

·实验研究·

本文引用: 符 佳, 张 伟, 周赛男, 徐 寅, 朱 莹. 苦参苓黛汤灌肠对溃疡性结肠炎大鼠 Cajal 间质细胞自噬的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(11): 2026–2034.

苦参苓黛汤灌肠对溃疡性结肠炎大鼠 Cajal 间质细胞自噬的影响

符 佳, 张 伟, 周赛男, 徐 寅*, 朱 莹*

湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

〔摘要〕 目的 探讨苦参苓黛汤灌肠对溃疡性结肠炎(UC)大鼠结肠 Cajal 间质细胞(ICC)自噬的影响及其作用机制。方法 将 40 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为空白对照组(10 只)和实验组(30 只)。实验组采用 5% 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)(100 mg/kg)联合 50%乙醇灌肠构建急性 UC 模型,造模成功后随机分为模型组、苦参苓黛汤组、美沙拉嗪组,每组 10 只。空白对照组和模型组给予等体积生理盐水灌肠,苦参苓黛汤组以 10.28 g/(kg·d)生药量灌肠,美沙拉嗪组以 0.41 g/(kg·d)灌肠,每天 1 次,连续干预 14 d。记录各组大鼠体重及疾病活动指数(DAI);观察结肠宏观损伤并计算结肠黏膜损伤指数(CMDI);HE 染色评估结肠组织病理变化;ELISA 检测血清白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-1 β 、IL-10 水平;免疫荧光检测结肠组织 c-kit 与自噬相关蛋白 Beclin-1 共定位情况;Western blot 检测结肠组织微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)-II/LC3-I 比值及 Beclin-1、p62 蛋白表达;透射电镜观察 ICC 超微结构及自噬小体数量。结果 与空白对照组比较,模型组大鼠体重降低($P<0.01$),DAI 及 CMDI 评分升高($P<0.01$);大鼠肠绒毛显著受损且伴有肿胀,固有层及黏膜下层有大量中性粒细胞浸润,水肿明显,黏膜层、黏膜下层结构紊乱;血清 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平升高($P<0.01$),IL-10 水平降低($P<0.01$);结肠组织 c-kit 与 Beclin-1 共表达比例、LC3-II/LC3-I 比值及 Beclin-1 蛋白表达上调($P<0.01$),p62 蛋白表达下调($P<0.01$);ICC 内自噬小体数量增多,细胞器损伤明显。与模型组比较,苦参苓黛汤组和美沙拉嗪组大鼠体重增加($P<0.01$),DAI、CMDI 评分降低($P<0.05$, $P<0.01$);大鼠肠绒毛损伤均有改善,黏膜下层和固有层中性粒细胞浸润减少,水肿减轻,黏膜层、黏膜下层结构清晰度提高;血清 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平降低($P<0.01$),IL-10 水平升高($P<0.01$);结肠组织 c-kit 与 Beclin-1 共表达比例、LC3-II/LC3-I 比值及 Beclin-1 蛋白表达下调($P<0.01$),p62 蛋白表达上调($P<0.01$);ICC 内自噬小体数量减少,细胞器损伤减轻。与苦参苓黛汤组比较,美沙拉嗪组大鼠体重增加($P<0.01$),DAI、CMDI 评分降低($P<0.05$, $P<0.01$);大鼠肠绒毛损伤均有改善,黏膜下层和固有层中性粒细胞浸润减少,水肿减轻,黏膜层、黏膜下层结构清晰度提高;血清 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平降低($P<0.01$),IL-10 水平升高($P<0.01$);结肠组织 c-kit 与 Beclin-1 共表达比例、LC3-II/LC3-I 比值及 Beclin-1 蛋白表达下调($P<0.01$),p62 蛋白表达上调($P<0.01$);ICC 内细胞器损伤减轻。结论 苦参苓黛汤灌肠可有效改善 UC 大鼠肠道炎症,其机制可能与抑制 ICC 过度自噬、调节自噬相关蛋白表达有关。

〔关键词〕 溃疡性结肠炎;苦参苓黛汤;灌肠;Cajal 间质细胞;自噬

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.11.002

Effects of Kushen Qindai Decoction enema on autophagy of interstitial cells of Cajal in rats with ulcerative colitis

FU Jia, ZHANG Wei, ZHOU Sainan, XU Yin*, ZHU Ying*

〔收稿日期〕 2025-08-07

〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(82374426, 81874466);全国名老中医药专家传承工作室建设项目(国中医药人教函[2022]75 号);湖南中医药大学中医国内一流建设学科项目;湖南省中医药科研课题(B2023079);湖南中医药大学校院联合基金项目(2023XYLH032);国家中医药管理局中医治疗优势病种(临床循证能力提升)项目(czxm-kyb-2025001)。

〔通信作者〕 * 朱 莹, 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, E-mail: zhuying089@126.com; 徐 寅, 男, 硕士, 副教授, 硕士研究生导师, E-mail: 673018872@qq.com。

