

王燕,柳荣,朱向东. 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 信号通路的免疫组化影响 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(1): 42-48.

Wang Y, Liu R, Zhu XD. Immunohistochemical effect of sishen pill on PI3K/Akt/mTOR signal pathway in colonic tissue of rats with ulcerative colitis model of spleen kidney yang deficiency [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(1): 42-48.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.01.006

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 信号通路的免疫组化影响

王燕,柳荣,朱向东*

(甘肃中医药大学,兰州 730000)

【摘要】 目的 本研究拟通过观察四神丸对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎(UC)模型大鼠结肠组织病理特征和 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白免疫组化表达水平的影响,探讨溃疡性结肠炎发生的可能机制。**方法** 120 只 SPF 级 Wistar 大鼠(雌雄各半)随机分出 20 只作为空白组,其余 100 只作为造模组,造模采用 DNBS/乙醇溶液灌肠+皮下注射氢化可的松+番泻叶灌胃法建立脾肾阳虚型 UC 大鼠模型。将成模大鼠随机分为 5 组,分别为模型组、美沙拉嗪组、四神丸高、中、低剂量组。模型组和空白组给予蒸馏水灌服,美沙拉嗪组按 0.36 g/kg 剂量灌胃,四神丸高、中、低剂量组分别按生药 3.2、1.6、0.8 g/kg 剂量灌胃,灌胃体积均为 10 mL/kg。每日 1 次,连续 21 d。采用 HE 染色法观察各组大鼠结肠组织病理改变,免疫组化法观察结肠组织 PI3K p85、p-PI3K p85、AKT、p-AKT Ser473、mTOR、p-mTOR Ser2448 蛋白的表达位置及表达水平。**结果** 与空白组比较,模型组大鼠病理切片见肠黏膜部分消失,腺体消失,有大量的炎性细胞浸润,聚集于黏膜层和基层;PI3K p85、p-PI3K p85、AKT、p-AKT Ser473、mTOR、p-mTOR Ser2448 蛋白平均光密度值显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,药物组炎性细胞减少,黏膜层结构不同程度的恢复正常,美沙拉嗪组和四神丸中剂量组效果最好,黏膜结构接近空白对照组。四神丸低剂量组炎性细胞稍有减少,可见少量的腺体结构;四神丸高、中、低剂量组及美沙拉嗪组 PI3K p85、p-PI3K p85、AKT、p-AKT Ser473、mTOR、p-mTOR Ser2448 蛋白平均光密度值均有不同程度下降($P < 0.01, P < 0.05$)。**结论** 四神丸可能通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的激活改善脾肾阳虚型溃疡性结肠炎模型大鼠的肠黏膜损伤。

【关键词】 溃疡性结肠炎;温肾健脾法;四神丸;磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B/雷帕霉素靶蛋白信号通路

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)01-0042-07

Immunohistochemical effect of sishen pill on PI3K/Akt/mTOR signal pathway in colonic tissue of rats with ulcerative colitis model of spleen kidney yang deficiency

WANG Yan, LIU Rong, ZHU Xiangdong*

(Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

Corresponding author: ZHU Xiangdong. E-mail: zhuxiangdong33@163.com

【Abstract】 Objective This study observed the effects of Sishen pills on the pathological characteristics of colon tissue in spleen and kidney yang deficiency ulcerative colitis model rats and expression of PI3K/Akt/mTOR signaling

[基金项目] 国家自然科学基金(81760833)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(81760833)。

