

本文引用: 戴 晖, 刘佳丽, 刘巧玲, 李昕染, 卞聪慧, 钱海华, 张 丹. 养阴生肌散通过 AMPK/mTOR 信号通路调控自噬改善克罗恩病肠纤维化的作用机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(3): 409-416.

养阴生肌散通过 AMPK/mTOR 信号通路调控自噬改善 克罗恩病肠纤维化的作用机制研究

戴 晖, 刘佳丽, 刘巧玲, 李昕染, 卞聪慧, 钱海华, 张 丹*

南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 210029

[摘要] **目的** 探讨养阴生肌散通过腺苷酸活化蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(AMPK/mTOR)信号通路调控自噬改善克罗恩病大鼠肠纤维化的作用机制。**方法** 将 28 只大鼠随机分为对照组、模型组、美沙拉嗪组(420 mg/kg)、养阴生肌散组(100 mg/kg), 每组 7 只。参考 Morris 方法制备克罗恩病肠纤维化模型, 药物组均灌肠 0.5 mL, 1 次/d, 共 4 周。观察大鼠的一般情况, 计算疾病活动指数(DAI)评分; 对结肠组织进行 HE 染色并行结肠黏膜损伤指数(CMDI)评分、组织学病变评分, 进行 Masson 染色并行纤维化指数评分; 采用 Western blot 法检测 AMPK、mTOR、核糖体蛋白 S6 激酶(p70S6K)、真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 1(4EBP1)、微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)蛋白水平; 运用 RT-PCR 法检测肌球蛋白 BCL2 结合蛋白(Beclin-1)、整合体 1(P62)的 mRNA 水平。**结果** 与对照组比较, 模型组体质量下降百分率分数显著上升($P<0.01$), DAI 评分、CMDI 评分、组织学病变评分、纤维化指数评分均显著增高($P<0.01$); LC3 II/LC3I、p-AMPK/AMPK、p-4EBP1/4EBP1、p-mTOR/mTOR 表达量显著降低($P<0.01$), p-p70S6K/p70S6K 显著增高($P<0.01$); Beclin-1 表达量明显降低($P<0.01$), P62 表达量明显增高($P<0.01$)。与模型组比较, 美沙拉嗪组和养阴生肌散组体质量下降百分率分数均显著升高($P<0.01$), DAI 评分、CMDI 评分、组织学病变评分、纤维化指数评分均显著降低($P<0.01$); LC3 II/LC3I、p-AMPK/AMPK、p-4EBP1/4EBP1、p-mTOR/mTOR 表达量显著升高($P<0.01$), p-p70S6K/p70S6K 显著降低($P<0.01$); Beclin-1 表达量明显上升($P<0.05$), P62 表达量明显下降($P<0.01$)。**结论** 养阴生肌散可能通过 AMPK/mTOR 通路介导的自噬激活改善克罗恩病肠纤维化。

[关键词] 克罗恩病; 肠纤维化; 养阴生肌散; 自噬; AMPK/mTOR 信号通路

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.03.003

The mechanism of action of Yangyin Shengji Powder in alleviating intestinal fibrosis in Crohn disease by regulating autophagy through AMPK/mTOR signaling pathway

DAI Hui, LIU Jiali, LIU Qiaoling, LI Xinran, BIAN Conghui, QIAN Haihua, ZHANG Dan*

Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210029, China

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism of action of Yangyin Shengji Powder (YYSJP) in alleviating intestinal fibrosis in rats with Crohn disease by regulating autophagy through the adenosine monophosphate-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin (AMPK/mTOR) signaling pathway. **Methods** A total of 28 rats were randomly divided into control group, model group, mesalazine group (420 mg/kg), and YYSJP group (100 mg/kg), with 7 rats in each group. The intestinal fibrosis model of Crohn disease was prepared according to the Morris method. The drug group was given enema of 0.5 mL once a day for a

[收稿日期] 2024-09-10

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81904203)。

[通信作者] * 张 丹, 女, 博士, 副主任中医师, 硕士研究生导师, E-mail: danaezhang@163.com。

total of four weeks. The general condition of rats was observed, and the disease activity index (DAI) was calculated; HE staining on colon tissue was performed to evaluate the colonic mucosa damage index (CMDI) and histological lesion score. Masson staining was used to evaluate the fibrosis index; Western blot was applied to measure the protein levels of AMPK, mTOR, ribosomal protein S6 kinase (p70S6K), eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4EBP1), and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3). RT-PCR was employed to measure the mRNA levels of Beclin-1 and sequestosome 1 (P62). **Results** Compared with the control group, the body weight loss percentage in the model group significantly elevated ($P<0.01$), DAI score, CMDI score, histological lesion score, and fibrosis index score all significantly increased ($P<0.01$); LC3 II/LC3I, p-AMPK/AMPK, p-4EBP1/4EBP1, and p-mTOR/mTOR expression levels significantly decreased ($P<0.01$), while p-p70S6K/p70S6K significantly increased ($P<0.01$); Beclin-1 expression level significantly decreased ($P<0.01$), and P62 expression level significantly increased ($P<0.01$). Compared with the model group, the body weight loss percentage of the mesalazine group and YYSJP group both significantly increased ($P<0.01$). DAI score, CMDI score, histological lesion score, and fibrosis index score all significantly decreased ($P<0.01$); the expression levels of LC3 II/LC3I, p-AMPK/AMPK, p-4EBP1/4EBP1, and p-mTOR/mTOR all significantly increased ($P<0.01$), while p-p70S6K/p70S6K significantly decreased ($P<0.01$); Beclin-1 expression level significantly increased ($P<0.05$), and P62 expression level significantly decreased ($P<0.01$). **Conclusion** YYSJP may alleviate intestinal fibrosis in Crohn disease by regulating autophagy through AMPK/mTOR signaling pathway.