The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Kushen Qindai Decoction (KSQDD) enema on autophagy of colonic interstitial cells of Cajal (ICC) in rats with ulcerative colitis (UC) and its mechanism of action. **Methods** Forty SPF-grade male SD rats were randomly divided into blank control group ($n=10$) and experimental group ($n=30$). The experimental group received enema administration of 5% 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) (100 mg/kg) combined with 50% ethanol to establish an acute UC model. After successful modeling, the experimental group was randomly subdivided into model group, KSQDD group and mesalazine group, with ten rats in each group. The blank control and model groups received enema with an equal volume of normal saline. The KSQDD group received KSQDD enema at a dose of 10.28 g/(kg·d) (crude drug concentration), while the mesalazine group received 0.41 g/(kg·d) enema, once daily for 14 consecutive days. Body weight and disease activity index (DAI) of rats in each group were recorded. Colonic macroscopic damage was observed and colonic mucosal damage index (CMDI) was calculated. Histopathological changes in the colon were assessed by Hematoxylin-eosin (HE) staining. Serum levels of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-1 β , and IL-10 were determined by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Immunofluorescence was used to check the co-localization of c-kit and the autophagy-related protein Beclin-1 in colonic tissue. Western blot was used to measure the microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)-II/LC3-I ratio and the protein expressions of Beclin-1 and p62 in colonic tissue. Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the ultrastructure of ICC and the number of autophagosomes. **Results** Compared with the blank control group, the model group showed reduced body weight ($P<0.01$), elevated DAI and CMDI scores ($P<0.01$), significant damage and swelling of the intestinal villi, massive infiltration of neutrophils in the lamina propria and submucosa, obvious edema, and disordered structure of the mucosal layer and submucosa. Serum levels of IL-6, TNF- α , and IL-1 β increased ($P<0.01$), while IL-10 level decreased ($P<0.01$). The co-expression ratio of c-kit and Beclin-1, the LC3-II/LC3-I ratio, and Beclin-1 protein expression in colonic tissue were up-regulated, while p62 protein expression was down-regulated ($P<0.01$). The number of autophagosomes in ICC increased, with obvious organelle damage. Compared with the model group, both the KSQDD and mesalazine groups showed increased body weight ($P<0.01$), decreased DAI and CMDI scores ($P<0.05$ or $P<0.01$), improved intestinal villi damage, reduced neutrophil infiltration in the submucosa and lamina propria, alleviated edema, and improved structural clarity of the mucosal layer and submucosa. Serum levels of IL-6, TNF- α , and IL-1 β decreased ($P<0.01$), while IL-10 level increased ($P<0.01$). The co-expression ratio of c-kit and Beclin-1, the LC3-II/LC3-I ratio, and Beclin-1 protein expression in colonic tissue were down-regulated ($P<0.01$), while p62 protein expression was up-regulated ($P<0.01$). The number of autophagosomes in ICC decreased, and organelle damage was alleviated. Compared with the KSQDD group, the mesalazine group demonstrated increased body weight ($P<0.01$), decreased DAI and CMDI scores ($P<0.05$, $P<0.01$), improved intestinal villi damage, reduced neutrophil infiltration in the submucosa and lamina propria, alleviated edema, and improved structural clarity of the mucosal layer and submucosa. Serum levels of IL-6, TNF- α , and IL-1 β decreased ($P<0.01$), while IL-10 level increased ($P<0.01$). The co-expression ratio of c-kit/Beclin-1, the LC3-II/LC3-I ratio, and Beclin-1 protein expression in colonic tissue were down-regulated ($P<0.01$), while p62 protein expression was up-regulated ($P<0.01$). Organelle damage in ICC was reduced. **Conclusion** KSQDD enema can effectively alleviate intestinal inflammation in UC rats, and its mechanism may be related to inhibiting excessive autophagy of ICC and regulating the expression of autophagy-related proteins.

[Keywords] ulcerative colitis; Kushen Qindai Decoction; enema; interstitial cells of Cajal; autophagy

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种慢性非特异性肠道炎症性疾病,以结肠黏膜连续性、弥漫性炎症和溃疡形成为特征,临床表现为反复腹痛、腹泻及血便^[1]。近年来,UC在中国的发病率为0.54/

10万~2.22/10万,且呈显著上升趋势,其病程迁延、易复发的特点不仅严重影响患者的生活质量,更给家庭和社会带来沉重负担^[2-3]。目前,该病发病机制尚未完全明确,普遍认为其与遗传易感性、免疫功能

失调、肠道屏障损伤及肠道微生态失衡等多因素交互作用密切相关^[4]。临床常用治疗药物包括氨基水杨酸制剂、糖皮质激素及生物制剂等,虽能暂时缓解症状,但存在疗效个体差异大、长期应用易产生耐药性及不良反应明显等问题^[5]。因此,探究安全有效的替代治疗方案已成为研究热点。

Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)是肠道动力系统的关键起搏细胞,通过产生慢波电位调控肠道平滑肌节律性收缩,是维持正常肠道运动功能的关键结构基础^[6]。多项研究发现,在 UC 结肠组织中 ICC 数量显著减少且网络结构破坏,其功能损伤与 UC 特征性的肠道动力障碍(如腹泻、腹胀)直接相关,可通过“促炎因子过度激活-ICC 损伤-动力紊乱”的恶性循环,进一步加剧肠道炎症的迁延与恶化^[7-9]。自噬作为细胞内重要的稳态维持机制,通过清除受损细胞器和异常蛋白参与炎症调控^[10]。病理状态下,肠道氧化应激及炎症因子可异常激活 ICC 自噬,导致其过度降解和功能衰竭,形成“自噬-炎症循环”,成为 UC 肠道病变进展的重要环节^[10]。综上,ICC 是连接 UC 肠道动力异常与炎症反应的重要枢纽细胞,其自噬状态直接影响 UC 的病理进程。因此,以 ICC 为研究对象、靶向调控其自噬水平,能深入揭示 UC 的发病机制,可为优化 UC 治疗策略提供新方向^[11]。

苦参苓藁汤是基于中医学“湿热致病”理论创立的经验方剂,由苦参、黄芩、秦皮、青黛、儿茶、地榆炭、败酱草组成,具有清热燥湿、解毒敛疮之效,临床常将其用于 UC 灌肠治疗。然而,苦参苓藁汤能否调节 ICC 自噬并改善炎症,尚未明确。本研究旨在建立 2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)诱导的 UC 大鼠模型,结合灌肠给药方式,探讨苦参苓藁汤对结肠 ICC 自噬水平及炎症的影响,为阐明该方清热燥湿、解毒敛疮的中医机制提供实验依据,并为 UC 的治疗开拓新视角。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只,6~8 周龄,体质量(200±20) g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司

