

党参含药血清通过调控 miR-21/PTEN 轴改善溃疡性结肠炎

王春霞¹, 杨洁², 史奇¹, 李芳¹, 陈正君¹, 杨彦平¹, 冯永辉³, 杨扶德^{1*}

1. 甘肃中医药大学药学院, 甘肃 兰州 730000

2. 北京中医药大学东直门医院, 北京 276000

3. 西安医学院药学院, 陕西 西安 100700

摘要: 目的 探讨党参含药血清 (Codonopsis Radix containing serum, CRCS) 对溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 体外模型炎症因子释放及上皮细胞过度凋亡的作用机制。方法 借助生物信息学分析工具预测调控磷酸酶和张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homolog, PTEN) 上游 miRNA, 采用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 5% 2,4,6-三硝基苯磺酸 (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid solution, TNBS) /乙醇复合溶液灌肠诱导的 UC 大鼠模型结肠组织中 PTEN mRNA 和蛋白表达水平, 以及 miR-21、miR-30a-3p、miR-198、miR-152-3p、miR-301a-3p、miR-320、miR-3691-5p 表达变化。10 μg/mL 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导人正常结肠上皮 NCM460 细胞构建 UC 体外模型, 给予 1%、2%、4%、6%、8% CRCS 干预 24 h, 利用 CCK-8 法检测细胞活力。分别转染 miR-21 模拟剂 (miRNA-21 mimics、miR-21 mimics) 与 miR-21 抑制剂 (miRNA-21 inhibitor、miR-21 inhibitor) 至模型细胞, 给予 6% CRCS 完全培养基培养 24 h, 采用 ELISA 检测各组白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-17、IL-1β、IL-8、核因子-κB (nuclear factor-κB, NF-κB) 和肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) 水平; qRT-PCR 检测各组 miR-21 表达; Western blotting 检测 PTEN、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax)、剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cysteine-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3) 和磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 通路相关蛋白的表达。通过生物信息学预测 miR-21 与 PTEN 结合位点, 并采用双荧光素酶报告基因检测系统验证 CRCS 干预后 miR-21 对 PTEN 的靶向作用。结果 生物信息学共筛选出 7 个可能靶向 PTEN 的 miRNA, 其中党参干预后 miR-21 表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 而 miR-30a-3p、miR-198、miR-152-3p、miR-301a-3p、miR-320 及 miR-3691-5p 表达变化均无统计学意义。CCK-8 结果表明, 2%、4%、6%、8% CRCS 均可显著提高细胞活力 ($P < 0.01$)。与模型组比较, CRCS 和 miR-21 inhibitor 可显著上调细胞内 PTEN 和 Bcl-2 蛋白表达水平 ($P < 0.01$), 并降低 miR-21、Bax、cleaved Caspase-3、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 表达水平 ($P < 0.01$); 与 CRCS 组比较, miR-21 mimics 可显著削弱 CRCS 对 PTEN 和 Bcl-2 表达的上调作用 ($P < 0.01$), 以及对 miR-21、Bax、cleaved Caspase-3、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 表达的下调作用 ($P < 0.05$ 、0.01)。双荧光素酶报告实验结果显示, 在转染 wt-Luc-PTEN 质粒细胞中, CRCS 干预后可显著提高荧光素酶活性 ($P < 0.01$), miR-21 mimics 可显著降低荧光素酶活性 ($P < 0.05$), 联合处理时, miR-21 mimics 可部分削弱 CRCS 对荧光素酶活性升高的作用 ($P < 0.01$); 在转染 mut-Luc-PTEN 质粒细胞中, CRCS 干预及 miR-21 mimics 均未引起荧光素酶活性显著变化。结论 CRCS 可通过抑制促炎因子释放及上皮细胞过度凋亡缓解 UC, 其机制至少部分依赖于 miR-21/PTEN/PI3K/Akt 轴。

关键词: 党参; 溃疡性结肠炎; 上皮细胞过度凋亡; miR-21/PTEN 轴; PI3K/Akt 通路; 党参炔苷

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)05-1773-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.05.016

Codonopsis Radix containing serum improves ulcerative colitis by regulating miR-21/PTEN axis

WANG Chunxia¹, YANG Jie², SHI Qi¹, LI Fang¹, CHEN Zhengjun¹, YANG Yanping¹, FENG Yonghui³, YANG Fude¹

1. School of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 276000, China

收稿日期: 2025-11-18

基金项目: 科技部国家重点研发计划项目 (2018YFC1706305); 甘肃省重点研发计划-社会发展类 (23YFFA0069); 甘肃省中医药研究中心开放课题 (zyzx-2023-10); 西北营养与环境相关疾病中医药防控协同创新中心 2025 年度开放基金课题 (ZYXT-25-04); 兰州市科技计划项目 (2024-9-78); 甘肃省优秀研究生“创新之星”项目 (2026CXZX-924)

作者简介: 王春霞, 博士研究生, 主要从事中药品质研究。E-mail: 1463120326@qq.com

*通信作者: 杨扶德, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药品质及中药材规范化栽培研究。E-mail: gszyfyd@163.com

3. School of Pharmacy, Xi'an Medical University, Xi'an 100700, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Dangshen (*Codonopsis Radix*) containing serum (CRCS) on inflammatory factors release and epithelial cell excessive apoptosis *in vitro* model of ulcerative colitis (UC). **Methods** Bioinformatics analysis tools were used to predict and regulate the upstream miRNAs of phosphatase and tensin homolog (PTEN). qRT-PCR and Western blotting were used to detect the mRNA and protein expression levels of PTEN and the expressions of *miR-21*, *miR-30a-3p*, *miR-198*, *miR-152-3p*, *miR-301a-3p*, *miR-320* and *miR-3691-5p* in colon tissues of UC rats model induced by enema 5% 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid solution (TNBS)/ethanol composite solution. Lipopolysaccharide (LPS, 10 µg/mL) was used to induce human normal colon epithelial NCM460 cells to construct an *in vitro* model of UC, 1%, 2%, 4%, 6% and 8% CRCS intervention was administered for 24 h. The cell viability was detected by CCK-8 method. Subsequently, miR-21 mimics and miR-21 inhibitor were transfected into model cells, respectively, which were cultured in 6% CRCS complete medium for 24 h. The levels of inflammatory factors interleukin-6 (IL-6), IL-17, IL-1β, IL-8, nuclear factor-κB (NF-κB) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in each group were detected by ELISA. The expression of *miR-21* in each group was detected by qRT-PCR. Western blotting was used to detect the expressions of PTEN, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), cleaved cystein-aspartate protease-3 (cleaved Caspase-3) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) pathway related proteins. The binding sites of miR-21 and PTEN were predicted by bioinformatics, and the targeting effect of miR-21 on PTEN was verified by dual luciferase reporter gene detection system. **Results** A total of seven miRNAs that may target PTEN were screened by bioinformatics analysis. Among them, the expression of *miR-21* was decreased significantly after CRCS intervention ($P < 0.01$), while the expressions of *miR-30a-3p*, *miR-198*, *miR-152-3p*, *miR-301a-3p*, *miR-320* and *miR-3691-5p* had no statistical significance. The results of CCK-8 showed that 2%, 4%, 6% and 8% CRCS could significantly improve cell viability ($P < 0.01$). Compared with model group, CRCS and miR-21 inhibitor increased the expression levels of PTEN and Bcl-2 proteins in cells ($P < 0.01$), and decreased the expression levels of *miR-21*, Bax, cleaved Caspase-3, p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt ($P < 0.01$). Compared with CRCS group, miR-21 mimics significantly attenuated the up-regulation of PTEN and Bcl-2 expressions by CRCS ($P < 0.01$) and the down-regulation of *miR-21*, Bax, cleaved Caspase-3, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt expressions ($P < 0.05, 0.01$). The results of dual luciferase reporter assay showed that in the transfected wt-Luc-PTEN plasmocytes, CRCS intervention could significantly increase luciferase activity ($P < 0.01$), and miR-21 mimics could significantly reduce luciferase activity ($P < 0.01$). In the combined treatment, miR-21 mimics could partially weaken the effect of CRCS on luciferase activity ($P < 0.01$). In transfected mut-Luc-PTEN plasmocytes, CRCS intervention and miR-21 mimics did not cause significant changes in luciferase activity. **Conclusion** CRCS could alleviate UC by inhibiting pro-inflammatory factors release and excessive apoptosis of epithelial cells. The mechanism is at least partially dependent on miR-21/PTEN/PI3K/Akt axis.