[**Keywords**] Crohn disease; intestinal fibrosis; Yangyin Shengji Powder; autophagy; AMPK/mTOR signaling pathway

克罗恩病(Crohn disease, CD)的常见并发症之一是肠纤维化,主要表现为黏膜肌层、固有肌层增厚和增生,反复发作会引起肠狭窄及肠梗阻,严重影响患者的生活质量^[1]。流行病学研究表明,在 CD 确诊 10 年内,超过 50%的患者发展成肠穿孔或肠狭窄,需手术进一步干预,且约 20%的患者需要再次行手术切除^[2]。为避免手术干预或缩小手术时肠道切除的范围,尽早控制肠道纤维化对于 CD 治疗至关重要。生物制剂和免疫抑制剂作为 CD 的推荐方案,疗效往往受该病长期反复发作、慢性进展等疾病特点影响^[3]。因此,CD 肠纤维化的发病机制仍待进一步明确,临床预防和治疗药物亟待研发。

肠纤维化的发生发展主要涉及间充质细胞、细胞因子和肠系膜脂肪细胞等多种细胞类型^[4]。这些细胞网络和信号通路的异常激活,引发细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积,并可能触发细胞自噬^[5]。细胞自噬是维持肠道细胞稳态的关键过程,可以通过降解受损的细胞器和蛋白质(特别是成纤维细胞中的胶原蛋白)来预防纤维化的发展^[6]。此外,自噬在改善与调节性 T 细胞功能相关的疾病中,如炎症性肠病中,发挥了重要作用^[7]。研究表明,激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)上游的丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路可以抑制自噬,而腺苷酸活化蛋白激酶(AMP activated protein kinase, AMPK)和 p53 等信号通路则可以通过负调控 mTOR 激活自噬^[8]。因此,抑制 mTOR 通

路已被认为是控制肠纤维化的潜在治疗策略之一^[9]。故本研究以 AMPK/mTOR 通路作为切入点,探讨自噬与 CD 肠道纤维化之间的关系。

CD 属于中医学“泄泻”范畴,属本虚标实之证,通常以脾虚为本,湿热瘀毒为标^[10]。湿热瘀毒长期蕴结于肠道,引发炎症反应和节段性的透壁性溃疡,最后可能发展为肠纤维化甚至肠狭窄。研究表明,养阴生肌散能够缩小溃疡面积、减小溃疡深度、控制炎症、修复纤维损伤^[11-12],但尚未见其在 CD 肠纤维化研究中报道。本研究以三硝基苯磺酸(3-nitrobenzenesulfonic acid hydrate, TNBS)诱导制备急性肠纤维化模型后,予养阴生肌散灌肠干预,通过观察大鼠体质量、疾病活动指数(disease activity index, DAI)、结肠组织损伤宏观表现及病理形态、结肠组织纤维化程度及自噬水平,探讨养阴生肌散对 CD 肠纤维化的潜在抗纤维化机制。

1 材料

1.1 实验动物与分组

8 周龄 SPF 级 Wistar 大鼠 28 只,雌雄各半,体质量(230±50) g[上海计划生育科学研究所,许可证号:SCXK(沪)2018-0006]。予自由进食、饮水,室温(22±2) °C,相对湿度 55%±5%,光照 12 h 昼夜交替。按照随机数字表法分为对照组、模型组、美沙拉嗪组、养阴生肌散组,每组 7 只。适应性饲养 1 周后开始造模。本研究所有处置均符合南京中医药大学附属医院伦理委员会相关规范与要求(伦理号:2020DW-30-01)。

1.2 药物制备

养阴生肌散由雄黄、甘草、龙胆、青黛、黄柏、牛黄、冰片、生石膏、儿茶、蒲黄、薄荷组成,由江苏省中医院制剂部统一制备提供(苏药制字:Z04000546)。

1.3 主要试剂与仪器

Tris-HCl(1.5 mol/L, pH 8.8)、Tris-HCl(1 mol/L, pH 6.8)(白鲨生物公司,批号:BL516B、BL514B);30%丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠、过硫酸铵、三(羟甲基)氨基甲烷(美国Bio-Rad公司,批号:161-0156、161-0302、161-0700、161-0719);Trizol试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:R1100);美沙拉嗪灌肠液(德国Dr.Falk Pharma GmbH公司,批号:16kS4);微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)、AMPK、mTOR、p-mTOR、真核翻译起始因子4E结合蛋白1(eIF4E-binding protein 1, 4EBP1)、核糖体蛋白S6激酶(p70 ribosomal protein S6 kinase, p70S6K)、肌球蛋白样BCL2结合蛋白(moesin-like BCL2 interacting protein, Beclin-1)、螯合体1(sequestosome-1, p62)(美国Proteintech公司,批号:14600-1-AP、10929-2-AP、66888-1-Ig、67778-1-Ig、83890-5-RR、14485-1-AP、11306-1-AP、18420-1-AP);p-AMPK、p-4EBP1、p-P70S6K(美国Abcam公司,批号:ab133448、ab278686、ab59208)。

恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司,型号:DNP-9022);垂直电泳系统(北京六一生物科技股份有限公司,型号:24DN);凝胶成像仪(上海勤翔科学仪器有限公司,型号:3200-97001);酶标仪(深圳市雷杜生命科学股份有限公司,型号:RT-6000);台式高速冰冻离心机[大龙兴创实验仪器(北京)股份有限公司,型号:LR5K001727];恒温金属浴(上海一恒科学仪器有限公司,型号:TU-100);紫外分光光度计(美国Thermo Fisher Scientific公司,型号:SMA2000);RT-PCR试剂盒[翌圣生物科技(上海)股份有限公司,型号:11201ES03];PCR仪(德国Eppendorf公司,型号:6311000070);qPCR荧光定量系统(杭州博日科技股份有限公司,型号:FQD-96A)。

2 方法

2.1 模型制备和干预

参照Morris方法制备CD肠纤维化模型^[13]。造模前24 h禁食、自由饮水。将大鼠称重后,以3%戊

巴比妥钠(50 mg/kg 体质量)麻醉大鼠,灌肠器插入肛门6~9 cm,灌入TNBS+50%乙醇混合液0.5 mL,倒置大鼠全身1 min后平卧,待其自然清醒,放回笼中。灌肠共6次,每周1次,前3周分别以15、30、45 mg灌肠,后3周以60 mg维持。造模大鼠体质量明显下降,出现稀便及血便症状提示造模成功^[13]。造模成功后,对照组、模型组每日给予蒸馏水0.5 mL灌肠。美沙拉嗪组按420 mg/(kg·d)灌肠给药、养阴生肌散组按100 mg/(kg·d)灌肠给药^[14],总体积均为0.5 mL,共干预4周。

2.2 取材

所有干预结束后,以3%的戊巴比妥钠(100 mg/kg)麻醉,脱椎处死大鼠,迅速分离结肠组织标本,观察大鼠结肠组织的大体表现,剪取病损明显的两段结肠,一段置于-80℃冰箱中保存待用,另一段于多聚甲醛溶液中固定后,常规石蜡包埋、切片。

2.3 一般情况与疾病活动指数

观察大鼠造模后体质量、粪便黏稠度、粪便潜血,计算DAI评分^[15]。DAI=(体质量下降百分率分数+粪便性状分数+便血分数)/3。DAI评分共有3个条目,包括体质量下降百分率、大便黏稠度、便血,每个条目计0~4分。0分为无症状,4分为症状程度最高,评分越高代表炎症活动度越高。

2.4 HE染色观察结肠组织损伤及病理形态改变

参照结肠黏膜损伤指数(colonic mucosa damage index, CMDI)^[16]评分标准进行结肠组织损伤评分,将固定在多聚甲醛中的结肠组织梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后,行结肠石蜡切片和HE染色。显微镜下观察各组大鼠结肠组织病理形态,并进行组织学病变评分^[17]。CMDI评分共有3个条目,包括腹泻(0~1分)、溃疡(0~10分)、组织粘连(0~2分),评分越高代表结肠损伤程度越重。组织学病变评分参数包括炎症程度(0~3分)、损伤程度(0~3分)、隐窝损伤(0~4分),评分越高代表病理形态改变程度越重。

2.5 Masson染色检测结肠组织纤维化水平

将固定在多聚甲醛中的结肠组织进行石蜡包埋、切片、脱蜡和Masson染色。显微镜下观察各组大鼠结肠组织纤维化程度,并进行纤维化指数评分^[18]。纤维化指数评分按照胶原蛋白沉积部位和范围计分(0~4分),评分越高说明纤维化程度越高。

2.6 Western blot 检测结肠组织蛋白的表达

用 RIPA 裂解液提取结肠组织总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,每次电泳取 20 μg 上样,电泳分离蛋白,半干法电转膜,脱脂奶粉封闭。分别加入以 1:1 000 比例稀释的一抗 (AMPK、p-AMPK、m-TOR、p-mTOR、4EBP1、p-4EBP1、p70S6K、p-p70S6K、LC3),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBST 洗涤条带 3 次,每次 4 min,加入二抗,室温孵育 1 h。PBST 洗涤 3 次,每次 4 min,加入适量 ECL,置入 PVDF 膜上,曝光显影拍照。使用 Image J 软件对条带灰度值进行分析,计算相对表达量。