[作者简介] 王燕(1979—),女,副教授,硕士,研究方向:中医药防治溃疡性结肠炎。Email: wyan1232004@163.com

[通信作者] 朱向东(1973—),男,教授,中医内科学博士后,研究方向:中医药防治糖尿病和溃疡性结肠炎。

Email: zhuxiangdong33@163.com

pathway-related proteins to explore possible mechanisms of inflammation in an ulcerative colon. **Methods** A total of 120 SPF Wistar rats (half male and half female) were randomly assigned to a blank group of 20, and the other 100 rats were used as the model group. The rat model of ulcerative colitis with spleen-kidney Yang deficiency was established by DNBS/ethanol solution enema + hydrocortisone subcutaneous injection + senna leaf gavage. Rats with successful model establishment were randomly divided into five groups: model, mesalazine, Sishen pill high, Sishen pill medium, and Sishen pill low dose groups. Model and blank groups were administered distilled water. The mesalazine group was orally administered 0.36 g/kg mesalazine, and the high, middle and low dose groups of Sishen pills were orally administered 3.2, 1.6, and 0.8 g/kg crude drug. Respectively, the volume of which was 10 mL/kg. Once a day for 21 d, colon tissues of rats were collected to observe general morphology and colon injury. HE staining was used to observe pathological changes. Immunohistochemistry was used to observe the localization and expression levels of PI3K p85, p-PI3K p85, AKT, p-AKT Ser473, mTOR, and p-mTOR Ser2448 proteins in colon tissues. **Results** Compared with the blank group, the intestinal mucosa had disappeared partially, glands had disappeared, and a large number of inflammatory cells had infiltrated and accumulated in mucosal and basal layers in pathological sections of the model group. The expression of PI3K p85, p-PI3K p85, AKT, p-AKT Ser473, mTOR, and p-mTOR Ser2448 proteins in the model group was increased significantly ($P < 0.01$). Compared with the model group, inflammatory cells in the drug groups were reduced, and the structure of the mucosal layer returned to normal to varying degrees. Mesalazine and Sishen pill medium dose groups had the best effects, and the mucosal structure was close to that in the blank control group. Inflammatory cells in the low dose group of Sishen pill were slightly reduced, and a small number of glandular structures was seen. The expression of PI3K p85, p-PI3K p85, AKT, p-AKT Ser473, mTOR, and p-mTOR Ser2448 proteins was decreased to varying degrees in high, middle, low dose groups of Sishen pill and the mesalazine group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusions** Sishen pill may improve intestinal mucosal damage of ulcerative colitis model rats with spleen and kidney yang deficiency by inhibiting activation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

【Keywords】 ulcerative colitis; warming the kidney and strengthening the spleen method; Sishen pill; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种以大肠黏膜与黏膜下炎症为主要特征的慢性非特异性炎症性疾病, 据统计 UC 患者罹患结肠癌风险极高, 对患者造成的危害及痛苦极大^[1-2]。目前认为 UC 的发病是外源物质引起宿主反应、基因和免疫影响三者相互作用的结果, 其病程漫长, 常反复发作。卢茂永^[3]认为 UC 缓解期以本虚为主, 本病虚多表现为脾阳虚, 也有兼肾阳不足的情况。任彦等^[4]认为年老者、病程长者及病情严重或反复者, 证素以脾、肾、湿、气虚为主, 故脾肾阳虚是 UC 常见的证型之一。四神丸为治疗脾肾阳虚之肾泄证 (五更泻) 经典方剂。明·王肯堂《证治准绳·类方》卷六在《证治准绳·类方》卷六有“治脾胃虚弱, 大便不实, 饮食不思, 或泄泻腹痛等证。肉豆蔻二两、补骨脂四两、五味子二两、吴茱萸浸, 炒一两上为末, 生姜八两, 红枣一百枚, 煮熟取枣肉和末丸, 如桐子大。每服五七十丸, 空心或食前白汤送下”。研究发现四神丸及其方中单味药具有止泻、抑制肠蠕动、抗肿瘤、免疫调节、抗炎镇痛等作用^[5-11]。四神丸治疗脾肾阳虚型 UC 的具体分子机制尚不完全清

楚, 本实验通过研究四神丸对脾肾阳虚型 UC 大鼠结肠组织病理改变, 结肠组织中 PI3K p85、p-PI3K p85、AKT、p-AKT Ser473、mTOR、p-mTOR Ser2448 蛋白免疫组化表达水平的影响来探讨四神丸治疗脾肾阳虚型 UC 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

120 只 70 d 龄 SPF 级 Wistar 大鼠, 雌雄各半, 体重 (180 ± 20) g, 甘肃中医药大学科研实验动物中心【SCXK(甘)2015-0002】。大鼠饲养于甘肃中医药大学实验动物中心 SPF 级屏障实验室【SYXK(甘)2015-0005】。饲养环境: 实验室温度 21 ~ 25℃, 相对湿度 50% ~ 60%, 光照 12 h/12 h 明暗交替, 噪音 < 50 dB。所有本研究中使用的实验方案由甘肃中医药大学动物管理委员会及动物福利伦理委员会批准, 严格按照 3R 原则进行动物饲养及实验 (项目批准号: 2018-081)。

