

参苓白术散抗炎症性肠病作用与调节肠上皮细胞自噬的关系探讨

游宇^{1*}, 刘玉晖², 廖旺娣¹

(1. 南昌大学第一附属医院, 南昌 330006; 2. 江西中医药大学, 南昌 330004)

[摘要] **目的:** 探讨参苓白术散通过调节肠上皮细胞自噬对5%葡聚糖硫酸钠(DSS)所致小鼠炎症性肠病(IBD)的改善作用。**方法:** 84只BALB/c小鼠随机分为7组,每组12只。除正常组之外,5% DSS自由饮用7d诱导急性炎症性肠病,治疗组分别给予参苓白术散高、中、低剂量(12, 6, 3 g·kg⁻¹·d⁻¹),美沙拉嗪(2 g·kg⁻¹·d⁻¹),自噬诱导剂雷帕霉素(4 mg·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃。苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠结肠组织的病理形态学变化;透射电镜检测肠上皮细胞自噬体形成情况;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测自噬相关蛋白LC3-II/LC3-I,磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K),哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR),泛素结合蛋白-1(p62),Beclin1磷酸化,ULK1,4EBP蛋白表达。**结果:** 与正常组比较,模型组小鼠结肠黏膜上皮细胞广泛缺失,腺体大多数不完整,呈结肠炎改变,LC3-II含量明显降低($P < 0.05$),自噬不明显,而自噬水平增加,结肠组织中自噬通路蛋白PI3K, mTOR, p-p62磷酸化程度及ULK1蛋白表达明显升高($P < 0.05$),Beclin1磷酸化程度及4EBP蛋白表达明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,参苓白术散中、高剂量组,美沙拉嗪组及雷帕霉素组结肠组织明显改善,LC3-II含量均明显升高($P < 0.05$),参苓白术散高、中、低剂量组,美沙拉嗪组及其对应的抑制剂组可明显抑制PI3K, mTOR, p-p62磷酸化,降低ULK1蛋白表达,促进Beclin1磷酸化及升高4EBP蛋白表达($P < 0.05$)。**结论:** 参苓白术散抗DSS诱导的IBD的作用与调节肠上皮细胞自噬通路蛋白PI3K, mTOR, p62的磷酸化有关。

[关键词] 参苓白术散; 炎症性肠病; 细胞自噬; 蛋白通路

[中图分类号] R2-0; R285; R289; R381.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)15-0051-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20191537

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190422.2201.001.html>

[网络出版时间] 2019-04-23 13:48

Effect of Shenling Baizhu San on Murine Model of IBD Induced by DSS in Mice Through Regulating of Autophagy

YOU Yu^{1*}, LIU Yu-hui², LIAO Wang-di¹

(1. The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China;

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Shenling Baizhu San on inflammatory bowel disease (IBD) induced by 5% dextran sodium sulfate (DSS) in mice by regulating autophagy of intestinal epithelial cells. **Method:** The 84 BALB/c mice were randomly divided into 7 groups with 12 mice in each group. In addition to the normal group, 5% DSS was freely drunk for 7 days to induce acute inflammatory bowel disease. In the treatment group, high, medium and low doses of shenlingbaizhu powder (12, 6, 3 g·kg⁻¹·d⁻¹), mesalazine (2 g·kg⁻¹·d⁻¹) and autophagy inducer rapamycin (4 mg·kg⁻¹·d⁻¹) were given by gavage. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the morphological changes of colon tissues in mice. The autophagosome formation of intestinal epithelial cells was detected by transmission electron microscopy. Western blot was used to

[收稿日期] 20181218007

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460627)