2.7 RT-PCR 检测结肠组织 mRNA 的表达

采用 TRizol 试剂盒提取结肠组织总 RNA,使用紫外分光光度计检测总 RNA 的浓度和纯度,用 RT-PCR 试剂盒逆转录反应合成 cDNA,进行 qPCR 扩增,以 GAPDH 作为内参,根据 GeneBank 中所列基因序列,由 Invitrogen 公司设计并合成基因的引物。引物序列如下:Beclin-1 正向 5'-ATGGAGGGGTC-TAAGGCGTC-3'、反向 5'-TCCTCTCCTGAGTTAGC-CTCT-3';P62 正向 5'-G GCACCGGAGGG TTTAA-TTTT-3'、反向 5'-GC AGGTGTTGTTCCAAAGTTG-3';GAPDH 正向 5'-ACTCCACTCACGGCAAATTCAA-3'、反向 5'-ACATACTCAGCACCGGCCTCAC-3'。反应条件:预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;变性和延伸 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,共 40 个循环。 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算基因的相对表达量。采用 SYBR 法于实时定量 PCR 仪上进行 PCR 反应,每份样品均进行 3 个复孔测定,通过分析软件得到样品阈值循环数。

2.8 统计学分析

使用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计学分析。计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,两组间采用配对样本 t 检验分析,多组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行作图。

3 结果

3.1 养阴生肌散对 CD 肠纤维化大鼠一般情况及 DAI 的影响

与对照组比较,模型组大鼠体质量下降百分率分数显著上升($P<0.01$),DAI 评分显著增加($P<0.01$)。与模型组比较,美沙拉嗪组和养阴生肌散组大鼠体质量下降百分率分数和 DAI 评分均显著下降($P<0.01$)。详见图 1。

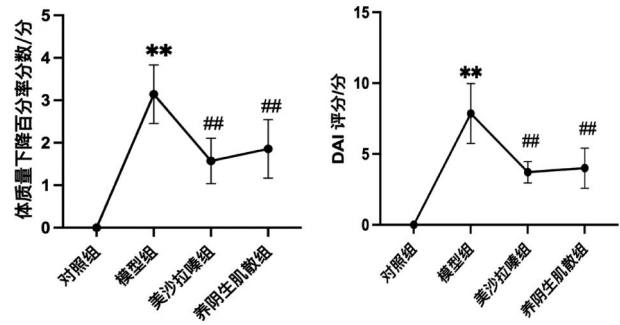


图 1 各组大鼠体质量下降百分率分数、DAI 评分比较

Fig.1 Comparison of the scores of body weight loss percentage and DAI scores among different groups of rats
注:与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

3.2 养阴生肌散对 CD 肠纤维化大鼠结肠组织损伤以及组织病理形态的影响

与对照组比较,模型组肠壁上皮层结构破坏,隐窝丢失,黏膜层轻度水肿,杯状细胞减少,大量炎症细胞浸润,且累及黏膜下层,黏膜下层和肌层成纤维细胞堆积,纤维结缔组织增生,肌层略有增厚。与模型组比较,美沙拉嗪组和养阴生肌散组肠壁上皮结构较完整,隐窝排列整齐,黏膜层水肿缓解,炎症细胞减少,黏膜下层和肌层纤维组织减少,增厚不明显。详见图 2。

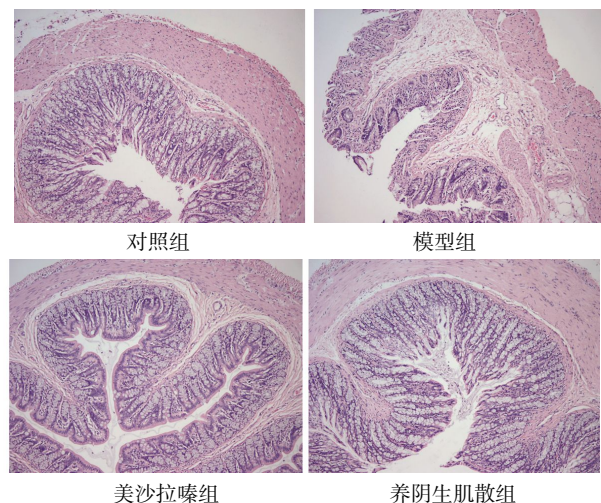


图 2 各组大鼠结肠组织 HE 染色图($\times 200$)

Fig.2 HE staining images of colon tissue of rats in each group ($\times 200$)

与对照组比较,模型组的 CMDI 评分、组织学病变评分均显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,养阴生肌散组和美沙拉嗪组 CMDI 评分、组织学病变评分均显著降低($P<0.01$)。详见图 3。

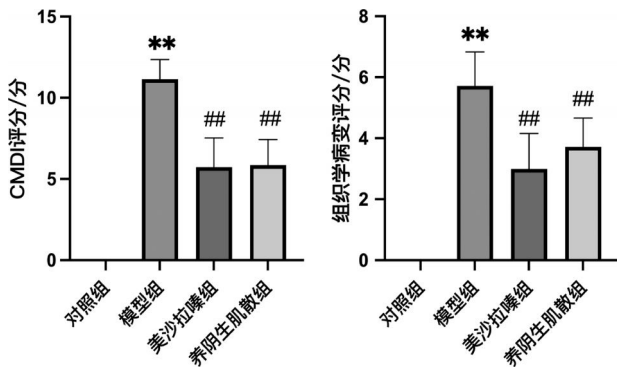


图3 各组大鼠结肠 CMDI 评分及组织学病变评分比较

Fig.3 Comparison of CMDI scores and histological lesion scores in the colon among different groups
注:与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

