

引用:龚颖,董越,刘雨晨,张金辉,宣自华,李青,张春彬,谢冬梅.基于PI3K/Akt/NF- κ B通路探讨增味承气合剂对治疗大鼠肠梗阻的药效及作用机制[J].中医导报,2025,31(10):34-40.

基于PI3K/Akt/NF- κ B通路探讨增味承气合剂治疗大鼠肠梗阻的药效及作用机制*

龚颖¹,董越¹,刘雨晨¹,张金辉¹,宣自华¹,李青³,张春彬³,谢冬梅^{1,2}

(1.安徽中医药大学药学院,安徽 合肥 230012;

2.安徽省中医药科学院中药资源开发与利用研究所,安徽 合肥 230012;

3.滁州市中西医结合医院,安徽 滁州 239000)

[摘要] 目的:探讨增味承气合剂对粘连性肠梗阻大鼠的药效作用并探究作用机制。方法:50只SD大鼠随机分为空白对照组7只、假手术组11只及造模组32只。造模组大鼠采用半结扎法建立大鼠肠梗阻模型,除损耗外造模成功的大鼠随机分为模型组9只、大承气汤组8只和增味承气合剂组8只。大承气汤组和增味承气合剂组灌胃并在1 h后灌肠给予相应药物(1 mL/100 g),空白对照组、假手术组和模型组灌胃并在1 h后灌肠给予0.9%氯化钠注射液(1 mL/100 g),2次/d,共治疗11次,观察各组大鼠进食量;酶联免疫吸附测定(ELISA)检测各组大鼠血清中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平;苏木素-伊红(HE)染色观察回肠组织病理变化;实时荧光定量多聚核苷酸链式反应(QRT-PCR)检测回肠组织磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)mRNA、蛋白激酶B(Akt)mRNA、核因子 κ B(NF- κ B)mRNA表达水平;蛋白质印迹法(WB)检测PI3K、Akt、p-Akt、NF- κ B蛋白表达水平。结果:模型组与假手术组比较,大鼠进食量降低,回肠组织发生炎性病变,血清炎症因子水平、回肠组织PI3K、Akt、p-Akt、NF- κ B蛋白表达水平及PI3K mRNA、Akt mRNA、NF- κ B mRNA表达水平显著升高($P<0.05$);在治疗5 d后,大承气汤组和增味承气合剂组与模型组比较进食量、回肠组织病理变化均得到改善,血清炎症因子水平、回肠组织PI3K、p-Akt、NF- κ B蛋白表达水平及Akt mRNA、NF- κ B mRNA表达水平显著降低($P<0.05$),Akt蛋白和PI3K mRNA表达水平呈下降趋势,增味承气合剂组与大承气汤组各指标比较多无显著性差异,部分指标显著低于大承气汤组($P<0.05$)。结论:增味承气合剂能显著改善手术肠梗阻的表现,具有治疗肠梗阻的作用,可能通过调节PI3K/Akt/NF- κ B信号通路改善大鼠体内炎症环境达到治疗作用。

[关键词] 粘连性肠梗阻;增味承气合剂;药效学评价;作用机制;PI3K/Akt/NF- κ B信号通路;大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)10-0034-07

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.10.006

The Efficacy and Mechanism of Zengwei Chengqi Mixture (增味承气合剂) in Treating Intestinal Obstruction in Rats Based on PI3K/Akt/NF- κ B Pathway

GONG Ying¹, DONG Yue¹, LIU Yuchen¹, ZHANG Jinhui¹, XUAN Zihua¹,

LI Qing³, ZHANG Chunbin³, XIE Dongmei^{1,2}

(1.College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei Anhui 230012, China;

2.Institute of TCM Resources Protection and Development, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei Anhui 230012, China; 3.Chuzhou Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital,

Chuzhou Anhui 239000, China)

[Abstract] Objective: To explore the pharmacological effect of Zengwei Chengqi mixture on adhesive intestinal obstruction rats and investigate its mechanism of action. Methods: Totally 50 Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into blank control group ($n=7$), sham surgery group ($n=11$) and modeling group ($n=32$). The

*基金项目:滁州市科技计划项目(2021ZN006);安徽省高校科研计划项目团队项目(2022AH010036)

