

## 地马煎剂对溃疡性结肠炎大鼠肠上皮细胞 BNIP3蛋白与mRNA的影响

李一芳<sup>1</sup>, 王睿<sup>2</sup>, 查安生<sup>2\*</sup>, 王丽娜<sup>1</sup>, 谭辉<sup>1</sup>

(1. 安徽中医药大学, 合肥 230012;

2. 安徽中医药大学第一附属医院, 合肥 230031)

**[摘要]** 目的:通过观察地马煎剂对腺病毒E1B 19 kD相互作用蛋白-3(BNIP3)蛋白及mRNA的调控水平,了解其在干预溃疡性结肠炎(UC)线粒体自噬及控制炎症中的机制。方法:60只SPF级SD大鼠随机分为空白组,模型组,地马煎剂低、中、高剂量(8.5, 17.0, 34.0 g·kg<sup>-1</sup>)组,美沙拉嗪(3.0 g·kg<sup>-1</sup>)组,每组10只。模型组高脂饮食+2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)+乙醇法建立活动期UC大鼠模型,给药组连续灌胃14 d。苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠结肠黏膜组织病理变化,蛋白免疫印迹法(Western blot)及实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肠上皮细胞BNIP3蛋白及mRNA的表达。结果:HE染色结果显示,模型组大鼠结肠组织可见大量炎性细胞浸润以及非干酪样肉芽组织,而各给药组大鼠出现不同程度的纤维性修复等表现。与正常组比较,模型组BNIP3蛋白及mRNA表达均明显升高( $P<0.05$ );与模型组比较,地马煎剂低、中、高剂量组及美沙拉嗪组BNIP3蛋白及mRNA表达均显著升高( $P<0.01$ );与地马煎剂低剂量组比较,地马煎剂中、高剂量组及美沙拉嗪组BNIP3蛋白及mRNA表达明显升高( $P<0.05$ )。结论:地马煎剂可增加UC活动期大鼠肠上皮的BNIP3表达,这可能是其促进线粒体自噬对抗UC炎症的机制之一。

**[关键词]** 地马煎剂; 溃疡性结肠炎; 腺病毒E1B 19 kD相互作用蛋白-3(BNIP3); 线粒体自噬; 机制

**[中图分类号]** R2-0;R289;R285.5;R364.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)11-0107-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20201140

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200326.1419.002.html>

**[网络出版日期]** 2020-3-26 16:15

### Effect of Dima Decoction on BNIP3 Protein and mRNA Expressions in Intestinal Epithelial Cells of Ulcerative Colitis Mice

LI Yi-fang<sup>1</sup>, WANG Rui<sup>2</sup>, ZHA An-sheng<sup>2\*</sup>, WANG Li-na<sup>1</sup>, TAN Hui<sup>1</sup>

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

2. First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the regulatory level of Dima decoction on adenovirus E1B 19 kD interacting protein 3(BNIP3) protein and to understand the mechanism in intervening mitophagy and controlling inflammation in ulcerative colitis. **Method:** The 60 SPF SD rats were randomly divided into normal control group, model control group, low, medium and high dose Dima decoction(8.5, 17.0, 34.0 g·kg<sup>-1</sup>) group and mesalazine(3.0 g·kg<sup>-1</sup>) group, 10 for each group. The model of UC rats was established by the method of environmental diet intervention +2, 4, 6-trinitro-Benzenesulfonic acid (TNBS) + ethanol, the administration group was administered for 14 days. Hematoxylin-eosin (HE) was used to detect pathological changes of colonic mucosal tissues in rats. Western blot and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) were used to

