

清肠解毒汤对溃疡性结肠炎相关癌变的治疗作用及PI3K/Akt/mTOR 通路调控机制

李 华,张 敏,周 华,方佩斐

(安徽医学高等专科学校,安徽合肥 230601)

摘要: **目的** 观察清肠解毒汤对溃疡性结肠炎相关癌变的治疗作用,并探讨通过PI3K/Akt/mTOR信号通路的调控机制。**方法** 取50只SPF级大鼠,随机分为5组,模型组、低、中、高剂量组采用氧化偶氮甲烷/葡聚糖硫酸钠(AOM/DSS)复合法建立溃疡性结肠炎相关癌变模型,对照组饮用水不变,生理盐水替换二甲胍(DMH);低、中、高剂量组灌胃4.5、9、1.8 g/kg的清肠解毒汤,模型组和对照组灌胃生理盐水,持续8周。观察各组大鼠一般情况,并对比灌胃1 d、2周、4周时疾病活动指数评分(DAI),大肠前、中、后段典型增生/癌变数,结肠黏膜组织病理学变化,PI3K、AKT、mTOR mRNA表达情况及AKT/pAKT差异。**结果** 模型组大鼠精神萎靡,伴血便、腹泻,3剂量组给药后精神状态逐渐好转,高剂量组好转最为明显。干预期间对照组DAI评分均为0分,DAI组间、时间、交互比较($P<0.05$)。对照组大鼠无溃疡性结肠炎相关癌变,其余4组结肠前段、中段及后段不典型增生/癌变数组间比较($P<0.05$)。组织病理学观察发现,模型组结肠黏膜上皮细胞脱落,部分可见低度不典型增生、癌变,固有腺体萎缩,伴有大量炎性细胞浸润,3剂量组上述病理变化均有所减轻,其中高剂量组减轻最为明显,个别低度不典型增生和淋巴滤泡出现,未见癌变。AKT mRNA相对表达量组间比较($P>0.05$),PI3K、mTOR mRNA和蛋白相对表达量及AKT/pAKT组间比较($P<0.05$)。**结论** 清肠解毒汤可通过抑制PI3K/Akt/mTOR通路发挥治疗溃疡性结肠炎相关癌变的作用,其中1.8 g/kg清肠解毒汤治疗效果最佳。

关键词: 清肠解毒汤;溃疡性结肠炎相关癌变;磷脂酰肌醇-3激酶;蛋白激酶B;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

中图分类号: R735

文献标志码: A

文章编号: 1004-6879(2024)01-0034-04

溃疡性结肠炎相关癌变10年发病率约2%,20年发病率约8%,30年则达18%^[1]。近年来,UC发病率逐年升高,导致溃疡性结肠炎相关癌变发生率随之增加^[2]。溃疡性结肠炎相关癌变属中医“大肠泄”、“滞下”等范畴,发病机理为湿热蕴结而致气滞血瘀,夹糟粕积滞于大肠,引起本病^[3]。清肠解毒汤源自俞根初《重订通俗伤寒论》,该汤剂以“气血并治”为原则,通过清热燥湿、活血解毒治疗疾病,临床中关于其辅助治疗晚期大肠癌已有报道^[4],但关于其对溃疡性结肠炎相关癌变的作用及具体调控机制尚不明确。为此,本研究通过观察清肠解毒汤对溃疡性结肠炎相关癌变的影响,并初步探讨其调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级雄性SD大鼠,50只,5周龄,体

质量(200±20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号SCXK(京)2018-0001。

1.1.2 药物、主要试剂和仪器 葡聚糖硫酸钠(DSS,MP Biomedicals公司,纯度99%、相对分子质量50000Da)、氧化偶氮甲烷(AOM,Sigma公司),便隐血检测试纸(万华普曼生物工程有限公司),逆转录试剂盒(日本Takara公司),BCA蛋白定量分析试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),兔抗大鼠磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)单抗、蛋白激酶B(Akt)单抗、p-Akt多抗、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)单抗(一抗)、山羊抗兔PI3K、Akt、p-Akt、mTOR(二抗,美国Invitrogen公司),RM2255切片机(徕卡显微系统贸易公司),E200显微镜(Nikon仪器上海有限公司),Image Pro-Plus图像分析系统(美国Media Cybernetics图像技术公司)。