Key words: *Codonopsis Radix*; ulcerative colitis; epithelial cell excessive apoptosis; miR-21/PTEN axis; PI3K/Akt pathway; lobetyolin

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是结肠黏膜特发性、慢性炎症性疾病, 以复发缓解型黏膜炎性损伤为病理特征, 黏液脓血便为典型临床症状^[1]。目前, 主要以氨基水杨酸作为轻中度 UC 的主要治疗选择^[2], 对氨基水杨酸治疗效果不佳的轻度至中度患者可口服皮质类固醇缓解临床症状^[3], 免疫抑制剂主要用于中重度 UC 患者, 但临床数据显示其缓解率不超过 30%^[4]。其中多达 15% 的 UC 患者需要进行结肠切除术^[1], 尽管结肠切除术有可能治愈 UC, 但大便失禁^[5]、肠梗阻^[6]、生育能力下降^[7]和性功能障碍^[8]等术后并发症多发, 严重影响患者生活质量。众多研究将组织学愈合作为 UC 最终的治疗目标^[9]。因此, 寻求标本兼治、通过全身调节促进结肠黏膜组织愈合的治疗方法至关重要。中医药强调整体观与辨证论治, 其通过多靶点、多途径的协同作用, 在调节全身功能状态、扶正祛邪以谋求长效根治方面, 展现

出独特的诊疗优势, 为现代复杂疾病的防治提供了重要视角。UC 作为一种难治性炎症性肠病, 其发病机制复杂, 亟待从整体调节角度探寻有效治疗方案。党参 *Codonopsis Radix*, 味甘性平, 功擅健脾益气、养血生津, 是临床常用的补气要药。数据挖掘显示, 其在 UC 复方中的用药频次高达 118 次^[10], 提示其为治疗 UC 的潜力中药。

UC 发病机制复杂, 普遍认为其与黏膜屏障缺陷、免疫反应失调和菌群失调密切相关^[11]。其中, 上皮细胞过度凋亡是黏膜屏障缺陷的重要诱因^[12]。在正常生理条件下, 肠上皮是肠腔细菌和黏膜免疫细胞之间的物理生化屏障, 然而, 上皮细胞过度凋亡会破坏肠道屏障完整性, 从而增加肠道通透性, 使细菌从肠腔浸润到肠壁, 引发炎症级联反应导致 UC^[13-14]。因此, 抑制上皮细胞过度凋亡被认为是防止 UC 相关肠道屏障损伤的潜在策略。磷脂酰肌醇

3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路可整合多种受体传递的外源刺激, 通过调控细胞存活、生长、增殖及凋亡维持组织稳态^[15]。此外, 该通路在调控 UC 肠上皮细胞凋亡方面具有关键作用, 靶向抑制 PI3K/Akt 可有效防止 2,4,6-三硝基苯磺酸 (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid solution, TNBS) 或炎症因子诱导的上皮细胞过度凋亡^[16]。本课题组前期研究证实, PI3K/Akt 信号通路是党参发挥作用的关键所在^[17], 然而其上游的具体分子机制仍未被揭示。miRNA 是由 19~28 个核苷酸组成的内源性的非编码单链 RNA 分子, 主要通过与其靶基因 mRNA 的 3'-UTR 区不完全互补结合实现对其表达的负向调控^[18]。UC 发病因素复杂, 机制尚不明确, 近年来, 随着 miRNA 与 UC 相关性研究的不断深入, miRNA 已被证明是影响 UC 发生发展的重要因素^[19-20]。研究表明 miRNA 通过靶向目标蛋白与基因, 激活特定信号通路的途径, 影响 UC 细胞凋亡, 进而增加肠黏膜通透性, 加速其发展进程^[21-22], 可以作为治疗 UC 的潜在靶点。磷酸酶和张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homolog, PTEN) 的功能类似于双特异性磷酸酶, 是 PI3K/Akt 通路的负调节因子, 可以通过磷脂酰肌醇三磷酸 (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, PIP3) 去磷酸化为磷脂酰肌醇二磷酸 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP2) 负性调节 PI3K/Akt 信号通路^[23]。当 PTEN 抑制、突变或缺失后会解除对 PI3K 负向调控, 使 PI3K 活性升高并促进细胞膜上 PIP3 积累, 招募并激活含 PH 结构域的磷脂酰肌醇依赖性激酶 1 (phosphatidylinositol dependent kinase 1, PDK1) 与 Akt, 导致 Akt 被磷酸化并启动其下游信号进而调控细胞凋亡、生长、代谢等多种生物学过程^[24]。因此, 本研究采用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激人正常结肠上皮 NCM460 细胞构建 UC 体外模型, 给予党参含药血清 (*Codonopsis Radix* containing serum, CRCS) 进行干预, 揭示党参通过 PI3K/Akt 通路治疗 UC 的上游分子机制, 为临床应用党参靶向治疗 UC 提供研究基础。

1 材料

1.1 动物与细胞

92 只 SPF 级雄性 SD 大鼠, 8 周龄, 体质量 (200±20) g, 购自甘肃中医药大学实验动物中心, 实验动物使用许可证号 SYXK (甘) 2021-0004, 实验动物生产许可证号 SCXK (甘) 2021-0001, 实验

动物质量合格证号 000704, 实验动物设施使用证号 000701。大鼠在 SPF 级实验室饲养, 温度 (20±2)℃、相对湿度 (50±10)%、12 h 光/暗循环。动物实验经甘肃中医药大学动物实验伦理委员会批准 (批准号 TJSQ2025-215)。

NCM460 细胞购自海星生物有限公司。

1.2 药材

党参 (批号 20240195) 购自甘肃康乐药业有限责任公司, 经甘肃中医药大学药学院中药鉴定教研室杨扶德教授鉴定为桔梗科党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. 的干燥根。

1.3 药品与试剂

TNBS (批号 MB5547-1) 购自大连博格林生物科技有限公司; 柳氮磺吡啶 (批号 9210105) 购自上海信谊天平药业有限公司; p-PI3K 抗体 (批号 IRVH00010) 购自美国 Millipore 公司; PI3K 抗体 (批号 TDY027)、PTEN 抗体 (批号 TDY042)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 B1509)、β-actin 抗体 (批号 RKB37) 购自美国 Immunoway 公司; p-Akt 抗体 (批号 36208)、Akt 抗体 (批号 26616) 购自上海翊圣生物科技有限公司; LPS (批号 3550130902) 购自北京索莱宝科技有限公司; 白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8)、IL-6、IL-17、IL-1β、核因子-κB (nuclear factor-κB, NF-κB)、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) 试剂盒 (批号分别为 2506R13、2506R58、2506R11、2506R47、2506R26、2506R19) 购自江苏酶免实业有限公司; miR-21 mimics (批号 S0625)、mimics NC (批号 U0910)、miR-21 inhibitor (批号 S1127)、inhibitor NC (批号 V0824)、质粒载体 (批号 GV306) 购自上海吉凯基因科技有限公司; RPMI 1640 基础培养基 (批号 PM150110) 购自武汉普诺赛科技有限公司; Lipofectamine™ 2000 转染试剂 (批号 11668019) 购自美国 Invitrogen 公司; Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit 双萤光素酶报告基因检测试剂盒 (批号 11402ES60) 购自上海翌圣生物科技股份有限公司; Opti-MEM 培养基 (批号 31985-070) 购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号 FSP500) 购自苏州依科赛生物科技股份有限公司; CCK-8 试剂盒 (批号 CK001-01) 购自深圳市尚唯生物科技有限公司; B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体 (批号 GTX100064)、Bcl-2 相关 X 蛋

白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体 (批号 GTX109683)、剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cystein-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3) 抗体 (批号 GTX86952) 购自美国 Gene Tex 公司; 葡萄糖 (批号 17042604) 标准品购自兰州普兰特生物有限责任公司; 人参皂苷 Re 对照品 (批号 74343-42-1)、党参炔苷对照品 (批号 136087-37-5) 购自上海源叶生物科技有限公司, 质量分数均 $\geq 98\%$ 。

1.4 仪器

SK-O180-E 型摇床 (美国 SCIOLOGEX 公司); DYY-6C 型电泳转印系统 (北京六一生物科技有限公司); 5424R 型高速冷冻离心机、RS232C 型微量核酸测定仪 (德国 Eppendorf 公司); iMark 型酶标仪 (美国 Bio Rad 公司); JXFSTPRP-24L 型全自动样品快速研磨仪 (上海净信实业发展有限公司); ABI-9700 型 PCR 扩增仪 (美国 Applied biosystems 公司); Quantstudio 3 型荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); LB963 型 Luminescence Microplate Reader 微孔板检测仪 (德国 BERTHOLD 公司); DYX700 型 DXY-2 恒温水浴锅 (深圳市鼎鑫宜实验设备有限公司); CI-191C 型 191L 气套式 CO₂ 培养箱 (美国 CRYSTAL 公司); UV Power 型紫外分光光度计 (北京莱伯泰科仪器股份有限公司); Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司)。

2 方法

2.1 党参水提液的制备及成分分析

2.1.1 党参水提液的制备 依据《中医药动物实验方法学》, 取党参 200 g, 加入 8 倍量纯净水浸泡 1 h 后, 煮沸煎煮 1 h, 连续煎煮 2 次, 滤过合并滤液, 67 °C 恒温水浴旋蒸浓缩至 2 g/mL (以原药材计) 母液。在此基础上, 按实验剂量要求将母液分别稀释, 配制成为以生药量计质量浓度为 1.80、0.90、0.45 g/mL 的给药溶液, 放置 -20 °C 冷藏备用。

2.1.2 多糖含量测定 精密称取葡萄糖标准品 20.00 mg 至 500 mL 量瓶中, 加入超纯水定容, 得质量浓度为 0.04 mg/mL 的葡萄糖标准品溶液。精密量取葡萄糖标准品 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 于试管中, 分别加超纯水至 4 mL, 精密加入 5% 苯酚溶液 2.0 mL, 摇匀; 精密加入浓硫酸 5.0 mL, 混匀, 90 °C 水浴 10 min, 流水迅速冷却, 采用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度 (A) 值, 以 A 值为横坐标 (x), 以葡萄糖质量浓度为纵坐标 (y), 绘制标准曲线, 得线性回归方程 $y=0.0082x+0.0127$ ($r=0.9991$),

