |

2.4 样本采集及结肠长度、单位结肠质量、结肠黏膜损伤指数测定 小鼠末次给药后禁食不禁水 24 h, 眼球取血后处死, 剥离整段结肠, 用预冷生理盐水清理肠内粪便, 测量结肠长度, 称定结肠质量, 计算单位结肠质量, 公式为单位结肠质量=结肠质量/结肠长度。肉眼观察结肠, 对其黏膜损伤指数 (colonmucosa damage index, CMDI) 进行评分, 无损伤, 计 0 分; 水肿、轻度充血, 计 1 分; 水肿、充血、糜烂或肠粘连, 计 2 分; 水肿、高度充血、坏死及溃疡 (纵径<1 cm) 形成, 计 3 分; 水肿、高度充血、黏膜坏死及溃疡 (纵径>1 cm) 形成或全肠壁坏死, 计 4 分。取部分结肠组织, 固定于多聚甲醛中, 石蜡包埋, 剩余部分-80 ℃ 冷冻保存。

2.5 HE 染色观察结肠组织病理变化 小鼠结肠组织经戊二醛固定后脱水、浸蜡、石蜡包埋, 制成 5  $\mu$ m 切片, 常规脱蜡, 水化, 苏木素染色, 返蓝, 伊红染色, 脱水封片, 病理切片全景扫描和分析系统扫描病理图像, 分析结肠组织炎性损伤及坏死情况, 参照文献 [14] 对其进行病理组织学评分, 标准见表 2。

表 2 组织损伤病理评分标准

Tab. 2 Pathological scoring criteria for tissue damage

| 评分/分 | 炎症浸润程度 | 病变深度    | 隐窝破坏程度       | 病变范围/% |
|------|--------|---------|--------------|--------|
| 0    | 无浸润    | 无病变     | 无破坏          | ≤25    |
| 1    | 轻度浸润   | 病变至黏膜下层 | 基底 1/3 隐窝被破坏 | 25~50  |
| 2    | 中度浸润   | 病变至肌层   | 基底 2/3 隐窝被破坏 | 50~75  |
| 3    | 重度浸润   | 病变至浆膜层  | 仅有完整表明上皮     | >75    |

2.6 荧光探针法检测结肠组织 ROS 水平 取小鼠结肠组织, 制成 40  $\mu$ m 冰冻切片, 按照 DHE 荧光 2200

探针检测试剂盒说明书进行染色 (5  $\mu$ mol/L) 及清洗, 置于荧光显微镜下观察染色情况, Image J

软件计算 ROS 荧光强度。

2.7 试剂盒检测结肠组织 GSH-Px、SOD 活性和 MDA 水平 称取小鼠结肠组织 100 mg，加入预冷的无菌 PBS，匀浆后 4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min，收集上清液，-80 ℃ 保存，严格按照试剂盒说明书操作步骤检测 GSH-Px、SOD 活性和 MDA 水平。

2.8 ELISA 法检测结肠组织 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平 将冷冻保存的小鼠结肠组织取出，严格按照试剂盒说明书操作步骤检测 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平。

2.9 Western blot 法检测结肠组织 p-AMPK、p-mTOR、p-p70S6K 蛋白表达 用含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解小鼠结肠组织，提取蛋白，BCA 法检测含量，取等量进行变性，加入上样缓冲液，冷冻保存。制备聚丙烯酰胺凝胶，上样，电泳，湿转法转移至 PVDF 膜，5% BSA 室温封闭 1 h，分别加入 p-AMPK、p-mTOR、p-p70S6K 抗体（1：1 000），4 ℃ 孵育过夜，次日加入二抗（1：1 000），室温孵育 1 h，进行 ECL 显色，以 GAPDH 为内参，通过 Image J 软件计算蛋白相对表

表 3 各组小鼠 DAI 评分、CMDI 评分、结肠长度、单位结肠质量比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )

Tab. 3 Comparison of mouse DAI score, CMDI score, colonic length and unit colonic weight of each group ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )

| 组别            | DAI 评分/分                 | CMDI 评分/分                | 结肠长度/cm                  | 单位结肠质量/( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) |
|---------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------------------|
| 空白组           | 0.19±0.02                | 0.24±0.02                | 7.64±0.68                | 0.027±0.001                              |
| 模型组           | 3.27±0.18**              | 3.38±0.20**              | 5.22±0.40**              | 0.036±0.002**                            |
| 白头翁合理中汤加减低剂量组 | 2.33±0.15 $\Delta\Delta$ | 2.59±0.16 $\Delta\Delta$ | 5.79±0.53 $\Delta$       | 0.033±0.001 $\Delta$                     |
| 白头翁合理中汤加减中剂量组 | 1.41±0.14 $\Delta\Delta$ | 1.73±0.18 $\Delta\Delta$ | 6.58±0.72 $\Delta\Delta$ | 0.030±0.002 $\Delta\Delta$               |
| 白头翁合理中汤加减高剂量组 | 0.90±0.09 $\Delta\Delta$ | 1.02±0.08 $\Delta\Delta$ | 7.03±0.62 $\Delta\Delta$ | 0.029±0.002 $\Delta\Delta$               |
| 柳氮磺吡啶组        | 0.75±0.11 $\Delta\Delta$ | 0.94±0.07 $\Delta\Delta$ | 7.13±0.55 $\Delta\Delta$ | 0.029±0.001 $\Delta\Delta$               |

注：与空白组比较，\*\*  $P<0.01$ ；与模型组比较， $\Delta$   $P<0.05$ ， $\Delta\Delta$   $P<0.01$ 。

3.2 白头翁合理中汤加减对 UC 小鼠结肠组织形态学变化的影响 空白组小鼠结肠黏膜组织结构完整光滑，未出现明显的病理学改变；模型组小鼠结肠黏膜组织中黏膜下层与黏膜层分解不清晰，结构遭到破坏和炎性细胞浸润；白头翁合理中汤加减各剂量组和柳氮磺吡啶组小鼠结肠黏膜损伤和炎性细胞浸润程度降低，见图 1。与空白组比较，模型组小鼠结肠病理学评分升高（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，白头翁合理中汤加减各剂量组和柳氮磺吡啶组小鼠结肠病理学评分降低（ $P<0.01$ ），见表 4。

3.3 白头翁合理中汤加减对 UC 小鼠结肠组织 ROS 水平的影响 与空白组比较，模型组小鼠结肠组织 ROS 荧光强度（红光）升高（ $P<0.01$ ）；

达量。

2.10 免疫荧光法检测结肠组织 LC3 蛋白表达 取小鼠结肠组织石蜡切片，加入通透剂，室温通透 20 min，PBS 漂洗，加入封闭液，室温下封闭 1 h，滴加 LC3 抗体，4 ℃ 孵育过夜，PBS 漂洗，滴加荧光二抗，室温避光孵育 60 min，PBS 漂洗，滴加 DAPI 染色液染核，滴加封片剂封片，置于荧光显微镜下拍照，通过 Image J 软件计算荧光强度。

2.11 统计学分析 通过 SPSS 21.0 软件进行处理，计量资料以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，多组间比较采用单因素方差分析和 Tukey 检验。 $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 白头翁合理中汤加减对 UC 小鼠 DAI 评分、CMDI 评分、结肠长度、单位结肠质量的影响 与空白组比较，模型组小鼠 DAI 评分、CMDI 评分、单位结肠质量升高（ $P<0.01$ ），结肠长度缩短（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，白头翁合理中汤加减各剂量组和柳氮磺吡啶组小鼠 DAI 评分、CMDI 评分、单位结肠质量降低（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），结肠长度增加（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），见表 3。

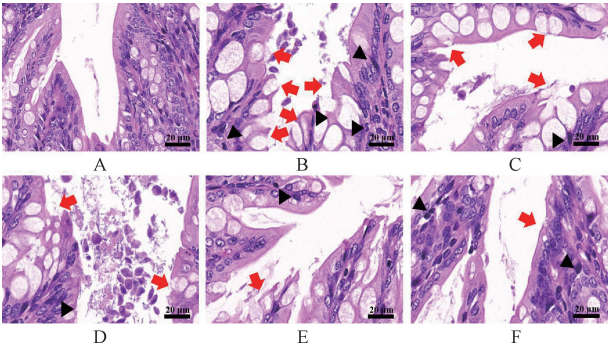
表 4 各组小鼠结肠组织病理学评分比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