1.2 方法

1.2.1 中药清肠解毒汤 按照清肠解毒汤组方(焦山梔10 g,金银花炭、黄芩、连翘、赤芍各7 g,黄连、黄柏、大黄、枳壳、防风各3 g)取中药材,常规方法煎药,纱布过滤收集滤液,将滤液浓缩至含生药1.8 g/mL备用,用前蒸馏水稀释至0.9 g/mL、0.45 g/mL。

1.2.2 模型建立及样本收集 取50只SPF级大鼠,按照体重进行编码并随机分为5组,各10只,模型组、低、中、高剂量组采用AOM/DSS法建立溃疡性结肠炎相关癌变模型^[5],对照组饮用水不变,生理盐水替换DMH,继续饲养20周;低、中、高剂量组分别按照10 mL/kg灌胃浓度为0.45、0.9、0.18 g/mL的清肠解毒汤,保证灌胃剂量为4.5、9、1.8 g/kg,模型组和对照组灌胃10 mL/kg生理盐水,每天灌胃1次,持续8周,灌胃期间所有大鼠自由饮水和摄食。

1.2.3 疾病活动指数评分(disease activity index, DAI) 灌胃1 d、4周、8周分别根据大鼠大便性状、体质量下降率、粪便隐血试验结果评估DAI;0分:大便正常、体质量下降率 $\leq 1\%$ 、隐血试验阴性;1分:软便、 $1\% < \text{体质量下降} \leq 5\%$ 、隐血试验阴性;2分:软便、 $5\% < \text{体质量下降} \leq 10\%$ 、隐血试验阳性;3分:腹泻、 $10\% < \text{体质量下降} \leq 15\%$ 、隐血试验阳性;4分:腹泻、体质量下降 $> 15\%$ 、隐血试验阳性、肉眼血便。

1.2.4 不典型增生/癌变数计数及组织病理学检测 末次灌胃后2 h处死大鼠,立即解剖取自回盲结合部至肛门上1 cm的整段大肠,垂直剖开,观察是否有瘤体,并计数大肠前段、中段和后段不典型增生/癌变数,不典型增生按照Riddell等标准^[6]描述为低度和高度不典型增生;取瘤体组织,对照组取同位置健康组织,4%多聚甲醛固定,常规制作厚度为4 μm 的连续石蜡切片,并采用苏木精-伊红染色法(HE)进行染色,中性树胶封片后在显微镜下观察结肠黏膜病变。

1.2.5 PI3K、AKT、mTOR mRNA相对表达量检测 末次灌胃后2 h处死大鼠,立即解剖取新鲜大肠组织,Trizol法提取总核糖核酸(RNA),逆转录获得互补链脱氧核糖核酸(cDNA),经琼脂糖凝胶电泳鉴定后,进行实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR),严格按照试剂盒说明书设定反应体系,设定反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性1 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,63 $^{\circ}\text{C}$ 退火40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸40 s,重复42个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延

伸5 min。以 β -actin作为内参对照物,所有实验重复3次取平均值, $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 为目的基因PI3K、AKT、mTOR的相对表达强度。引物序列见表1。

表1 引物序列

基因		引物序列
PI3K	上游引物	5' -TCGTAGCTGACTGTAGCTGACTCT-3'
	下游引物	5' -AGCTGCATGCTAGTCGTAGTCGTA-3'
AKT	上游引物	5' -GATCTAGTCTAGCTGTAGCTTAGCT-3'
	下游引物	5' -GCTATGCTAGCTAGTGTAGCTAGCGTAC-3'
mTOR	上游引物	5' -GATCGTAGCTAGTCGTTGCCACAC-3'
	下游引物	5' -TACGTAGTCGTAGCTGTAGCTGAG-3'
β -actin	上游引物	5' -ATGCTAGCTGTACGGATCGATCGAC-3'
	下游引物	5' -CGCTAGCTGATCGTGATCGTAGTGA-3'

1.2.6 PI3K、AKT、pAKT、mTOR蛋白相对表达量 采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,电转仪转膜60 min,封闭液摇床封闭2 h(常温),洗涤后加入稀释一抗(1:800),摇床孵育过夜(4 $^{\circ}\text{C}$),洗涤后,加入稀释二抗(1:5000),常温孵育2 h,暗室中曝光,扫描拍照,采用BandScan工具进行灰度值分析,以目的蛋白灰度值与内参 β -actin灰度值比值描述蛋白相对表达量。