1.1.2 药物

四神丸组方药物,购于兰州惠仁堂大药房,甘肃中医药大学中药鉴定中心鉴定合格,实验处方:补骨脂、吴茱萸、肉豆蔻、五味子、生姜、大枣,制备方法:按照 4:1:2:2:4:4 的比例称取补骨脂、吴茱萸、肉豆蔻、五味子、生姜、大枣,将生姜、大枣先煎,去姜去枣核,将枣肉捣成泥,其余药物打粉,混入枣泥并搓成梧桐子大的水丸。使用时将四神丸水丸高、中、低剂量组分别按生药 3.2、1.6、0.8 g/kg 剂量打粉,加适量热蒸馏水搅拌均匀后备用。番泻叶药剂制备:番泻叶,购于兰州惠仁堂大药房,甘肃中医药大学中药鉴定中心鉴定合格,将番泻叶按照大鼠体重 10 g/kg 取定量的药材,加适量水煎煮,过滤药液使用旋转蒸发器将药液浓缩,浓度为 1 g/mL,装入消毒过的药瓶,放入冰箱保存备用。美沙拉嗪药剂制备:购于葵花药业集团佳木斯鹿灵制药有限公司(批号 170804),将美沙拉嗪肠溶片按大鼠体重 0.36 g/kg 剂量打粉,加适量蒸馏水搅拌均匀后备用。氢化可的松注射液:购于国药集团容生制药有限公司(批号 1708201)。2,4-二硝基苯磺酸:购于梯希爱(上海)化成工业发展有限公司(批号 FHB01-NRAJ)。

1.1.3 主要试剂与仪器

兔 SP 试剂盒(中杉金桥公司,SP-9001),HE 染色试剂盒(索莱宝,G1120),苏木素(索莱宝,1140),p-AKT Ser473(CellSignaling,4060S),mTOR(CellSignaling,2983S),PI3K p85(ImmunoWay,YT3711),p-mTOR Ser2448(ImmunoWay,YP0176),p-PI3K p85(abcam,GR194710-78), β -actin(abcam,GR3255609-1),AKT(GeneTex,43264)。

H1650R 型台式高速冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司,中国),2016 型切片机(LEICA,德国),KD-T 电脑生物组织摊烤片机(科迪仪器设备有限公司,中国),KD-BM 生物组织包埋机(科迪仪器设备有限公司,中国),BI2000 免疫组化分析系统(泰盟软件有限公司,中国),iMark 酶标仪(Bio-Rad,美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物造模

参照文献方法采用病证结合法使用 DNBS/乙醇溶液灌肠 + 皮下注射氢化可的松 + 番泻叶灌胃建立脾肾阳虚型 UC 大鼠模型^[12]。对 SPF 级 Wistar 大鼠进行番泻叶灌胃 10 mL/(kg·d),配合氢化可的松皮下注射 10 mg/(kg·d),每日 1 次,连续 21 d。

21 d 后,禁食 24 h,腹腔麻醉,使用注射器配 16 号灌胃针经肛门插入到达结肠部位,注射时将肛门捏紧,将 DNBS/乙醇溶液(每只 25 mg DNBS + 50% 的乙醇 0.25 mL)缓慢注入大鼠肠腔内,完全注入药液后再注入 1 mL 空气,捏取大鼠尾巴使大鼠保持倒立状态 1 min,使药液与结肠充分接触,结束后拔出灌胃针,待麻醉清醒后继续正常喂养。

1.2.2 大鼠的分组与给药

将 120 只 Wistar 大鼠适应性喂养 7 d 后,随机抓出 20 只作为空白组,其余 100 只进行造模。造模成功后,将剩余成功建立模型的大鼠随机分为模型组、阳性对照(美沙拉嗪)组、四神丸高剂量组、四神丸中剂量组、四神丸低剂量组。空白组和模型组灌服蒸馏水,美沙拉嗪组按生药 0.36 g/kg 剂量灌胃,四神丸高、中、低剂量组分别按生药 3.2、1.6、0.8 g/kg 剂量灌胃,灌胃量均为 10 mL/kg。各组灌胃每日 1 次,连续 21 d。

1.2.3 标本采集

大鼠给药治疗 21 d 结束后,各组大鼠禁食不禁水 1 d,注射麻醉,颈椎脱臼法处死大鼠。用组织剪剪下大鼠结肠组织,纵剪剖开,截取大鼠结肠病变最严重处组织,剪去组织周边多余脂肪,用预冷过的生理盐水反复冲洗干净,放滤纸上吸干液体,将结肠组织置于装有 4% 多聚甲醛溶液的玻璃瓶中固定保存,用于苏木精-伊红染色法(Hematoxylin-eosin Staining,HE)染色以及链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(Streptavidin-peroxidase,SP)实验。

1.2.4 各组大鼠结肠组织病理学改变

将固定在 4% 多聚甲醛溶液中的结肠组织取出,用 PBS 缓冲液进行冲洗,乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡包埋后制成石蜡切片后,依次进行脱蜡→水化→苏木素染色→伊红染色→脱水封片→显微镜进行下拍照观察。