提供,动物许可证号:SYXK(湘)2019-0009。饲养环境温度 20~25 ℃,湿度 50%~70%,12 h 光照、黑暗循环。实验开始前适应性分笼喂养 7 d,自由摄食饮水,定期更换垫料。本研究实验已通过湖南中医药大学伦理委员会审核(伦理批号:LL2023081004)。

1.2 药物、试剂与仪器

1.2.1 药物 苦参苓藁汤组成:苦参 15 g,黄芩 15 g,秦皮 15 g,地榆炭 15 g,败酱草 30 g,青黛(分冲)5 g,儿茶(包煎)5 g。所用药材均由湖南中医药大学第一附属医院中药房提供并鉴定。水煎煮 2 次(首次加水 10 倍量,第二次加水 8 倍量),合并滤液,采用旋转蒸发仪将药液浓缩,4 ℃保存,使用前复温。阳性对照药物:美沙拉嗪灌肠液(瑞士 Vifor AG Zweigniederlassung Medichemie Ettingen 公司,规格:60 g:4 g,批号:230171A)。

1.2.2 主要试剂 TNBS(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号:SLBT1657);异氟烷(深圳瑞沃德生命科技有限公司,批号:2023090502);大鼠白细胞介素(interleukin, IL)-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-1 β 、IL-10 ELISA 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号:E-EL-R0015、E-EL-R2856、E-EL-R0012、E-EL-R0016);c-kit(一种受体酪氨酸激酶,也称为 CD117)抗体(武汉 ABclonal 生物科技股份有限公司,批号:ab115801);微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)抗体、p62 抗体(上海Abways 生物科技股份有限公司,批号:F154202、H651206025);自噬相关蛋白 Beclin-1 抗体、GAPDH 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:11306-1-AP、60004-1-Ig)。

1.2.3 主要仪器 多功能酶标分析仪(美国赛默飞世尔科技公司,型号:5250040);化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司,型号:721BR11512);透射电子显微镜(日本电子株式会社,型号:JEM-1400FLASH)。

1.3 动物分组与造模

SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只,使用随机数字表法分为空白对照组(10 只)与实验组(30 只)。实验组采用单日单次灌注含 5% TNBS(100 mg/kg)与 50%乙醇混合液以构建急性 UC 模型^[12-13]。造模前,所有大鼠禁食 24 h,异氟烷麻醉后,经肛门插入润滑软管

至结肠 8 cm 深处。空白对照组灌注等量生理盐水。灌注后棉球轻压肛门,倒置约 30 s 防止漏液。

1.4 分组与干预

选取出现腹泻、便血等典型 UC 症状的大鼠,随机分为模型组、苦参苓黛汤组、美沙拉嗪组,每组 10 只。参考临床剂量(苦参苓黛汤生药 100 g/d;美沙拉嗪 4 g/d),按体表面积折算法^[14-15]及成人 60 kg 标准体质量计算大鼠等效剂量。造模后第 2 天起,苦参苓黛汤组按 10.28 g/(kg·d)灌肠给药,美沙拉嗪组按 0.41 g/(kg·d)灌肠给药。模型组与空白对照组予以生理盐水灌肠。各组每天灌肠 1 次,灌肠体积固定为 1.5 mL,持续 14 d。

1.5 材料和标本收集

末次给药前禁食 24 h。麻醉后腹主动脉取血,4 ℃静置 30 min 后 3 000 r/min 离心 15 min(离心半径为 8 cm),取上清液于-80 ℃保存。取结肠组织,冰生理盐水冲洗后观察黏膜损伤,再行组织分装:4%多聚甲醛固定(组织病理/免疫荧光染色);液氮速冻后-80 ℃保存(Western blot);2.5%戊二醛固定(透射电镜)。

1.6 观察指标与检测方法

1.6.1 大鼠一般情况及疾病活动指数评估 每天观察并记录大鼠的体质量变化、粪便性状和便血等情况,计算大鼠疾病活动指数(disease activity index, DAI)=(体质量下降分数+粪便性状分数+便血分数)/3。评分标准采用 0~4 分制,分值越高代表 UC 病情越严重^[16]。解剖后,结合黏膜充血、溃疡等损伤情况,评估结肠黏膜损伤指数(colon mucosal damage index, CMDI),CMDI 总分为 0~5 分,分值越高代表结肠黏膜损伤越严重^[17]。

1.6.2 结肠组织病理评价 4%多聚甲醛固定 48 h,石蜡包埋切片(5 μm),行 HE 染色后在光学显微镜下观察结肠组织形态变化。

1.6.3 ELISA 检测血清炎症因子 IL-6、TNF-α、IL-1β、IL-10 水平 按照 ELISA 试剂盒说明书分别检测各组大鼠血清 IL-6、TNF-α、IL-1β、IL-10 水平。

1.6.4 免疫荧光检测 c-kit 和 Beclin-1 共表达 石蜡切片抗原修复后,加 0.5% TritonX-100 透化,10%山羊血清封闭,滴加 c-kit 一抗(1:100),4 ℃孵育过

夜,次日洗涤后孵育荧光二抗(1:400)。洗涤后加入 TSA 试剂孵育,微波修复后使用 10%山羊血清封闭 10 min。加 Beclin-1 一抗(1:200),4 ℃孵育过夜。次日洗涤后孵育荧光二抗(1:400)50 min,洗涤后加入 TSA 试剂孵育。DAPI 染细胞核,避光孵育 10 min。封片后荧光显微镜观察并采集图像。采用 ImageJ 计算共表达面积占比。

1.6.5 Western blot 检测结肠组织中自噬相关蛋白表达 RIPA 裂解液(含蛋白酶抑制剂)提取蛋白,BCA 法定量。样品加入 5×上样缓冲液,95 ℃变性 5 min。SDS-PAGE 电泳(浓缩胶 80 V 30 min,分离胶 120 V 60 min),转膜后 5%脱脂牛奶封闭 90 min,一抗 LC3(1:2 000)、Beclin-1(1:2 000)、p62(1:5 000)、GAPDH(1:5 000)4 ℃孵育过夜。HRP 标记山羊抗兔/鼠二抗(1:20 000)室温孵育 1 h,ECL 显影,ImageJ 分析条带灰度值。