**[收稿日期]** 20191031 (022)

**[基金项目]** 安徽省自然科学基金青年基金项目(1808085QH257);安徽省卫生计生委中医药科研课题项目(2016zy68)

**[第一作者]** 李一芳, 硕士, 讲师, 从事中医脾胃病发病及护理研究, E-mail: lyf20110801@163.com

**[通信作者]** \* 查安生, 硕士, 教授, 从事中医脾胃病病因病机研究, E-mail: zhaansheng2006@163.com

detect the expressions of BNIP3 protein and mRNA in intestinal epithelial cells. **Result:** HE staining results showed that a large number of inflammatory cell infiltration and non-cheesy granulation tissue were observed in the colon of rats in the model group, while the rats in each drug group showed different degrees of fibrous repair. Compared with normal group, the expression of BNIP3 protein and mRNA in model group were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, the expression of BNIP3 protein and mRNA in low, medium and high-dose Dima decoction group and mesalazine group were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with low-dose group, the expression of BNIP3 protein and mRNA in medium and high-dose groups and mesalazine group were significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Dima decoction can increase the expression of BNIP3 in the intestinal epithelium of UC active rats, which may be one of the mechanisms of promoting mitochondrial autophagy against UC inflammation.

[Key words] Dima decoction; ulcerative colitis; adenovirus E1B 19 kD-interacting protein 3 (BNIP3); mitophagy; mechanism

溃疡性结肠炎(UC)病因与自身免疫异常有关<sup>[1]</sup>。在自身免疫异常的情况下,由外界因素刺激导致发作,出现广泛的黏膜糜烂、溃疡<sup>[2]</sup>。在临床上表现为反复发作的腹痛、腹泻和黏液脓血便。目前临床上针对UC的用药包括水杨酸制剂、激素、免疫抑制剂及生物制剂,需长期维持用药且不能根治,一旦停药则存在复发风险。

目前尚无根治UC的方法且UC发病机制尚未完全清晰,因此,如何有效提高UC患者自身的抗炎及损伤修复能力,对控制UC复发有重要的影响。现有的研究结果已证明中医药的抗炎机制及疗效,但可用中医治法治则解释,且能有效对抗UC复发的分子生物学机制有待进一步研究。B淋巴细胞瘤-2/腺病毒E1B 19 kD相互作用蛋白-3(Bcl-2/BNIP3)为Bcl-2的一种亚族,通过结合自噬蛋白轻链-3(LC3)介导哺乳动物线粒体自噬,进一步清除损伤的线粒体和过多的自由基,以对抗氧化应激损伤,保护上皮细胞。研究表明,线粒体自噬可以对抗UC的炎症活动,抑制UC的发作<sup>[3]</sup>。UC属于中医“休息痢”范畴,以脾虚湿困为基础,临床活动期表现出肠道湿热,治疗以清热化湿为法。课题组长期临床中发现,UC患者长期处于发作期缓解期交替,呈现出上盛下虚、中有瘀热湿浊的状态,因此治疗需要重视健脾化湿、活血解毒并用。地马煎剂由治疗湿热痢代表方剂芍药汤化裁而成,有健脾化湿、活血解毒功效<sup>[4]</sup>。前期研究发现本方可刺激UC大鼠肠上皮细胞提高线粒体自噬水平<sup>[5]</sup>,并进一步控制UC的炎症活动。BNIP3是线粒体自噬的正向激活通路中的关键蛋白,在促进自噬和提高肠上皮抗炎水平中起发挥正向调节作用。本研究着眼于观察地马煎剂对BNIP3蛋白及mRNA表达的调控能力,探

讨地马煎剂通过调控线粒体自噬及对抗UC的机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 60只SPF级SD大鼠,6~8周龄,体质量(250±12)g,雌雄各半。购自长沙市天勤生物技术有限公司,合格证号SCXK(湘)2019-0014,适应性喂养1周后进入实验。本研究经安徽中医药大学实验动物委员会批准,实验符合动物伦理委员相关指导原则。