Tab. 4 Comparison of mouse colonic histopathological score of each group ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

| 组别            | 组织病理学评分/分                |
|---------------|--------------------------|
| 空白组           | 0.10±0.02                |
| 模型组           | 2.79±0.25**              |
| 白头翁合理中汤加减低剂量组 | 2.06±0.19 $\Delta\Delta$ |
| 白头翁合理中汤加减中剂量组 | 1.39±0.26 $\Delta\Delta$ |
| 白头翁合理中汤加减高剂量组 | 0.91±0.17 $\Delta\Delta$ |
| 柳氮磺吡啶组        | 0.85±0.13 $\Delta\Delta$ |

注：空白组比较，\*\*  $P<0.01$ ；与模型组比较， $\Delta\Delta$   $P<0.01$ 。

与模型组比较，白头翁合理中汤加减各剂量组和柳氮磺吡啶组小鼠结肠组织 ROS 荧光强度降低（ $P<0.01$ ），见图 2、表 5。



注：A 为空白组，B 为模型组，C~E 分别为白头翁合理中汤加  
减低、中、高剂量组，F 为柳氮磺吡啶组。红色箭头表示上皮  
细胞损伤，黑色箭头表示炎症细胞。

图 1 各组小鼠结肠组织形态学变化 (HE, ×400)  
Fig.1 Morphological change of mouse colon tissue of  
each group (HE, ×400)

表 5 各组小鼠结肠组织 ROS 水平比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )  
Tab.5 Comparison of ROS level in mouse colon tissue of  
each group ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

| 组别            | 相对荧光强度                   |
|---------------|--------------------------|
| 空白组           | 1.00±0.08                |
| 模型组           | 3.93±0.26**              |
| 白头翁合理中汤加减低剂量组 | 2.75±0.17 $\Delta\Delta$ |
| 白头翁合理中汤加减中剂量组 | 2.28±0.14 $\Delta\Delta$ |
| 白头翁合理中汤加减高剂量组 | 1.69±0.11 $\Delta\Delta$ |
| 柳氮磺吡啶组        | 1.95±0.13 $\Delta\Delta$ |

注：空白组比较，\*\*  $P<0.01$ ；与模型组比较， $\Delta\Delta P<0.01$ 。

表 6 各组小鼠结肠组织 GSH-Px、SOD 活性和 MDA 水平比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )  
Tab.6 Comparison of GSH-Px, SOD activities and MDA level in mouse colonic tissue of each group ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )

| 组别            | GSH-Px/(U·mg <sup>-1</sup> ) | SOD/(U·mL <sup>-1</sup> ) | MDA/(nmol·mg <sup>-1</sup> ) |
|---------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|
| 空白组           | 78.27±4.39                   | 53.31±3.05                | 3.64±0.57                    |
| 模型组           | 45.43±3.15**                 | 29.14±2.27**              | 16.29±1.44**                 |
| 白头翁合理中汤加减低剂量组 | 53.81±3.62 $\Delta\Delta$    | 36.68±2.84 $\Delta\Delta$ | 12.07±1.15 $\Delta\Delta$    |
| 白头翁合理中汤加减中剂量组 | 64.52±3.43 $\Delta\Delta$    | 44.75±3.12 $\Delta\Delta$ | 8.36±1.08 $\Delta\Delta$     |
| 白头翁合理中汤加减高剂量组 | 69.05±4.16 $\Delta\Delta$    | 48.29±3.47 $\Delta\Delta$ | 5.92±0.83 $\Delta\Delta$     |
| 柳氮磺吡啶组        | 61.30±3.57 $\Delta\Delta$    | 45.53±2.78 $\Delta\Delta$ | 7.79±1.26 $\Delta\Delta$     |

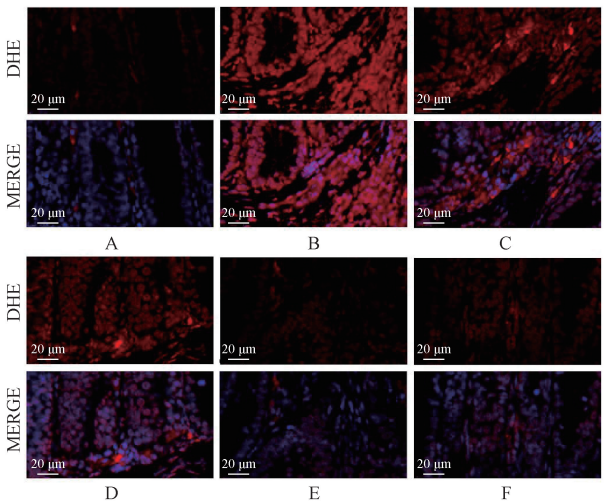
注：与空白组比较，\*\*  $P<0.01$ ；与模型组比较， $\Delta\Delta P<0.01$ 。