1.6.6 电镜观察结肠组织中 ICC 自噬情况 结肠组织 2.5%戊二醛固定 24 h,1%锇酸固定 2 h,丙酮梯度脱水,Epon 812 包埋。超薄切片(70 nm)经醋酸铀-柠檬酸铅双染,透射电镜观察 ICC 自噬小体。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行数据分析。符合正态分布的数据使用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,多组比较使用单因素方差分析,方差齐时使用 LSD 检验进行组间两两比较。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 苦参苓黛汤对 UC 模型大鼠一般情况与 DAI 评分的影响

空白对照组大鼠精神状态无明显异常,毛质柔顺,行动敏捷,粪便成形。与空白对照组比较,模型组大鼠精神状态较差,蜷缩少动,出现黏液便、血便。苦参苓黛汤组和美沙拉嗪组大鼠精神状态好转,活动增多,黏液便、血便减少。与空白对照组比较,模型组大鼠体质量降低、DAI 评分升高($P < 0.01$)。与模型组比较,苦参苓黛汤组和美沙拉嗪组大鼠体质量增加、DAI 评分降低($P < 0.01$)。与苦参苓黛汤组比较,美沙拉嗪组大鼠体质量增加、DAI 评分降低($P < 0.01$)。详见图 1。

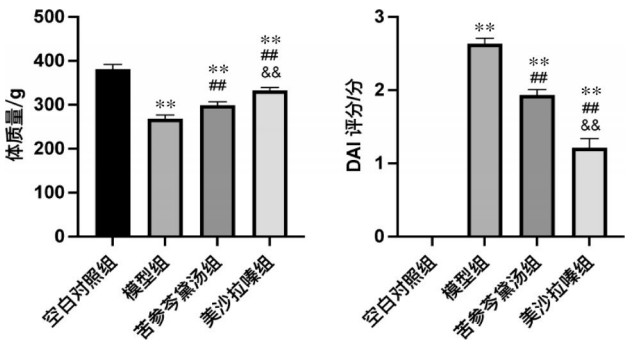


图 1 各组大鼠体重及 DAI 评分比较($\bar{x}\pm s, n=5$)

Fig.1 Comparison of body weight and DAI scores among different groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=5$)

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.01$;与苦参苓黛汤组比较,** $P<0.01$ 。

2.2 苦参苓黛汤对 UC 模型大鼠结肠组织形态的影响

空白对照组大鼠肠绒毛及上皮结构完整,未见中性粒细胞浸润,黏膜层、黏膜下层结构清晰。与空白对照组比较,模型组大鼠肠绒毛显著受损,伴有肿胀,固有层及黏膜下层有大量中性粒细胞浸润,水肿明显,CMDI 评分升高($P<0.01$)。与模型组比较,苦参苓黛汤组和美沙拉嗪组大鼠肠绒毛损伤改善,黏膜下层和固有层中性粒细胞浸润显著减少,水肿减轻,CMDI 评分降低($P<0.05, P<0.01$)。与苦参苓黛汤组比较,美沙拉嗪组大鼠肠绒毛损伤改善,黏膜下层和固有层中性粒细胞浸润显著减少,水肿减轻,CMDI 评分降低($P<0.05$)。详见图 2—3。

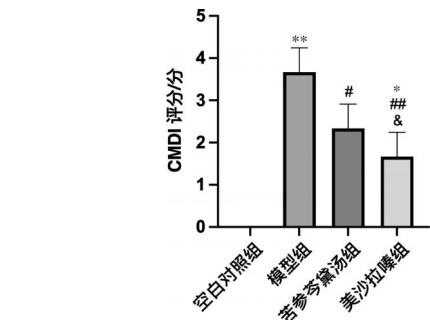


图 2 各组大鼠结肠 CMDI 评分比较($\bar{x}\pm s, n=5$)

Fig.2 Comparison of CMDI scores among different groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=5$)

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与苦参苓黛汤组比较,* $P<0.05$ 。

2.3 苦参苓黛汤对 UC 模型大鼠血清炎症因子的影响

与空白对照组比较,模型组血清 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6、IL-1 β 含量升高,IL-10 含量降低($P<0.01$)。与模型组比较,苦参苓黛汤组和美沙拉嗪组血清 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6、IL-1 β 含量降低,IL-10 含量升高($P<0.01$)。与苦参苓黛汤组比较,美沙拉嗪组血清 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6、IL-1 β 含量降低,IL-10 含量升高($P<0.01$)。详见图 4。

2.4 苦参苓黛汤对 UC 模型大鼠结肠组织 c-kit 和 Beclin-1 共表达比例的影响

与空白对照组比较,模型组 c-kit 和 Beclin-1 共表达比例升高($P<0.01$)。与模型组比较,苦参苓黛汤组和美沙拉嗪组 c-kit 和 Beclin-1 共表达比例降低($P<0.01$)。与苦参苓黛汤组比较,美沙拉嗪组 c-kit 和 Beclin-1 共表达比例降低($P<0.01$)。详见图 5—6。