线性范围 5~20 $\mu\text{g/mL}$ 。

取“2.1.1”项下 2 g/mL 党参水提液 4 mL, 加入超纯水稀释后, 缓慢搅拌加入 95% 乙醇至乙醇体积分数为 75%, 置于 4 °C 冰箱过夜, 3 000 r/min 离心 10 min, 取沉淀, 超纯水定容至 100 mL, 摇匀得到党参粗多糖溶液。采用酶标仪测定 A 值, 计算多糖含量。

2.1.3 总皂苷含量测定 精密称取人参皂苷 Re 对照品 20.00 mg 至 50 mL 量瓶中, 加入甲醇定容, 得质量浓度为 0.4 mg/mL 的人参皂苷 Re 对照品溶液。精密量取人参皂苷 Re 对照品溶液 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 于试管中, 水浴甲醇挥至近干后, 加入 5% 香草醛溶液 0.2 mL、高氯酸 0.8 mL, 60 °C 水浴加热 15 min, 迅速冷却 5 min 后加入冰醋酸 4 mL。采用紫外分光光度计测定 540 nm 处的 A 值, 以 A 值为横坐标 (x), 以人参皂苷 Re 质量浓度为纵坐标 (y), 绘制标准曲线, 得线性回归方程 $y=0.1724x+0.0145$ ($r=0.9969$), 线性范围为 40~160 $\mu\text{g/mL}$ 。

取“2.1.1”项下 2 g/mL 党参水提液 4 mL, 置于分液漏斗中用水饱和的正丁醇 8 mL 进行萃取, 共萃取 3 次, 收集正丁醇部位, 旋蒸使正丁醇挥至近干, 用甲醇定容至 100 mL 量瓶, 摇匀得到党参总皂苷溶液。采用紫外分光光度计测定 A 值, 计算总皂苷含量。

2.1.4 党参炔苷含量测定

(1) 色谱条件: 采用 Shiseido Capcell pak C₁₈ 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (25:75); 检测波长 268 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量 10 μL 。

(2) 对照品溶液的制备: 精密称取党参炔苷对照品 2.00 mg 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 4 °C 保存备用。以党参炔苷质量浓度为横坐标 (x), 以峰面积为纵坐标 (y), 绘制标准曲线, 得线性回归方程 $y=7502.3x+15915$ ($r=0.9997$), 线性范围为 19.2~240.0 mg/L。

(3) 供试品溶液的制备: 取“2.1.1”项下 2 g/mL 党参水提液, 加甲醇至乙醇体积分数为 75%, 静置过夜, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 减压旋蒸除去乙醇, 过 0.22 μm 有机微孔滤膜, 甲醇溶解定容得质量浓度为 0.1 g/mL 的供试品溶液, 进样检测。

2.2 大鼠分组、UC 模型的制备、给药与取材

按照随机数表法将 72 只大鼠随机分为对照组、模型组及党参高、中、低剂量 (18.0、9.0、4.5 g/kg)^[25-26]组和柳氮磺吡啶 (0.3 g/kg) 组, 每组 12

只。大鼠禁食不禁水 24 h, ip 5%戊巴比妥钠麻醉, 除对照组外, 其余大鼠制备 UC 模型, 具体操作如下: 使用 2.9 mm 直径的无菌硅胶管(用石蜡油润滑)从肛门插至 8 cm, 灌肠给予 0.8 mL 5% TNBS/乙醇复合溶液(100 mg/kg), 随后注入 0.3 mL 空气, 捏紧肛门倒提 2~3 min, 造模后 1 h 自由进食。对照组大鼠以等体积的生理盐水灌肠, 其余方法均相同。根据体质量下降、腹泻、便血、组织学病理等指标确定模型建立成功后, 各给药组 ig 相应药物(20 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续给药 7 d。末次给药后 2 h, 大鼠 ip 5%戊巴比妥钠麻醉, 心脏取血后脱臼处死, 每组随机选取 3 只大鼠的结肠组织用于 qRT-PCR 和 Western blotting 检测。

2.3 CRCS 的制备

目前对于中药药理学作用机制的研究, 主要以药物含药血清和药物提取物直接干预为主, 但由于中药粗提物直接作用于体外体系, 既难以明确真正发挥作用的有效成分, 又可能因杂质干扰导致实验结果偏差; 同时, 中药经口服后需经过体内消化、吸收和代谢, 其实际发挥药效的物质与原始制剂并不完全一致^[27-28]。中药血清药理学方法以机体对药物成分的生物选择和代谢转化为基础, 能够更真实地反映中药在体内的有效成分及其药效作用机制, 从而提高体外实验结果的科学性和可信性。因此本实验将 20 只雄性 SD 大鼠按照随机数表法分为对照组和党参(18 g/kg)组, 每组 10 只。党参组 ig 党参水提液, 对照组 ig 等体积的生理盐水, 2 次/d, 连续给药 7 d。末次给药前大鼠禁食不禁水 12 h, 末次给药 1 h 后麻醉, 心脏采血置于无抗凝剂采血管, 室温静置 3 h, 4 °C、3 000 r/min 离心 15 min, 分离获取血清, 56 °C 灭活 30 min, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 于-80 °C 保存备用。按培养基终体积计算, 总血清体积分数固定为 10%。分别加入 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mL 党参含药血清, 以 FBS 补足至总血清体积为 1.0 mL, 加入 9.0 mL RPMI 1640 培养基混匀, 即得到最终体积分数为 1%、2%、4%、6%和 8%的 CRCS 培养基, 其中对照组培养基为 10% FBS。

2.4 细胞培养

NCM460 细胞用含 10% FBS、100 μg/mL 青霉素/链霉素的 RPMI 1640 培养基, 轻轻反复吹打制成细胞混悬液后移至无菌培养瓶, 轻轻晃动保证细胞混悬液与培养基均匀分布, 于 5% CO₂、37 °C 的细胞培养箱中孵育。待细胞融合度达到 80%~95%,

弃去细胞培养液, 加入 3 mL PBS 清洗细胞 2 次, 弃去 PBS, 加入 1 mL 0.25%胰蛋白酶消化细胞并传代培养, 待细胞生长至对数生长期进行后续实验。

2.5 UC 体外模型的建立

NCM460 细胞生长至对数生长期时, 加入 0.25%胰蛋白酶消化至细胞圆缩脱落, 4 °C、1 000 r/min 离心 3 min, 加入新鲜完全培养基重悬制成细胞悬液, 以 8×10^3 个/孔接种于 96 孔板, 加入 10 μg/mL LPS 刺激 24 h, 诱导 UC 体外模型^[29-30]。

2.6 CCK-8 筛选 CRCS 干预浓度

NCM460 细胞以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板, 待细胞贴壁并生长至 60%~70%融合度时, 弃去培养基, 设置对照组、模型组和 CRCS 给药组, 除对照组外, 其余各组加入含 10 μg/mL LPS 的完全培养基处理 24 h。弃去培养液, PBS 轻轻洗涤 2 次, 给药加入含 1%、2%、4%、6%、8% CRCS 培养基孵育 24 h, 对照组和模型组加入含 10% FBS 的培养基。每孔加入 10 μL CCK-8 工作液, 轻轻振荡混匀, 孵育 2 h, 采用酶标仪测定 450 nm 处的 A 值。

2.7 细胞转染

NCM460 细胞以 1×10^5 个/孔接种至 6 孔板, 待细胞贴壁并生长至 60%~70%融合度时, 除对照组外, 其余组加入含 10 μg/mL LPS 的完全培养基处理 24 h。弃去培养液, PBS 轻轻洗涤 1 次, 加入无血清无双抗的基础培养基。将 50 μL Lipofectamine 2000 稀释于 50 μL Opti-MEM 培养基中, 轻轻混匀, 室温放置 5 min; 将 30 nmol/L miR-21 mimics、mimics NC、miR-21 inhibitor 或 inhibitor NC 分别稀释于 50 μL Opti-MEM 培养基中, 轻轻混匀, 室温放置 5 min。将转染复合物加入每孔细胞中, 轻轻晃动混匀, 37 °C、5% CO₂ 条件下孵育 6 h。随后弃去转染培养基, 加入含 6% CRCS 培养基, 继续孵育 24 h。收集细胞, 用于提取总 RNA 或总蛋白, 进行 qRT-PCR 和 Western blotting 分析。

2.8 应用生物信息技术预测靶基因

借助生物信息学分析工具 TargetScan (<https://www.targetscan.org/>)、mirDIP (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>)、miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>)、miRDB (<https://mirdb.org/>) 等靶基因预测软件对调控 PTEN 的 miRNA 进行预测。

2.9 载体构建与鉴定

根据 NCBI 数据库中查找得到人基因组 PTEN 的 3'-UTR 野生型序列。以 miR-21 与 PTEN 的 3'-

UTR 结合位点为目标,对预测结合位点碱基进行突变,PTEN 5'-TGGTTGTGCCTAGAGGTATTTTGA-GACTA-3'碱基由 GCCTAG 突变为 TAAGCT,其他碱基序列不变,合成突变型序列。最后将含预测结合位点的 PTEN 3'-UTR 序列质粒载体命名为 wt-Luc-PTEN,含 PTEN 3'-UTR 突变序列质粒载体命名为 mut-Luc-PTEN。质粒载体构建与鉴定由上海吉凯基因科技有限公司完成。

2.10 双荧光素酶报告基因分析

按“2.7”项下方法处理后,弃去培养液,PBS清洗2次,弃去PBS,添加1×PLB工作液300μL至6孔板,室温裂解15min,收集细胞裂解液,4℃、12000r/min离心30s,取上清。将20μL上清和100μL LARII工作液加入96孔板,混匀检测获得样本的萤火虫荧光素酶活性,随后加100μL Stop&Glo工作液至96孔板,混匀后读取海肾荧光素酶活性。