通信作者:谢冬梅,女,副教授,研究方向为中药资源与中药质量评价

rats in modeling group were used to establish an intestinal obstruction model via the semi-ligation method. Excluding those dead during the modeling process, the successfully modeled rats were randomly assigned to model group ($n=9$), Dachengqi decoction (大承气汤) group ($n=8$), and Zengwei Chengqi mixture group ($n=8$). Rats in the Dachengqi decoction group and Zengwei Chengqi mixture group received intragastric administration of the corresponding drugs, followed by enema administration of the same drugs at a dose of 1 mL/100 g 1 hour later. Rats in the blank control group, sham surgery group and model group were given 0.9% sodium chloride injection instead, with the same administration route (intragastric first, then enema 1 hour later) and dose (1 mL/100 g). The treatment was administered twice a day for a total of 11 times, and the food intake of rats in each group was observed throughout the period. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the serum of rats in each group. Hematoxylin eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes in ileal tissue. Quantitative real-time polymerase chain reaction (QRT-PCR) was used to detect the expression levels of PI3K mRNA, Akt mRNA and NF- κ B mRNA in ileal tissue. Western blotting (WB) was used to detect the expression levels of PI3K, Akt, p-Akt and NF- κ B proteins. Results: Compared with the sham surgery group, the model group showed a decrease in food intake and inflammatory lesions in the ileum tissue. The levels of serum inflammatory factors, protein expression of PI3K, Akt, p-Akt and NF- κ B, and expression of PI3K mRNA, Akt mRNA and NF- κ B mRNA in the ileum tissue were significantly increased in model group ($P<0.05$). After 5 days of intervention treatment, the food intake and pathological changes in the ileum tissue of Dachengqi decoction group and Zengwei Chengqi mixture group were improved compared with the model group. The levels of serum inflammatory factors, protein expression of PI3K, p-Akt and NF- κ B, and expression of Akt mRNA and NF- κ B mRNA expression in the ileum tissue were significantly reduced in Dachengqi decoction group and Zengwei Chengqi mixture group ($P<0.05$). The expression levels of Akt protein and PI3K mRNA showed a downward trend. There were no significant differences in various indicators between the Zengwei Chengqi mixture group and Dachengqi decoction group, while some indicators were significantly lower than those in the Dachengqi decoction group ($P<0.05$). Conclusion: Zengwei Chengqi mixture group can significantly improve the symptoms of surgical intestinal obstruction and has a therapeutic effect on intestinal obstruction. It may improve the inflammatory environment in rats by regulating the PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway.

[Keywords] adhesive intestinal obstruction; Zengwei Chengqi mixture; pharmacodynamic evaluation; mechanism; PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway; rat

肠梗阻(intestinal obstruction, IO)是常见的急腹症之一,常发生于术后老年群体,其中以腹腔粘连(包括手术、炎症等)为首要因素引发的粘连性肠梗阻(adhesive intestinal obstruction, AIO)最为常见^[1-2],临床常用经典名方大承气汤增减方进行治疗^[3-7]。滁州市中西医结合医院在临床治疗粘连性肠梗阻病例时,为避免手术治疗,减轻老年患者的痛苦和不便,在大承气汤的基础上不断探索,研制了临床经验方增味承气合剂[药物组成:厚朴、枳实、大黄(后下)、木香、火麻仁、黄芩、金银花、赤芍、桃仁、丹参、芒硝(冲服)],用于非手术治疗,疗效满意。该方在大承气汤的基础上增添了7味药,以中和药性,增强行气活血功效,使之更适合术后老年患者。由于传统汤剂煎煮耗时较长,考虑用药不便,故将其开发成院内制剂以便患者及时、便捷使用。合剂与汤剂比较,增加了抑菌剂等辅料,可长期保存,随用随取,工艺方法简便,方便服用和携带^[8-9],常用于院内口服制剂的开发,可避免汤剂煎煮操作繁琐、准备时间长等问题。该处方组成复杂,需考虑药味的添加是否会影响该方治疗肠梗阻的效果,同时还需对该复方治疗

肠梗阻的作用机制进行研究。

本研究采用半结扎法制备大鼠肠梗阻模型,以经典名方大承气汤为阳性对照,通过动物实验探究增味承气合剂的药效学差异。

1 材 料

1.1 实验动物 SPF级健康雄性SD大鼠50只,6周龄,体质量(200.00 ± 20.00)g,购于济南朋悦实验动物繁育有限公司,生产许可证号:SCXK(鲁)2019-0003,动物质量合格证号:370726220100245575。大鼠饲养于安徽中医药大学药学院动物室,相对湿度50%~70%,温度(25 ± 2)℃,昼夜12 h交替,分笼常规性饲养,自由饮水进食,定时通风换气。实验由安徽中医药大学实验动物伦理委员会批准,动物实验伦理证明号:2024010。

1.2 药物与试剂 增味承气方中饮片厚朴、枳实、大黄、木香、火麻仁、黄芩、金银花、赤芍、桃仁、丹参、芒硝等由滁州市中西医结合医院提供,并经安徽中医药大学谢冬梅副教授鉴定。苯甲酸钠(批号:20210823)和无水乙醇(批号:20160920)