**1.2 药物及试剂** 马齿苋30g,生黄芪30g,黄连6g,黄柏10g,地锦草30g,槟榔10g,炒白术10g,木香10g,赤芍10g,购于安徽省中医药制剂中心。以上药材经安徽中医药大学第一附属医院药剂科高家荣主任药师鉴定。美沙拉嗪缓释颗粒剂(法国艾迪莎公司,批号191002,药品准字号H20040727);2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS,美国Sigma公司);苏木素染色液,伊红染色液(中国雷根生物技术有限公司,批号分别为B102516, AIG2062C);醋酸双氧铀(北京中镜科仪技术有限公司,批号GZ02625);铅盐染色液(上海如吉生物科技有限公司,批号SJH0579);SDS-PAGE梯度预制胶(中国金斯瑞生物科技有限公司,批号EB06BA0002);BCA法蛋白浓度测定试剂盒, RNAiso Plus, cDNA第一链合成试剂盒, QPCR定量反应试剂盒(日本Takara公司,批号分别为AI91729A, AIG1560A, AIG2022A);BNIP3一抗(中国艾美捷科技有限公司,批号PAB11857); $\beta$ -微管蛋白(tubulin)(美国CST公司,批号2146S);二抗(中国碧云天生物技术公司,批号10251919021);蛋白酶抑制剂(瑞士Roche公司,批号10251819041);ECL增强化学发光检测仪试剂盒(美国Thermo公司,批号UC280907)。

**1.3 仪器** Muliskan MK3型多功能酶标仪(美国 Thermo 公司), P115型 pH 仪(德国 Mettler-Toledo GmbH 公司); 382AT型超低温冰箱(日本 Sanyo 公司); Precisa12A型电子分析天平(瑞士 Precisa 公司); VS-1300型超净工作台(中国苏州安泰空气技术有限公司); 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR) 仪(加拿大 Funglyn Biotech 公司); PowerPac 型电泳仪, Trans-Blot 型蛋白湿转仪(美国 Bio-Rad 公司); GDS8000 凝胶扫描系统(美国 UVP 公司); BACKMAN CS-15R 型高速台式离心机(美国 Beckman 公司); EPS-100 型凝胶成像仪稳压 DNA 电泳仪(中国上海天能科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 药物制备** 原方参考《黄帝内经·素问·病机气宜保命集》中芍药汤结合临床化裁, 古今剂量换算并结合临床常用剂量, 马齿苋 30 g, 生黄芪 30 g, 黄连 6 g, 黄柏 10 g, 地锦草 30 g, 槟榔 10 g, 炒白术 10 g, 木香 10 g, 赤芍 10 g。冷水浸泡药物 20~30 min, 加常温水浸泡 60 min, 轻压药材时水高出药平面约 2 cm。武火煎煮 30 min, 后文火煎煮 60 min, 煮取药液 300 mL。

**2.2 动物分组、造模及给药** 大鼠 60 只随机分为空白组, 模型组, 地马煎剂低、中、高剂量组, 美沙拉嗪组, 每组 10 只。病症结合的溃疡性结肠炎大鼠模型复制 高脂饮食+TNBS+乙醇法建立活动期 UC 大鼠模型<sup>[6-7]</sup>: 适应性喂养 7d, 自由摄食标准颗粒饲料。模型鼠蜂蜜水自由饮用, 隔日灌服猪油 15 g·kg<sup>-1</sup>(灌胃前加热融化)、白酒(乙醇浓度为 40%) 20 mL·kg<sup>-1</sup>灌胃, 共 20 d。第 6, 20 天予注射抗原乳化液。其后各组禁食 36 h, 7% 水合氯醛以 5 mL·kg<sup>-1</sup>剂量麻醉后, 各组大鼠予灌肠给药, 空白组用生理盐水 2.5 mL 灌肠, 其他各组用 12:5 比例的 5% TNBS 与 50% 乙醇灌肠液 2.5 mL 灌肠。大鼠出现腹泻、脓血便, 大便常规中隐血试验呈阳性, 饮水及饮食减少, 活动减少, 尿少而黄, 粪便黏滞不成形, 舌苔黄腻说明造模成功<sup>[8-9]</sup>。灌肠结束后, 空白组、模型组以生理盐水灌胃 14 d; 大鼠以一般人用量 6 倍作为中剂量, 低、中、高剂量以 1:2:4 比例给药, 给药剂量分别为地马煎剂低剂量组以 8.5 g·kg<sup>-1</sup>灌胃, 地马煎剂中剂量组以 17.0 g·kg<sup>-1</sup>灌胃, 地马煎剂高剂量组以 34.0 g·kg<sup>-1</sup>灌胃<sup>[10]</sup>, 美沙拉嗪组予美沙拉嗪缓释颗粒剂 3.0 g·kg<sup>-1</sup>, 分别灌胃 14 d。