2.11 ELISA 检测炎症因子水平

按“2.7”项下方法处理后,收集细胞,于冰上加入裂解液充分裂解,4℃、12000r/min离心10~15min,取上清,按照试剂盒说明书测定IL-6、IL-17、IL-1β、IL-8、NF-κB和TNF-α水平。

2.12 Western blotting 分析

取“2.2”项下大鼠结肠组织,用预冷的生理盐水洗涤,按照10mg组织加入100μL裂解液的比例加入含PMSF、磷酸酶抑制剂的裂解液和预冷钢珠,置于低温组织研磨匀浆仪充分匀浆,取出钢珠,冰上裂解50min,4℃、12000r/min离心15min,取上清液,采用BCA法测定蛋白浓度。

按“2.7”项下方法处理后,收集细胞,于冰上加入裂解液充分裂解,4℃、12000r/min离心10~15min,取上清至预冷离心管,采用BCA法测定蛋白浓度。根据BCA测定结果,取30μg蛋白,加入5×上样缓冲液,充分混匀后95℃金属浴5min使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至PVDF膜,加入5%脱脂牛奶于室温封闭90min,加入Bax(1:2000)、cleaved Caspase-3(1:1000)、Bcl-2(1:1000)、PTEN(1:2000)、PI3K(1:1000)、p-PI3K(1:1000)、Akt(1:2000)、p-Akt(1:2000)一抗,4℃孵育过夜;TBST洗涤后加入二抗,室温摇床孵育1h;TBST洗涤后,使用ECL发光液显色并在成像系统中曝光。使用Image J软件对蛋白条带的灰度值进

行数据化分析。

2.13 qRT-PCR 分析

取“2.2”项下大鼠结肠组织置于匀浆管中,加入1mL总RNA提取试剂,按照试剂盒说明书提取RNA。按“2.7”项下方法处理后,收集细胞,按照试剂盒说明书提取RNA。按照以下扩增程序进行DNA扩增:95℃预变性5min循环1次,95℃变性10s,60℃退火20s,72℃延伸20s共循环40次。扩增完成后测得各组Ct值,以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法定量miR-21、miR-30a-3p、miR-198、miR-152-3p、miR-301a-3p、miR-320、miR-3691-5p和PTEN mRNA的表达水平。本研究所用成熟miRNA的序列均已在miRWalk数据库核实。人源miR-21-5p(hsa-miR-21-5p)和大鼠miR-21-5p(rno-miR-21-5p)具有完全相同的成熟序列:5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3';人源miR-30a-3p(rno-miR-30a-3p):5'-CUUUCAGUCGGAU-GUUUGCAGC-3';人源miR-198(rno-miR-198):5'-GGUCCAGAGGGAGAUAGGUUC-3';人源miR-152-3p(rno-miR-152-3p):5'-UCAGUGCAU-GACAGAACUUGG-3';人源miR-301a-3p(rno-miR-301a-3p):5'-CAGUGCAAUAGUAUUGUCAAGC-3';人源miR-320(rno-miR-320):5'-GCCUUCUC-UUCCCGGUUCUUC-3';人源miR-3691-5p(rno-miR-30a-3p):5'-AGUGGAUGAUGGAGACUCGG-UAC-3'。PTEN引物序列见表1。

2.14 统计学分析

所有实验数据用SPSS 20统计分析软件进行处理,计量资料符合正态分布的数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,不符合正态分布的数据用M(P25JP75)描述。采用单因素方差(One-way ANOVA),方差齐性时用LSD法对组间变量进行多重比较,方差不齐时用Dunnett's T3法对组间变量进行多重比较。实验数据至少重复3次。

3 结果

3.1 党参水提液的成分分析

党参炆苷对照品和供试品的色谱图见图1。结

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')	片段长度/bp
PTEN	F: ATTACAGACCAGTGGCAC	130
	R: CCTGAGTTGGAGGAGTAG	
GAPDH	F: CATCTTCTTGTGCAGTGCC	217
	R: ACCAGCTTCCCATTCTCAG	

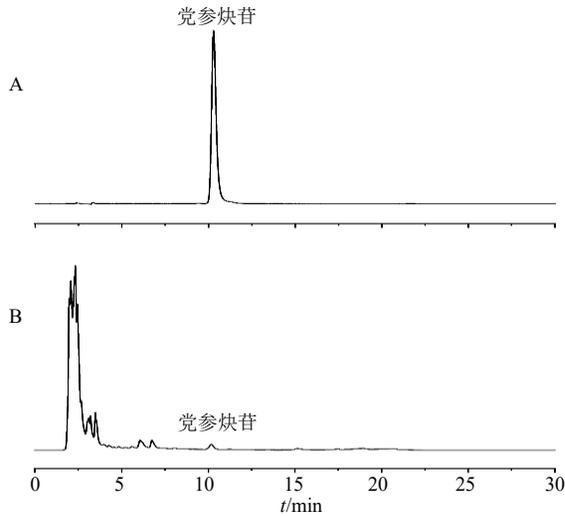
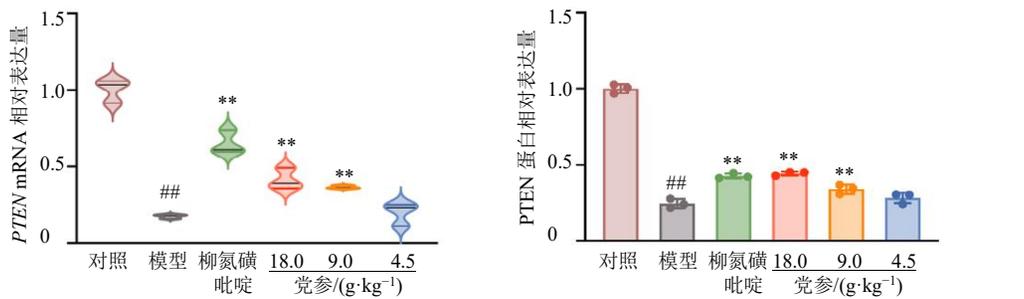


图1 党参炔苷对照品 (A) 和供试品 (B) 的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of lobetyolin reference substances (A) and sample (B)



与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$, 图 4、5 同。
$P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs model group, same as Figs. 4, 5.

图2 各组大鼠结肠组织中 PTEN mRNA 和蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 PTEN mRNA and protein expression levels in colon tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

miRWalk、miRDB 等靶基因预测软件对调控 PTEN 的 miRNA 进行预测。采用 Venn 图分析筛选出的 miRNA, 如图 3 所示, 确定潜在靶向 PTEN 的 miRNA 为 miR-30a-3p、miR-198、miR-152-3p、miR-301a-3p、miR-320、miR-3691-5p 及 miR-21。

3.4 各组大鼠结肠组织中与 PTEN 相互作用的 miRNA 的表达水平

采用 qRT-PCR 技术验证了 UC 大鼠结肠组织中 7 种 miRNA 的表达水平, 如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠结肠组织 miR-21 的相对表达量显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组 miR-21 的相对表达量显著降低 ($P < 0.01$), 表明党参对 miR-21 的表达具有显著影响。同时发现, 与模

果显示, 党参水提液中总多糖质量分数为 (12.42 ± 0.87)%, 总皂苷质量分数为 (1.11 ± 0.08)%, 党参炔苷质量分数为 (0.00671 ± 0.00035)%, 符合相关文献报道^[31-32]及《中国药典》2025 年版标准, 表明党参提取液质量稳定, 可用于后续体内外实验研究。

3.2 各组大鼠结肠组织中 PTEN mRNA 和蛋白表达水平

如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠结肠组织 PTEN mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 柳氮磺吡啶组和党参高、中剂量组 PTEN mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。

3.3 生物信息学分析工具筛选与 PTEN 相互作用的 miRNA

借助生物信息学分析工具 TargetScan、mirDIP、

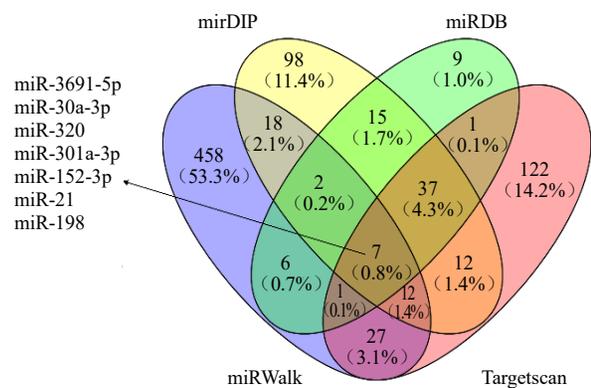
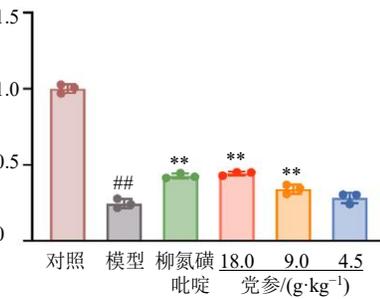


图3 生物信息学分析工具筛选与 PTEN 相互作用的 miRNA
Fig. 3 Bioinformatics tools for screening miRNAs interacting with PTEN