均购于国药集团化学试剂有限公司;0.9%氯化钠注射液(江西科伦药业有限公司,批号:C23090703);4%多聚甲醛(北京兰杰柯科技有限公司,批号:71032700);白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(批号:JL2023120001)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)ELISA试剂盒(批号:JL2023110001)和肿瘤坏死因子- α (tumor Necrosis Factor- α , TNF- α)(批号:JL2023090001)均购于上海江莱生物科技有限公司;RIPA细胞裂解液(强)(批号:09271919023)、Western快速转膜液(批号:052223230928)和ECL超敏发光试剂盒(批号:23158476)均购于上海Beyotime生物技术有限公司;PVDF膜(美国Millipore公司,批号:0000185693);PBS缓冲液粉末(批号:22121401)、山羊抗小鼠免疫球蛋白(G, IgG)(批号:236000213)、山羊抗兔IgG(批号:234750414)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)(批号:200040908)均购于北京中杉金桥生物技术有限公司;预染蛋白Marker(赛默飞世尔科技公司,批号:91299553);磷脂酰肌醇-3-激酶p85(PI3 Kinase p85 alpha Rabbit mAb, PI3K p85)抗体(批号:N30JA0P)、苏氨酸蛋白激酶B(Akt Rabbit mAb, Akt)抗体(批号:N06MA8P)、磷酸化苏氨酸蛋白激酶B抗体[Phospho-Akt (Ser473) Rabbit mAb, p-Akt]抗体(批号:N30JA7P)和核因子 κ B(NF- κ B p65 Rabbit mAb, NF- κ B)抗体(批号:N15AP7P)均购于成都正能生物科技有限责任公司;RNA提取液(批号:G3013)、氯仿替代物(批号:G3014)、Water Nuclease-Free(批号:G4700)、RNA溶解液(批号:G3029)、SweScript All-in-One RT SuperMix for qPCR(One-Step gDNA Remover)(批号:G3337)和2 \times Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix(批号:G3326)均购于武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.3 主要仪器 SW-30Y09型煎药壶(浙江苏泊尔股份有限公司);YP-5102型电子分析天平(上海光正医疗仪器有限公司);IMS-20型自动制冰机(常熟市雪科电器有限公司);Centrifuge 5810 R多功能台式离心机(德国艾本德股份公司);EPS300型电泳仪、VE-180型电泳槽和VE-186型转膜仪均购于上海天能科技有限公司;JW-3021H型高速冷冻离心机(安徽嘉文仪器装备有限公司);TS-1000型水平摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);Master-S30 UF型纯水机(上海和泰仪器有限公司);Research plus型移液器(德国艾本德股份公司);JS-1070P型自动曝光仪(上海培清科技有限公司);KZ-5F-3D型三维冷冻研磨仪、SMV-3500型涡旋混匀仪、SMC-5000F型掌上离心机、FS-A20型封膜仪、SMP-2型微孔板离心机、PCR-9601-NS型PCR反应板、G6065型荧光定量PCR封板膜和PCR-02-FC型PCR反应管均购于武汉赛维尔生物科技有限公司;D3024R型台式高速冷冻型微量离心机[大龙兴创实验仪器(北京)股份公司];CFX ConnectTM荧光定量PCR仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司];ETC811型PCR仪(北京东胜创新生物科技有限公司)。

2 方 法

2.1 大鼠分组及肠梗阻模型的制备 50只雄性大鼠遵从随机、均衡原则分组,分为空白对照组7只、假手术组11只及造

模组32只。造模组大鼠参照文献[10-11]采用半结扎法制备肠梗阻大鼠模型,大鼠腹腔注射20%乌拉坦(0.5 mL/100 g)充分麻醉,备皮消毒后沿腹中线做约2.5 cm切口,小心取出大鼠胃肠道置于无菌洞巾上,自幽门至回盲部全肠段使用有齿镊每间隔约3 cm挤压3 s至出现点状淤痕,后使用生理盐水浸润的无菌棉签轻柔擦拭挤压3次,在距离回盲部3 cm处紧贴肠道置一中心静脉导管,使用3-0号手术线结扎后小心抽出中心静脉导管,将肠道理顺后归回腹腔内逐层缝合消毒。假手术组大鼠麻醉开腹后用针线穿透肠系膜但不结扎,空白对照组不做手术处理。术后间隔一天随机挑选肠梗阻模型大鼠及假手术组大鼠各4只,各均分为两组,一组参考文献[12]比较粪便量及含水率。另一组按剂量灌胃生理盐水炭末混悬液,20 min后将大鼠开腹剪取幽门至盲肠段小肠,无张力拉直后测量肠道全长 L_1 ;再测量炭末行进长度 L_2 ,计算大鼠肠道推进率(肠道推进率= $D=\frac{L_1}{L_2}\times 100\%$)以判断造模是否成功。

除损耗外,造模成功大鼠共计25只,分为模型组9只,大承气汤组8只,增味承气合剂组8只。

2.2 试药的制备 大承气汤:取单日处方枳实12 g、厚朴24 g加入10倍量清水共360 mL浸泡30 min,武火煎煮至微沸后文火煎煮30 min,共煎煮提取3次,每次均加入10倍量清水。提取完成后,合并滤液浓缩至200 mL左右,将大黄加入合并后滤液中继续煎煮10 min,不需额外加水,煎煮完成后兑入芒硝,溶解滤过并定容至200 mL,即得大承气汤试药,相当于含生药0.285 g/mL。

增味承气合剂:称取单日处方饮片(除大黄、芒硝外),与大承气汤提取工艺一致,兑入芒硝后再添加2.5%的苯甲酸钠,溶解滤过并定容至200 mL,即得增味承气合剂试药,相当于含生药0.615 g/mL。

2.3 给药及取材 大承气汤组和增味承气合剂组大鼠分别灌胃给药相应试药(1 mL/100 g)并在1 h后灌肠给药(1 mL/100 g)治疗,2次/d,共治疗11次。空白对照组、假手术组、模型组用0.9%氯化钠注射液(1 mL/100 g)灌胃结合灌肠治疗。

治疗10次后,禁食不禁水12 h,末次给药1 h后,大鼠麻醉后开腹,经腹主动脉取血置离心管中;取回盲部往幽门3 cm处一段回肠组织固定于4%多聚甲醛溶液用于苏木素-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色,另取同部位一段组织迅速装于离心管中,液氮速冻后保存于-80℃冰箱用于蛋白质印迹法(Western blotting, WB)和实时荧光定量多聚核苷酸链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, QRT-PCR)检测。

2.4 观察指标

2.4.1 通路筛选 基于网络药理学筛选增味承气方治疗肠梗阻的作用通路^[13]。将增味承气方除芒硝外10味中药的基因靶点和“肠梗阻”疾病靶点取交后,将交集基因导入Metascape数据库,物种选择为“Homo sapiens”对交集基因进行KEGG通路富集分析,结果按照P值大小降序排列。