[通信作者] *游宇, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 从事肠道疾病的治疗, E-mail: youyu1979@126.com

detect the ratio of autophagy related protein LC3-II/LC3-I, phosphatidylinositol-3kinase (PI3K), mammalian target of rapamycin (mTOR), ubiquitin-binding protein-1 (p62), Beclin1 phosphorylation, ULK1, 4EBP protein expression. **Result:** Compared with normal group, model group mice colonic mucosa epithelial cells are widely missed, most incomplete glands, change in colitis, LC3-II content decreased significantly ($P < 0.05$), autophagy is not obvious, and an increased level of autophagy, autophagy pathways in the colon tissue protein PI3K, mTOR, p-p62 phosphorylation degree and the ULK1 protein expression increased significantly ($P < 0.05$), Beclin1 phosphorylation and 4 ebp protein expression significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with model group, Shenling Baizhu San high dose group, salad lamictal and rapamycin group improved colon tissue obviously, LC3-II levels were higher significantly ($P < 0.05$), and Shenling Baizhu San high, medium and low dose group, salad oxazine group and its corresponding inhibitor can obviously inhibit PI3K, mTOR, p-p62 phosphorylation, reduce ULK1 protein expression, promote Beclin1 phosphorylation and 4EBP protein expression ($P < 0.05$). **Conclusion:** The effect of Shenling Baizhu San on DSS-induced IBD is related to the regulation of the phosphorylation of PI3K, mTOR and p62 proteins in the autophagy pathway of intestinal epithelial cells.

[**Key words**] Shenling Baizhu San; inflammatory bowel disease; autophagy; protein pathway

炎症性肠病 (IBD) 病因以及发病机制不清楚。肠上皮细胞屏障功能受损导致肠上皮细胞通透性增加, IBD 发生过程中肠腔内有毒物质吸收入血加重炎症反应。如何维系肠上皮细胞黏膜屏障功能以及内环境稳态成为治疗 IBD 的热点, 而内环境稳态的维持与细胞自噬密切相关。

自噬是普遍存在于真核细胞内的一种现象, 自噬体形成后与溶酶体融合降解其所包裹的内容物实现细胞的新陈代谢, 在维持细胞存活、更新、物质再利用和细胞稳态中起着重要作用^[1]。自噬相关基因 (ATG) 参与自噬的形成, 如 ATG5, ATG6, ATG8, ATG12, 在自噬的形成过程中扮演着非常重要的角色^[2-3]。磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 是研究细胞自噬的经典信号通路, PI3K 通过活化的 Akt 激活下游 mTOR 通路, 阻断细胞自噬发生。选择性阻断 PI3K/Akt/mTOR 信号通路能调控巨噬细胞自噬, PI3K 分为 I, II, III 亚型, I 型 PI3K 活化时, 可激活下游信号通路, 阻断细胞自噬的进程; III 型 PI3K 活化时, 可激活 Beclin1 (ATG6), Beclin1 是启动自噬的重要开关, 通过与 III 型的 PI3K 形成复合物, 调控自噬相关基因。泛素结合蛋白-1 (p62), 是一种自噬底物蛋白, 当自噬发生时, 细胞质中的 p62 结合相关泛素化蛋白与 LC3 结合形成复合物, 经 LC3 介导进入自噬体中, 最后在自噬溶酶体中完成降解^[4-6]。哺乳动物细胞中微管轻链蛋白 3 (LC3) 定位于自噬泡与自噬泡膜表面, 当细胞中未发生自噬现象时, LC3 经细胞内加工成 LC3-I; 当细胞自噬启动时, LC3-I 转化形为 LC3-II, 结合到自噬体膜表面。自

噬目前常用的检测方法如 LC3-II/LC3 I, 透射电镜下观察自噬体形态, 已被广泛应用于细胞自噬的基础研究中。IBD 病理过程中, 肠上皮屏障被破坏, 肠黏膜通透性增加, 导致肠上皮细胞肿胀及营养缺乏, 而肠上皮细胞肿胀具有抑制细胞自噬的作用^[7]。基因组研究发现自噬执行基因 Atg16L1 在 IBD 中发挥重要作用^[8]。因此, 肠上皮细胞自噬可能成为治疗 IBD 的新靶点, 但对 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路 with IBD 的相互关系的研究及其选择性抑制此通路促进肠上皮细胞自噬进而改善甚至治疗 IBD 的研究尚属空白。