1.3 观察指标

(1)大鼠一般情况观察及不同时刻DAI评分对比;(2)不典型增生/癌变数对比;(3)组织病理学观察;(4)PI3K、AKT、mTOR mRNA表达情况对比;(5)PI3K、mTOR蛋白表达及AKT/pAKT对比。

1.4 统计学分析

统计工具SPSS 23.0分析处理数据,以 $(\bar{x} \pm s)$ 描述计量资料,重复计量资料比较采用重复测量方差分析,进一步两两样本比较采用LSD-*t*检验,多样本计量资料比较采用单因素方差分析,进一步两两样本比较采用SNK-*q*检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况观察及不同时刻DAI评分对比

对照组大鼠精神状态、进食均正常,模型组精神萎靡、毛发粗糙无光泽,血便、腹泻,体重减轻,3剂量组给药后精神状态逐渐好转,血便减轻,其中高剂量组好转最为明显。模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组DAI评分组间、时间、交互比较($P < 0.05$),见表2。

表2 不同时刻DAI评分对比($\bar{x}\pm s$,分, $n=10$)

组别	干预1d	干预4周	干预8周
模型组	3.28±0.47	3.22±0.44	3.14±0.38
低剂量组	3.09±0.35	2.60±0.27 ^{ad}	2.23±0.20 ^{adc}
中剂量组	2.97±0.33	2.51±0.28 ^{ad}	1.88±0.26 ^{abde}
高剂量组	2.83±0.34	1.93±0.25 ^{abcd}	1.50±0.24 ^{abcde}

与模型组比,^a $P<0.05$;与低剂量组比,^b $P<0.05$;与中剂量组比,^c $P<0.05$;与干预1d比,^d $P<0.05$;与干预4周比,^e $P<0.05$

2.2 不典型增生/癌变数对比

对照组大鼠无溃疡性结肠炎相关癌变;其余4组结肠前段、中段及后段不典型增生/癌变数组间比较($P<0.05$),见表3。

表3 不典型增生/癌变数对比($\bar{x}\pm s$,个, $n=10$)

组别	前段	中段	后段
模型组	0.60±0.10	0.80±0.10	2.40±0.50
低剂量组	0.30±0.06 ^a	0.50±0.07 ^a	2.00±0.30 ^a
中剂量组	0.20±0.05 ^{ab}	0.30±0.06 ^{ab}	1.70±0.25 ^{ab}
高剂量组	0.10±0.03 ^{abc}	0.10±0.03 ^{abc}	1.10±0.20 ^{abc}

与模型组比,^a $P<0.05$;与低剂量组比,^b $P<0.05$;与中剂量组比,^c $P<0.05$

2.3 组织病理学观察

组织病理学观察发现,对照组结肠黏膜上皮完整、形态正常,模型组结肠黏膜上皮细胞脱落,部分可见低度不典型增生、癌变,固有腺体萎缩,伴有大量炎性细胞浸润,3剂量组上述病理变化均有所减轻,见图1。

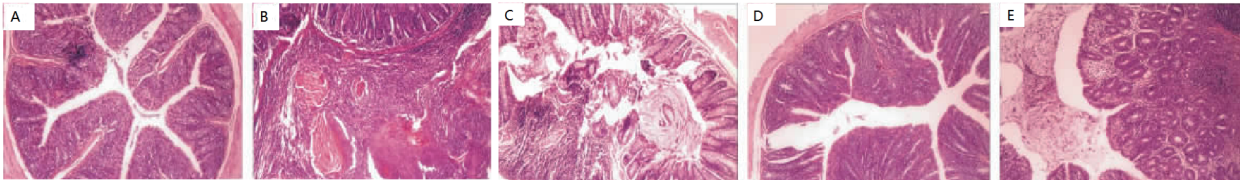


图1 各组结肠黏膜HE染色(×100)