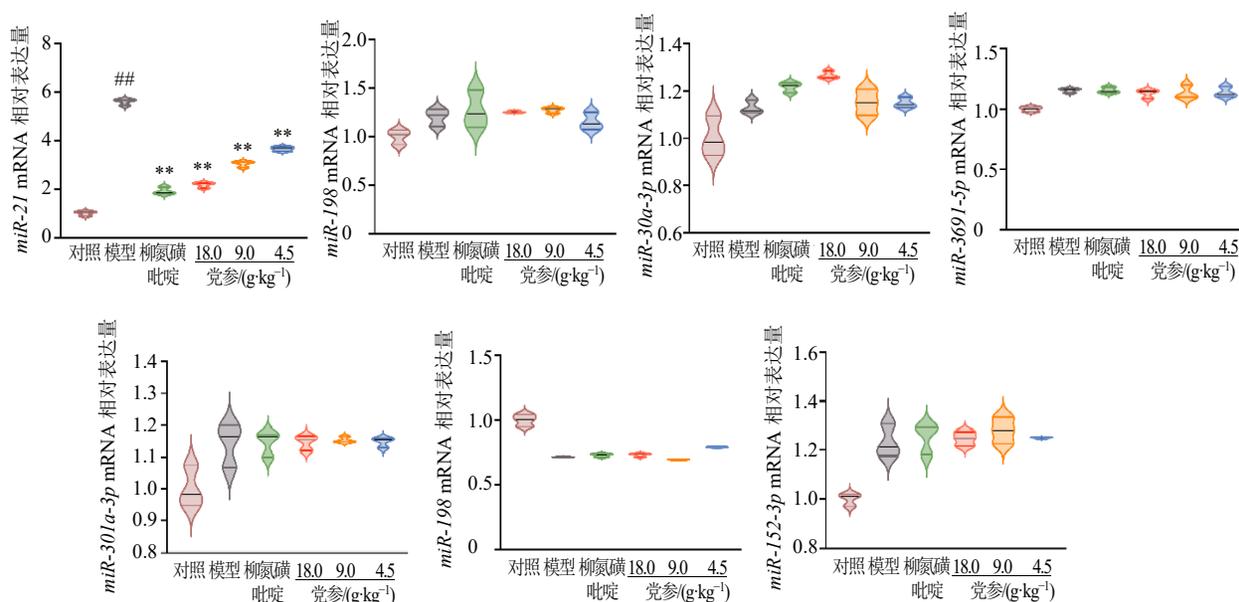


图 4 各组大鼠结肠组织中与 PTEN 相互作用的 miRNA 的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Expression levels of miRNAs interacting with PTEN in colon tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

型组比较, 党参组对 *miR-30a-3p*、*miR-198*、*miR-152-3p*、*miR-301a-3p*、*miR-320* 及 *miR-3691-5p* 的表达无显著影响, 即党参可能通过与 *miR-21* 相互作用来调控 PTEN 的表达。基于上述结果, 聚焦 *miR-21* 进行深入研究。

3.5 CRCS 对 LPS 诱导的 NCM460 细胞活力的影响

采用 CCK-8 法检测党参含药血清对 NCM460 细胞活力的影响, 如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组细胞活力显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 2%、4%、6%、8% CRCS 组细胞活力均显著升高 ($P < 0.01$)。综合实验结果, 选择 6% CRCS 进行后续实验。

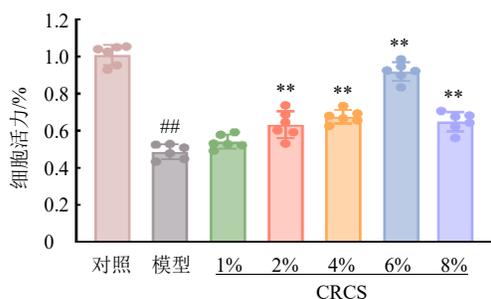


图 5 CRCS 对 LPS 诱导的 NCM460 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

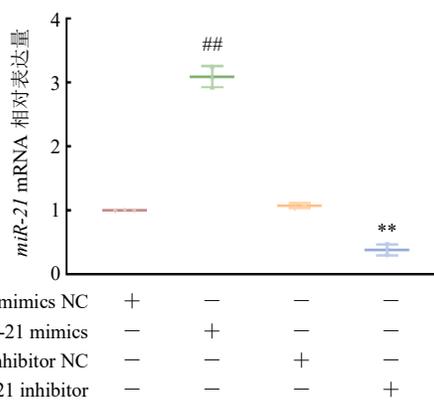
Fig. 5 Effect of CRCS on viability of LPS-induced NCM460 cells ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.6 各组细胞中 miR-21 表达水平

如图 6 所示, 与阴性对照组 mimics NC 和 inhibitor NC 相比, *miR-21* mimics 转染使细胞中 *miR-21* 的表达显著上调 ($P < 0.01$), 而 *miR-21* inhibitor 则使其表达显著下调 ($P < 0.01$); 2 个阴性对照组间表达无显著差异, 证实了对照系统的可靠性。

3.7 miR-21 过表达后各组细胞 miR-21 表达水平

如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组 *miR-21* 的表达水平明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, *miR-*

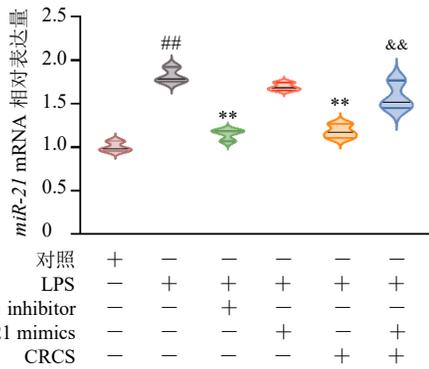


与 mimics NC 组比较: $##P < 0.01$; 与 inhibitor NC 组比较: $**P < 0.01$ 。

$##P < 0.01$ vs mimics NC group; $**P < 0.01$ vs inhibitor NC group.

图 6 各组细胞中 miR-21 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 miR-21 expression level in cells of each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$; 与 CRCS 组比较: & $P < 0.05$ && $P < 0.01$, 图 8、10~12 同。
$P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs model group; & $P < 0.05$ && $P < 0.01$ vs CRCS group, same as Figs. 8, 10-12.

图 7 miR-21 过表达后各组细胞 miR-21 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Expression level of miR-21 in cells of each group after miR-21 over-expression ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

miR-21 inhibitor 明显降低细胞内 miR-21 表达 ($P < 0.01$), miR-21 mimics 对 miR-21 表达无显著变化, CRCS 干预后显著降低细胞内 miR-21 表达 ($P < 0.01$); 与 CRCS 组比较, miR-21 mimics 显著阻断了 CRCS 对细胞模型中 miR-21 表达的下调作用 ($P < 0.01$)。

3.8 miR-21 过表达后各组细胞 PTEN 蛋白表达水平

如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组 PTEN 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较,

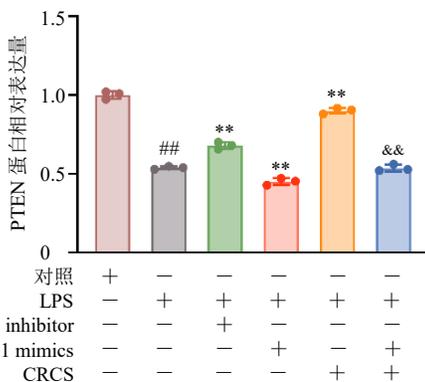
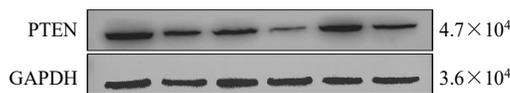


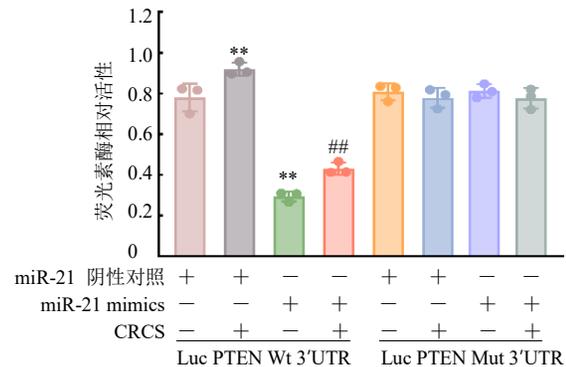
图 8 miR-21 过表达后各组细胞 PTEN 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Expression level of PTEN protein in cells of each group after miR-21 over-expressions ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

miR-21 inhibitor 明显上调 PTEN 蛋白表达 ($P < 0.01$), miR-21 mimics 明显下调 PTEN 蛋白表达 ($P < 0.01$), CRCS 干预后显著上调 PTEN 蛋白表达 ($P < 0.01$); 与 CRCS 组比较, miR-21 mimics 显著阻断了 CRCS 对细胞模型中 PTEN 表达的上调作用 ($P < 0.01$)。

3.9 双荧光素酶活性的检测结果

如图 9 所示, 转染 wt-Luc-PTEN 质粒后, 与 mimics NC 组比较, miR-21 mimics 组荧光素酶活性明显降低 ($P < 0.01$), CRCS 组荧光素酶活性明显升高 ($P < 0.01$); 与 CRCS 组比较, miR-21 mimics 明显逆转 CRCS 对荧光素酶活性的上调作用 ($P < 0.01$)。转染 mut-Luc-PTEN 质粒后, 各组荧光素酶活性均无显著变化。



与 CRCS 组比较: ## $P < 0.01$; 与 miR-21 阴性对照组比较: ** $P < 0.01$ 。
$P < 0.01$ vs CRCS group; ** $P < 0.01$ vs miR-21 negative control group.