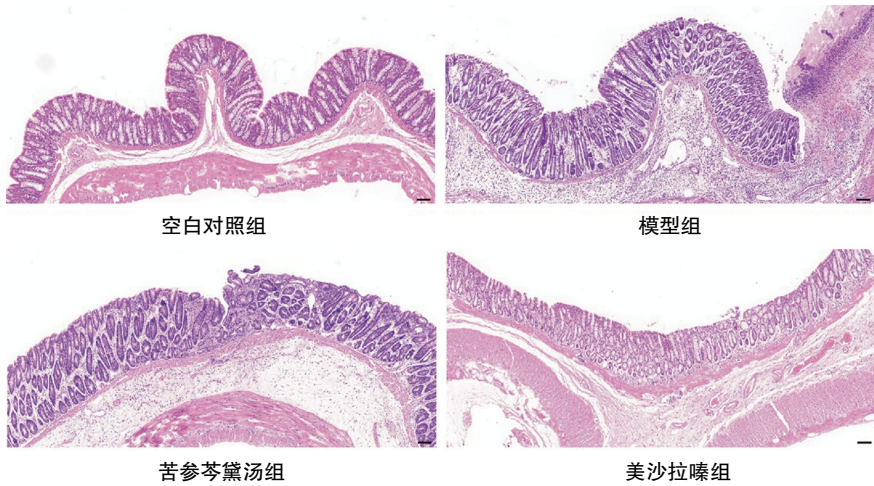


图 3 各组大鼠结肠组织 HE 染色图($\times 100$, 标尺=100 μm , $n=5$)

Fig.3 Comparison of HE staining in colonic tissue among different groups of rats ($\times 100$, scale bar=100 μm , $n=5$)

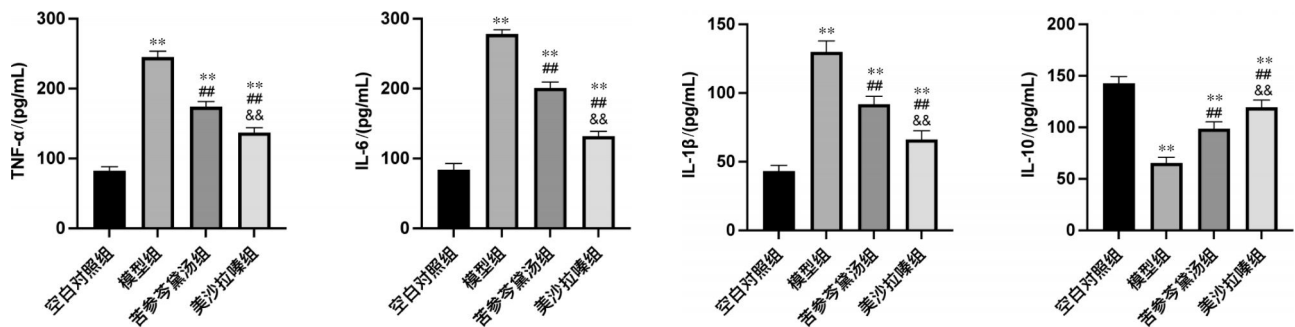


图 4 各组大鼠血清炎症因子含量比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig.4 Comparison of serum inflammatory cytokines levels among different groups of rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与苦参苓黛汤组比较,&& $P<0.01$ 。

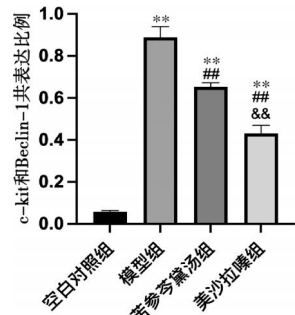


图 5 各组大鼠结肠组织 c-kit 和 Beclin-1 共表达比例比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.5 Comparison of the co-expression ratio of c-kit and Beclin-1 in colonic tissue among different groups of rats

($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与苦参苓黛汤组比较,&& $P<0.01$ 。

2.5 苦参苓黛汤对 UC 大鼠结肠组织自噬蛋白 LC3- I、LC3- II、Beclin-1、p62 蛋白表达水平的影响

与空白对照组比较,模型组 LC3- II/LC3- I 比值、Beclin-1 相对表达量上调,p62 蛋白相对表达量下调($P<0.01$)。与模型组比较,苦参苓黛汤组和美沙拉嗪组 LC3- II/LC3- I 比值、Beclin-1 相对表达量下调,p62 蛋白相对表达量上调($P<0.01$)。与苦参苓黛汤组比较,美沙拉嗪组 LC3- II/LC3- I 比值、Beclin-1 相对表达量下调,p62 蛋白相对表达量上调($P<0.01$)。详见图 7。