3.3 养阴生肌散对 CD 肠纤维化大鼠结肠组织纤维化程度的影响

对照组大鼠结肠组织呈现出均匀的蓝染,其中肌肉纤维和血管等结构清晰可见,无明显的纤维化病变。与对照组比较,模型组大鼠黏膜层、黏膜下层和部分肌层弥漫性蓝染,纤维原性胶原沉积较多,组织结构轻度改变,肠道慢性炎症伴随纤维化形成。与模型组比较,美沙拉嗪组与养阴生肌散组胶原蛋白沉积范围缩减,纤维化表达降低,组织间分界较清晰。详见图4。

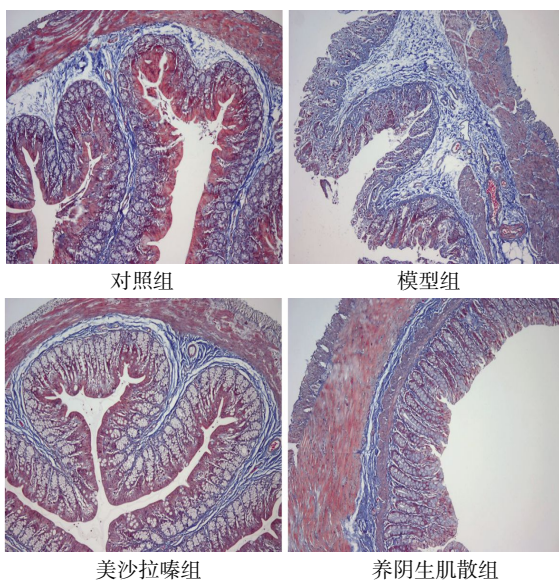


图4 各组大鼠结肠组织 Masson 染色图($\times 200$)

Fig.4 Masson staining images of colon tissue of rats in each group ($\times 200$)

与对照组比较,模型组大鼠的纤维化评分显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,美沙拉嗪组与养阴生肌散组纤维化评分均显著降低($P<0.01$)。详见图5。

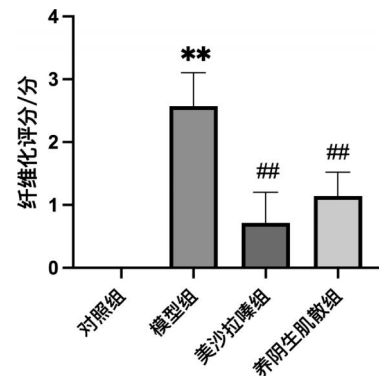


图5 各组大鼠纤维化评分比较

Fig.5 Comparison of fibrosis scores among different groups
注:与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

3.4 养阴生肌散对 CD 肠纤维化大鼠结肠组织 LC3、AMPK/mTOR 调控通路相关分子表达量的影响

与对照组比较,模型组 LC3 II/LC3I、p-AMPK/AMPK、p-mTOR/mTOR、p-4EBP1/4EBP1 表达量均显著降低($P<0.01$),p-p70S6K/p70S6K 表达量显著增高($P<0.01$)。与模型组比较,美沙拉嗪组和养阴生肌散组 LC3 II/LC3I、p-AMPK/AMPK、p-mTOR/mTOR、p-4EBP1/4EBP1 表达量均显著升高($P<0.01$),p-p70S6K/p70S6K 表达量显著降低($P<0.01$)。详见图6。

3.5 养阴生肌散对 CD 肠纤维化大鼠结肠组织自噬相关分子水平的影响

与对照组比较,模型组 Beclin-1 mRNA 表达量下降($P<0.01$),P62 mRNA 表达量显著增加($P<0.01$)。与模型组比较,美沙拉嗪组和养阴生肌散组 Beclin-1 mRNA 表达量增加($P<0.05$),P62 mRNA 表达量显著降低($P<0.01$)。详见图7。

4 讨论

随着全球CD发病率的持续升高^[19],肠纤维化已成为CD并发症治疗的一大挑战。长期纤维化常导致肠道狭窄和肠梗阻,给患者带来沉重的身心和经济负担^[20]。中医学理论认为,湿热瘀毒是肠纤维化的核心病机,治疗当以清热利湿、解毒祛瘀为主要原则^[21-22]。养阴生肌散作为外用散剂,其治疗口疮疗效显著,由江苏省中医院对其化裁改良后,该方剂被用