2.4.2 大鼠进食量 固定给予所有大鼠200 g/d的饲料,给药治疗后,每日定时收集剩余饲料并计算平均进食量,比较造

模以及给药对大鼠进食量造成的影响。

2.4.3 大鼠血清指标检测 腹主动脉血室温下静置2 h,转移至4℃冰箱4 h, Centrifuge 5810 R, A-4-81水平转子 $r \approx 16.8$ cm, 3 000 r/min离心15 min分离上层血清,采用酶联免疫吸附测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量,实验操作严格按照试剂盒说明书进行,采用酶标仪法进行检测,每份血清样品平行检测3次。

2.4.4 回盲部病理变化 回肠组织经乙醇脱水、石蜡包埋、切片,经HE染色后,使用CaseViewer软件观察肠道组织病理改变^[14]。

2.4.5 实时荧光定量PCR检测回肠组织中PI3K mRNA、Akt mRNA、NF- κ B mRNA表达水平 使用氯仿替代物提取回肠组织的总RNA并稀释至200 ng/ μ L,使用逆转录试剂盒以20 μ L反应体系制样,于普通PCR仪上完成逆转录,程序设置:25℃ 5 min, 42℃ 30 min, 85℃ 5 s。cDNA于荧光定量PCR仪上完成扩增,反应体系如下:(1)第一阶段:95℃, 30 s预变性;(2)第二阶段:95℃, 30 s预变性, 60℃, 30 s退火/延伸, 40个循环;(3)溶解曲线阶段:65℃ \rightarrow 95℃, 每升温0.5℃, 采集一次荧光信号。以GAPDH基因为内参,采用2^{- $\Delta\Delta$ CT}法计算各目的基因相对表达量,实验所用引物由武汉赛维尔生物科技有限公司合成,引物序列见表1。

表1 引物序列

目的基因	序列(5'→3')	扩增产物长度/bp
GAPDH	上游:CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	下游:GGTGAAGAATGGGAGTTGCT	
PI3K	上游:AGGATGCTGCGTTAGGGCTT	219
	下游:GCACAGTCCATCCTTTGTCCCT	
Akt	上游:CGCTTCTTTGCCAACATCG	217
	下游:CACTGGCTGAGTAGGAGAACTGG	
NF- κ B	上游:AACGCAAAAGGACCTACGAGA	156
	下游:TTGAAAAGGCATAGGGCTGG	

2.4.6 Western blotting检测回肠组织中PI3K、Akt、p-Akt、NF- κ B蛋白表达水平 回肠组织加入RIPA细胞裂解液JW-3021H, H0224角转子 $r \approx 11.6$ cm, 12 000 r/min离心5 min,收集上清液后,采用BCA法测定蛋白浓度,定量后SDS-PAGE胶80 V恒压电泳1 h左右,转膜后加入5%脱脂奶粉室温封闭2 h,

加入稀释后的一抗PI3K p85、Akt、phospho-Akt、NF- κ B p65 (1:1 000) 4℃缓慢摇动孵育过夜, PBST洗涤后,使用辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:20 000)室温孵育1.2 h,显色成像后,使用Image J软件进行条带的分析。

2.5 统计学方法 使用SPSS 26.0软件进行统计分析,使用GraphPad Prism 9.0.0软件进行绘图,本研究计量资料均符合正态分布,以“均数 \pm 标准差”($\bar{x} \pm s$)表示,组间结果进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 通路筛选结果 通过整理平台和文献收录的数据,共收集除矿物药芒硝外共228种化合物, 576个成分基因靶点, 2 041个“肠梗阻”疾病靶点,取交集共计得到420个增味承气合剂治疗肠梗阻的潜在靶点;共确定227个KEGG条目($P < 0.01$),结果显示,癌症通路(pathways in cancer)、脂质与动脉粥样硬化信号通路(lipid and atherosclerosis)、PI3K-Akt信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)等为主要涉及通路, AKT1、PIK3R1、PIK3CD等为该方作用在通路上的核心靶点^[15]。(见表2)

3.2 大鼠进食量变化趋势 空白对照组5 d平均进食量均高于其他四组,其次是假手术组。由于麻醉及开腹,假手术组大鼠第1天的进食量低于空白对照组,但高于3个造模组;第2天起,假手术组与空白对照组大鼠的进食量差异逐渐缩小;3个造模组在第1天统计时进食量几乎没有差别,开始给药后,大承气汤组和增味承气合剂组大鼠进食量均升高,与假手术组的差异逐渐减小;模型组大鼠5 d平均进食量均为最低,推测原因为梗阻后大鼠无法排便导致进食量减少,而2个给药组在给药后,梗阻情况得到缓解,因此进食量提升。(见图1)

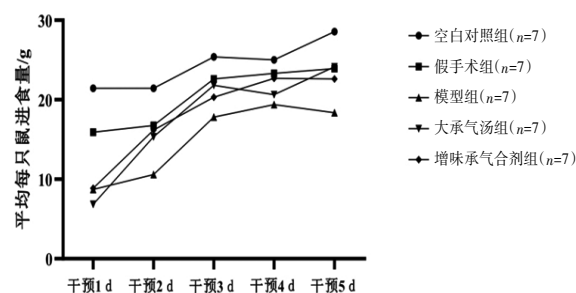


图1 各组大鼠进食量比较统计图

表2 成分-疾病交集靶点的 KEGG 信号通路 (前10条)