《太平惠民和剂局方》所记载的参苓白术散由人参片、白术、茯苓、山药、莲子肉、白扁豆、薏苡仁、砂仁、桔梗、炙甘草组成。前期实验已证实参苓白术散可以减轻 IBD 症状的同时具有改善肠上皮黏膜屏障的作用^[9-10]。因此, 肠上皮细胞自噬可能成为治疗 IBD 的新靶点, 但对 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路 with IBD 的相互关系的研究及其选择性抑制此通路促进肠上皮细胞自噬进而改善甚至治疗 IBD 的研究尚属空白。本研究拟探讨参苓白术散对 DSS 诱导 BALB/c 小鼠 IBD 的影响, 从自噬及自噬相关通路蛋白探讨其可能机制。

1 材料

1.1 动物与药品 6~8 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠, 共 84 只, 体质量 (20 ± 2) g, 南昌大学医学院实验动物提供。饲养于清洁级动物房, 生产许可证号 SYXK(赣)2010-0002。严格按照学校动物伦理委员会标准进行动物实验 (伦理号 2017 医研伦审第 093 号)。参苓白术散 (云南白药集团股份有限公司, 组

成为人参片、白术、茯苓、山药、莲子肉、白扁豆、薏苡仁、砂仁、桔梗、炙甘草,批号 Z20044106);美沙拉嗪(艾迪莎,上海爱的发制药有限公司,批号 C14200623779);雷帕霉素(美国 Wyeth Pharmaceuticals 公司,批号 H20120483)。

1.2 试剂 戊二醛, 6% 冰醋酸, 电泳缓冲液, 转膜缓冲液(上海碧云天公司, 批号分别为 P0014A, P0021A, CAS111-30-10, CAS20816-13); RIPA 高效裂解液, 苯甲磺酰氟(PMSF, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)(北京索莱宝公司, 批号分别为 20160330, 20141110); 化学发光 HRP 基板(美国 Millipore 公司, 批号 1505101); 显影粉(北京康为世纪公司, 批号 10122); 定影粉(北京康为世纪, 批号 00041510); BeyoECL Plus, BCA 蛋白浓度测定试剂盒(美国 Thermo 公司, 批号分别为 MD158290, PC200898); 辣根过氧化物酶(HRP)标记免疫球蛋白(Ig)G 二抗(美国 CST 公司, 批号 7076P2); Anti-LC3 A/B, p-PI3K, p-mTOR, 磷酸化 p62 (p-p62), ULK1, Beclin1, 4EBP 抗体, LC3-I, LC3-II 抗体(英国 Abcam 公司, 批号分别为 ab128025, ab32089, ab109268, ab109012, ab203207, ab207612, ab111309, ab48394, ab51520); 苏木素染色液, 伊红染色液(碧云天生物技术有限公司, 批号分别为 C0105-1, C0105-2)。

1.3 仪器 DM2700P 型倒置荧光显微镜, CM1905 型冰冻切片仪(德国 Leica 公司); HT7800 型透射电镜(日本日立公司); IX81-FV1000 型倒置双光子共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司); ST40R 型台式高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司); AllegraTMX-12R 型离心机(美国 BECKMAN 公司); Mini-PROTEAN 3 型电泳仪, 170-4157 型全能型蛋白快速转膜仪, GelDoc 型伯乐凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); ECs3 凝胶成像系统(美国 UVP 公司)。

2 方法

2.1 造模、分组及给药 84 只 BALB/c 小鼠, 随机分为 7 组, 每组 12 只。正常组予以自由饮水饮食, 其余各组均予以 5% DSS 自由饮用 7 d 诱导急性炎症性肠病, 治疗组分别给予美沙拉嗪($2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 参苓白术散高、中、低剂量($12, 6, 3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 自噬诱导剂雷帕霉素($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)灌胃; 小鼠给药剂量参考人体剂量进行换算^[9]。每日观察粪便性状及隐血, 并观察小鼠进食、饮水、活动等一般情况。连续给予相应药物灌胃 15 d。