1.2.5 SP 免疫组化法检测结肠组织中 PI3K p85、p-PI3K p85、Akt、p-AKT Ser473、mTOR、p-mTOR Ser2448 蛋白表达水平

将固定于 4% 多聚甲醛溶液中的结肠组织取出进行石蜡包埋后制成石蜡切片后,依次进行脱蜡→水化→抗原修复→正常血清封闭→滴加 PI3K p85、p-PI3K p85、Akt、p-AKT Ser473、mTOR、p-mTOR Ser2448 抗体→DAB 显色→复染→返蓝→梯度酒精脱水→透明封片→通过图像分析系统观察分析 PI3K p85、p-PI3K p85、Akt、p-AKT Ser473、mTOR、

p-mTOR Ser2448 的蛋白表达位置及平均光密度值。

1.3 统计学分析

实验所得的计量资料采用 SPSS 21.0 软件进行统计处理。若数据符合正态分布以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差 (One-way, ANOVA) 分析, 方差齐时组间比较用最小显著法 (least significant difference, LSD) 检验, 方差不齐选用 Tamhane's T2 检验; 若数据不符合正态分布, 则用中位数和四分位数间距表示, 用 W-H 秩和检验统计分析。

2 结果

2.1 各组大鼠结肠组织病理学改变

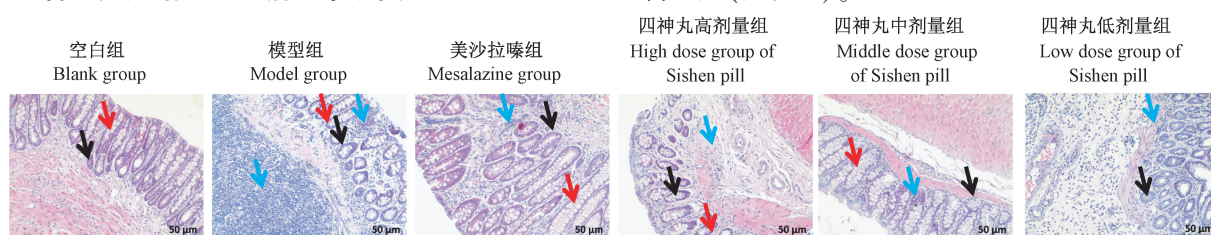
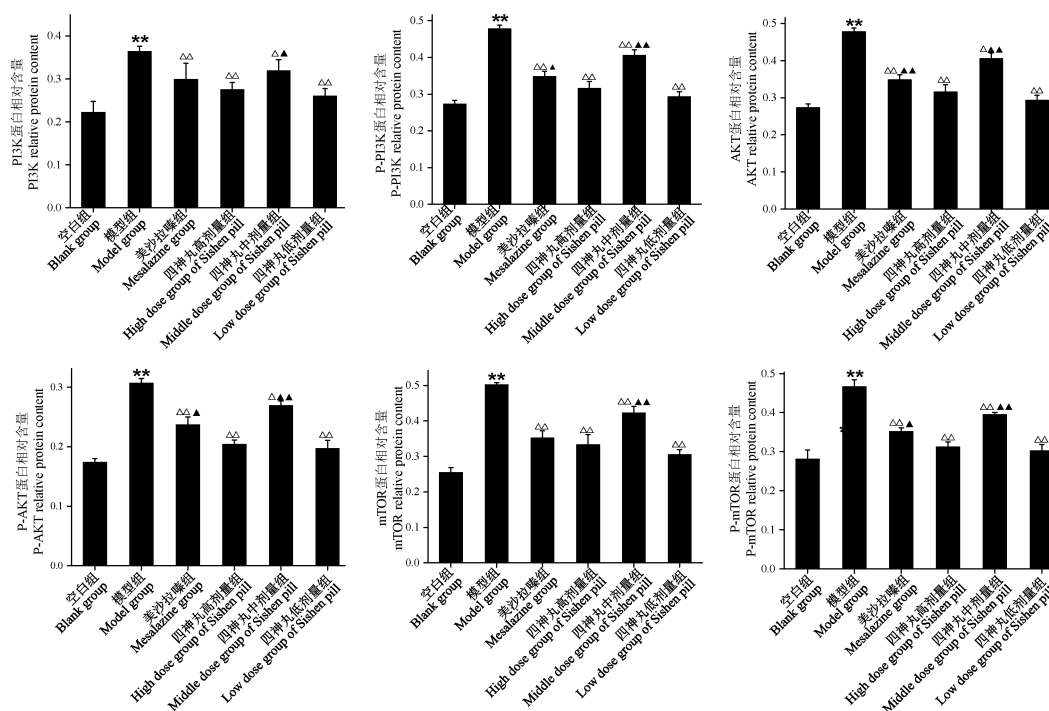


图 1 各组大鼠结肠病理形态

Figure 1 Pathological morphology of colon in each group



注: 与空白组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与美沙拉嗪组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ 。

图 2 各组大鼠结肠组织中 PI3K p85、p-PI3K p85、Akt、p-AKT Ser473、mTOR、p-mTOR Ser2448 蛋白平均光密度值柱状图 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Note. Compared with the model group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$. Compared with the mesalazine group, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$.