序号	通路	富集倍数	P	基因数
1	癌症通路(Pathways in cancer)	93.81	1.55*10 ⁻⁹⁴	108
2	脂质与动脉粥样硬化(Lipid and atherosclerosis)	64.60	2.52*10 ⁻⁶⁵	63
3	PI3K-Akt信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)	51.08	8.25*10 ⁻⁵²	64
4	卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染(Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection)	49.45	3.52*10 ⁻⁵⁰	51
5	癌症中的蛋白多糖(Proteoglycans in cancer)	48.11	7.85*10 ⁻⁴⁹	51
6	前列腺癌(Prostate cancer)	47.93	1.16*10 ⁻⁴⁸	40
7	AGE-RAGE信号通路在糖尿病并发症中的作用(AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)	47.28	5.30*10 ⁻⁴⁸	40
8	乙型肝炎(Hepatitis B)	44.81	1.55*10 ⁻⁴⁵	45
9	MAPK信号通路(MAPK signaling pathway)	43.37	4.25*10 ⁻⁴⁴	54
10	EGFR酪氨酸激酶抑制剂耐药性(EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance)	41.56	2.77*10 ⁻⁴²	34

3.3 血清指标检测 与空白对照组大鼠比较,假手术组IL-1 β 、IL-6及TNF- α 水平均无明显差异($P>0.05$);模型组IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平均显著高于假手术组($P<0.01$);与模型组比较,大承气汤组与增味承气合剂组IL-1 β 、IL-6及TNF- α 水平均显著低于模型组($P<0.01$);增味承气合剂组与大承气汤组比较,IL-1 β 、IL-6水平均无显著性差异($P>0.05$),增味承气合剂组TNF- α 水平显著低于大承气汤组($P<0.01$)。(见表3)

表3 各组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 水平 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-1 β /(ng/L)	IL-6/(pg/mL)	TNF- α /(ng/L)
空白对照组	7	86.47 \pm 3.34 ^b	83.57 \pm 6.18 ^b	196.56 \pm 14.75 ^b
假手术组	7	83.50 \pm 6.99 ^b	81.33 \pm 8.15 ^b	193.90 \pm 26.63 ^b
模型组	9	144.05 \pm 8.96 ^a	173.49 \pm 5.10 ^a	334.24 \pm 13.26 ^a
增味承气合剂组	8	107.44 \pm 6.22 ^{bc}	134.26 \pm 10.32 ^{bc}	231.44 \pm 13.13 ^{bc}
大承气汤组	8	114.30 \pm 7.22 ^b	138.89 \pm 5.28 ^b	283.68 \pm 11.12 ^b
<i>F</i>		74.933	169.487	80.505
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与大承气汤组比较,^c $P>0.05$ 。

3.4 病理切片观察 空白对照组回肠黏膜结构正常,隐窝边界清晰、排列整齐,偶见炎症细胞浸润。假手术组大鼠与空白对照组比较无明显变化。模型组大鼠与空白对照组和假手术组比较,浆膜层和肌层水肿充血,出现红细胞浸润,隐窝水肿、结构破损,细胞流出。增味承气合剂组大鼠与模型组比较结构完整,隐窝排列整齐;与空白对照组比较浆膜层和肌层水肿;但与大承气汤组比较,肌层水肿现象有改善,偶见炎性细胞浸润。大承气汤组大鼠与增味承气合剂组情况类似,与模型组比较,回肠结构完整,隐窝排列整齐清晰;跟空白对照组比较,浆膜层和肌层仍有水肿加厚现象,偶见炎性细胞浸润。(见图2)

3.5 回肠组织中PI3K mRNA、Akt mRNA、NF- κ B mRNA表达水平 假手术组大鼠与空白对照组比较无明显差异;与假手术组比较,模型组PI3K mRNA表达水平呈上升趋势,Akt mRNA和NF- κ B mRNA表达水平显著升高;给药治疗后,增味承气合剂组和大承气汤组PI3K mRNA表达水平呈下降趋势,Akt mRNA和NF- κ B mRNA表达水平均显著性下降;与大承气汤组比较,增味承气合剂组PI3K mRNA、Akt mRNA表达水平无显著性差异,而NF- κ B mRNA表达水平显著低于大承气汤组,提示半结扎法造大鼠肠梗阻模型促进了PI3K mRNA、Akt mRNA和NF- κ B mRNA的表达,在给药增味承气合剂治疗后,抑制了该通路的激活,增味承气合剂与大承气汤比较同样具

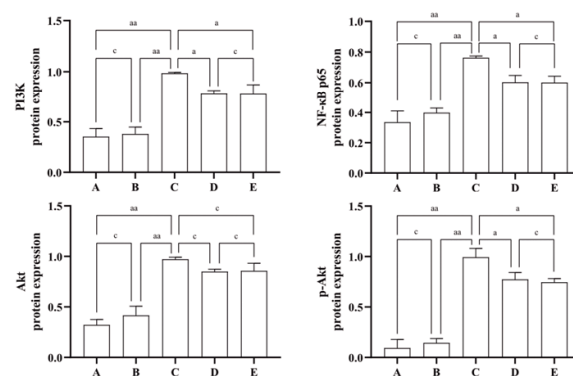
有治疗肠梗阻的药效,且效果更好。(见表4)