2.2 结肠组织标本 颈椎脱臼处死小鼠, 分离远端回肠和结肠, 分离出肛门至盲肠末端整个结肠

和直肠, 经无 RNA 酶的磷酸缓冲液洗涤后, 用 RIPA Buffer 制备蛋白标本, $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.3 苏木素-伊红(HE)染色观察结肠组织病理学变化 组织病理学检查, 结肠组织固定、石蜡包埋, 间隔 $4 \mu\text{m}$ 进行连续切片 30 张, 每间隔 10 张取 1 张。由有经验病理医生对结肠组织学评分, 每张切片随机选取 15 个高倍视野(400 倍)计分, 取其平均值。评分标准如下^[11], 病变, 无, 0 分; 黏膜下层, 1 分; 肌层, 2 分; 浆膜层, 3 分。炎症, 无, 0 分; 轻度, 1 分; 重度, 2 分。病变范围, 1% ~ 25%, 1 分; 26% ~ 50%, 2 分; 51% ~ 75%, 3 分; 76% ~ 100%, 4 分。隐窝破坏, 无, 0 分; 基底 1/3 破坏, 1 分; 基底 2/3 破坏, 2 分; 仅有完整表皮, 3 分; 全部隐窝和上皮破坏, 4 分。

2.4 透射电镜检测自噬情况 取适量结肠组织放入 2.5% 戊二醛磷酸缓冲液中固定, 过夜后经磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗, 加入 1% 锇酸后固定, PBS 冲洗, 2% 醋酸铀水溶液染色、不同浓度乙醇梯度脱水, 100% 丙酮脱水、无水丙酮与包埋剂按 1:1 体积混合渗透组织, 之后震荡 2 h, 包埋, 置于烘箱内 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 聚合 24 h, $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 聚合 24 h, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 聚合 48 h, 修块并超薄(约 120 nm)切片、染色, 4% 醋酸铀染色 20 min, 枸橼酸铅染色 5 min。染色后放到单孔铜网上, TECNAI 10 透射电镜下观察并记录、拍照。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 LC3-II/LC3-I, PI3K, mTOR, p62, Beclin1 磷酸化, ULK1, 4EBP 蛋白表达 用 RIPA 高效裂解液和 PMSF 制备蛋白样品, BCA 试剂盒检测蛋白浓度, SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜, 封闭, 与抗体特异性结合, 化学发光显影, 拍照保存, 用 Quantity One 图像分析软件测定条带的灰度值。

2.6 统计学方法 所有数据均采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析进行多样本间的均数比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠肠组织病理形态的影响 正常组小鼠结肠黏膜结构完整, 无炎性细胞浸润。模型组结肠黏膜上皮细胞广泛缺失, 腺体大多数不完整, 炎症细胞广泛浸润, 呈结肠炎改变; 参苓白术散组、美沙拉嗪组及雷帕霉素组结肠黏膜腺体基本完整, 局部有少量炎性细胞浸润或隐窝破坏, 较模型组结肠组织显著改善。见图 1, 表 1。

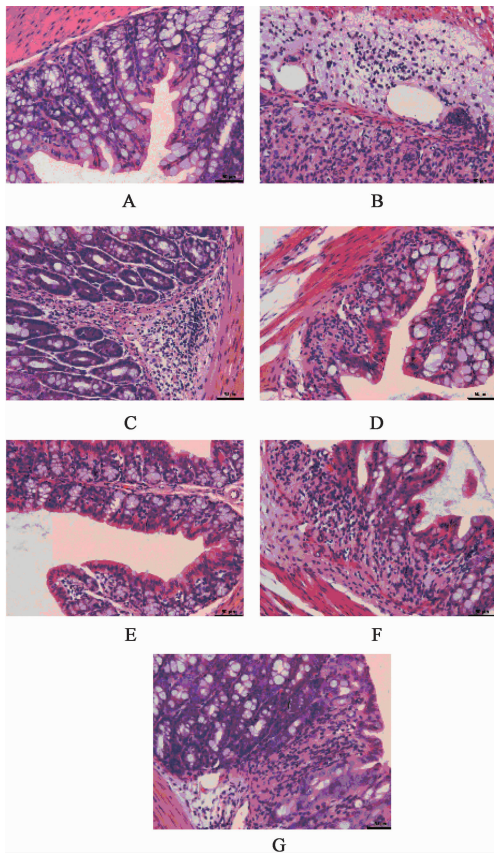


图 1 参苓白术散对小鼠肠组织病理形态的影响(HE, ×200)
A. 正常组; B. 模型组; C. 参苓白术散低剂量组; D. 参苓白术散中剂量组; E. 参苓白术散高剂量组; F. 雷帕霉素组; G. 美沙拉嗪组(图 2, 4 同)