图 9 双荧光素酶报告实验检测 CRCS 干预时 miR-21 与 PTEN 靶向性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Detection of miR-21 targeting PTEN during CRCS intervention via dual-luciferase reporter assay ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.10 miR-21 过表达后各组细胞炎症因子水平

如图 10 所示, 与对照组比较, 模型组细胞内 IL-6、IL-17、IL-1 β 、IL-8、NF- κ B、TNF- α 水平明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, miR-21 inhibitor 明显降低细胞内 IL-6、IL-17、IL-1 β 、IL-8、NF- κ B、TNF- α 水平 ($P < 0.01$), miR-21 mimics 对细胞内 IL-6、IL-17、IL-1 β 、IL-8、NF- κ B、TNF- α 水平无显著影响, CRCS 干预后显著降低细胞内 IL-6、IL-17、IL-1 β 、IL-8、NF- κ B、TNF- α 水平 ($P < 0.01$); 与 CRCS 组比较, miR-21 mimics 显著阻断了 CRCS 对细胞模型中炎症因子水平的抑制作用 ($P < 0.01$)。

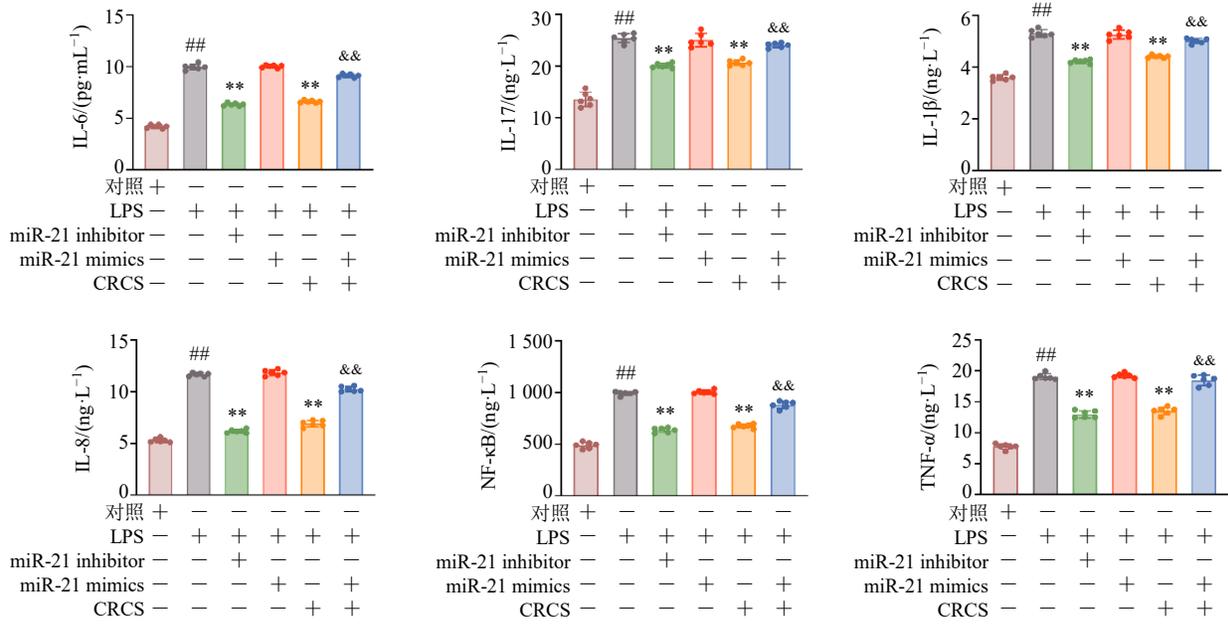


图 10 miR-21 过表达后各组细胞炎症因子水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 10 Levels of inflammatory factors in cells of each group after miR-21 over-expression ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.11 miR-21 过表达后各组凋亡相关蛋白表达水平

如图 11 所示, 与对照组比较, 模型组细胞内 Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$), Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。与

模型组比较, miR-21 inhibitor 明显降低细胞内 Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平 ($P < 0.01$), 升高 Bcl-2 蛋白表达水平 ($P < 0.01$); miR-21 mimics 明显上调细胞内 Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达 ($P <$

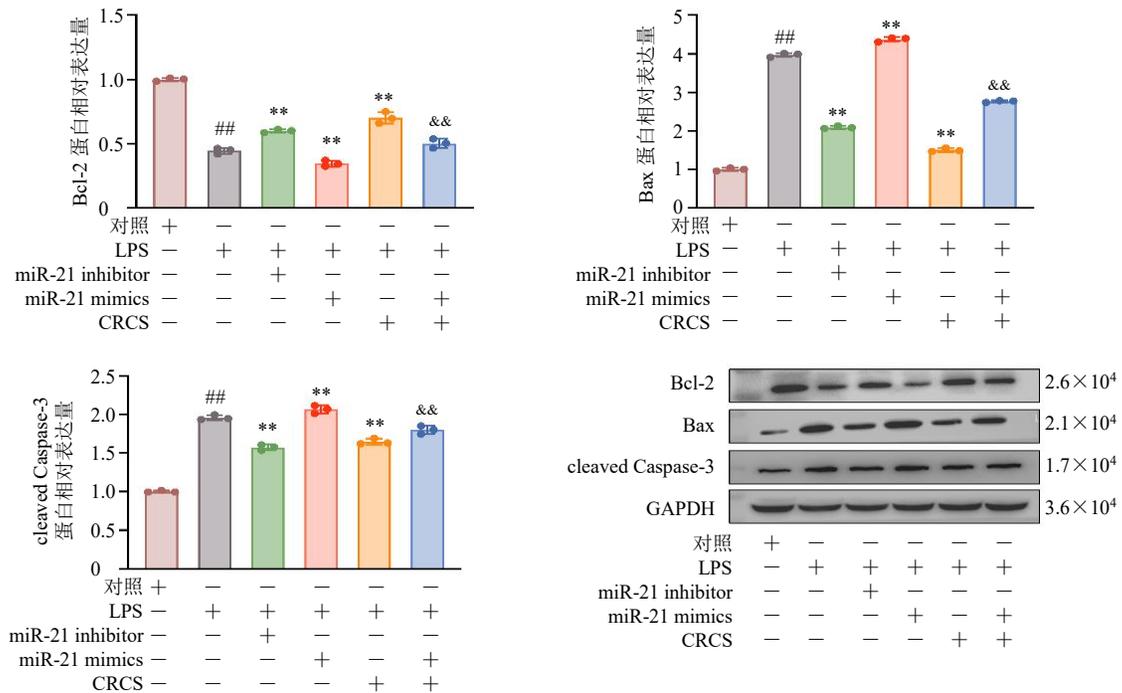


图 11 miR-21 过表达后各组细胞 Bax、cleaved Caspase-3 和 Bcl-2 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Expression levels of Bax, cleaved Caspase-3 and Bcl-2 proteins in cells of each group after miR-21 over-expression ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

0.01), 下调 Bcl-2 蛋白表达 ($P < 0.01$); CRCS 干预后显著降低细胞内 Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平 ($P < 0.01$), 上调 Bcl-2 表达 ($P < 0.01$); 与 CRCS 组比较, miR-21 mimics 显著阻断了 CRCS 对细胞模型中凋亡相关蛋白表达的调节作用 ($P < 0.01$)。

3.12 miR-21 过表达后各组细胞 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达水平

如图 12 所示, 与对照组比较, 模型组细胞内

p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, miR-21 inhibitor 明显下调 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 表达 ($P < 0.01$); miR-21 mimics 显著上调 p-Akt/Akt 蛋白表达 ($P < 0.01$), 但对于 p-PI3K/PI3K 蛋白表达无显著影响; CRCS 干预后显著下调 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 表达 ($P < 0.01$); 与 CRCS 组比较, miR-21 mimics 显著阻断了 CRCS 对细胞模型中 PI3K/Akt 信号通路的抑制作用 ($P < 0.05、0.01$)。

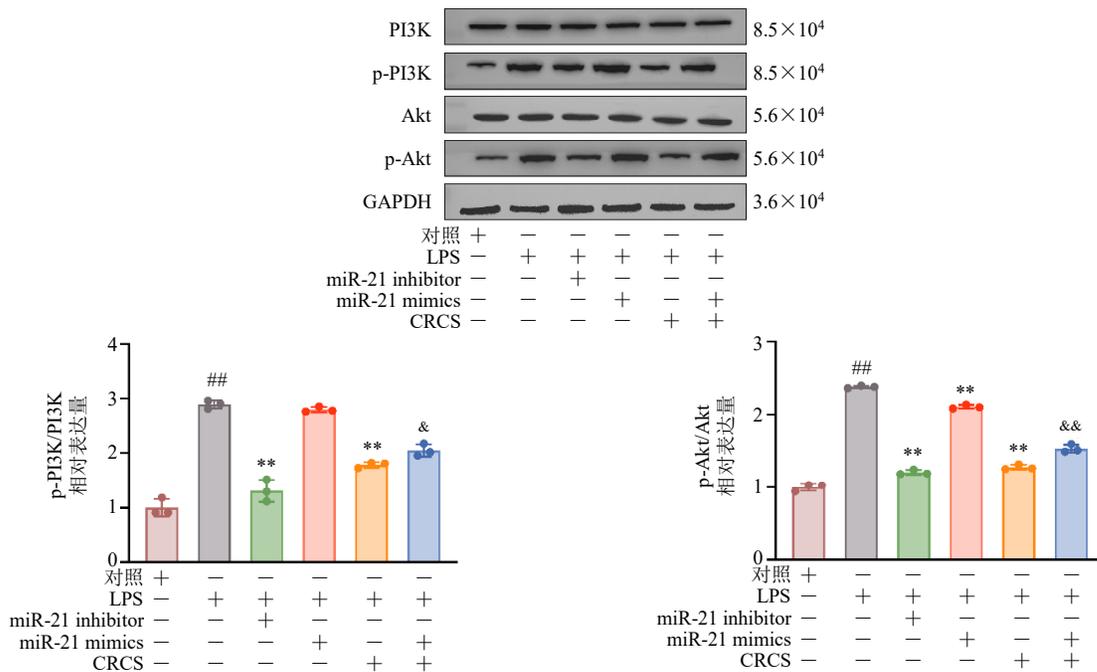


图 12 miR-21 过表达后各组细胞 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 12 Expression level of PI3K/Akt pathway related proteins in cells of each group after miR-21 over-expression ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