表4 各组大鼠回肠组织 PI3K mRNA、Akt mRNA、NF- κ B mRNA 表达水平 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	PI3K mRNA	Akt mRNA	NF- κ B mRNA
空白对照组	7	0.95 \pm 0.14	1.01 \pm 0.13	1.00 \pm 0.17
假手术组	7	0.92 \pm 0.08	0.43 \pm 0.30	1.21 \pm 0.38
模型组	9	1.67 \pm 0.33 ^a	2.04 \pm 0.23 ^a	2.54 \pm 0.05 ^a
增味承气合剂组	8	0.83 \pm 0.18 ^{bc}	0.11 \pm 0.08 ^{bc}	0.20 \pm 0.20 ^b
大承气汤组	8	1.27 \pm 0.38	0.62 \pm 0.12 ^b	1.21 \pm 0.17 ^b
<i>F</i>		6.641	46.498	43.531
<i>P</i>		0.007	0.000	0.000

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与大承气汤组比较,^c $P>0.05$ 。

3.6 回肠组织中PI3K、Akt、p-Akt、NF- κ B蛋白表达水平 与空白对照组大鼠比较,假手术组4个指标均无显著性差异($P>0.05$),说明手术对实验的影响不大;模型组的4个指标蛋白表达量均显著高于空白对照组和假手术组,提示半结扎法造成的大鼠肠梗阻调控了回肠组织PI3K、Akt、p-Akt、NF- κ B蛋白的升高($P<0.01$);给药治疗后,与模型组大鼠比较,增味承气合剂组和大承气汤组PI3K、NF- κ B和p-Akt蛋白的表达量均显著下降($P<0.05$),Akt蛋白呈现下降趋势($P>0.05$),提示给药治疗抑制了该通路上蛋白的表达;增味承气合剂组大鼠与大承气汤组比较,4个指标均无显著性差异($P>0.05$),提示二者均具有改善肠梗阻的药效,且可调控PI3K/Akt/NF- κ B通路相关蛋白的表达。(见图3~4)



注:A.空白对照组;B.假手术组;C.模型组;D.增味承气合剂组;E.大承气汤组。与模型组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;组间没有显著性差异,^c $P>0.05$ 。

图3 各组大鼠回肠组织 PI3K、Akt、p-Akt、NF- κ B 蛋白表达水平

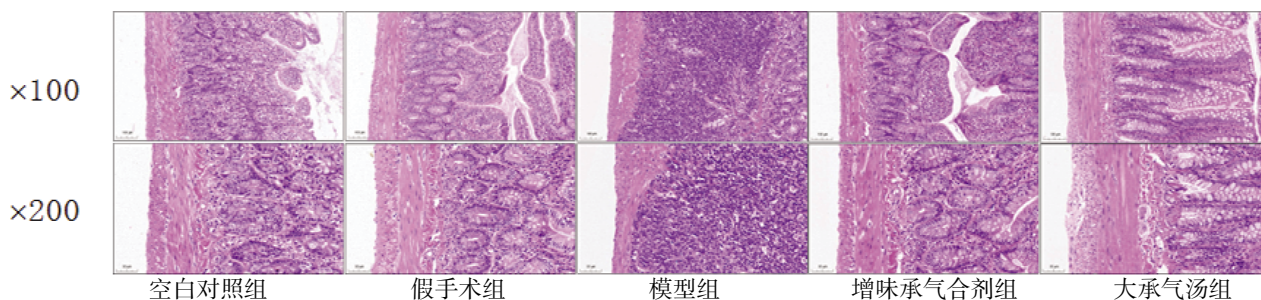
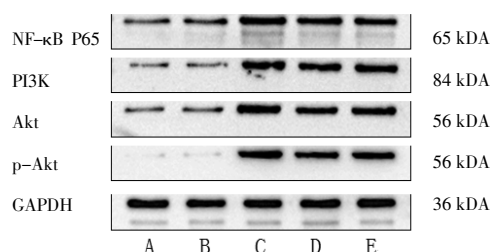


图2 大鼠回肠组织病理图 (HE)



注:A.空白对照组;B.假手术组;C.模型组;D.增味承气合剂组;E.大承气汤组。

图4 各组大鼠回肠组织 PI3K、Akt、p-Akt、NF-κB 蛋白条带图

4 讨 论

4.1 剂型的选择 医院制剂需在保证药效的前提下,尽可能便利患者使用。增味承气汤含先煎、后下及冲服,且给药途径包含口服及灌肠,因此,在考虑医院制剂常见剂型后,排除不易灌肠的颗粒剂、胶囊剂等,选择制备简单便于携带的合剂作为目标剂型^[15-16]。前期研究根据正交实验结果确定了处方的制备工艺并结合药典规定和临床使用确定了防腐剂的使用。增味承气合剂考虑到术后肠梗阻多发生于老年人群中,矫味剂或影响老年人血糖等指标,故暂未考虑矫味剂的使用。本研究既讨论了更改剂型的药效等效性,也以经典名方大承气汤作为阳性对照,讨论新药味的加入是否会影响处方治疗肠梗阻的药效。

4.2 动物模型及检测指标的选择 肠梗阻多发生于手术后,故多采用手术造模法进行大鼠肠梗阻模型的建立。研究表明过量盐酸洛哌丁胺可诱发便秘以造成梗阻^[17],亦有研究证实了不同处理方式对大鼠肠梗阻模型的影响^[18]。本课题前期实验对几种不同造模方式进行了对比,盐酸洛哌丁胺虽可造成小鼠便秘,但其机制为激动肠壁的 μ -阿片受体,可抑制肠道平滑肌的收缩,减少肠蠕动,导致肠梗阻的复现性不高,橡胶管法与半结扎法比较,操作又更为繁琐,综合考虑选择半结扎法造大鼠肠梗阻模型。该临床经验方在治疗肠梗阻方面具有较好的临床效果,前期实验对增味承气合剂低、中、高剂量(3.075、6.150、12.300 g/kg)进行了药效学评价。结果表明,该处方低剂量具有较好的改善作用,高剂量具有稳定的安全性。