Table 1 Effect of Shenling Baizhu San on colon histopathological score in mice (n = 8)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	0	I	II	III	IV
正常	-	8	0	0	0	0
模型	-	0	0	0	2	6
参苓白术散	3	0	5	0	2	1
	6	3	2	2	1	0
	12	6	2	0	0	0
美沙拉嗪	2	6	2	0	0	0
雷帕霉素	4 × 10 ⁻³	5	2	1	0	0

3.2 对小鼠肠上皮细胞自噬的影响 与正常组比较,模型组小鼠肠上皮细胞自噬明显减少,镜下所见双层膜的液泡状结构形成较少,而参苓白术散各剂量组、美沙拉嗪组及雷帕霉素组可以明显增加肠上皮细胞自噬,镜下可见较多的双层膜的液泡状结构,内含胞浆成分如线粒体等。见图 2。

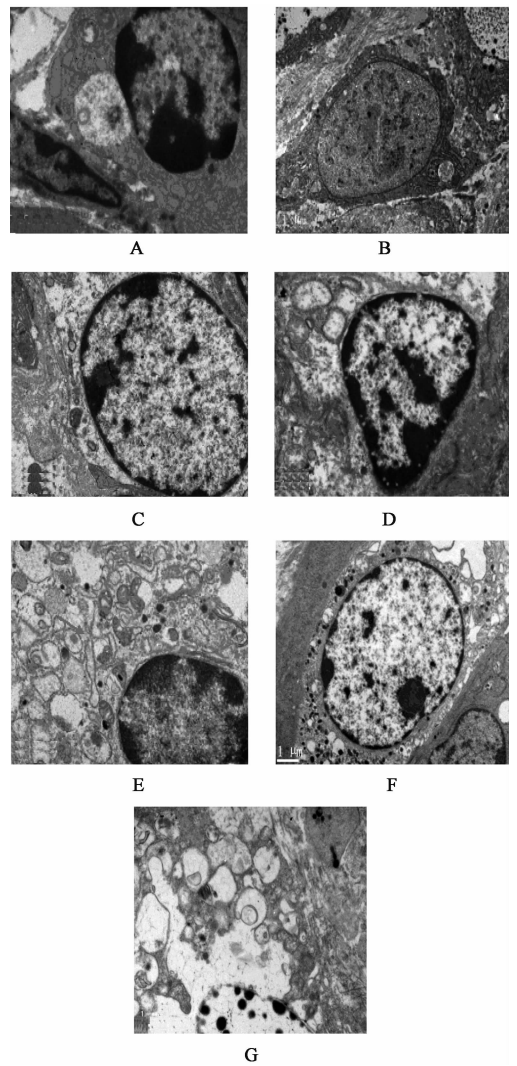
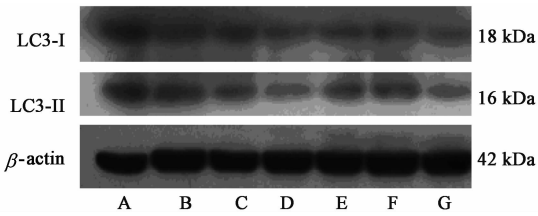


图 2 参苓白术散对炎症性肠病小鼠肠上皮细胞自噬的影响(透射电镜, ×5 900)

Fig. 2 Effect of Shenling Baizhu San on autophagy of intestinal epithelial cells in inflammatory intestinal mice(TEM, ×5 900)