**2.3 苏木精-伊红(HE)染色观察大鼠肠上皮细胞病理形态学变化** 予麻醉下剪开腹腔并分离结肠, 距

肛缘 8 cm 病灶处取结肠组织, 磷酸盐缓冲液(PBS)清洗, 4% 多聚甲醛固定, 石蜡切片, 苏木素染液染色 10 min, 伊红染液染色 30 s。200 倍光学显微镜下观察大鼠结肠组织病理变化。

**2.4 透射电镜下观察大鼠肠上皮细胞线粒体自噬** 样本固定、脱水、包埋后, 切为厚约 1 μm 的半薄切片, 60 °C 条件下美蓝染液染色 30 s, 复合染料染色 10 s, 切取约 50 nm 超薄切片, 醋酸双氧铀染色液及铅染色液于室温下各染色 10, 12 min, 透射电子显微镜观察肠上皮细胞线粒体自噬情况。

**2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 BINP3 蛋白的表达** 采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE), 电泳后转至 PVDF(经甲醇活化)膜, 转膜 1~3 h, TBST 清洗 1 min, 5% 脱脂牛奶封闭液室温封闭 2 h。滴加 BNIP3 一抗(1:500), tubulin(1:5000), 4 °C 孵育过夜, 加入二抗(1:1000), 温育 1.5 h; 化学发光底物发光并曝光, 用曝光仪检测。利用 Image J 来计算 Western blot 中各条带的灰度值。

**2.6 Real-time PCR 检测肠上皮细胞 BINP3 mRNA 的表达** 反转录反应条件的设置: 25 °C 10 min, 42 °C 50 min, 85 °C 5 min; Real-time PCR 扩增条件的设置: 94 °C 4 min; 94 °C 20 s, 退火 60 °C 30 s, 延伸为 72 °C 30 s 各 1 次, 进行 35 个循环, 收集荧光信号, 反应结束, 进行数据分析用。提取组织总 RNA 后根据逆转录试剂盒制备 cDNA 后进行 Q-PCR 检测: BNIP3 的 mRNA 表达。以 β-actin 为内参, 以 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法计算 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

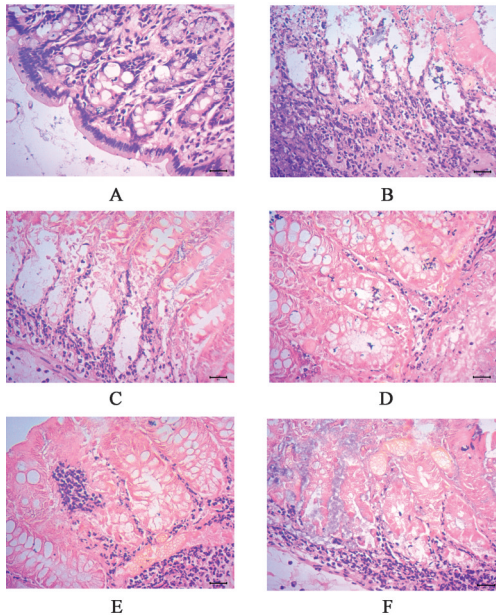
引物	序列(5'-3')	长度/bp
BNIP3	上游 ACTGTGACAGCCACCTCG	180
	下游 GCCGACTTGACCAATCCC	
β-actin	上游 CCCATCTATGAGGGTTACGC	150
	下游 TTTAATGTCACGCACGATTTTC	