2.6 苦参苓黛汤对 ICC 内超微结构的影响

空白对照组 ICC 中细胞核形态规则、染色质分

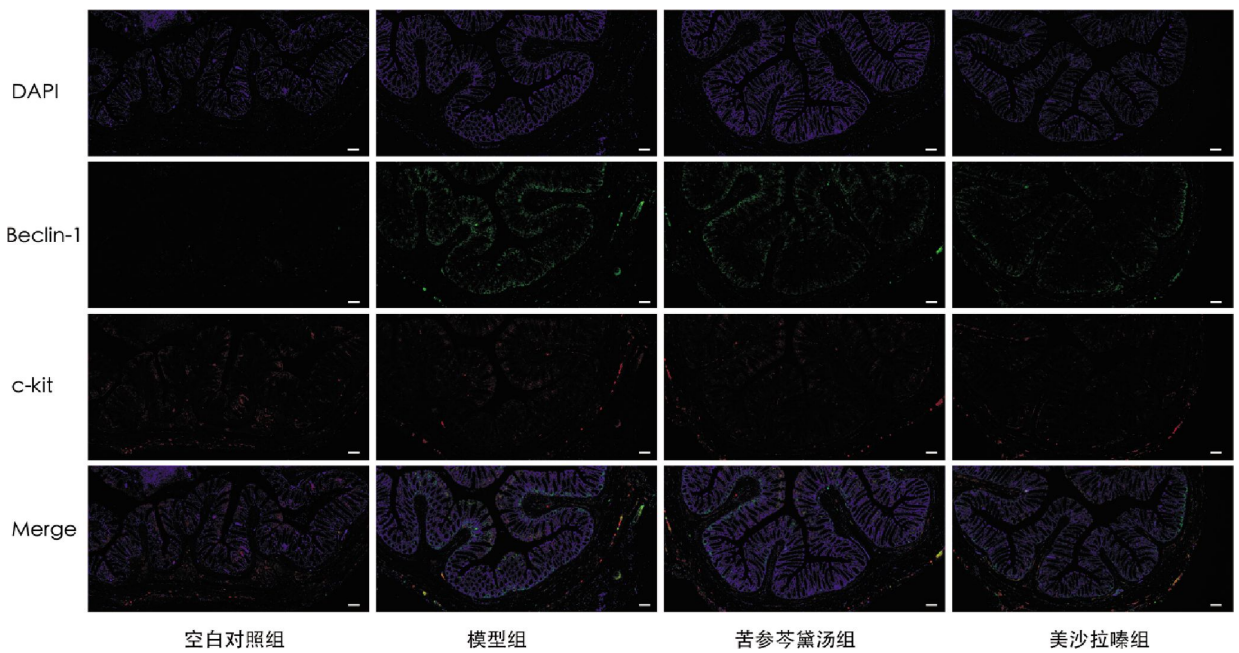


图 6 各组大鼠结肠组织 c-kit 和 Beclin-1 共表达免疫荧光图($\times 100$, 标尺=100 μm)

Fig.6 Immunofluorescence images of c-kit and Beclin-1 co-expression in colonic tissue of rats in each group ($\times 100$, scale bar=100 μm)

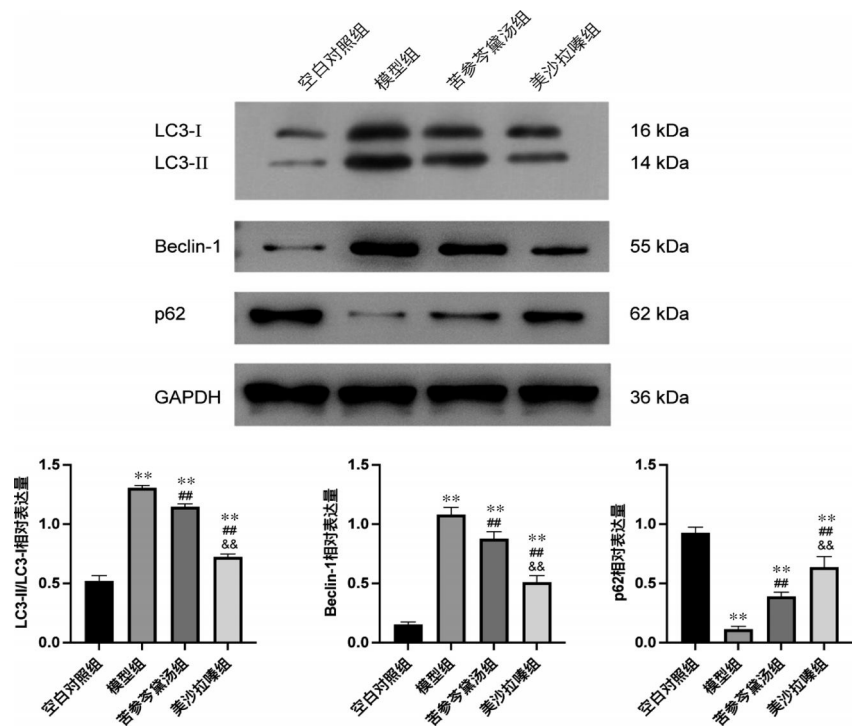


图 7 各组大鼠结肠组织 LC3- II/LC3- I、Beclin-1、p62 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.7 Comparison of the relative protein expressions of LC3-II/LC3-I, Beclin-1, and p62 in colonic tissue among different groups of rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与苦参苓黛汤组比较,^^ $P<0.01$ 。

布均匀,线粒体结构完整、嵴清晰,粗面内质网未见明显异常。模型组 ICC 内可见核周隙增宽,线粒体明显肿胀,粗面内质网扩张,并可见典型的自噬小体。苦参苓黛汤和美沙拉嗪组 ICC 内可见线粒体轻微肿胀,核周隙增宽与粗面内质网扩张较模型组减轻,自噬小体减少。与苦参苓黛汤组比较,美沙拉嗪组线粒体肿胀减轻,核周隙增宽与粗面内质网扩张减轻。详见图 8。

3 讨论

UC 归属于中医学“休息痢”“久痢”“泄泻”等范

畴,其核心病机为湿热蕴结肠道、气血壅滞、肠络受损。中医学基于辨证施治原则,通过整体调节改善肠道微环境、修复黏膜损伤,在控制 UC 急性发作、减少复发频率方面具有独特优势^[18]。苦参苓黛汤是立足中医学“湿热致病”理论创立的经验方剂,针对 UC 急性期的核心病机,有清热燥湿、解毒敛疮、凉血止血功效的治疗方法^[19-20]。方中苦参专入下焦,能荡涤肠道湿火热毒,取《备急千金要方·伤寒方下·伤寒杂治第十》中“苦参汤”治湿热下注之法,为君药;黄芩清热燥湿,青黛凉血解毒,二者与苦参相须为

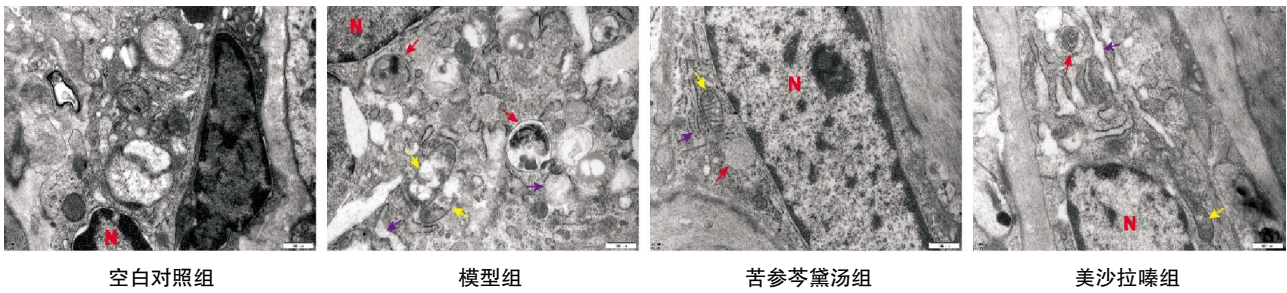


图 8 各组大鼠结肠 ICC 内超微结构电镜图($\times 25\ 000$, 标尺=500 nm)