miRNA 因其强大的基因调控功能被证实是导致 UC 免疫稳态失衡、肠黏膜屏障受损及肠道菌群失调等核心病理环节的重要因素^[33]。因此, 靶向调控特定的 miRNA 成为阐释中药治疗 UC 作用机制的一个新兴且极具前景的研究方向。本课题组前期研究发现党参可以抑制 PI3K/Akt 信号通路缓解肠上皮细胞过度凋亡, 但党参干预 PI3K/Akt 的上游机制尚不清楚。作为 PI3K 的主要拮抗剂, PTEN 通过将 PIP3 转化为 PIP2 抑制 PI3K/Akt 轴^[34-35]。PTEN 失活导致 PI3K/Akt 信号通路过度激活, 进而加剧肠上皮细胞过度凋亡诱发 UC^[36-37], 这与本研究结果一致。借助生物信息学分析工具 TargetScan、mirDIP、miWalk、miRDB 等靶基因预测软件对调控 PTEN 的 miRNA

进行预测发现, miR-30a-3p、miR-198、miR-152-3p、miR-301a-3p、miR-320、miR-3691-5p 及 miR-21 均可潜在靶向 PTEN, 采用 qRT-PCR 对其表达进行检测, 发现 UC 模型及 CRCS 干预组 miR-30a-3p、miR-198、miR-152-3p、miR-301a-3p、miR-320、miR-3691-5p 表达无显著变化, 但 CRCS 干预后 miR-21 表达可显著下调。Takagi 等^[38]发现 UC 患者结肠组织 miR-21 水平显著高于健康对照组, 表明 UC 发生发展与 miR-21 水平密切相关。因此, 选择 miR-21 作为本研究的重要作用基点, 对党参抑制上皮细胞过度凋亡及炎症因子的分子机制进行探索。

miR-21 可影响炎症因子及肠上皮细胞, 其过表达会诱发促炎症因子释放, 促进上皮细胞过度凋亡, 增加肠道通透性, 损害肠道屏障功能^[39]。因此,

miR-21 上调可能是促炎因子释放和上皮细胞过度凋亡的重要因素。本研究采用 LPS 诱导 NCM460 细胞建立 UC 体外模型，通过“功能获得性实验”和“功能缺失性实验”采用 ELISA 和 Western blotting 检测炎症因子 IL-6、IL-17、IL-1β、IL-8、NF-κB、TNF-α 水平和关键凋亡蛋白 Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3 表达，结果显示 miR-21 inhibitor 及 CRCS 可以显著抑制促炎因子水平及上皮细胞过度凋亡，而 miR-21 mimics 能够逆转 CRCS 对促炎因子水平升高及上皮细胞过度凋亡的抑制作用，表明 miR-21 是介导党参抗炎与细胞保护作用的关键靶点。

miRNA 通过靶向目标蛋白与基因，激活特定信号通路加速其发展进程^[40]。结合前期实验验证，党参可抑制 PI3K/Akt 信号通路减少炎症因子和上皮细胞凋亡，降低细胞通透性缓解 UC。因此，本研究就 miR-21 作为 PTEN/PI3K/Akt 通路上游关键因子进行探究。结果发现，CRCS 和 miR-21 inhibitor 增强 PTEN 活性，抑制 PI3K/Akt 信号通路，且 miR-21 mimics 可以逆转 CRCS 对 PTEN 的上调作用及对 PI3K/Akt 通路的抑制作用，即抑制 miR-21 是党

参调控 PTNE/PI3K/Akt 通路的关键机制。党参治疗 UC 时 miR-21 是否能够靶向 PTEN 还需进一步探讨。本研究采用双荧光素酶报告基因系统，通过细胞转染将 miR-21 mimics、mimics NC 分别与重组野生型质粒 wt-Luc-PTEN 和突变型质粒 mut-Luc-PTEN 转染至 NCM460 细胞，结果发现转染 wt-Luc-PTEN 质粒时，CRCS 干预后荧光素酶活性显著升高，并且 miR-21 mimics 显著逆转 CRCS 对荧光素酶活性的作用。但是转染 mut-Luc-PTEN 质粒时，各组荧光素酶活性无显著变化。这提示转染 wt-Luc-PTEN 质粒，miR-21 mimics 可以和 PTEN mRNA 3'-UTR 位点结合，进而降低荧光素酶活性，而 CRCS 干预后可以抑制内源性 miR-21 表达，减少与 PTEN 3'-UTR 位点结合，进而升高荧光素酶活性；转染 mut-Luc-PTEN 质粒，将 PTEN mRNA 3'-UTR 结合位点突变后，miR-21 和 PTEN 结合位点不能结合，所以 CRCS 干预后 miR-21 mimics 和 mimics NC 荧光素酶活性不受影响。以上结果表明，在党参干预时 PTEN mRNA 3'-UTR 有 miR-21 结合位点，miR-21 可以靶向调控 PTEN（图 13）。

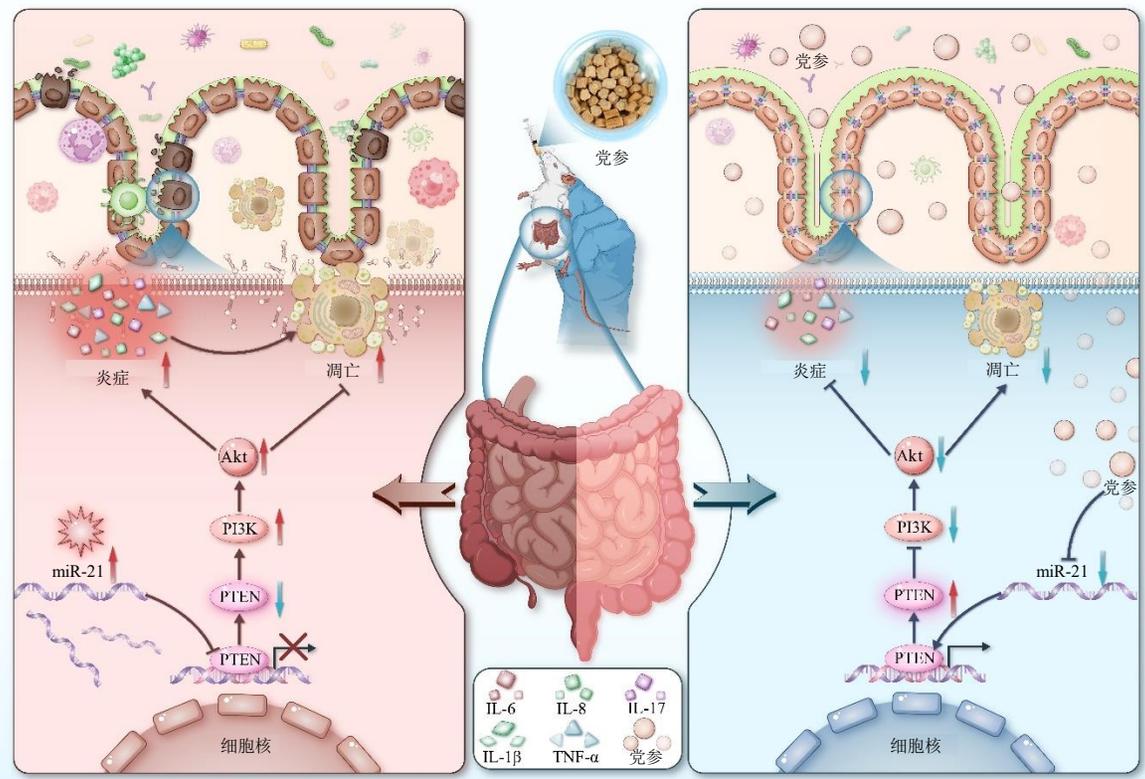


图 13 CRCS 通过下调 miR-21 靶向增强 PTEN 活性进而抑制 PI3K/Akt 信号通路抑制体外细胞模型炎症因子释放和上皮细胞过度凋亡

Fig. 13 CRCS inhibits PI3K/Akt signaling pathway by down-regulating miR-21 targeting to enhance PTEN activity to inhibit release of inflammatory factors *in vitro* cell models and excessive apoptosis of epithelial cells