**2.7 统计学分析** 实验数据用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。满足正态性与方差齐性, 多组间比较采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对各组大鼠结肠黏膜组织病理学的影响** 与空白组比较, 模型组大鼠结肠黏膜结构破坏, 可见大量炎性细胞浸润以及非干酪样肉芽组织; 与模型

组比较,地马煎剂各剂量组和美沙拉嗪组病灶周边出现新生上皮,黏膜下各层出现纤维性修复,以地马煎剂高剂量组最明显。见图1。



A.空白组;B.模型组;C.地马煎剂中剂量组;D.地马煎剂低剂量组;E.地马煎剂高剂量组;F.美沙拉嗪组(图2同)

图1 地马煎剂对各组大鼠结肠组织病理学的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of Dima Jianji on histopathology of intestinal epithelial in different groups of rats(HE,×200)

**3.2 对各组大鼠电镜下线粒体自噬的影响**与空白组比较,模型组线粒体内脂类包含物增多,线粒体外室肿胀,提示线粒体损伤,但视野内未见自噬小体。与模型组比较,地马煎剂各剂量组和美沙拉嗪组中可见到双层脂膜结构的自噬小体,并可见到内质网-线粒体接触位点。提示在地马煎剂各剂量组和美沙拉嗪组中线粒体自噬活动频繁。其中以地马煎剂高剂量组最明显。见图2。

**3.3 对各组大鼠结肠黏膜组织 BINP3 蛋白表达水平的影响**与空白组比较,模型组 BINP3 蛋白相对表达量明显升高( $P < 0.05$ ),提示模型组通路激活水平均明显升高。与模型组比较,地马煎剂各剂量组和美沙拉嗪组 BINP3 蛋白表达均显著升高( $P < 0.01$ ),提示药物干预后线粒体自噬水平和通路激活水平亦明显升高。地马煎剂中剂量组、高剂量组和美沙拉嗪组 BINP3 蛋白表达显著高于地马煎剂低剂量组( $P < 0.05$ ),但3组之间无明显差异。见图3,表2。

**3.4 对各组大鼠结肠黏膜组织 BINP3 的 mRNA 表达**与空白组比较,模型组 BINP3 mRNA 表达量明

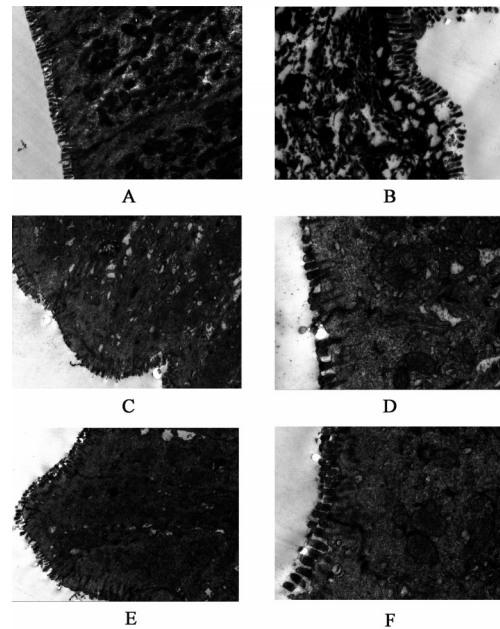
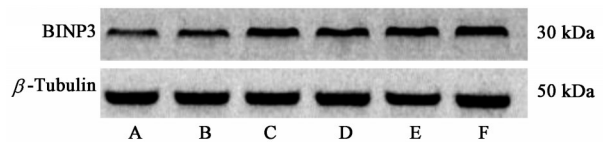