3.5 白头翁合理中汤加减对 UC 小鼠结肠组织  
TNF-α、IL-6、IL-1β 水平的影响 与空白组比较，  
模型组小鼠结肠组织 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平升

表 7 各组小鼠结肠组织 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平比较 (pg/mg,  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

| 组别            | TNF-α                       | IL-6                     | IL-1β                     |
|---------------|-----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 空白组           | 81.31±10.36                 | 4.91±1.02                | 21.80±3.75                |
| 模型组           | 222.75±25.82**              | 14.84±1.78**             | 49.36±4.07**              |
| 白头翁合理中汤加减低剂量组 | 186.43±19.24 $\Delta$       | 11.62±1.59 $\Delta$      | 42.79±4.43 $\Delta$       |
| 白头翁合理中汤加减中剂量组 | 145.60±17.15 $\Delta\Delta$ | 8.47±1.04 $\Delta\Delta$ | 33.53±3.19 $\Delta\Delta$ |
| 白头翁合理中汤加减高剂量组 | 113.67±15.07 $\Delta\Delta$ | 6.19±1.27 $\Delta\Delta$ | 29.28±2.88 $\Delta\Delta$ |
| 柳氮磺吡啶组        | 167.91±20.38 $\Delta\Delta$ | 8.25±1.43 $\Delta\Delta$ | 34.42±3.36 $\Delta\Delta$ |

注：与空白组比较，\*\*  $P<0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P<0.05$ ， $\Delta\Delta P<0.01$ 。



注：A 为空白组，B 为模型组，C~E 分别为白头翁合理中汤加  
减低、中、高剂量组，F 为柳氮磺吡啶组。

图 2 各组小鼠结肠组织 ROS 荧光染色 (DHE, ×400)  
Fig.2 ROS fluorescence staining of mouse colon tissue of  
each group (DHE, ×400)

3.4 白头翁合理中汤加减对 UC 小鼠结肠组织  
GSH-Px、SOD 活性和 MDA 水平的影响 与空白组  
比较，模型组小鼠结肠组织 GSH-Px、SOD 活性降  
低 ( $P<0.01$ )，MDA 水平升高 ( $P<0.01$ )；与模  
型组比较，白头翁合理中汤加减各剂量组和柳氮磺  
吡啶组小鼠结肠组织 GSH-Px、SOD 活性升高 ( $P<$   
0.01)，MDA 水平降低 ( $P<0.01$ )，见表 6。

高 ( $P<0.01$ )；与模型组比较，白头翁合理中汤加  
减各剂量组和柳氮磺吡啶组 TNF-α、IL-6、IL-1β  
水平降低 ( $P<0.05$ ， $P<0.01$ )，见表 7。

3.6 白头翁合理中汤加减对 UC 小鼠结肠组织 p-AMPK、p-mTOR、p-p70S6K 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组小鼠结肠组织 p-AMPK 蛋白表达降低 ( $P<0.01$ ), p-mTOR、p-p70S6K 蛋白表达升高 ( $P<0.01$ );与模型组比较,白头翁合理中汤加减各剂量组和柳氮磺吡啶组小鼠结肠组织 p-AMPK 蛋白表达升高 ( $P<0.01$ ), p-mTOR、p-p70S6K 蛋白表达降低 ( $P<0.01$ ), 见图 3、表 8。

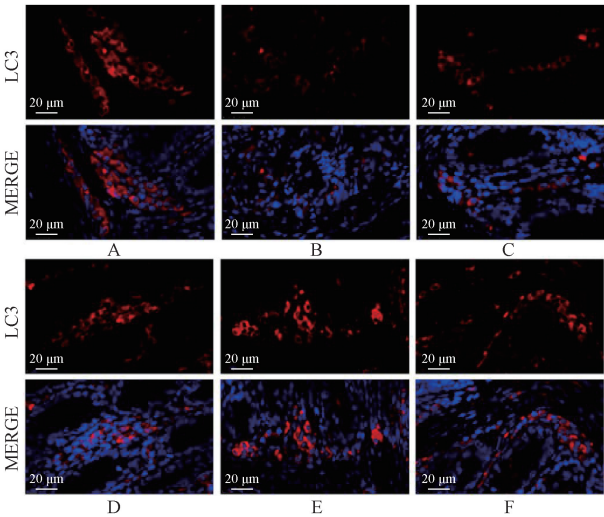
3.7 白头翁合理中汤加减对 UC 小鼠结肠组织 LC3 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组小鼠结肠组织 LC3 蛋白表达降低 ( $P<0.01$ );与模型组比较,白头翁合理中汤加减各剂量组和柳氮磺吡啶组小鼠结肠组织 LC3 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 见图 4、表 9。