3.3 对自噬形成 LC3-II/LC3-I 的影响 与正常组比较,模型组的 LC3-II 表达显著降低,LC3-II/LC3-I 为(0.68 ± 0.07) (P < 0.01),而参苓白术散中、高剂量与美沙拉嗪及雷帕霉素组可以明显升高 LC3-II 表达,LC3-II/LC3-I 分别为(1.10 ± 0.09), (1.29 ± 0.08), (0.81 ± 0.08), (1.08 ± 0.09) (P < 0.05)。见图 3。

3.4 对结肠组织中 PI3K, mTOR, Beclin1, p-p62, ULK1, 4EBP 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组结肠组织中 PI3K 磷酸化程度明显升高(P < 0.05),与模型组比较,参苓白术散各剂量组、美沙拉嗪及雷帕霉素组可以显著抑制 PI3K 磷酸化(P < 0.05);与正常组比较,模型组结肠组织中 mTOR 磷酸化程度明显升高(P < 0.05),与模型组比较,参苓



A. 正常组; B. 参苓白术散高剂量组; C. 参苓白术散中剂量组; D. 参苓白术散低剂量组; E. 美沙利嗪组; F. 雷帕霉素组; G. 模型组

图 3 结肠组织中 LC3- I 和 LC3- II 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of LC3- I and LC3- II protein expression in colon tissues

白术散各剂量组、美沙利嗪及雷帕霉素组可以明显抑制 mTOR 磷酸化 ($P < 0.05$); 与正常组比较, 模型组结肠组织中 Beclin1 磷酸化程度明显降低, 与模型组比较, 参苓白术散中剂量组、美沙利嗪及雷帕霉素组可以明显促进 Beclin1 磷酸化 ($P < 0.05$); 与正常组比较, 模型组结肠组织中 p-p62 明显升高 ($P < 0.05$), 与模型组比较, 参苓白术散各剂量组、美沙利嗪及雷帕霉素可以明显抑制 p-p62 表达 ($P < 0.05$); 与正常组比较, 模型组结肠组织中 ULK1

蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$), 与模型组比较, 参苓白术散、美沙利嗪及雷帕霉素组可以显著降低 ULK1 蛋白表达 ($P < 0.05$); 与正常组比较, 模型组结肠组织中 4EBP 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$), 与模型组比较, 参苓白术散、美沙利嗪及雷帕霉素组可以显著升高 4EBP 蛋白表达 ($P < 0.05$)。见图 4, 表 2。

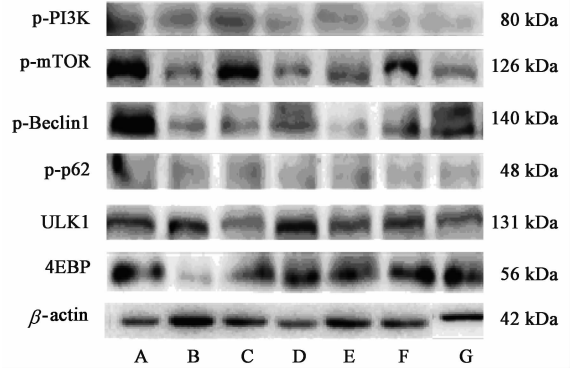


图 4 结肠组织中 p-PI3K, p-mTOR, p-Beclin1, p-p62, ULK1, 4EBP 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of p-PI3K, p-mTOR, p-Beclin1, p-p62, ULK1, 4EBP protein expression in colon tissues