党参作为补而不燥、滋而不腻补益类中药代表，其化学成分研究已较为深入，其中党参多糖是其主要关注的活性成分。Qin 等^[41]发现党参多糖 CPPS5 可能通过调控 miR-221 促进超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）和过氧化氢酶（catalase, CAT）活性，并降低丙二醛（malondialdehyde, MDA）含量、线粒体潜在膜释放率、Caspase-3 活性、凋亡率和乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase, LDH）释放率，进而增强巨噬细胞的抗氧化应激能力。Chen 等^[42]也发现黄芪多糖与党参多糖协同使用可影响胚胎着床和胎盘发育，减少习惯性流产率，其分子机制可能与调节 miR-92a-1-5p/趋化因子 C-C-基元受体 7（chemokine C-C-motif receptor 7, CCR7）轴密切相关。上述研究提示党参多糖可能是党参发挥 miRNA 调控作用的重要物质基础，具有进一步深入研究的价值。当前，miRNA 药物的研发主要集中于 miRNA 模拟物及 miRNA 抑制剂两种策略，但由于 miRNA 分子易发生脱靶效应、靶向递送效率有限以及体内稳定性较差、降解率较高等问题，其临床转化进程受到一定限制。已有研究显示，植物 miRNA 可通过胃肠道途径进入循环系统，并通过调节内源性 miRNA 水平，在转录后层面参与基因表达调控，这为探索基于天然产物的 miRNA 调控策略提供了新的研究思路。既往研究表明，特定营养成分的摄入可一定程度调节肠道微生物群组成并缓解 UC 相关症状^[43]。鉴于部分药食同源中药兼具营养干预与药理调节特征，党参作为其中的代表之一，因其性味平和并具有健脾益肺等传统功效，在疾病长期干预及复发管理中的应用前景值得关注。

综上，党参可以通过抑制 miR-21 过表达减少肠上皮细胞过度凋亡及炎症因子释放，其作用可能与降低 miR-21 和增强 PTEN 活性进而抑制 PI3K/Akt 信号通路有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ungaro R, Mehandru S, Allen P B, *et al.* Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10080): 1756-1770.
- [2] Bressler B, Marshall J K, Bernstein C N, *et al.* Clinical practice guidelines for the medical management of nonhospitalized ulcerative colitis: The Toronto consensus [J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(5): 1035-1058.e3.
- [3] Carbonnel F, Colombel J F, Filippi J, *et al.* Methotrexate is not superior to placebo for inducing steroid-free remission, but induces steroid-free clinical remission in a larger proportion of patients with ulcerative colitis [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(2): 380-388.
- [4] Järnerot G, Hertervig E, Friis-Liby I, *et al.* Infliximab as rescue therapy in severe to moderately severe ulcerative colitis: A randomized, placebo-controlled study [J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(7): 1805-1811.
- [5] Shen B. Pouchitis: What every gastroenterologist needs to know [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2013, 11(12): 1538-1549.
- [6] Øresland T, Bemelman W A, Sampietro G M, *et al.* European evidence based consensus on surgery for ulcerative colitis [J]. *J Crohns Colitis*, 2015, 9(1): 4-25.
- [7] Beyer-Berjot L, Maggiori L, Birnbaum D, *et al.* A total laparoscopic approach reduces the infertility rate after ileal pouch-anal anastomosis: A 2-center study [J]. *Ann Surg*, 2013, 258(2): 275-282.
- [8] Kani H T, Shen B. Male issues of the ileal pouch [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2015, 21(3): 716-722.
- [9] Zenlea T, Yee E U, Rosenberg L, *et al.* Histology grade is independently associated with relapse risk in patients with ulcerative colitis in clinical remission: A prospective study [J]. *Am J Gastroenterol*, 2016, 111(5): 685-690.
- [10] 彭卓崙, 陶丽芬, 蓝斯莹, 等. 基于数据挖掘对溃疡性结肠炎中医用药规律的分析 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2020, 22(7): 2269-2275.
- [11] Le Berre C, Honap S, Peyrin-Biroulet L. Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2023, 402(10401): 571-584.
- [12] Patankar J V, Becker C. Cell death in the gut epithelium and implications for chronic inflammation [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(9): 543-556.
- [13] Günther C, Neumann H, Neurath M F, *et al.* Apoptosis, necrosis and necroptosis: Cell death regulation in the intestinal epithelium [J]. *Gut*, 2013, 62(7): 1062-1071.
- [14] Maloy K J, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease [J]. *Nature*, 2011, 474(7351): 298-306.
- [15] Cantley L C. The phosphoinositide 3-kinase pathway [J]. *Science*, 2002, 296(5573): 1655-1657.
- [16] Li Q Q, Li J, Yin L X, *et al.* Sophoricoside improved Crohn's disease-like colitis by inhibiting intestinal epithelial cell apoptosis through PI3K/AKT signaling [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 131: 111886.
- [17] Li F, Yang Y P, Ge J L, *et al.* Multi-omics revealed the mechanisms of *Codonopsis pilosula* aqueous extract in improving UC through blocking abnormal activation of PI3K/Akt signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024,

- 319(Pt 2): 117220.
- [18] Bartel D P. Metazoan microRNAs [J]. *Cell*, 2018, 173(1): 20-51.
- [19] Cao Y Y, Wang Z H, Yan Y Q, *et al.* Enterotoxigenic bacteroides fragilis promotes intestinal inflammation and malignancy by inhibiting exosome-packaged miR-149-3p [J]. *Gastroenterology*, 2021, 161(5): 1552-1566.e12.
- [20] Vermeire S, Nitecheu J, Gineste P, *et al.* Obefazimod in patients with moderate-to-severely active ulcerative colitis: Efficacy and safety analysis from the 96-week open-label maintenance phase 2b study [J]. *J Crohns Colitis*, 2025, 19(5): jjaf074.
- [21] Yu T X, Kalakonda S, Liu X Z, *et al.* Long noncoding RNA uc.230/CUG-binding protein 1 axis sustains intestinal epithelial homeostasis and response to tissue injury [J]. *JCI Insight*, 2022, 7(19): e156612.
- [22] Chen Y, Xiao Y, Ge W, *et al.* miR-200b inhibits TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition and promotes growth of intestinal epithelial cells [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4(3): e541.
- [23] Machama T, Dixon J E. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(22): 13375-13378.
- [24] Lee Y R, Chen M, Pandolfi P P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: New modes and prospects [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(9): 547-562.
- [25] 李芳, 陈正君, 葛俊李, 等. 党参经 PI3K/Akt 干预溃疡性结肠炎黏膜细胞铁死亡-线粒体动力学失衡的机制研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(12): 3865-3877.
- [26] 胡志航, 赵建斌, 柴建新, 等. 党参的毒理学试验研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2018, 28(19): 2325-2329.
- [27] 王领弟, 孙孟瑶, 张芳, 等. 体外细胞实验中中药干预方法研究进展 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(4): 1448-1451.
- [28] 孟雪, 吴鸿. 中药含药血清制备的研究进展与思考 [J]. *辽宁中医杂志*, 2025, 52(6): 122-124.
- [29] 陈莉娟, 李彦龙, 杨维建, 等. 基于 NLRP3/Caspase-1 通路探讨薏苡仁多糖对溃疡性结肠炎体外炎症模型的干预作用及机制 [J]. *重庆医科大学学报*, 2023, 48(11): 1323-1330.
- [30] 姜莎莎, 臧思源, 柳越冬, 等. 青黛对溃疡性结肠炎体外炎症模型的抗炎作用及机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(2): 1101-1104.
- [31] 张惠琴, 杨海燕, 张红霞, 等. 党参标准汤剂指纹图谱及质量标准研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39(22): 2921-2926.
- [32] 彭锐, 马鹏, 莫让瑜, 等. 川党参药材质量标准研究 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2014, 16(3): 578-581.
- [33] Fisher K, Lin J M. microRNA in inflammatory bowel disease: Translational research and clinical implication [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(43): 12274-12282.
- [34] Endicott S J, Miller R A. PTEN activates chaperone-mediated autophagy to regulate metabolism [J]. *Autophagy*, 2024, 20(1): 216-217.
- [35] Miller K A, Degan S, Wang Y Q, *et al.* PTEN-regulated PI3K-p110 and AKT isoform plasticity controls metastatic prostate cancer progression [J]. *Oncogene*, 2024, 43(1): 22-34.
- [36] Salmena L, Carracedo A, Pandolfi P P. Tenets of PTEN tumor suppression [J]. *Cell*, 2008, 133(3): 403-414.
- [37] Alimonti A, Carracedo A, Clohessy J G, *et al.* Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility [J]. *Nat Genet*, 2010, 42(5): 454-458.
- [38] Takagi T, Naito Y, Mizushima K, *et al.* Increased expression of microRNA in the inflamed colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 25(Suppl 1): S129-S133.
- [39] Casado-Bedmar M, Roy M, Berthet L, *et al.* Fecal let-7b and miR-21 directly modulate the intestinal microbiota, driving chronic inflammation [J]. *Gut Microbes*, 2024, 16(1): 2394249.
- [40] Ferragut Cardoso AP, Banerjee M, Nail AN, *et al.* miRNA dysregulation is an emerging modulator of genomic instability [J]. *Semin Cancer Biol*, 2021, 76: 120-131.
- [41] Qin T, Sun M K, Huang Y Y, *et al.* miR-221 on protective oxidative induced by selenium modified *Codonopsis pilosula* polysaccharide [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 279(Pt 3): 134815.
- [42] Chen Y, Yu C, Hu F L, *et al.* *Astragalus* polysaccharides combined with *Codonopsis pilosula* polysaccharides modulates the physiological characteristics of trophoblasts via miR-92a-1-5p/CCR7 axis [J]. *Tissue Cell*, 2022, 77: 101827.
- [43] Devkota S, Wang Y W, Musch M W, *et al.* Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in $Il10^{-/-}$ mice [J]. *Nature*, 2012, 487(7405): 104-108.

[责任编辑 李亚楠]