表 8 各组小鼠结肠组织 p-AMPK、p-mTOR、p-p70S6K 蛋白表达比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

Tab.8 Comparison of p-AMPK, p-mTOR, p-p70S6K and LC3 protein expressions in mouse colonic tissue of each group ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

| 组别            | p-AMPK/GAPDH                   | p-mTOR/GAPDH                   | p-p70S6K/GAPDH                 |
|---------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 空白组           | 1.00±0.05                      | 1.00±0.05                      | 1.00±0.07                      |
| 模型组           | 0.24±0.02**                    | 2.71±0.12**                    | 2.30±0.10**                    |
| 白头翁合理中汤加减低剂量组 | 0.32±0.02 $\triangle\triangle$ | 2.27±0.13 $\triangle\triangle$ | 1.91±0.09 $\triangle\triangle$ |
| 白头翁合理中汤加减中剂量组 | 0.48±0.03 $\triangle\triangle$ | 1.86±0.10 $\triangle\triangle$ | 1.55±0.07 $\triangle\triangle$ |
| 白头翁合理中汤加减高剂量组 | 0.67±0.06 $\triangle\triangle$ | 1.39±0.09 $\triangle\triangle$ | 1.42±0.08 $\triangle\triangle$ |
| 柳氮磺吡啶组        | 0.53±0.04 $\triangle\triangle$ | 1.50±0.13 $\triangle\triangle$ | 1.48±0.09 $\triangle\triangle$ |

注：与空白组比较, \*\*  $P<0.01$ ；与模型组比较,  $\triangle\triangle P<0.01$ 。

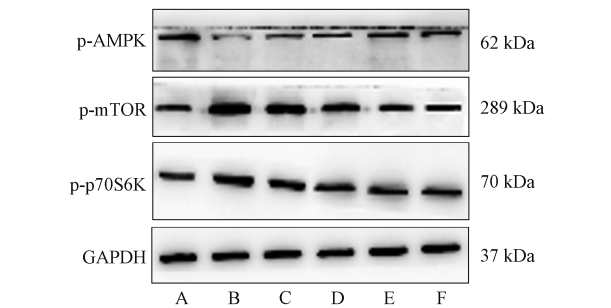


注：A 为空白组, B 为模型组, C~E 分别为白头翁合理中汤加减低、中、高剂量组, F 为柳氮磺吡啶组。

图 4 各组小鼠结肠组织 LC3 蛋白免疫荧光染色 ( $\times 400$ )  
Fig.4 Immunofluorescence staining of LC3 protein in mouse colon tissue of each group ( $\times 400$ )

4 讨论

白头翁合理中汤加减以白头翁、干姜为君药,在清热解、凉血燥湿止痢的同时配伍干姜祛散寒



注：A 为空白组, B 为模型组, C~E 分别为白头翁合理中汤加减低、中、高剂量组, F 为柳氮磺吡啶组。

图 3 各组小鼠结肠组织 p-AMPK $\alpha$ 、p-mTOR、p-p70S6K 蛋白条带  
Fig.3 Bands of p-AMPK $\alpha$ , p-mTOR and p-p70S6K proteins in mouse colonic tissue of each group

表 9 各组小鼠结肠组织 LC3 蛋白表达比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )  
Tab.9 Comparison of LC3 protein expression in mouse colon tissue of each group ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

| 组别            | LC3 相对荧光强度                     |
|---------------|--------------------------------|
| 空白组           | 1.00±0.07                      |
| 模型组           | 0.36±0.03**                    |
| 白头翁合理中汤加减低剂量组 | 0.44±0.05 $\triangle$          |
| 白头翁合理中汤加减中剂量组 | 0.87±0.06 $\triangle\triangle$ |
| 白头翁合理中汤加减高剂量组 | 0.95±0.11 $\triangle\triangle$ |
| 柳氮磺吡啶组        | 0.76±0.08 $\triangle\triangle$ |