表 2 参苓白术散对小鼠肠组织 p-PI3K, p-mTOR, p-Beclin1, p-p62, ULK1, 4EBP 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effect of Shenling Baizhu San on PI3K, mTOR, Beclin1, p62 phosphorylation, ULK1 and 4EBP expression of intestines of BALB/c mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-PI3K/ β -actin	p-mTOR/ β -actin	p-Beclin1/ β -actin	p-p62/ β -actin	ULK1/ β -actin	4EBP/ β -actin
模型	-	1.83 \pm 0.09 ¹⁾	1.79 \pm 0.08 ¹⁾	0.73 \pm 0.08 ¹⁾	1.67 \pm 0.09 ¹⁾	1.70 \pm 0.07 ¹⁾	0.66 \pm 0.7 ¹⁾
美沙利嗪	2	1.22 \pm 0.07 ²⁾	1.30 \pm 0.09 ²⁾	1.46 \pm 0.09 ²⁾	1.32 \pm 0.07 ²⁾	1.30 \pm 0.07 ²⁾	1.28 \pm 0.08 ²⁾
雷帕霉素	4 \times 10 ⁻³	0.93 \pm 0.06 ²⁾	0.86 \pm 0.07 ²⁾	1.38 \pm 0.07 ²⁾	1.40 \pm 0.08 ²⁾	1.25 \pm 0.06 ²⁾	1.42 \pm 0.10 ²⁾
参苓白术散	3	1.60 \pm 0.08	1.56 \pm 0.06	0.86 \pm 0.08	1.60 \pm 0.08	1.62 \pm 0.08	0.76 \pm 0.07
	6	1.42 \pm 0.07 ²⁾	1.50 \pm 0.06	1.12 \pm 0.06 ²⁾	1.51 \pm 0.07	1.46 \pm 0.07 ²⁾	1.05 \pm 0.08 ²⁾
	12	1.25 \pm 0.05 ²⁾	1.38 \pm 0.07 ²⁾	1.40 \pm 0.05 ²⁾	1.28 \pm 0.08 ²⁾	1.18 \pm 0.06 ²⁾	1.33 \pm 0.08 ²⁾

注: 正常组各蛋白设定为 1; 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

IBD 的发病机制与环境、遗传以及免疫等多种因素相关, 自噬异常可能参与 IBD 的发病。自噬在细胞稳态和机体免疫中发挥重要作用, ATG16L1, ULK1 等自噬相关基因与 IBD 相关^[12]。研究证实, ATG16L1 缺陷小鼠不发生自发性肠道炎症, 但 ATG16L1 和内质网应激相关因子 XBP1 双缺陷小鼠可发生自发性炎症, 且其炎症特征与人类 CD 相似, 研究结果认为自噬异常可能与 IBD 发生有关^[13]。

自噬的激活与调控, 研究较多的是 PI3K/Akt/mTOR 通路。起始由 ULK1/2-ATG13-FIP200 复合体介导自噬, 当饥饿或雷帕霉素作用于细胞时,

mTORC1 活性被抑制, 促使 ULK1/2-ATG13-FIP200 复合体形成, 进而诱导自噬起始。mTOR 一方面通过磷酸化 ULK1 变得不稳定来抑制自噬; 另一方面 mTOR 通过磷酸化 4EBP1 和 p70S6K 来调节蛋合成与细胞生长的方式来调节自噬^[14-15]。自噬的调控也存在着 mTOR 非依赖的分子通路, Beclin1 基因敲除小鼠出现自噬缺陷, 说明 Beclin1 是自噬重要的正性调节因子^[16]。p62 是自噬的首选靶位, p62 可以直接与自噬标记蛋白 LC3 结合, 细胞内的 p62 水平有自噬水平调控 IBD 病理过程中, 肠上皮屏障被破坏, 肠黏膜通透性增加, 导致肠上皮细胞肿胀及营养缺乏, 而肠上皮细胞肿胀具有抑制细胞自噬的

作用^[17]。

UC 与 CD 是现代西医学的疾病名称,中医学中没有与之完全对应的病,根据炎症性肠病的临床特点,中医将其归属于“痢疾”“泄泻”“肠僻”“下利”等范畴。中医认为本病发病之关键是机体脾气亏虚,湿邪内蕴,气血壅滞乃。参苓白术散出自《太平惠民和剂局方》,其原方功效为益气健脾,渗湿止泻。本课题组前期研究证实参苓白术散可以减轻小鼠 IBD 症状,也能够改善肠上皮黏膜屏障功能^[8-9,18]。