Figure 2 Histogram of average optical density values of PI3K p85, p-PI3K p85, Akt, p-AKT Ser473, mTOR, p-mTOR Ser2448 protein in colon tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

空白组: 染色均匀, 细胞核清晰可见, 肠黏膜层结构完整 (红色箭头), 基层腺体 (黑色箭头) 分布均匀。模型组: 与空白组相比较, 染色清晰均匀, 细胞结构清晰可见, 肠黏膜部分消失 (红色箭头), 腺体消失 (黑色箭头), 有大量的炎性细胞浸润 (蓝色箭头), 聚集于黏膜层和基层。治疗组: 与模型组相比较, 药物组炎性细胞减少 (蓝色箭头), 黏膜层结构不同程度的恢复正常 (红色箭头), 美沙拉嗪组和四神丸中剂量组效果最好, 黏膜结构接近空白对照组。四神丸低剂量组与模型组相比, 炎性细胞稍有减少 (蓝色箭头), 可见少量的腺体结构 (黑色箭头), 黏膜层虽被炎性细胞浸润, 损伤严重但腺体结构可见 (见图 1)。

2.2 各组大鼠结肠组织中 PI3K p85、p-PI3K p85、Akt、p-AKT Ser473、mTOR、p-mTOR Ser2448 蛋白的定位表达水平

与空白组相比,模型组 PI3K p85、p-PI3K p85、Akt、p-AKT Ser473、mTOR、p-mTOR Ser2448 蛋白平均光密度值显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比,PI3K p85、p-PI3K p85、Akt、p-AKT Ser473、mTOR、p-mTOR Ser2448 蛋白平均光密度值在四神丸高、中、低剂量组及美沙拉嗪组均有不同程度下降,有显著性差异 ($P < 0.01, P < 0.05$)。与美沙拉嗪组比较,四神丸高剂量组 Akt 蛋白平均光密度值显著高于美沙拉嗪组 ($P < 0.01$), p-PI3K p85、p-AKT Ser473、p-mTOR Ser2448 蛋白平均光密度值高于美沙拉嗪组 ($P < 0.05$), PI3K p85、mTOR 蛋白平均光密度值高于美沙拉嗪组,但无显著性差异 ($P > 0.05$); 四神丸低剂量组 p-PI3K p85、Akt、p-AKT Ser473、mTOR、p-mTOR Ser2448 蛋白平均光密度值显著高于美沙拉

嗪组 ($P < 0.01$), PI3K p85 蛋白平均光密度值高于美沙拉嗪组 ($P < 0.05$); 四神丸中剂量组 PI3K p85、p-PI3K p85、Akt、p-AKT Ser473、mTOR、p-mTOR Ser2448 蛋白平均光密度值高于美沙拉嗪组,但无显著性差异 ($P > 0.05$) (见图 2、3)。

3 讨论

近年来,UC 在我国发病率明显增高,其中病程长且病变范围广泛者癌变危险性极高,对患者造成极大的危害^[1-2]。UC 病位在大肠,但病机关键是脾虚,病程较长或反复发作的 UC 发展过程常见脾肾两虚。从中西医结合角度来看,阳气虚证病人机体免疫力也相应低下,致使吞噬系统紊乱,而很多补益药都已证实有增强免疫力,加速吞噬细菌、毒素机能,控制炎症的作用^[12]。西药治疗 UC 价格昂贵,副作用大,且无法根治反复发作。中医复方从中医整体观念上对 UC 进行整体调节具有副作用