注：与空白组比较, \*\*  $P<0.01$ ；与模型组比较,  $\triangle P<0.05$ ,  $\triangle\triangle P<0.01$ 。

邪,温运中焦,恢复脾阳;臣以黄连、黄柏燥湿厚肠,泻下焦湿热,助君药止痢之功;佐以党参、白术补气燥湿健脾;甘草调和诸药兼能补脾和中,使全方清热解毒、凉血止痢的同时不伤脾胃正气,恢复机体升清降浊之功<sup>[15]</sup>。本研究发现,白头翁合理中汤加减可降低 UC 小鼠 DAI 指数、CMDI 评分及单位结肠质量,增加结肠长度,改善结肠黏膜病理损伤。

氧化损伤和炎性因子过量生成与 UC 发生密切相关<sup>[16]</sup>, ROS、MDA 水平升高及 SOD、GSH-Px

活性降低标志着机体内氧化应激反应的过度活化，能客观反映组织氧化损伤程度<sup>[17]</sup>。在 UC 发生过程中，TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  等炎性因子水平升高，引起瀑布样级联免疫炎症反应，导致结肠黏膜受损<sup>[18]</sup>，故降低三者水平能缓解结肠黏膜的损伤<sup>[19]</sup>。本研究发现，白头翁合理中汤加减可降低 UC 小鼠结肠组织 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  水平，升高 GSH-Px、SOD 活性，降低 ROS、MDA 水平，可能与减轻氧化损伤和降低炎症反应有关。

自噬是一种细胞降解途径，其活化的能抑制机体炎症反应与氧化损伤<sup>[20]</sup>，有效减轻 UC 小鼠结肠炎症和损伤<sup>[21]</sup>。白术内酯Ⅲ能诱导 LC3 蛋白表达升高，进而恢复 UC 小鼠结肠组织 SOD、GSH-Px 活性，缓解结肠损伤<sup>[22]</sup>。本研究发现，UC 小鼠结肠组织 LC3 蛋白表达降低，而白头翁合理中汤加减干预后升高，提示其能诱导自噬活化。AMPK/mTOR/p70S6K 信号通路与细胞自噬的调控密切相关，其中 AMPK 是细胞内关键的能量传感器，AMPK 磷酸化可抑制下游蛋白 mTOR、p70S6K 磷酸化水平，最终对细胞自噬起到调控作用<sup>[23-25]</sup>，UC 小鼠结肠组织中该因子水平降低，表明相关信号受到抑制<sup>[26]</sup>。本研究发现，UC 小鼠结肠组织 p-AMPK 蛋白表达降低，p-mTOR、p-p70S6K 蛋白表达升高；白头翁合理中汤加减干预后 UC 小鼠结肠组织 p-AMPK 蛋白表达升高，下游蛋白 p-mTOR、p-p70S6K 表达降低，可能与调控 AMPK/mTOR/p70S6K 信号通路有关。另外，白头翁合理中汤加减是否通过其他分子机制（如磷脂酰肌醇 3-激酶（PI3K）/蛋白激酶 B（Akt）通路等）来诱导自噬尚不明确，有待进一步考察。

参考文献：

[ 1 ] Rubin D T, Ananthakrishnan A N, Siegel C A, *et al.* ACG Clinical Guideline: Ulcerative colitis in adults[J]. *Am J Gastroenterol*, 2019, 114(3): 384-413.

[ 2 ] 刘珊山, 卢利霞, 李 斌, 等. 自噬和肠道微生物群在溃疡性结肠炎中的研究进展[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2023, 32(9): 1048-1052.

[ 3 ] 熊珮宇, 陈 旭, 张 薇, 等. 人參敗毒散调控自噬修复溃疡性结肠炎黏膜的机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(19): 34-41.

[ 4 ] 徐亚民. 白头翁汤与理中汤灌肠治疗溃疡性结肠炎 43 例[J]. *光明中医*, 2016, 31(24): 3590-3591.

[ 5 ] 陈宝霞, 华永丽, 纪 鹏, 等. 理中汤和白头翁汤对寒湿和湿热泄泻大鼠相关指标的影响[J]. *动物医学进展*, 2023, 44(5): 64-70.

[ 6 ] 丁以绚, 赵桂梅, 李丽华, 等. 基于网络药理学分析附子理中汤治疗晚期胃癌的作用机制[J]. *浙江中医药大学学报*, 2021, 45(4): 398-405.