本研究利用 5% DSS 诱导 BALB/c 小鼠实验性结肠炎模型,与正常组比较,模型组 LC3-II 表达显著降低,自噬不明显;中、高剂量参苓白术散组、美沙利嗪组、雷帕霉素组均可显著升高 LC3-II 表达,提高自噬水平。模型组结肠组织中自噬通路蛋白 PI3K, mTOR, p-p62 程度及 ULK1 蛋白表达较正常组显著升高,Beclin1 磷酸化程度及 4EBP 蛋白表达显著降低,低中高剂量参苓白术散组、美沙利嗪组及其相应抑制剂组可以抑制 PI3K, mTOR, p-p62,降低 ULK1 蛋白表达,促进 Beclin1 磷酸化及升高 4EBP 蛋白水平。因此,参苓白术散治疗 DSS 诱导 IBD 的作用机制与调节肠上皮细胞自噬通路相关蛋白 PI3K, mTOR, p62 的磷酸化有关。

[参考文献]

[1] ZHAO Y G, ZHANG H. Formation and maturation of autophagosomes in higher eukaryotes: a social network [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2018, 53:29-36.

[2] Lee E J, Tournier C. The requirement of uncoordinated 51-like kinase 1 (ULK1) and ULK2 in the regulation of autophagy [J]. *Autophagy*, 2011, 7(7):689-695.

[3] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and autophagy [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 445:77-88.

[4] Noureldein M H, Eid A A. Gut microbiota and mTOR signaling: insight on a new pathophysiological interaction [J]. *Microb Pathog*, 2018, 118:98-104.

[5] LIU Y H, DING Y, GAO C C, et al. Functional macrophages and gastrointestinal disorders [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(11):1181-1195.

[6] Martini E, Krug S M, Siegmund B, et al. Mend your fences: the epithelial barrier and its relationship with

mucosal immunity in inflammatory bowel disease [J]. *Cell Mol Gas Hep*, 2017, 4(1):33-46.

[7] HU C A, HOU Y, YI D, QIU Y, et al. Autophagy and tight junction proteins in the intestine and intestinal diseases [J]. *Anim Nutr*, 2015, 1(3):123-127.

[8] Massey D C, Parkes M. Genome-wide association scanning highlights two autophagy genes, ATG16L1 and IRGM, as being significantly associated with Crohn's disease [J]. *Autophagy*, 2007, 3(6):649-651.

[9] 刘玉晖,胡婕,易文凤,等.参苓白术散治疗炎症性肠病与肠上皮细胞紧密连接的关系探讨[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(3):130-133.

[10] 刘玉晖,刘志勇,廖旺娣,等.参苓白术散抗脂多糖致肠隐窝上皮细胞损伤的作用及机制[J]. *中药新药与临床药理*, 2016, 27(1):1-5.

[11] Kanauchi O, Nakamura T, Agata K, et al. Effects of germinated barley food stuff on dextran sulfate sodium-induced colitis in rats [J]. *J Gastroenterol*, 1998, 33:179-188.

[12] Massey D C, Parkes M. Genome-wide association scanning highlights two autophagy genes, ATG16L1 and IRGM, as being significantly associated with Crohn's disease [J]. *Autophagy*, 2007, 3(6):649-651.

[13] Adolph T E, Tomczak M F, Niederreiter L, et al. Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation [J]. *Nature*, 2013, 503(7475):272-276.

[14] Kundu M. ULK1, mammalian target of rapamycin, and mitochondria: linking nutrient availability and autophagy [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14(10):1953-1958.

[15] 徐昌君,王鹏飞,刘杨,等.黄芪甲苷对特发性肺纤维化自噬活性作用及 PI3K/Akt/mTOR 信号调控的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(18):75-82.

[16] YUE Z, JIN S, YANG C, et al. Beclin1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(25):15077-15082.

[17] Haussinger D. The role of cellular hydration in the regulation of cell function [J]. *Biochem J*, 1996, 31(3):697.

[18] 刘玉晖,严雪梅,佟阳,等.参苓白术散通过 MAPK 信号通路对炎症性肠病小鼠的作用[J]. *时珍国医国药*, 2014, 25(4):793-795.

[责任编辑 孙丛丛]