肠梗阻的发病机制虽未被完全阐述,但与炎症密切相关^[18]。本课题前期网络药理学分析后发现增味承气合剂治疗肠梗阻涉及多条通路,其中PI3K/Akt信号通路是一条经典炎症通路,可介导炎症的反应发生和发展^[19],故选择该条通路对增味承气合剂治疗肠梗阻的作用机制展开研究。PI3K/Akt信号通路可通过调节下游多种蛋白质降低机体炎症因子的表达,介导炎症反应^[20],提示增味承气合剂或可通过降低指标血清炎症因子,抑制炎症反应等治疗肠梗阻。因此,本次实验选择血清炎症因子水平和回盲部病理切片作为检测指标来验证将该方更改剂型为合剂是否会降低其治疗肠梗阻的药效。

IL-6是维持体内平衡的典型细胞因子。当体内环境失衡或组织损伤破坏时,IL-6会立即产生,并通过刺激急性期应答、造血和免疫反应来帮助宿主防御这种突发的压力^[21]。亦有研究表明,结肠炎患者体内IL-6表达量显著升高^[22]。IL-1 β 是由先天免疫系统的细胞产生的有效促炎细胞因子,在机体受到

外界刺激时,可诱导IL-1 β 的生成^[23]。TNF- α 主要由活化的巨噬细胞和T淋巴细胞产生,于1975年被鉴定为内毒素诱导的糖蛋白,在炎性和感染性疾病中发现TNF- α 水平升高,并且水平与感染的严重程度相关^[24]。TNF又可在炎症环境中诱导程序性坏死^[25]。前期研究推测在AIO相关症状出现时,实验大鼠体内的IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平将高于正常大鼠,而给药后,抑制了相关炎症反应,改善了大鼠体内炎症环境,该三种血清炎症因子的水平应当降低。这三种炎症因子受PI3K/Akt信号通路调控^[26],PI3K/Akt信号通路由有磷酸化磷脂酰肌醇3羟基的脂类激酶活性的PI3K及下游Akt组成。PI3K对细胞的凋亡、焦亡、自噬、氧化应激等途径有关键的作用,活化后经磷酸化Akt磷酸化位点Ser473和Thr308而激活Akt,调控下游多种蛋白质如mTOR、NF- κ B等,参与调节细胞存活、增殖、凋亡以及血管生成等^[27],从而降低机体炎症因子的表达,介导炎症反应。亦有学者研究表明,药物通过调控PI3K/Akt信号通路改善大鼠胃肠道炎症反应^[28-30]。

4.3 结果的讨论 进食量结果提示给药具有一定改善大鼠进食的效果。病理切片和血清指标检测结果提示,给药5 d后大鼠病情虽好转但未痊愈,故临床使用时还需要辅助后期协助治疗与调整。QRT-PCR和WB结果提示,增味承气合剂通过抑制PI3K/Akt/NF- κ B通路达到改善大鼠肠梗阻的效果。WB实验结果中p-Akt蛋白表达量的下降可能是基于Akt蛋白的下降,而较Akt结果与模型组比较显著性更高则可能由于上游PI3K激活后促进Akt磷酸化进一步调控下游NF- κ B所导致;而增味承气合剂组与大承气汤组比较,结果普遍无显著性差异,少数指标显著低于大承气汤组,提示该处方具有较强的降低血清炎症反应的能力。

以上3个指标显示假手术组和空白对照组之间均没有显著性差异,说明开腹并非造成肠梗阻的原因,机械造模才是造成肠梗阻的原因,排除了开腹和麻醉对实验的影响,也提示开腹后造成肠壁机械损伤以及粘连是进行大鼠肠梗阻造模的有效方式。

综上所述,增味承气合剂具有改善术后肠梗阻的药效,同时,提示了该复方可通过抑制PI3K/Akt/NF- κ B通路的活化改善大鼠体内炎症环境,抑制炎症反应从而减轻术后肠梗阻症状。后续实验也将就这一方向深入探索,并对该复方血清药物化学展开研究,以期阐明增味承气合剂物质基础及作用规律。

参考文献

- [1] 程华初,徐琦,杨茜芸,等.大承气汤对不完全性肠梗阻模型大鼠回盲部组织病理改变的影响及作用机制研究[J].湖南中医药大学学报,2021,41(11):1669-1675.
- [2] GHIMIRE P, MAHARJAN S. Adhesive small bowel obstruction: A review[J]. JNMA J Nepal Med Assoc, 2023,61(260):390-396.
- [3] 闫富俊,王培养.大承气汤加减治疗肠梗阻患者疗效及对胃肠功能的影响[J].中国肛肠病杂志,2023,43(4):21-23.
- [4] 卓海文,陈凤英,严海燕,等.大承气汤治疗剖宫产术后肠梗阻的临床效果[J].中外医学研究,2021,19(25):135-137.