[ 7 ] 雷 彪, 冯文哲, 石 鹏, 等. 白头翁汤加减治疗轻中度溃疡性结肠炎急性发作临床观察[J]. *中国临床研究*, 2020, 33(12): 1681-1683; 1687.

[ 8 ] 胡肖丽, 华永丽, 纪 鹏, 等. 白头翁汤对溃疡性结肠炎小鼠的作用及对炎性细胞因子的影响[J]. *中成药*, 2023, 45(1): 246-250.

[ 9 ] 邹志强, 刘晏灼, 于如娟, 等. 白头翁汤药理作用研究进展[J]. *山东畜牧兽医*, 2020, 41(1): 63-65.

[ 10 ] 梁晨晨, 高建鹏. MSCs 通过调控 AMPK/mTOR 促进自噬改善 NASH 肝损伤[J]. *昆明医科大学学报*, 2023, 44(7): 162-167.

[ 11 ] 钟焕英, 刘礼剑, 卫家润, 等. 中药对微小 RNA 调控溃疡性结肠炎相关信号通路的干预作用研究进展[J]. *中国药房*, 2023, 34(17): 2167-2171.

[ 12 ] 林子栋, 席作武, 刘洪波. SIRT1 在复方苦参汤抑制溃疡性结肠炎小鼠氧化损伤和炎性反应中的作用[J]. *中成药*, 2023, 45(2): 415-422.

[ 13 ] 姬永宽, 倪睿凡, 梁宴霖, 等. 慢溃宁方对 DSS 诱导溃疡性结肠炎小鼠 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 细胞焦亡通路和肠道菌群的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(15): 68-78.

[ 14 ] 张梁坤, 谷文超, 吴婷婷, 等. 基于脑肠轴探究半夏泻心汤对 DSS-UC 小鼠肠道菌群及 5-HT 的影响[J]. *世界科学技术 (中医药现代化)*, 2023, 25(7): 2390-2401.

[ 15 ] 钟 宇, 郑学宝, 叶 华, 等. 白头翁汤对溃疡性结肠炎大鼠的疗效及免疫机制的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(12): 15-21.

[ 16 ] 黎笑兰, 张新广, 尹少萍. 白芨多糖抑制溃疡性结肠炎大鼠炎症反应与氧化应激[J]. *基础医学与临床*, 2020, 40(2): 224-228.

[ 17 ] 陈 静, 魏运姣, 罗 超, 等. 基于 Nrf2/ARE 抗氧化应激途径探究乌梅丸对溃疡性结肠炎小鼠的作用机制[J]. *天津医药*, 2024, 52(3): 278-284.

[ 18 ] 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.

[ 19 ] 薛 怡, 张露蓉, 梁国强, 等. 薏苡附子败酱散及拆方对溃疡性结肠炎大鼠炎性因子和肠黏膜修复的影响[J/OL]. *中国现代应用药学*: 1-7 ( 2023-09-28 ) [ 2024-05-20 ]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/33.1210.R.20230927.1346.003.html>.

[ 20 ] 王 超, 潘庆军, 刘华锋. 系统性红斑狼疮中自噬现象研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2014, 30(10): 1413-1415.

[ 21 ] 邓双娇, 左冬梅, 陈倩云, 等. 复方苦参汤对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织中炎症因子及自噬水平的影响[J]. *上海中医药杂志*, 2023, 57(9): 63-69.

[ 22 ] 任 燕, 黄明进, 蒋雯文, 等. 白术内酯Ⅲ通过调节自噬水平清除过氧化物减轻小鼠溃疡性结肠炎[J]. *世界科学技术 (中医药现代化)*, 2022, 24(8): 3219-3225.

[ 23 ] 罗 焱, 张 平. 姜黄素通过激活 AMPK 信号通路介导的

自噬抑制大鼠蛛网膜下腔出血后神经元凋亡[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(7): 807-811; 818.

[24] 文兰香, 覃世运, 陈丽君. 槲皮素调控 AMPK/mTOR 通路对肺癌 A549 细胞自噬的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(19): 2375-2379.

[25] 叶 婷, 马国庆, 魏明慧, 等. 黄芪多糖对糖尿病心肌病大

鼠 AMPK-mTOR 通路的调控机制研究[J]. 世界中医药, 2022, 17(7): 977-982.

[26] Su S, Wang X, Xi X N, *et al.* Phellodendrine promotes autophagy by regulating the AMPK/mTOR pathway and treats ulcerative colitis[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25 ( 12 ): 5707-5720.