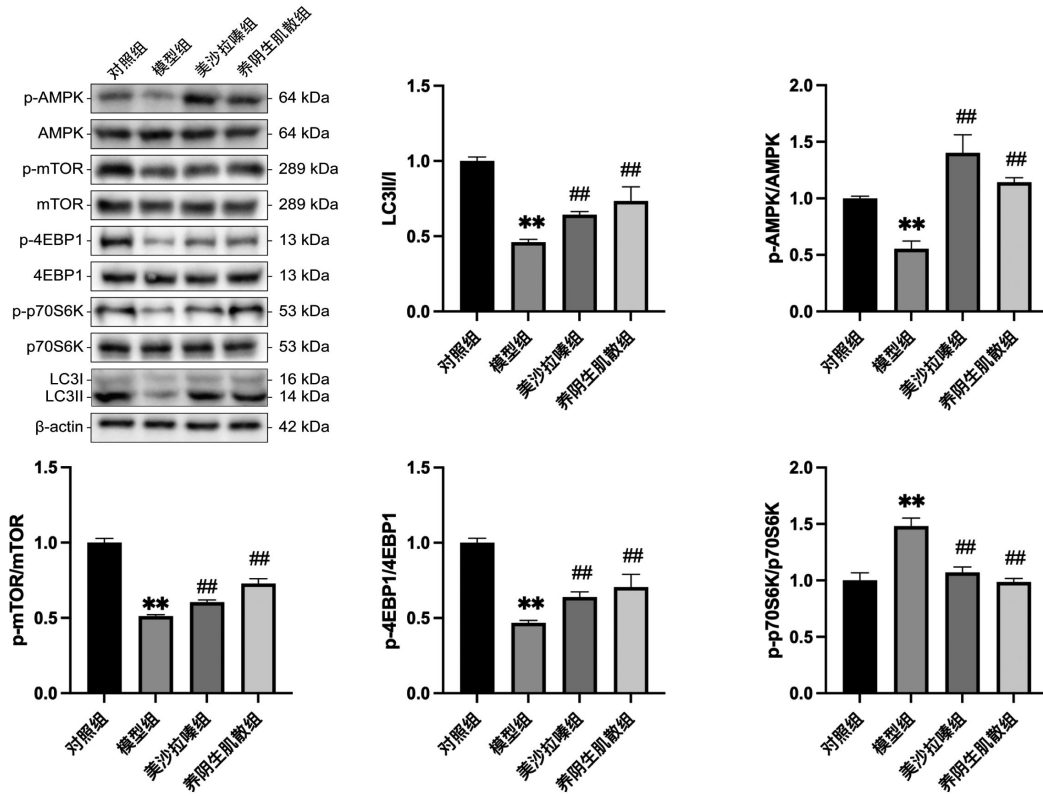


图 6 各组大鼠结肠组织中 AMPK/mTOR 信号通路相关蛋白表达量比较

Fig.6 Comparison of protein expression levels related to AMPK/mTOR signaling pathway in colon tissue among different groups of rats

注:与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.01$ 。

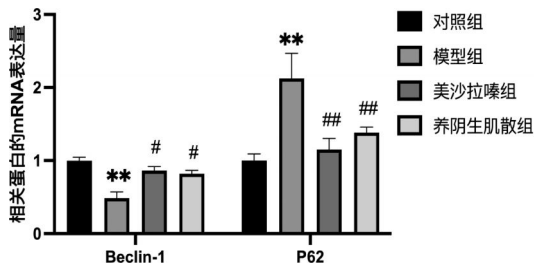


图 7 各组大鼠结肠组织 Beclin-1、P62 的 mRNA 表达量比较

Fig.7 Comparison of mRNA expression levels of Beclin-1 and P62 in colon tissue among different groups of rats

注:与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

于 CD 患者的基础治疗中, 疗效显著^[23]。

肠纤维化被认为是慢性炎症不断刺激肠道黏膜, 造成 ECM 过度沉积的结果^[24]。目前, 肠纤维化防治策略多侧重于抑制炎症。虽然炎症会引发纤维化, 但有研究表明, 纤维化过程可独立进行并自我维持^[25]。研究显示, 自噬及其相关通路通过调节细胞内的代谢平衡, 影响 ECM 的合成和降解, 进而决定纤维化的程度^[26]。因此, 自噬、ECM 和纤维化之间存

在着复杂的相互调控关系, 为干预肠纤维化提供了潜在的治疗途径^[27]。肠纤维化小鼠模型中, 自噬抑制会加重纤维化程度, 而自噬激活会阻止纤维化进程^[6]。以上表明, 调控自噬可能是改善 CD 肠纤维化程度的机制之一。

AMPK/mTOR 信号通路是自噬调控的经典途径之一。通常情况下, 磷酸化的 mTOR 抑制自噬, 而 AMPK 通过去磷酸化 mTOR 促进自噬, 从而调节细胞增殖和代谢^[8]。AMPK 还可通过直接磷酸化 UNC-51 样自噬激活激酶 1 启动自噬^[28], 为自噬发生的重要起点。AMPK/mTOR 通路在自噬的调控中起关键作用, 表明其是治疗纤维化疾病的潜在靶点。磷酸化的 4EBP1 被视为 mTOR 信号转导的一个重要标志物^[29], 研究发现, 氯硝柳胺乙醇胺盐通过 mTOR/4EBP1 信号通路促进自噬, 并抑制上皮-间充质转化和 ECM 积累^[30]。此外, p70S6K 是 mTOR 的主要下游靶点, 在调节纤维化和抑制自噬中起关键作用。ZHENG 等^[31]研究表明, 利拉鲁肽能抑制心肌细胞 mTOR/p70S6K 信号, 显著增强自噬活性, 从而有效

