

# 参苓白术散通过调节肠上皮细胞自噬治疗 葡聚糖硫酸钠所致小鼠炎症性肠病

游宇<sup>1\*</sup>, 刘玉晖<sup>2</sup>, 李林<sup>2</sup>, 廖旺娣<sup>1</sup>

(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:**探究参苓白术散对5%葡聚糖硫酸钠(DSS)所致BALB/c小鼠炎症性肠病(IBD)的改善作用与肠上皮细胞自噬的关系。**方法:**84只BALB/c小鼠,除正常组之外,5% DSS自由饮用7 d诱导急性炎症性肠病,治疗组分别给予参苓白术散高、中、低剂量组(12, 6, 3 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),美沙拉嗪组(2 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),自噬诱导剂雷帕霉素组(4 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)灌胃。观察小鼠体质量、粪便性状、隐血便血,计算疾病活动度(DAI)积分;酶联免疫吸附测定(ELISA)检测小鼠血清中炎症因子白细胞介素-8(IL-8), IL-10含量;苏木素-伊红(HE)染色观察结肠组织病理学改变;免疫组化检测肠组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和IL-1 $\beta$ 的表达;共聚焦显微镜观察肠上皮细胞自噬体形成情况;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测自噬相关通路蛋白的水平。**结果:**与模型组比较,参苓白术散组小鼠隐血,便血,体质量下降,DAI积分,病理改变等均改善;与正常组比较,模型组小鼠血清中IL-10含量显著降低,IL-8含量显著升高( $P < 0.01$ ),小鼠肠组织中IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的表达明显升高( $P < 0.01$ ),肠上皮细胞自噬体减少,微管轻链蛋白3(LC3)-II/LC3-I比值含量显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,参苓白术散可以升高小鼠血清IL-10含量,降低IL-8含量明显( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),明显降低IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的表达( $P < 0.05$ ),参苓白术散高剂量组、雷帕霉素及美沙拉嗪组肠上皮细胞自噬体形成显著增多,显著升高LC3 II/LC3 I含量。**结论:**参苓白术散抗DSS诱导的IBD的作用与抑制炎症及调节肠上皮细胞自噬有关。

**[关键词]** 参苓白术散; 炎症性肠病; 细胞自噬; 炎症

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)05-0043-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190504

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20181119.0946.004.html>

**[网络出版时间]** 2018-11-21 15:12

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

YOU Yu<sup>1\*</sup>, LIU Yu-hui<sup>2</sup>, LI Lin<sup>2</sup>, LIAO Wang-di<sup>1</sup>

(1. Gastroenterology Department of the First Affiliated Hospital Nanchang University, Nanchang 330006, China;  
2. China Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the mechanism of Shenling Baizhu San (SLBZS) in treating dextra sulfate sodium (DSS) -induced inflammatory bowel disease (IBD) mice and its relationship with autophagy. **Method:** SPF BALB/c mice were randomly divided into control group, model group, mesalazine group, low, medium and high-dose SLBZS groups, and autophagy inducer rapamycin group. The IBD mice were fed with 5% DSS in their drinking water for 7 days, and the control mice received only water. SLBZS groups were given SLBZS at doses of 3, 6, 12 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, positive group was given mesalazine sustained release granules at the dose of 2 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, rapamycin group was given rapamycin at the dose of 4 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, and control mice was given the same volume of normal saline by gavage. The mice weight, stool occult blood in stool, score of disease activity (DAI), pathological examination of intestinal mucosal lesions integral were observed after 7 days. interleukin

**[收稿日期]** 20180813(013)

**[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,硕士生导师,从事肠道疾病的治疗工作,E-mail:834977364@qq.com

(IL)-8 and IL-10 in serum were detected by enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA), vascular tissue samples were prepared for the detection of tumor neorosis factor- (TNF- $\alpha$ ) and IL-1 $\beta$ , and transmission electron microscope and Western blot were used to detect the formation of autophagosomes and the level of autophagy. **Result:** The body mass decrease, the colon length, disease activity scoring, and histological scoring of SLBZS group were better than those of DSS group. Compared with control group, the level of IL-10 decreased, while the level of IL-8 increased obviously ( $P < 0.01$ ), IL-1 and TNF- $\alpha$  expressions significantly up-regulated ( $P < 0.01$ ), the formation of autophagosome decreased, and LC3- II / I level down-regulated. Compared with IBD group, SLBZS group showed increase in formation of autophagosome and LC3- II / I and IL-10, decrease in IL-8 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and down-regulation in IL-1 and TNF- $\alpha$  expressions ( $P < 0.01$ ). These results were observed in mesalazine group and rapamycin group. **Conclusion:** Shenling Baizhu San can significantly inhibit the IBD by regulating autophagy and suppressing inflammation.