- [5] 欧阳晓霞,吴华.大承气汤加减联合西医治疗肠梗阻的效果分析[J].中国现代药物应用,2023,17(2):6-10.
- [6] 程华初,徐琦,杨茜芸,等.大承气汤治疗肠梗阻的临床研究进展[J].中医药导报,2021,27(11):142-146.
- [7] 孔祥辉.大承气汤治疗外科术后早期炎症性肠梗阻的临床效果观察[J].北方药学,2023,20(12):62-64.
- [8] 任龙艳,杨亮,曾真,等.益肾结透合剂制备工艺研究和验证[J].贵州科学,2024,42(6):41-45.
- [9] 李力,何靓,刘蔚,等.清血解毒合剂的制备工艺及质量标准研究[J].湖北中医药大学学报,2023,25(4):33-37.
- [10] 李兴海,李萌,刘仕杰,等.乌司他丁对粘连性肠梗阻大鼠的作用机制研究[J].解放军医药杂志,2022,34(1):14-18.
- [11] YUAN M L, YANG Z, LI Y C, et al. Comparison of different methods of intestinal obstruction in a rat model[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(5):692-705.
- [12] 李禹呈,杨拯,袁梦郎,等.新方法建立大鼠不完全性肠梗阻模型的实验研究[J].四川动物,2013,32(2):276-279, 156.
- [13] 龚颖,董越,张春彬,等.基于网络药理学和动物实验探讨增味承气方治疗肠梗阻作用机制[J/OL].亚太传统医药, 2025:1-9[2025-07-12].<https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CJFD&dbname=CJFD&filename=YTCT20250701008>.
- [14] 李敏,林思思,刘胜远,等.中药大承气汤改良方对术后肠梗阻小鼠胃肠功能的影响及机制研究[J].中国病理生理杂志,2021,37(3):466-474.
- [15] 文建文,孙雪林,徐奎,等.通痹止痛合剂工艺优化和质量标准的研究[J].中国民族民间医药,2025,34(2):65-69.
- [16] 贾传春,马力.中药合剂制备工艺探讨[J].基层中药杂志, 1995,9(2):15-16.
- [17] 王鹤.盐酸洛哌丁胺致老年腹泻患者肠梗阻1例[J].中华保健医学杂志,2011,13(4):294.
- [18] 于林枫,朱安龙.术后麻痹性肠梗阻的发病机制及防治策略[J].医学综述,2019,25(23):4716-4719,4725.
- [19] 颜帅,汪小辉,王晓鹏,等.大黄-桃仁配伍对粘连性肠梗阻大鼠炎性细胞因子及肠黏膜屏障的影响[J].国际中医
- 中药杂志,2021,43(2):150-155.
- [20] 邱佳惠,陈萌.基于PI3K/Akt信号通路探索“化瘀通便汤”对慢传输型便秘模型大鼠的作用机制[J].江苏中医药, 2025,57(8):70-75.
- [21] TANAKA T, NARAZAKI M, KISHIMOTO T. Interleukin (IL-6) immunotherapy[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018, 10(8):a028456.
- [22] 赵菲菲,高会芳,杨桂玲.D-二聚体和白细胞介素-6在溃疡性结肠炎患者中的表达及其与肠道菌群的相关性研究[J].中国肛肠病杂志,2025,45(1):44-47.
- [23] LOPEZ-CASTEJON G, BROUGH D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2011, 22(4):189-195.
- [24] BRADLEY J R. TNF-mediated inflammatory disease[J]. J Pathol, 2008, 214(2):149-160.
- [25] JAYARAMAN A, HTIKE T T, JAMES R, et al. TNF-mediated neuroinflammation is linked to neuronal necroptosis in Alzheimer's disease hippocampus[J]. Acta Neuropathol Commun, 2021, 9(1):159.
- [26] 钟佳琳,郑立,贺花,等.PI3K/Akt信号通路相关的生物学调控机制研究进展[J].基因组学与应用生物学,2019,38(1):143-147.
- [27] 徐利本,吴朝阳,王远东.PI3 K/Akt信号传导通路在肿瘤发生发展及治疗中的作用[J].现代肿瘤医学,2021,29(1):177-180.
- [28] 沈浩伟,夏长军,陈剑,等.黄芪多糖通过PI3K-Akt信号通路对大鼠术后肠梗阻的改善作用[J].世界中西医结合杂志,2023,18(5):915-918,923.
- [29] 曹婷婷,郑东林,商磊凌,等.肠病药方调控PI3K/AKT/NF- κ B信号通路改善溃疡性结肠炎的研究[J].贵州医科大学学报,2024,49(5):672-677.
- [30] 程扬,宾东华,尹园缘,等.参苓白术散对克罗恩病大鼠肠道炎症及PI3K/Akt信号通路的影响[J].中医药导报,2024, 30(4):30-34.

(收稿日期:2025-01-13 编辑:时格格)

(上接第33页)

- [23] WANG T, LI M M, DONG Z, et al. P3H4 Regulates apoptosis and autophagy of breast cancer cells via BCL-2/BAX/Caspase-3 and AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathways[J]. Molecular Biology, 2024, 58(4):646-657.
- [24] MARCONDES-DE-CASTRO I A, REIS-BARBOSA P H, MARINHO T S. AMPK/mTOR pathway significance in healthy liver and non-alcoholic fatty liver disease and its progression [J]. Journal of gastroenterology and hepatology, 2023, 38(11):1868-1876.
- [25] CHEN Y F, QIU Q, WANG L, et al. Quercetin ameliorates myocardial injury in diabetic rats by regulating autophagy and apoptosis through AMPK/mTOR signaling pathway[J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2024, 52(3):841-864.
- [26] 马金苗,项志兵,朱杰,等.附黄汤改善心力衰竭大鼠的心室重构:基于抑制AMPK/mTOR通路介导的细胞自噬[J].南方医科大学学报,2023,43(3):466-473.

(收稿日期:2025-01-02 编辑:李海洋)