Fig.8 Electron micrographs of the ultrastructure of ICC in colonic tissue of rats in each group ($\times 25\ 000$, scale bar=500 nm)

注:细胞核(N)、自噬小体(↑)、线粒体肿胀(↑)和粗面内质网扩张(↑)。

用,增强清泻下焦血热之功;秦皮清热解毒、收涩止痢,合白头翁汤之意。此四味相合,共成清热燥湿之特征核心。儿茶收湿生肌定痛,地榆炭凉血止血敛疮,取地榆汤治下焦血证之效,二者与功擅排脓破瘀之败酱草相伍,共奏解毒敛疮之效,承薏苡附子败酱散治痈脓之法,三者共为佐使药。全方君臣佐使配伍严谨,清热燥湿与解毒敛疮并重,共奏清热解毒、凉血止痢、排脓生肌之效,切中 UC 湿热毒盛、肠络受损的病理要害。中医理论强调“外治之理即内治之理”,苦参芩黛汤采用灌肠给药方式,使药物直接作用于病变结肠黏膜,既提高局部药物浓度,增强黏膜屏障保护和肠道局部细胞功能调节作用,又避免口服给药的肝脏首过效应,充分契合 UC“病位在肠”的病理特点,为临床治疗提供了优化方案^[21-22]。

本研究采用 TNBS/乙醇复合造模方法成功构建 UC 大鼠模型,并选择美沙拉嗪作为阳性对照药。美沙拉嗪是 UC 临床一线治疗药物,疗效与安全性已得到明确验证^[23];在 UC 相关研究中,美沙拉嗪常被用作阳性对照药,且能验证实验模型的有效性^[24]。本研究结果发现,造模后大鼠出现体质量下降、黏液血便等典型症状,结肠组织可见明显黏膜糜烂、炎症细胞浸润,血清促炎因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平显著升高,抗炎因子 IL-10 水平降低,与临床 UC 患者的病理特征高度吻合。经苦参芩黛汤灌肠治疗 14 d 后,大鼠一般状况明显改善,DAI 及 CMDI 评分显著降低,结肠黏膜损伤减轻,炎症因子谱恢复平衡,提示该方剂可有效缓解 UC 的肠道炎症反应。这一结果与中医理论中苦参芩黛汤“清热解毒、凉血止痢”的功效特点一致,方中苦参、黄芩等药清利湿热、祛除毒邪,儿茶、地榆炭等佐使药则收敛止血以促进溃疡修复,全方共奏标本兼治之效。

ICC 作为肠道动力的起搏细胞,其数量减少和功能损伤是 UC 肠道运动障碍的重要病理基础^[25-26]。c-kit 不仅是 ICC 的特异性分子标志物,也参与调控 ICC 的发育、存活与自我平衡,而适度的自噬对维持这一自我平衡具有重要作用^[27]。有研究表明,UC 模型小鼠 ICC 中存在过度自噬,而通过调节肠道炎症可能抑制 ICC 的过度自噬^[28-29]。本研究通过免疫荧光共定位发现,UC 模型大鼠结肠组织中 c-kit 与自噬标志物 Beclin-1 的共表达比例显著升高,提示

ICC 自噬异常激活可能参与其功能损伤过程。透射电镜结果证实,模型组 ICC 内存在大量自噬小体,伴随线粒体肿胀、内质网扩张等超微结构损伤,而苦参芩黛汤治疗可显著减少自噬小体数量并改善细胞器形态。自噬流激活表现为 LC3-II/LC3-I 比值升高与 p62 降解^[30]。Western blot 结果显示,模型组结肠组织的 LC3-II/LC3-I 比值和 Beclin-1 表达上调,p62 表达下调,符合自噬显著激活的分子特征;苦参芩黛汤干预后,自噬蛋白 LC3-II/LC3-I 比值、Beclin-1 表达下调,p62 表达上调,表明该方剂可有效抑制 ICC 过度自噬。这一发现揭示了 ICC 自噬异常可能是 UC 肠道动力障碍及炎症的新机制,而苦参芩黛汤通过调控自噬稳态来保护 ICC 功能,可能是其改善肠腑运动和炎症的重要途径。

综上所述,本研究首次证实苦参芩黛汤灌肠可通过抑制 UC 大鼠结肠 ICC 过度自噬、调节炎症因子平衡,从而改善肠道黏膜损伤和临床症状。这一发现不仅为该方剂的临床应用提供了实验依据,更揭示了靶向 ICC 自噬可能是 UC 治疗的新靶点,为中西医结合防治 UC 开辟了新思路。

参考文献

- [1] LE BERRE C, HONAP S, PEYRIN-BIROULET L. Ulcerative colitis[J]. *Lancet*, 2023, 402(10401): 571-584.
- [2] ANANTHAKRISHNAN A N, KAPLAN G G, NG S C. Changing global epidemiology of inflammatory bowel diseases: Sustaining health care delivery into the 21st century[J]. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2020, 18(6): 1252-1260.
- [3] 史瑞, 李军祥, 沈洪, 等. 溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识(2023)[J]. *中华中医药杂志*, 2024, 39(1): 288-296.
- [4] KOBAYASHI T, SIEGMUND B, LE BERRE C, et al. Ulcerative colitis[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2020, 6: 74.
- [5] SANDS B E, SANDBORN W J, PANACCIONE R, et al. Ustekinumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2019, 381(13): 1201-1214.
- [6] LI P Y, XIAO Y D, ZHOU L, et al. A bibliometric analysis of interstitial cells of Cajal research[J]. *Frontiers in Medicine*, 2024, 11: 1391545.
- [7] DAVE M, HAYASHI Y, GAJDOS G B, et al. Stem cells for murine interstitial cells of Cajal suppress cellular immunity and colitis via prostaglandin E2 secretion[J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(5): 978-990.