[**Key words**] Shenling Baizhu San; inflammatory bowel disease (IBD); cell autophagy; inflammation

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)主要包括克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)<sup>[1-2]</sup>,其作用机制未明。肠黏膜屏障在 IBD 中具有关键的作用,完整的肠黏膜屏障对减少上皮细胞炎症损伤,维持上皮通透性与机体内环境具有重要作用<sup>[3]</sup>。而备受研究者关注的自噬被发现在修复病变的肠黏膜屏障中发挥了重要的作用,研究证实,自噬诱导剂通过激活自噬从而改善肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )诱导的肠屏障损伤,而自噬相关基因异常可导致肠黏膜屏障受损,诱发 IBD 的发生<sup>[4-5]</sup>。

自噬是广泛存在于真核细胞内的一种以胞质空泡自噬化为特征的溶酶体依赖性降解途径,实现细胞本身代谢需要和某些细胞器更新,主要与细胞的存活、分化、发育和内环境稳态的维持密切相关。自噬过程的关键是自噬体的形成,它与多个自噬相关基因(autophagy-related, Atg)相关<sup>[6]</sup>。其中,Atg6(Beclin1)与细胞浆内隔膜结合后,通过 Atg12-Atg5-Atg16 复合物形成前自噬泡,自噬泡招集 Atg8[微管轻链蛋白 3(Microtubule-associated protein 1 light chain3, LC3)]结合到隔膜上,当 Atg12-Atg5-Atg16 复合物脱落下来后便形成成熟的自噬体。哺乳动物发生自噬时,细胞内 LC3 含量以及 LC3-I 向 LC3-II 的转化明显增加,LC3-II 含量的多少反映了细胞的自噬活性<sup>[7]</sup>。

《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、白扁豆、薏苡仁、砂仁、桔梗、炙甘草组成,本方治证由脾虚夹湿所致。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<sup>[8-9]</sup>。本研究拟用葡聚糖硫酸钠(DSS)诱发 BALB/c 小鼠出现

IBD,通过检测肠组织中 TNF- $\alpha$  和白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )的表达、肠上皮细胞自噬体形成情况及自噬相关通路蛋白的水平研究参苓白术散改善 IBD 症状与自噬的关系。

## 1 材料

**1.1 动物** BALB/c 小鼠,SPF 级,动物许可证号 SYXK(赣)2010-0002,84 只,6 ~ 8 周龄,体质量(20  $\pm$  2) g,购于南昌大学医学院实验动物部,饲养于清洁级动物房。动物实验严格按照学校动物伦理委员会标准执行(伦理编号 2017 医研伦审第 093 号)。

**1.2 药物与试剂** DSS(MW5000,美国 Fluka 公司,批号 9011-18-1);参苓白术散(由人参片、白术、茯苓、山药、莲子、白扁豆、薏苡仁、砂仁、桔梗、炙甘草组成,云南白药集团股份有限公司,批号 Z20044106,实验中所用的参苓白术散均为云南白药集团股份有限公司生产,且为医院门诊药房提供);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(惠氏制药有限公司,批号 H20120483);苏木素-伊红(HE)染液,RIPA 高效裂解液,苯甲基磺酰氟(PMSF)(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 G1120,20160330,20141110);IL-8,IL-10 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(美国 Ray Biotech 公司,批号分别为 0302160408,0302160410);电泳缓冲液,转膜缓冲溶液(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 P0014A, P0021A);Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate(美国 Millipore 公司,批号 1505101);显影粉,定影粉(康为世纪生物科技有限公司,批号分别为 10122,00041510);BCA 蛋白浓度测定试剂盒, BeyoECL Plus(美国 Thermo 公司,批号分别为

PC200898, MD158290); 兔抗免疫球蛋白(Ig)G 辣根过氧化物酶(HRP)耦连抗体, 鼠抗 IgG HRP 耦连抗体(美国 Cell Signaling 公司, 批号分别为 7074S, 7076P2); LC3-I/II, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ,  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(美国 Abcam 公司, 批号分别为 GR252926-8, GR1134-35, GR108122-1, GR218720-5); 兔免疫组化试剂盒, 小鼠免疫组化试剂盒(北京中杉金桥有限公司, 批号分别为 K153317G, K156720C)。