图2 地马煎剂对各组电镜下线粒体自噬的影响(电镜,×3 000)

Fig. 2 Effect of Dima Jianji on mitophagy of rats in different groups under electron microscope of rats(TEM,×3 000)



A.空白组;B.模型组;C.地马煎剂中剂量组;D.美沙拉嗪组;E.地马煎剂低剂量组;F.地马煎剂高剂量组

图3 大鼠结肠组织 BINP3 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of BINP3 protein expression in colon of rats

表2 地马煎剂对大鼠结肠组织 BINP3 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=4$ )  
Table 2 Effect of Dima decoction on expression of BINP3 protein in colon of rats( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	BINP3/ $\beta$ -tubulin
空白	-	83.90±3.50
模型	-	104.95±4.73 <sup>1)</sup>
地马煎剂	8.5	143.85±5.05 <sup>2)</sup>
	17.0	180.31±2.48 <sup>3)</sup>
	34.0	191.92±3.21 <sup>3)</sup>
美沙拉嗪	3.0	184.33±5.71 <sup>3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与地马煎剂低剂量组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ (表3同)。

显升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,地马煎剂各剂量组和美沙拉嗪组 BINP3 的 mRNA 表达显著升高( $P < 0.01$ );地马煎剂中、高剂量组和美沙拉嗪组 BINP3 mRNA 表达显著高于地马煎剂低剂量组( $P < 0.05$ )。见表3。

表3 地马煎剂对各组大鼠结肠组织BNIP3 mRNA表达量的影响  
( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Table 3 Effect of Dima Jianji on BNIP3 mRNA expression in colon of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	BNIP3
空白	-	0.025±0.01
模型	-	0.049±0.02 <sup>1)</sup>
地马煎剂	8.5	0.067±0.02 <sup>2)</sup>
	17.0	0.099±0.04 <sup>3)</sup>
	34.0	0.082±0.03 <sup>3)</sup>
美沙拉嗪	3.0	0.079±0.04 <sup>3)</sup>

#### 4 讨论

本实验大鼠在高脂饮食+TNBS+乙醇作用的影响下,模型组、地马煎剂各剂量组、地马煎剂+抑制组及美沙拉嗪组在饮水量及体质量变化上均与空白组明显不同。HE染色后高背景下各组大鼠黏膜组织均出现明显的炎症活动性及炎症修复状态,但其水平在不同的组别呈现出差异性,而这些差异性同样也在各组BNIP3表达水平中出现,但是否呈正相关尚不明确。

自噬发生的分子机制非常复杂。在自噬体的形成过程中,主要有两大信号通路参与调控:磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)通路,缺氧诱导因子(HIF)-1 $\alpha$ /BNIP3/Beclin-1通路,其中前者是抑制性通路,后者则是激活性通路。其中HIF-1 $\alpha$ /BNIP3/Beclin-1通路与线粒体自噬关系密切<sup>[11]</sup>。BNIP3作为HIF-1下游靶基因,作用是直接调控细胞死亡。BNIP3属于B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)蛋白家族中的BH3-only亚族,正常情况下BNIP3的表达量很低,但在缺氧条件下BNIP3的表达上调<sup>[12]</sup>。其表达主要定位于线粒体外膜、细胞质内质网膜、核膜。除了在细胞死亡中发挥着重要的作用,BNIP3也是细胞自噬乃至线粒体自噬过程中的重要调控蛋白<sup>[13]</sup>。在其他学者研究中,也发现BNIP3水平与线粒体自噬激活通路的表达水平呈正相关<sup>[14]</sup>。