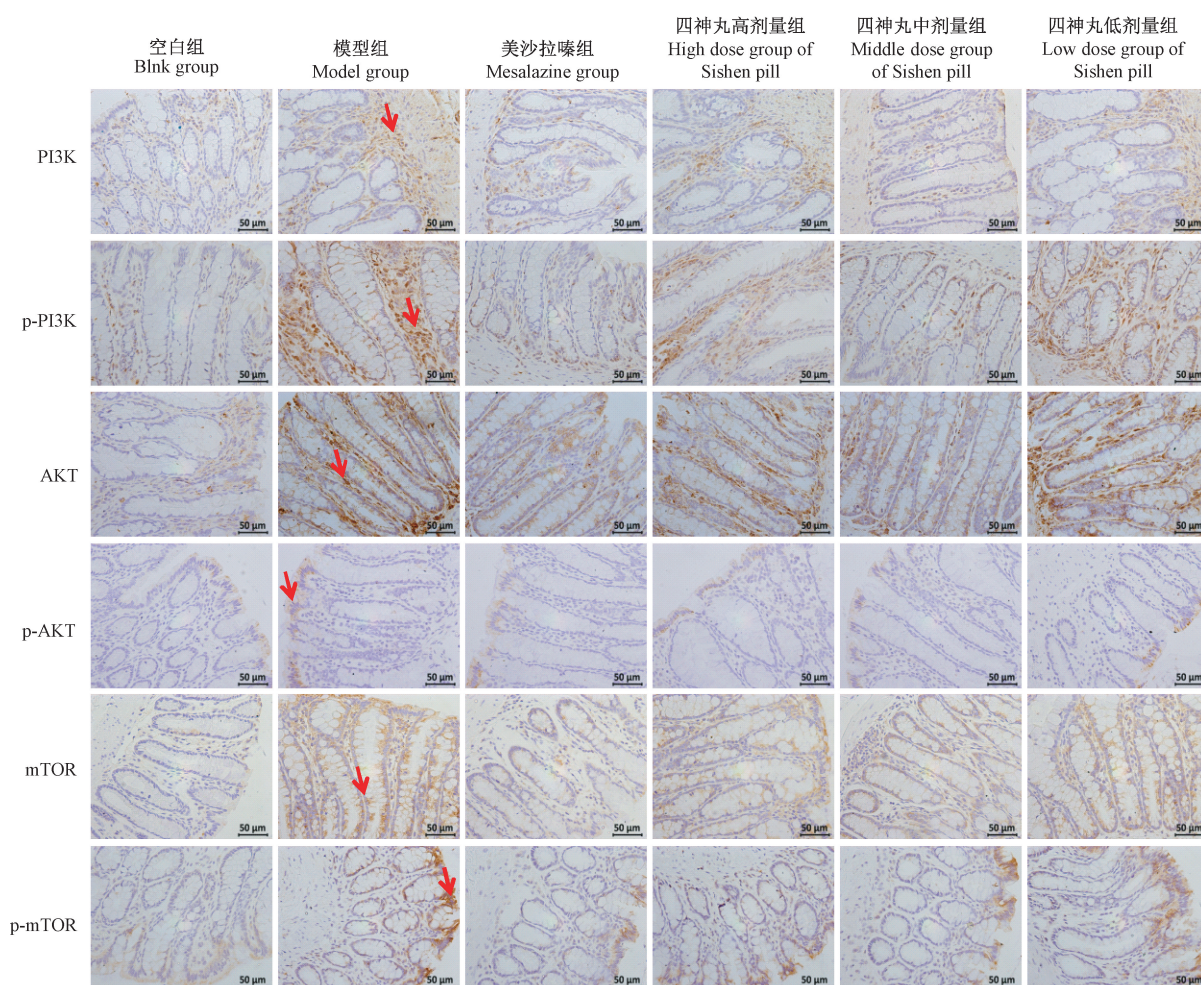


图 3 各组大鼠结肠蛋白免疫组化结果

Figure 3 Immunohistochemical results of protein in colon of rats in each group

少、治疗后不易反复发作等优势。临床上,四神丸治疗脾肾阳虚型 UC 疗效确切,可修复肠道黏膜损伤,治疗肠道病变,缓解或治愈 UC 相关症状^[13-15]。四神丸相关的实验研究也进一步证实,四神丸可修复肠黏膜屏障,抑制炎症反应,改善胃肠道功能^[16]。

PI3K/Akt/mTOR 信号通路在代谢、炎症、肿瘤等疾病发生中发挥重要作用。研究^[17-22]发现 PI3K/Akt/mTOR 信号通路影响细胞增殖、分化和凋亡,在肠道炎症及肿瘤反应中起着重要作用,认为 PI3K/Akt/mTOR 信号通路可能同时参与了 UC 的炎症及癌变过程。通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路亦能够诱导巨噬细胞自噬从而抑制炎症反应^[23]。现代药理学表明^[10,11,16,24-26],四神丸可抑制炎症通路过度激活,能一定程度的阻止癌变,恢复机体免疫平衡,修复肠黏膜屏障,抑制肠道推进作用。其中单味药均具有不同程度的止泻、抗炎、免疫调节等作用,可有效治疗 UC。本研究以 PI3K/Akt/mTOR 信号通路对 UC 的影响为切入点,进一步探讨四神丸治疗脾肾阳虚型 UC 可能的分子机制。