**1.3 仪器** DM500 型倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司); Olympus IX81-FV1000 型倒置双光子共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司); AllegraTMX-12R 型离心机(美国 BECskman 公司); 台式高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司); CM1905 型冰冻切片(德国莱卡公司); ChemiDoc MP 型蛋白免疫印迹法(Western blot)电泳仪、转膜仪及凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); ECs3 型凝胶成像系统(美国 UVP 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物实验分组及给药** 84 只 BALB/c 小鼠, 除正常组之外, 5% DSS 自由饮用 7 d 诱导急性 IBD, 治疗组分别给予参苓白术散高、中、低剂量(12, 6, 3 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), 美沙拉嗪(2 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), 自噬诱导剂雷帕霉素(40 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)灌胃, 每组 12 只; 给药剂量的确定参考人的剂量并进行动物的剂量换算而来。每日观察粪便性状及粪便隐血情况及一般情况, 如进食、饮水、活动等。连续给予相应药物灌胃 15 d。

### 2.2 样本收集与预处理

**2.2.1 血样本** 动物经眼球取血后, 室温静置 30 min 后, 4 ℃, 3 500 r·min<sup>-1</sup> 低温离心 10 min 后, -20 ℃ 冰箱保存备用。

**2.2.2 肠组织样本** 颈椎脱臼处死小鼠, 游离结肠和远端回肠, 取出肛门至盲肠末端的整个结肠和直肠段, 观察各组小鼠结肠的大体改变, 经无 RNA 酶的磷酸缓冲液洗涤后, 一部分经 4% 的甲醛固定, 石蜡包埋、切片, 用于病理学。一部分用 RIPA Buffer 制备蛋白标本, -70 ℃ 保存用于 Western blot 分析。

### 2.3 观察指标与方法

**2.3.1 疾病活动度(DAI)积分评分** 参照文献[10] HE 染色观察标准, 每日观察小鼠的体质量、大便性状和隐血情况, 计算每只小鼠的 DAI, DAI 评分标准见表 1。

**2.3.2 HE 染色观察组织病理学变化** 病理切片

表 1 DAI 积分评分

Table 1 Scoring of clinical signs for DAI

体质量下降 /%	大便性状	大便隐血 /肉眼血便	积分/分
0	正常	正常	0
1~5	松散	隐血阳性	1
5~10	松散	隐血阳性	2
10~15	松散	隐血阳性	3
>15	稀便	肉眼血便	4

行 HE 染色, 按照试剂盒说明书进行, 对结肠组织学损伤进行评分, 每个切片随机选取 15 个高倍视野(400 倍)计分, 取其平均值。评分标准如下<sup>[10]</sup>, 炎症, 无 0 分; 轻度 1 分; 重度 2 分。病变, 无 0 分; 黏膜下层 1 分; 肌层 2 分; 浆膜层 3 分。隐窝破坏, 无为 0 分; 基底 1/3 破坏为 1 分; 基底 2/3 破坏为 2 分; 仅有完整表皮为 3 分; 全部隐窝和上皮破坏为 4 分。病变范围, 1%~25% 为 1 分; 26%~50% 为 2 分; 51%~75% 为 3 分; 76%~100% 为 4 分。

**2.3.3 ELISA 检测血清生化指标** 采用 ELISA 试剂盒检测血清中 IL-8, IL-10 的含量, 操作严格按照说明书进行。

**2.3.4 共聚焦显微镜观察自噬** 快速冷冻的冰冻组织用 1% 锇酸固定液固定、梯度丙酮去除游离水、浸透包埋、超薄切片 50~70 nm, 染色、利用倒置双光子共聚焦显微镜观察自噬体的形成并拍照, 通过检测自噬体形成过程及自噬流的顺畅程度判别适度自噬。

**2.3.5 Western blot 检测 LC3-II, LC3-I 蛋白的表达** 使用 RIPA 高效裂解液和 PMSF 制备蛋白样品, BCA 试剂盒测蛋白浓度, 用 1.0 mm 的板铺好胶后, 准确上样, 60 V 电泳 10 min, 再由 80 V 恒压电泳, 当条带到达伯乐板底端时, 停止电泳, 剪切目的凝胶带, 置于 NC 膜上, 加入转膜液, 恒流 200 mA 开始转膜, 控制好时间。转膜完成后, 置 5% 脱脂奶粉封闭 2.5 h, 之后加入一抗中进行孵抗, 4 ℃ 过夜。孵抗完成后, 用 TBST 润洗 3 次, 每次 10 min, 加入相对应的二抗进行孵育(1:1 000), 室温作用 2.5 h。再用 TBST 润洗 3 次, 每次 10 min, 在暗室中加入发光液进行曝光、显影。以  $\beta$ -actin 作为内参, 用图像分析软件 Quantity One 测定其灰度值。

**2.3.6 免疫组化检测肠组织中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的表达** 按照试剂盒说明进行免疫组化染色, 显微镜下观察, 每张免疫组化切片随机选择 3 个不同的视野( $\times 200$ )观察, 并判读阳性积分吸光度 IA 表达强