UC发作期处于炎症活动状态,故肠上皮细胞的线粒体自噬水平会反应性升高,以促进细胞的修复及对抗炎症,而实验过程中发现模型组中BNIP3的表达与空白组比较明显升高,证实了这种关系。地马煎剂各剂量组的BNIP3检测结果均较模型组有明显差异,提示了应用地马煎剂后肠上皮的线粒体自噬水平更加活跃,而黏膜病理组织均呈现出炎症修复状态。此结果提示BNIP3有促进炎症修复,

保护肠上皮细胞的作用。而BNIP3是HIF-1 $\alpha$ /BNIP3/Beclin-1通路中的关键蛋白,则说明BNIP3的作用机制,可能是通过激活通路、促进线粒体自噬实现的。地马煎剂中、高剂量组对BNIP3的调节水平相对低剂量组更加显著,且与美沙拉嗪组无明显差异,说明对BNIP3蛋白的调控可能是地马煎剂对抗UC炎症活动的机制,在轻、中度UC患者中能部分替代西药美沙拉嗪的作用。

UC无对应中医病名,但与痢疾中的“休息痢”相似<sup>[15]</sup>。本病病机总属本虚标实,为体内宿有湿热之邪,久伏于胃肠,一旦复感外邪,引动伏邪则发病,表现出脾虚湿困、瘀毒内蕴的状态<sup>[16]</sup>。本病患者多饮食不节,喜食辛辣,情志不遂或急躁易怒。饮食不节损伤脾胃,失于运化,气血不畅;同时水湿不化,酿生湿浊而伏于中下焦。或因情志久病、肝肾不足,下虚不足而阴虚火旺,致上盛下虚、中有瘀热湿浊内伏。一旦触发,病处中焦下焦,为脾虚湿困、瘀毒内蕴。湿热瘀毒困于肠腑,与气血相搏,以致大肠积滞、不能传导,血络受损,血败肉腐,壅滞以成疡,而败血腐肉随壅滞而下,做休息痢<sup>[17]</sup>。对本病特点的描述,最早见于《伤寒论》:“下利已差,至其年、月、日、时复发者,以病不尽故也,当下之。”即是对休息痢特点的描述;而《诸病源候论·痢疾候》则对休息痢发作与缓解交替的特点做了描述:“故为痢也……其痢乍发乍止,谓之休息痢也”。而严用和在《济生方·痢疾》提出休息痢脾虚为本的病机:“脾胃不充,大肠虚弱,而风冷暑湿之邪,得以成间而入,故为痢疾也”。历代治疗本病,如白头翁汤、香连丸、黄芩汤、驻车丸、芍药汤等,基本以调气活血,清热解毒为法。但现代疾病UC的病机即存在瘀毒内蕴的邪实,亦存在脾虚甚至湿困的虚损状态。因此,除了活血、解毒外,固本培元同样重要。因此,健脾化湿、活血解毒成为UC活动期现代治疗的主要原则<sup>[18]</sup>。而地马煎剂作为长期应用于UC临床的院内制剂,同样具有上述功效。在课题组的前期临床实验中,发现其能够通过调节Toll样受体(TLR)/髓样分化因子88(MyD88)信号通路的表达干预UC的炎症发生并改善凝血功能,且与临床症状的缓解程度呈正比<sup>[19]</sup>。

当前对溃疡性结肠炎中医治疗的机制研究,在免疫调节、干预细胞凋亡、抑制炎症方面均取得相关进展,证实了中医药干预UC的部分现代医学机制<sup>[20-21]</sup>。但这些研究中,尚缺乏现代医学机制对中医治法治则实质的探讨。线粒体为细胞的生命活

动提供必须的能量<sup>[22]</sup>,与中医理论中脾所具有的“主运化、后天之本”功能相似,激活自噬即类似于“益气健脾”;而线粒体更新是通过自噬,以降解受损细胞器和有害物质来实现,则类似“活血解毒”的功效。因此,地马煎剂干预线粒体自噬对抗UC的分子机制,符合本处方的益气健脾、活血解毒的中医治则,这也从现代医学的微观角度,对解释中医理论中“益气健脾”和“活血解毒”的实质提供一种客观的认识。