抑制心肌纤维化。在自噬过程中,LC3I 可通过类泛素样反应转化为 LC3 II,后者结合于自噬体膜上,参与调控自噬体的成熟和降解。因此,LC3 II/LC3I 比值被称为自噬活性的“指示器”^[32]。P62 通过自噬降解,当自噬受到抑制时,P62 会在细胞内积累,这一现象常被视为自噬受阻的标志^[33]。Beclin-1 参与自噬的起始阶段,蛋白表达水平在自噬后上调^[34]。二甲双胍通过上调 Beclin-1 和 LC3 II 的表达,调控 AMPK/mTOR 信号通路,从而增强自噬活性,缓解二氧化硅诱导的肺纤维化^[35]。这提示 AMPK/mTOR 信号通路在其他类型纤维化(如肝纤维化和肠纤维化)中的应用潜力。

本研究结果显示,与模型组相比,养阴生肌散组的 DAI 评分显著降低,结肠组织损伤及病理形态得到明显改善,LC3 II/LC3I、AMPK、4EBP1 磷酸化水平显著升高,p70S6K 磷酸化水平显著降低,Beclin-1 表达量升高以及 P62 表达量下降。这些变化提示养阴生肌散在减轻肠纤维化方面具有显著疗效,其具体的作用机制可能是通过激活 AMPK/mTOR 信号通路及其下游分子,增强自噬活性,从而发挥其抗肠纤维化的作用。

在生理状态下,自噬诱导和 mTOR 激活之间存在紧密的反向偶联^[36]。本研究探索养阴生肌散通过抑制 mTOR 通路从而促进自噬改善肠纤维化,而 mTOR 磷酸化水平升高,与预期不符。mTOR 蛋白有多个可以进行磷酸化的残基,其磷酸化具有复杂性,mTOR 检测靶点的磷酸化不一定反映 mTOR 激酶活性的增加,也不应作为 mTOR 激活的衡量标准。有研究认为,mTOR 的调节和功能在很大程度上取决于 mTOR 对接或相关的蛋白^[37]。因此,本研究对 mTOR 活化的分析可侧重于下游蛋白和效应蛋白,如 p70S6K 和 4EBP1。研究结果发现,4EBP1 磷酸化水平显著升高,p70S6K 磷酸化水平显著降低,自噬水平上调,结果符合预期。

综上所述,本研究表明养阴生肌散能够有效改善 CD 肠纤维化,其可能通过 AMPK/mTOR 通路激活自噬,从而抑制肠道成纤维细胞的合成,为防治 CD 肠道纤维化提供了思路。本研究尚存在一定的局限性,例如样本量较少等。此外,本研究尚未进行

临床试验验证,限制了其临床应用的推广。未来的研究应开展大样本、多中心、双盲实验,检验养阴生肌散在 CD 肠纤维化治疗中的疗效与安全性。

参考文献

- [1] LIN S N, MAO R, QIAN C C, et al. Development of antifibrotic therapy for stricturing Crohn's disease: Lessons from randomized trials in other fibrotic diseases[J]. *Physiological Reviews*, 2022, 102(2): 605-652.
- [2] ARATARI A, SCRIBANO M L, PUGLIESE D, et al. Crohn's disease after surgery: Changes in post-operative management strategies over time and their impact on long-term re-operation rate—a retrospective multicentre real-world study[J]. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2024, 59(12): 1579-1588.
- [3] FREDERICKS E. Treatment withdrawal in Crohn's disease: Slowly becoming clearer[J]. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 2023, 8(3): 200-201.
- [4] WANG J, LIN S N, BROWN J M, et al. Novel mechanisms and clinical trial endpoints in intestinal fibrosis[J]. *Immunological Reviews*, 2021, 302(1): 211-227.
- [5] D'ALESSIO S, UNGARO F, NOVIELLO D, et al. Revisiting fibrosis in inflammatory bowel disease: The gut thickens[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2022, 19(3): 169-184.
- [6] COSIN-ROGER J, CANET F, MACIAS-CEJA D C, et al. Autophagy stimulation as a potential strategy against intestinal fibrosis[J]. *Cells*, 2019, 8(9): 1078.
- [7] KABAT A M, HARRISON O J, RIFFELMACHER T, et al. The autophagy gene Atg16l1 differentially regulates Treg and TH2 cells to control intestinal inflammation[J]. *eLife*, 2016, 5: e12444.
- [8] KIM J, KUNDU M, VIOLLET B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1[J]. *Nature Cell Biology*, 2011, 13(2): 132-141.
- [9] ZHAO J, DONG J N, WANG H G, et al. Docosahexaenoic acid attenuated experimental chronic colitis in interleukin 10-deficient mice by enhancing autophagy through inhibition of the mTOR pathway[J]. *JPEN Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 2017, 41(5): 824-829.
- [10] 罗 墨, 宾东华, 王爱华. 王爱华教授辨治克罗恩病经验[J]. *亚太传统医药*, 2021, 17(5): 101-103.
- [11] 胡永寿, 李喜香, 刘军刚. 养阴生肌散(膜)局部治疗复发性口腔溃疡的系统评价[J]. *实用口腔医学杂志*, 2019, 35(1): 66-70.
- [12] 刘晓梅, 韶建生, 戴广益. 养阴生肌散加蛋黄油对促进肛裂术后大鼠模型创面愈合的研究[J]. *中医外治杂志*, 2021, 30(3): 6-7.
- [13] MORRIS G P, BECK P L, HERRIDGE M S, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon[J]. *Gastroenterology*, 1989, 96(3): 795-803.