本实验结果显示,模型组结肠组织肠黏膜部分消失,腺体消失,有大量的炎性细胞浸润,聚集于黏膜层和基层;而黏膜损伤可能与 PI3K p85、p-PI3K p85、AKT、p-AKT Ser473、mTOR、p-mTOR Ser2448 蛋白平均光密度值显著升高有关。经药物预后与模型组比较,药物组炎性细胞减少,黏膜层结构不同程度的恢复正常;同时 PI3K p85、p-PI3K p85、AKT、p-AKT Ser473、mTOR、p-mTOR Ser2448 蛋白平均光密度值在四神丸高、中、低剂量组及美沙拉嗪组均有不同程度下降。其中以美沙拉嗪组和四神丸中剂量组改变最为明显,这说明四神丸可能通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的激活,进而调控炎症因子,调节机体免疫、自噬,从而修复肠道黏膜损伤。

参 考 文 献(References)

- [1] Bezzio C, Furfaro F, de franchis R, et al. Ulcerative colitis: current pharmacotherapy and future directions [J]. Expert Opin Pharmacother, 2014, 15(12): 1659-1670.
- [2] 方培植, 黄会云, 张涛, 等. PI3K/Akt-mTOR 信号通路介导溃疡性结肠炎相关癌变的实验研究 [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2015, 24(7): 802-806.
Fang PZ, Huang HY, Zhang T, et al. PI3K/Akt mTOR signaling pathway mediates ulcerative colitis associated carcinogenesis [J]. Chin J Gastroenter Hepatol, 2015, 24(7): 802-806.
- [3] 卢茂永. 四神丸加减治疗溃疡性结肠炎(脾肾阳虚)的临床观察 [D]. 长春: 长春中医药大学; 2019.
- Lu YM. Clinical observation on the treatment of ulcerative colitis (spleen and kidney yang deficiency) with modified Sishen pill [D]. Changchun: Changchun University of Traditional Chinese Medicine; 2019.
- [4] 任彦, 柯晓, 黄美娜, 等. 溃疡性结肠炎中医证素特点及规律的研究 [J]. 中医临床研究, 2013, 5(21): 1-4.
Ren Y, Ke X, Huang MN, et al. Study on the characteristics and laws of TCM syndrome elements in ulcerative colitis [J]. Clin J Chin Med, 2013, 5(21): 1-4.
- [5] 高长玉, 李冀, 柴剑波, 等. 四神丸止泻作用的实验研究 [J]. 中医药学报, 2005, 33(2): 40-41.
Gao CY, Li J, Chai JB, et al. Experimental study on antidiarrheal effect of Sishen pill [J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2005, 33(2): 40-41.
- [6] 王燕, 朱向东, 段永强, 等. 四神丸对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织病理形态及血清抗炎、促炎因子平衡的影响 [J]. 中医研究, 2014, 27(1): 53-56.
Wang Y, Zhu XD, Duan YQ, et al. Effect of Sishen Pill on colonic histopathology and serum anti-inflammatory and pro-inflammatory factors balance in rats with ulcerative colitis [J]. Tradit Chin Med Res, 2014, 27(1): 53-56.
- [7] 张晓云, 许燕妮, 赵海梅, 等. 理论论证四神丸中补骨脂、肉豆蔻核心药对的配伍地位 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(7): 1660-1662.
Zhang XY, Xu YN, Zhao HM, et al. Objective to demonstrate the compatibility of Psoralea corylifolia and nutmeg in Sishen pills [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2019, 37(7): 1660-1662.
- [8] 汪庆飞, 高家荣. 补骨脂的药理作用研究进展 [J]. 中国妇幼保健研究, 2016, 27(1): 256-257.
Wang QF, Gao JR. Research progress on pharmacological effects of psoralea corylifolia [J]. Chin J Woman Child Health Res, 2016, 27(1): 256-257.
- [9] 马存, 洗少华, 相雨, 等. 肉豆蔻药理作用研究进展 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(8): 1200-1206.
Ma C, Xian SH, Xiang Y, et al. Research progress on pharmacological effects of nutmeg [J]. Modern Chin Med, 2017, 19(8): 1200-1206.
- [10] 张明发, 陈光娟. 吴茱萸温中止痛药理研究 [J]. 中药材, 1991, 14(3): 37-42.
Zhang MF, Chen GJ. Pharmacological study of Evodia rutaecarpa in warming and relieving pain [J]. J Chin Med Mater, 1991, 14(3): 37-42.
- [11] 苗明三, 方晓艳. 五味子多糖对正常小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国中医药科技, 2003, 10(2): 28, 41.
Miao MS, Fang XY. Effect of Schisandra chinensis polysaccharide on immune function of normal mice [J]. Chin J Tradit Med Sci Technol, 2003, 10(2): 28, 41.
- [12] 王丽凤. 益生菌 L.plantarum P-8 对肉鸡肠道菌群、肠道免疫和生长性能影响的研究 [D]. 内蒙古: 内蒙古农业大学; 2014.
Wang LF. Effects of probiotics L. plantarum P-8 on intestinal flora, intestinal immunity and growth performance of broilers