- [8] 姜 威, 林 傲, 孙佳斌, 等. 溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 Cajal 间质细胞变化的研究[J]. 黑龙江医药科学, 2018, 41(4): 40–42.
- [9] 陈贤家, 符士颖, 林力森, 等. 桃红四物汤对溃疡性结肠炎大鼠 SCF/c-kit 通路及 Cajal 间质细胞的影响[J]. 上海中医药杂志, 2021, 55(4): 79–84.
- [10] ZHANG W, ZOU M L, FU J, et al. Autophagy: A potential target for natural products in the treatment of ulcerative colitis[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2024, 176: 116891.
- [11] 戴彦成, 张亚利, 唐志鹏. ICC 自噬调控: 溃疡性结肠炎肠动力紊乱治疗的新靶点[J]. 胃肠病学, 2015, 20(6): 377–379.
- [12] 揣 强, 翟文静, 贾苏杰, 等. 基于 Nrf2/SLC7A11/GPX4 通路探究泄浊解毒方通过抑制铁死亡和缓解肠黏膜损伤治疗溃疡性结肠炎的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 1–10[2025–10–20]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20250643>.
- [13] 谢超群, 陈 凯, 孙豪娴, 等. 穴位埋线调控 NOD 样受体热蛋白结构域 3/半胱氨酸蛋白酶-1 信号通路抗溃疡性结肠炎损伤的机制研究[J]. 针刺研究, 2023, 48(7): 625–634.
- [14] 邓文龙. 动物中人体剂量换算遵循的原则[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(3): 196–197.
- [15] 邱爱珠, 徐晔青, 欧阳翌国, 等. 基于 TLR4/NF- κ B 信号通路探讨荆芥连翘汤对溃疡性结肠炎大鼠的作用及机制[J]. 湖南中医杂志, 2024, 40(6): 168–174.
- [16] LI Q M, CUI Y, XU B C, et al. Main active components of Jiawei Gegen Qinlian decoction protects against ulcerative colitis under different dietary environments in a gut microbiota-dependent manner[J]. *Pharmacological Research*, 2021, 170: 105694.
- [17] XIE Q, LI H Y, MA R, et al. Effect of *Coptis chinensis* franch and *Magnolia officinalis* on intestinal flora and intestinal barrier in a TNBS-induced ulcerative colitis rats model [J]. *Phytomedicine*, 2022, 97: 153927.
- [18] 中国中西医结合学会. 溃疡性结肠炎中西医结合诊疗专家共识[J]. 中国中西医结合杂志, 2023, 43(1): 5–11.
- [19] 张 琢, 董若兰, 刘 琼, 等. 清热解毒中药及复方治疗溃疡性结肠炎的研究进展[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2022, 51(6): 858–863.
- [20] 张 伟, 邹孟龙, 周 耀, 等. 从“虚、毒、瘀”理论与中性粒细胞胞外诱捕网辨治溃疡性结肠炎[J]. 中药药理与临床, 1–17[2025–10–20]. <https://doi.org/10.13412/j.cnki.zyyj.20250401.001>.
- [21] 万 军, 周丽莎, 罗甜甜, 等. 直肠给药制剂治疗溃疡性结肠炎的研究进展[J]. 中国药房, 2025, 36(7): 887–890.
- [22] 彭西兰, 张洁瑜, 刘远成, 等. 中药保留灌肠治疗湿热内蕴型溃疡性结肠炎的临床研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(11): 1395–1398.
- [23] NGUYEN N H, FUMERY M, DULAI P S, et al. Comparative efficacy and tolerability of pharmacological agents for management of mild to moderate ulcerative colitis: A systematic review and network meta-analyses[J]. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 2018, 3(11): 742–753.
- [24] XU F F, WANG J X, ZHANG T Y, et al. Bakuchiol mitigates colitis through GPR120 activation[J]. *Phytomedicine*, 2025, 140: 156618.
- [25] LU C, LU H L, HUANG X, et al. Colonic transit disorder mediated by downregulation of interstitial cells of Cajal/anoc-tamin-1 in dextran sodium sulfate-induced colitis mice [J]. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 2019, 25 (2): 316–331.
- [26] BERNARDINI N, SEGNANI C, IPPOLITO C, et al. Immunohistochemical analysis of myenteric Ganglia and interstitial cells of Cajal in ulcerative colitis[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2012, 16(2): 318–327.
- [27] SANDERS K M, DRUMM B T, COBINE C A, et al. Ca^{2+} dynamics in interstitial cells: Foundational mechanisms for the motor patterns in the gastrointestinal tract[J]. *Physiological Reviews*, 2024, 104(1): 329–398.
- [28] 戴彦成, 郑 烈, 张亚利, 等. 健脾清肠方对 DSS 诱导结肠炎小鼠肠道动力学影响的研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2017, 25(2): 123–128.
- [29] DAI Y C, ZHENG L, ZHANG Y L, et al. Jianpi Qingchang decoction regulates intestinal motility of dextran sulfate sodium-induced colitis through reducing autophagy of interstitial cells of Cajal[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2017, 23(26): 4724–4734.
- [30] YAMAMOTO H, ZHANG S D, MIZUSHIMA N. Autophagy genes in biology and disease[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2023, 24(6): 382–400.

(本文编辑 周 旦)