- [14] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, (9): 1069-1072.
- [15] COOPER H S, MURTHY S N, SHAH R S, et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis[J]. *Laboratory Investigation*, 1993, 69(2): 238-249.
- [16] BUTZNER J D, PARMAR R, BELL C J, et al. Butyrate Enema therapy stimulates mucosal repair in experimental colitis in the rat[J]. *Gut*, 1996, 38(4): 568-573.
- [17] MA Y B, GUAN Q D, BAI A P, et al. Targeting TGF- β 1 by employing a vaccine ameliorates fibrosis in a mouse model of chronic colitis[J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2010, 16(6): 1040-1050.
- [18] 王怡如, 蒋笑影, 董若曦, 等. 三硝基苯磺酸诱导急性肠纤维化大鼠模型的改良方法[J]. *实验动物与比较医学*, 2022, 42(4): 284-293.
- [19] NG S C, SHI H Y, HAMIDI N, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: A systematic review of population-based studies[J]. *The Lancet*, 2018, 390(10114): 2769-2778.
- [20] D'HAENS G, RIEDER F, FEAGAN B G, et al. Challenges in the pathophysiology, diagnosis, and management of intestinal fibrosis in inflammatory bowel disease[J]. *Gastroenterology*, 2022, 162(1): 26-31.
- [21] 崔成成, 叶 柏. 叶柏教授治疗克罗恩病经验[J]. *长春中医药大学学报*, 2016, 32(5): 938-940.
- [22] 卢 一, 葛畅畅, 沈 洪, 等. 基于数据挖掘的沈洪教授治疗湿瘀互结型克罗恩病核心处方分析及临床疗效研究[J]. *南京中医药大学学报*, 2024, 40(7): 740-746.
- [23] 刘晓梅, 谷云飞. 养阴生肌散联合蛋黄油在肛裂术后的应用及疗效观察[J]. *临床医药文献电子杂志*, 2016, 3(14): 2882-2883.
- [24] RIEDER F, MUKHERJEE P K, MASSEY W J, et al. Fibrosis in IBD: From pathogenesis to therapeutic targets[J]. *Gut*, 2024, 73(5): 854-866.
- [25] RIEDER F, BETTENWORTH D, IMAI J, et al. Intestinal fibrosis and liver fibrosis: Consequences of chronic inflammation or independent pathophysiology?[J]. *Inflammatory Intestinal Diseases*, 2016, 1(1): 41-49.
- [26] ZHAO X J, YANG W J, YU T M, et al. Th17 cell-derived amphiregulin promotes colitis-associated intestinal fibrosis through activation of mTOR and MEK in intestinal myofibroblasts[J]. *Gastroenterology*, 2023, 164(1): 89-102.
- [27] MIGNEAULT F, HÉBERT M J. Autophagy, tissue repair, and fibrosis: A delicate balance[J]. *Matrix Biology*, 2021, 100: 182-196.
- [28] SUN D D, TAO W W, ZHANG F, et al. Trifolirhizin induces autophagy-dependent apoptosis in colon cancer via AMPK/mTOR signaling[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2020, 5(1): 174.
- [29] QIN X Y, JIANG B, ZHANG Y J. 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein[J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(6): 781-786.
- [30] PEI X L, ZHENG F X, LI Y, et al. Niclosamide ethanolamine salt alleviates idiopathic pulmonary fibrosis by modulating the PI3K-mTORC1 pathway[J]. *Cells*, 2022, 11(3): 346.
- [31] ZHENG R H, ZHANG W W, JI Y N, et al. Exogenous supplement of glucagon like peptide-1 protects the heart against aortic banding induced myocardial fibrosis and dysfunction through inhibiting mTOR/p70S6K signaling and promoting autophagy[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2020, 883: 173318.
- [32] TANIDA I, UENO T, KOMINAMI E. LC3 and autophagy[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2008, 445: 77-88.
- [33] ZHANG X W, ZHOU J C, PENG D, et al. Disrupting the TRIB3-SQSTM1 interaction reduces liver fibrosis by restoring autophagy and suppressing exosome-mediated HSC activation[J]. *Autophagy*, 2020, 16(5): 782-796.
- [34] KIM S, CHO H, HONG S O, et al. LC3B upregulation by NANOG promotes immune resistance and stem-like property through hyperactivation of EGFR signaling in immune-refractory tumor cells[J]. *Autophagy*, 2021, 17(8): 1978-1997.
- [35] LI N, LIN Z, ZHOU Q, et al. Metformin alleviates crystalline silica-induced pulmonary fibrosis by remodeling endothelial cells to mesenchymal transition via autophagy signaling[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 245: 114100.
- [36] SHIMOBAYASHI M, HALL M N. Making new contacts: The mTOR network in metabolism and signalling crosstalk[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, 15(3): 155-162.
- [37] FIGUEIREDO V C, MARKWORTH J F, CAMERON-SMITH D. Considerations on mTOR regulation at serine 2448: Implications for muscle metabolism studies[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2017, 74(14): 2537-2545.

(本文编辑 周 旦)