A对照组;B模型组;C低剂量组;D中剂量组;E高剂量组

2.4 PI3K,AKT,mTOR mRNA表达情况对比

AKT mRNA相对表达量组间比较($P>0.05$),PI3K、mTOR mRNA相对表达量组间比较($P<0.05$),见表4。

表4 PI3K,AKT,mTOR mRNA相对表达量对比($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	PI3K	AKT	mTOR
对照组	0.20±0.03	0.75±0.09	0.13±0.03
模型组	0.92±0.11 ^a	0.73±0.08	0.74±0.08 ^a
低剂量组	0.69±0.07 ^{ab}	0.71±0.08	0.55±0.06 ^{ab}
中剂量组	0.52±0.06 ^{abc}	0.73±0.07	0.41±0.04 ^{abc}
高剂量组	0.35±0.04 ^{abcd}	0.72±0.08	0.26±0.03 ^{abcd}

与对照组比,^a $P<0.05$;与模型组比,^b $P<0.05$;与低剂量组比,^c $P<0.05$;与中剂量组比,^d $P<0.05$

2.5 PI3K,mTOR蛋白表达及AKT/pAKT对比

PI3K、mTOR蛋白相对表达量及AKT/pAKT组间比较($P<0.05$),见图2、表5。

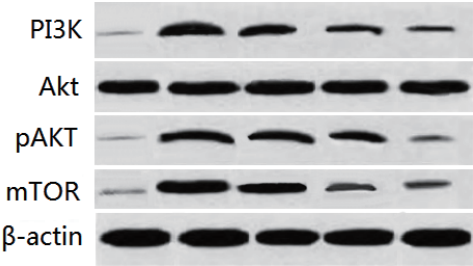


图2 Western blot检测PI3K、AKT、pAKT、mTOR蛋白表达

表5 PI3K,mTOR蛋白表达及AKT/pAKT对比($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	PI3K	pAKT/AKT	mTOR
对照组	0.11±0.02	0.10±0.02	0.20±0.03
模型组	0.92±0.10 ^a	0.85±0.10 ^a	0.95±0.10 ^a
低剂量组	0.68±0.07 ^{ab}	0.73±0.07 ^{ab}	0.68±0.07 ^{ab}
中剂量组	0.43±0.04 ^{abc}	0.52±0.06 ^{abc}	0.43±0.05 ^{abc}
高剂量组	0.25±0.03 ^{abcd}	0.22±0.02 ^{abcd}	0.36±0.04 ^{abcd}

与对照组比,^a $P<0.05$;与模型组比,^b $P<0.05$;与低剂量组比,^c $P<0.05$;与中剂量组比,^d $P<0.05$

3 讨论

溃疡性结肠炎相关癌变发病机制复杂,涉及基因突变、多基因调控、环境改变等多种复杂过程^[7]。研究证实^[8],PI3K/Akt/mTOR信号通路参与多种肿瘤的发生、发展过程的调控,包括肿瘤细胞癌变、增殖、代谢等。研究表明^[9],在炎症状态下,PI3K/Akt/mTOR信号通路处于过度激活状态,推测在溃疡性结肠炎相关癌变过程中发挥重要作用。清热解毒汤在抗炎、抗肿瘤方面均有重要作用^[10]。

本研究发现,模型组大鼠精神状态及结直肠黏膜病变最为明显,经不同剂量清肠解毒汤干预后精神状态好转,结直肠黏膜病变减轻。随着时间的延长、剂量的增加大

鼠DAI评分不同程度改善,随剂量的增加结肠前、中及后段不典型增生/癌变数减少,提示清肠解毒汤具有治疗溃疡性结肠炎相关癌变的作用,其中1.8 g/kg清肠解毒汤效果最佳。清肠解毒汤方剂由9味常用中药材组成,焦山栀泻火利湿、凉血止痛;金银花炭活血化瘀、补虚疗风;黄芩除湿止泻;连翘清热散结、消肿止痛;赤芍凉血散瘀、通经止痛;黄连、黄柏清热燥湿、泻火解毒;大黄泻下攻坚、凉血逐瘀;枳壳破气行痰、消积止痛;防风祛风劫痹、防风止痉,全方配伍通过祛除湿邪毒、排除瘀血,同时调理肺腑之气,将活血、清热、燥湿三法合一,发挥清肠解毒之功。现代药理学研究证实,焦山栀(栀子)、连翘具有抗菌消炎作用^[11];金银花、黄芩多糖具有调节机体免疫力作用^[12];枳壳对胃肠道平滑肌具有双向调节作用^[13]。