[参考文献]

- [1] 陈灏珠,林果为,王吉耀. 实用内科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2013:2005-2011.
- [2] 陈灏珠,钟南山,陆再英. 内科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2013:385-390.
- [3] ASLAN M, NAZLIGU Y, BOLUKBAS C, et al. Peripheral lymphocyte DNA damage and oxidative stress in patients with ulcerative colitis [J]. Pol Arch Med Wewn, 2011, 121(7/8): 223-229.
- [4] 章小平,查安生,丁小丽,等. 健脾解毒化瘀方灌肠对溃疡性结肠炎患者T细胞亚群的研究[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(2): 396-398.
- [5] 王睿,王键,查安生,等. 地马煎剂对溃疡性结肠炎大鼠 HIF-1 $\alpha$ /BNIP3/Bcl-2 通路相关蛋白及线粒体自噬水平的调节作用[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(09): 3956-3959.
- [6] 刘佳丽,杨坤,徐爱玲,等. 不同造模次数对2,4,6-三硝基苯磺酸/乙醇诱导重症溃疡性结肠炎模型大鼠的影响[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(27): 4363-4368.
- [7] 孙乐,蔺晓源,邓娜,等. 溃疡性结肠炎中医病证结合动物模型的研究进展[J]. 中国中医急症, 2019, 28(7): 1300-1302.
- [8] 宫健伟,苑述刚,阮时宝. 对免疫方法制作溃疡性结肠炎动物模型的探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(2): 70-71.
- [9] 许胜杰,潘志. 中医湿热证动物模型研究[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2018, 6(3): 34-35.
- [10] REAGAN-SHAW S. Dose translation from animal to human studies revisited [J]. FASEB J, 2008, 22(3): 659-661.
- [11] KAMADA Y, FUNAKOSHI T, SHINTANI T, et al. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex [J]. Cell Biol, 2000, 150(6): 1507-1713.
- [12] GROSS A, MCDONELL J M., KORSMEYER S J. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis [J]. Gene Dev, 1999, 13(15): 1899-1911
- [13] YU H, CHEN B, REN Q. Baicalin relieves hypoxia-aroused H9c2 cell apoptosis by activating Nrf2/HO-1-mediated HIF1 $\alpha$ /BNIP3 pathway [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 3657-3663.
- [14] KANG C, KANG M Y, HAN Y Y, et al. 6-Gingerols (6G) reduces hypoxia-induced PC-12 cells apoptosis and autophagy through regulation of miR-103/BNIP3 [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 1653-1661.
- [15] 张声生,沈洪,郑凯,等. 溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识意见(2017)[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(8): 3585-3589.
- [16] 王鹏. 溃疡性结肠炎的中医证候学研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2014.
- [17] 张伯礼,薛博瑜. 中医内科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2012: 217-225.
- [18] 汪悦. 益气解毒化瘀方对慢性复发型溃疡性结肠炎凝血状态的影响[D]. 合肥:安徽中医药大学, 2015.
- [19] 汪悦,查安生. 中医药对溃疡性结肠炎 TLR/MyD88 信号通路 NF- $\kappa$ B 的干预研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2015, 23(8): 426-429.
- [20] 吴东升,曹晖,张彧,等. 芍药汤对溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜免疫屏障的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(9): 6-11.
- [21] 王一帆,范恒. 氧化苦参碱调控 RhoA/ROCK 信号通路介导溃疡性结肠炎 E-cadherin 及 TGF- $\beta$  的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(6): 73-80.
- [22] GUO W J, SUN Y, LIU W, et al. Small molecule-driven mitophagy-mediated NLRP3 inflammasome inhibition is responsible for the prevention of colitis-associated cancer [J]. Autophagy, 2014, 10(6): 972-985.

[责任编辑 孙丛丛]