# 运脾通肠方对脾肾阳虚型阿片类药物所致便秘大鼠肠黏膜屏障及TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路的影响

张录梅<sup>1,2</sup>, 张志明<sup>2,3\*</sup>, 宋忠阳<sup>2,4</sup>, 王 忻<sup>2,4</sup>, 徐 倩<sup>1</sup>, 杨 霞<sup>5</sup>, 李欣钰<sup>1</sup>, 沈雁云<sup>1</sup>, 赵海宏<sup>1</sup>, 王志刚<sup>1,5\*</sup>

(1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃省中西医结合肿瘤临床医学研究中心, 甘肃 兰州 730000; 3. 甘肃省中医院, 甘肃 兰州 730000; 4. 甘肃中医药大学附属医院, 甘肃 兰州 730000; 5. 天水市中医医院, 甘肃 天水 741000)

**摘要：****目的** 探讨运脾通肠方对脾肾阳虚型阿片类药物所致便秘（OIC）大鼠肠黏膜屏障损伤的改善作用。**方法** 大鼠随机分为空白组（10 只）和造模组（50 只），造模组大鼠给予洛哌丁胺皮下注射联合活性炭冰水与白醋交替灌胃，建立脾肾阳虚型 OIC 模型，连续造模 7 d。造模成功的大鼠随机分为模型组、枸橼酸莫沙必利片组（1.35 mg/kg）及运脾通肠方高、中、低剂量组（15.12、7.56、3.78 g/kg），每组 8 只，连续给药 14 d。测定中医证候评分、粪便含水率、首粒黑便排出时间、小肠推进率，HE 染色观察结肠组织病理变化，ELISA 法检测血清 IL-6、TNF-α、IL-1β 水平，免疫组化法检测结肠组织闭锁小带蛋白-1（ZO-1）、闭合蛋白（Occludin）表达，RT-qPCR 法检测结肠组织 *MyD88*、*TLR4*、*NF-κB p65* mRNA 表达，Western blot 法检测结肠组织 MyD88、TLR4、NF-κB p65 蛋白表达。**结果** 与空白组比较，模型组大鼠中医证候评分升高（ $P<0.01$ ），粪便含水率、小肠推进率下降（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），首粒黑便排出时间延长（ $P<0.01$ ）；结肠组织黏膜水肿，炎性浸润明显，腺体紊乱；血清 IL-6、TNF-α、IL-1β 水平升高（ $P<0.05$ ）；结肠组织 ZO-1、Occludin 表达降低（ $P<0.01$ ），TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA 和蛋白表达均升高（ $P<0.01$ ）。与模型组比较，运脾通肠方中剂量组和枸橼酸莫沙必利片组均能有效降低中医证候评分（ $P<0.01$ ），提高粪便含水率与小肠推进率（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），缩短首粒黑便排出时间（ $P<0.01$ ）；改善结肠黏膜水肿与炎性浸润；降低血清 IL-6、TNF-α、IL-1β 水平（ $P<0.01$ ），上调 ZO-1、Occludin 蛋白表达（ $P<0.01$ ），下调 TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA、蛋白表达（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ）。**结论** 运脾通肠方可有效调节脾肾阳虚型 OIC 大鼠肠道炎症，维持肠上皮屏障完整性并改善便秘，其机制可能与抑制 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路活化有关。

**关键词：**运脾通肠方；脾肾阳虚；阿片类药物所致便秘；TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路；肠黏膜屏障

**中图分类号：**R285.5                      **文献标志码：**A                      **文章编号：**1001-1528(2025)07-2205-08

**doi:**10.3969/j.issn.1001-1528.2025.07.011

收稿日期：2024-08-13

基金项目：甘肃省科技计划项目（18JR2FA001，24YFFA067）；兰州市青年科技人才创新项目（2023-7-49）

作者简介：张录梅（1991—），女，博士生，从事中医药防治内分泌代谢性疾病研究。Tel：18393811643，E-mail：1942028272@qq.com

\* 通信作者：张志明（1965—），男，教授，主任医师，从事急危重症、肿瘤的中医药防治研究。Tel：（0931）2687109，E-mail：zhangzhimingys@163.com

王志刚（1968—），男，教授，主任医师，从事中医药防治内分泌代谢性疾病研究。Tel：（0938）8523819，E-mail：tsszyyy@163.com