此外,5组PI3K、mTOR蛋白表达及AKT/pAKT差异显著,对照组最低,模型组最高,3剂量组介于二者之间,提示清肠解毒汤可通过抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路达到治疗溃疡性结肠炎相关癌变的目的。PI3K/AKT/mTOR通路在多种癌细胞中均处于激活状态,在促进癌细胞的增殖、分化等过程中发挥关键作用。PI3K属于异源二聚体,AKT使其下游重要效应分子,当PI3K接受胞外信号刺激后,信号转至AKT分子使之发生膜转位,继而被磷酸化激活进入胞内^[14]。mTOR是调控细胞分裂、代谢的重要靶点基因,相关信号信息可通过PI3K及下游AKT传递至mTOR启动靶点TOR复合体1(TORC1),继而激活mTOR,参与细胞分裂、增殖等过程^[15]。不同剂量清肠解毒汤灌胃溃疡性结肠炎相关癌变大鼠后,结直肠组织中PI3K基因和蛋白表达及AKT磷酸化被抑制,细胞分裂、代谢关键调控蛋白mTOR表达被抑制,达到治疗溃疡性结肠炎相关癌变的目的。

综上所述,清肠解毒汤可通过抑制PI3K/Akt/mTOR通路发挥治疗溃疡性结肠炎相关癌变的作用,其中1.8 g/kg清肠解毒汤治疗效果最佳。

参考文献

- [1] Bopanna S, Ananthakrishnan AN, Kedia S, et al. Risk of colorectal cancer in Asian patients with ulcerative colitis: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2017, 2(4): 269-276.
- [2] Wang YN, Li J, Zheng WY, et al. Clinical characteristics of ulcerative colitis-related colorectal cancer in Chinese patients [J]. *J Dig Dis*, 2017, 18(12): 684-690.
- [3] 屠明华. 从《伤寒论》辨证分析溃疡性结肠炎的发病机理及治疗方药[J]. *四川中医*, 2020, 38(8): 33-36.
- [4] 朱巧玲, 张荣珍, 谢强龙. 清肠解毒方对肠癌患者胃肠道功能、生存质量的影响[J]. *四川中医*, 2021, 39(6): 92-95.
- [5] 马秀兰, 王秀萍, 王佳林, 等. 大鼠溃疡性结肠炎模型的建立[J]. *中医药临床杂志*, 2021, 33(9): 1754-1759.
- [6] Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF, et al. Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications [J]. *Hum Pathol*, 1983, 14(11): 931-968.
- [7] Pekow J, Meckel K, Dougherty U, et al. miR-193a-3p is a Key tumor suppressor in ulcerative colitis-associated colon cancer and promotes carcinogenesis through upregulation of IL17RD [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(17): 5281-5291.
- [8] Guan H, Piao H, Qian Z, et al. 2,5-Hexanedione induces autophagic death of VSC4.1 cells via a PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Mol Biosyst*, 2017, 13(10): 1993-2005.
- [9] Wang X, 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.
- [10] 符顺丹, 吴胜. 自拟疏风清热解暑汤辅助治疗小儿急性上呼吸道感染(表里俱热证)疗效观察[J]. *四川中医*, 2022, 40(5): 82-85.
- [11] 管政, 王也, 王长振, 等. 栀子醇提物对食源性微生物抑制效果的研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2018, 38(11): 871-875.
- [12] 梁英, 金迪, 李丹丹, 等. 黄芩多糖的免疫调节活性[J]. *中国食品学报*, 2017, 17(2): 23-27.
- [13] 左诗淳, 李慧杰. 齐元富巧用枳壳白术治疗胃癌经验[J]. *山东中医杂志*, 2017, 36(4): 313-314, 321.
- [14] Yu JS, Cui W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination [J]. *Development*, 2016, 143(17): 3050-3060.
- [15] Wu XL, Wang LK, Yang DD, et al. Effects of Glut1 gene silencing on proliferation, differentiation, and apoptosis of colorectal cancer cells by targeting the TGF- β /PI3K-AKT-mTOR signaling pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(2): 2356-2367.

(收稿日期:2023-05-25)