- [D]. Inner Mongolia: Inner Mongolia Agricultural University; 2014.
- [13] 顾庆奎. 健脾益肾法治疗溃疡性结肠炎的疗效观察 [J]. 中医临床研究, 2011, 3(13): 31-32.
- Gu QK. Observation on the curative effect of the method of strengthening the spleen and kidney to treat ulcerative colitis [J]. Clin J Chin Med, 2011, 3(13): 31-32
- [14] 王峰, 余磊, 李玉荣. 四神丸加味治疗溃疡性结肠炎 45 例观察 [J]. 实用中医内科杂志, 2008, 22(7): 35.
- Wang F, Yu L, Li YR. Observation on 45 cases of ulcerative colitis treated with modified Sishen pill [J]. J Pract Tradit Chin Inter Med, 2008, 22(7): 35.
- [15] 杜波, 王婧. 四神丸合理中汤加味治疗溃疡性结肠炎 76 例 [J]. 中医杂志, 2011, 52(20): 1778-1779.
- Du B, Wang J. 76 cases of ulcerative colitis treated with modified Sishen pill reasonable Chinese Decoction [J]. J Tradit Chin Med, 2011, 52(20): 1778-1779.
- [16] 刘佳星, 王彦礼, 杨伟鹏, 等. 四神丸对 IBS-D 大鼠肠道屏障影响的实验研究 [J]. 中药药理与临床, 2019, 35(3): 24-28.
- Liu JX, Wang YL, Yang WP, et al. Experimental study on the effect of Sishen Pill on intestinal barrier of IBS-D rats [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2019, 35(3): 24-28.
- [17] Huang XL, Xu J, Zhang XH, et al. PI3K/Akt signaling pathway is involved in the pathogenesis of ulcerative colitis [J]. Inflamm Res, 2011, 60(8): 727-734.
- [18] Lee G, Goretsky T, Managlia E, et al. Phosphoinositide 3-Kinase signaling mediates β -Catenin activation in intestinal epithelial stem and progenitor cells in colitis [J]. Gastroenterology, 2010, 139(3): 869-881.
- [19] 伏代刚, 黄晓丽, 甘华田, 等. PTEN/PI3K/AKT 在溃疡性结肠炎炎症-肿瘤序列演进中的作用 [J]. 四川大学学报(医学版), 2009, 40(6): 1021-1023.
- Fu DG, Huang XL, Gan HT, et al. The role of PTEN / PI3K / Akt in the progression of inflammatory tumor sequence in ulcerative colitis [J]. J Sichuan Univ (Med Sci Edi), 2009, 40(6): 1021-1023.
- [20] Atreya I, Atreya R, Neurath MF. NF-kappaB in inflammatory bowel disease [J]. J Internal Med, 2008, 263(6): 591-596.
- [21] Jia Wei J F. Signaling pathways associated with inflammatory bowel disease [J]. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov, 2010, 4(2): 105-117.
- [22] Salem M, Ammitzboell M, Nys K, et al. ATG16L1: a multifunctional susceptibility factor in Crohn disease [J]. Autophagy, 11(4): 585-594.
- [23] 杜涛, 黄海, 陈欣, 等. 脂多糖通过 PI3K/Akt/mTOR 通路调控巨噬细胞自噬 [J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(4): 675-680.
- Du T, Huang H, Chen X, et al. Lipopolysaccharide regulates macrophage autophagy through PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. Chin J Pathophys, 2014, 30(4): 675-680.
- [24] 杨意, 朱向东, 李婷, 等. 四神丸对溃疡性结肠炎大鼠血清相关炎症因子表达及结肠组织病理形态的影响 [J]. 甘肃中医药大学学报, 2017, 34(2): 22-26.
- Yang Y, Zhu XD, Li T, et al. Effect of Sishen Pill on the expression of serum related inflammatory factors and pathological morphology of colon tissue in rats with ulcerative colitis [J]. J Gansu Univ Tradit Chin Med, 2017, 34(2): 22-26.
- [25] 余凌英, 胡昌江, 陈杰, 等. 补骨脂盐炙对实验动物止泻作用影响的研究 [J]. 四川中医, 2009, 27(10): 43-44.
- Yu LY, Hu CJ, Chen J, et al. Effect of Psoralea corylifolia salt on antidiarrheal effect of experimental animals [J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2009, 27(10): 43-44.
- [26] 袁子民, 刘欢, 王静. 肉豆蔻及炮制品醇提取物的止泻及抗炎作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(12): 2910-2911.
- Yuan ZM, Liu H, Wang J. Anti diarrhea and anti-inflammatory effects of alcohol extracts from nutmeg and processed products [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2015, 26(12): 2910-2911.

[收稿日期] 2020-10-04