度和阳性率。染色结果采用半定量分析方法,以染色强度结合阳性细胞数百分比进行评分。染色强度以多数细胞呈现的染色强度并减去背景着色计分<sup>[11]</sup>,无明显着色为 0 分,轻微为 1 分,中度为 2 分,重度为 3 分。阳性细胞百分比即每张免疫组化切片选择 3 个不同的视野(×200)观察,0~5% 分评为 0 分,6%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分,>75% 均评为 4 分。对每个视野均进行染色强度计分与阳性细胞百分比评分,最终评分以阳性细胞百分比与染色强度的加和,0 分为阴性(-),1~3 分为弱阳性,4~5 分为中度阳性,6~7 分为强阳性。

**2.4 统计学方法** 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,运用单因素方差分析进行多样本间的均数比较,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 IBD 小鼠 DAI 积分的影响** 与正常组比较,模型组 DAI 积分显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,参苓白术散、美沙拉嗪及雷帕霉素组 DAI 积分明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ),均能降低 DAI 积分并减轻 DSS 诱导引起的结肠炎症状。见表 2。

表 2 参苓白术散对 IBD 小鼠 DAI 评分的影响( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )  
Table 2 Effect of Shenling Baizhu San (SLBZS) on DAI level of intestines of BALB/c mice( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	DAI 积分/分
正常	-	0.00
模型	-	5.26 ± 0.63 <sup>1)</sup>
参苓白术散	3	3.98 ± 0.56 <sup>2)</sup>
	6	3.01 ± 0.68 <sup>3)</sup>
	12	2.46 ± 0.52 <sup>3)</sup>
美沙拉嗪	2	2.20 ± 0.61 <sup>3)</sup>
雷帕霉素	4 × 10 <sup>-3</sup>	2.68 ± 0.72 <sup>3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ (表 3~5 同)。

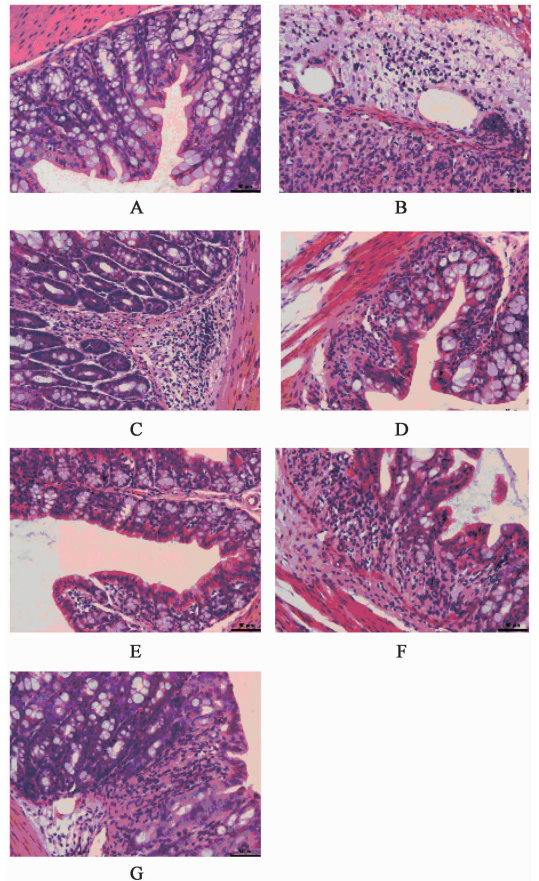
**3.2 对 IBD 小鼠结肠组织 HE 染色病理学评分的影响** 正常组结肠黏膜结构完整,无炎性细胞浸润。模型组肠黏膜上皮细胞广泛缺失,腺体大多数不完整,炎症细胞广泛浸润,呈典型炎症改变;参苓白术散、美沙拉嗪及雷帕霉素组结肠黏膜腺体基本完整,局部有少量炎性细胞浸润或隐窝破坏,明显改善模型组的肠组织炎症性病变。见表 3,图 1。

**3.3 对 IBD 小鼠血清炎症因子 IL-10 和 IL-8 含量的影响** 与正常组比较,模型组小鼠血清中 IL-10 含量显著降低,IL-8 含量显著升高( $P < 0.01$ );与

表 3 参苓白术散对 IBD 小鼠结肠组织 HE 染色病理学评分的影响( $n = 8$ )

Table 3 Effect of SLBZS on histologic scoring level of intestines of BALB/c mice( $n = 8$ )

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



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 1 参苓白术散对 IBD 小鼠结肠组织病理学的影响(HE, ×200)

Fig.1 Effect of SLBZS on histologic scoring level of intestines of BALB/c mice(HE, ×200)

模型组比较,参苓白术散高剂量组小鼠血清 IL-10 含量显著升高,IL-8 含量显著降低( $P < 0.01$ ),美沙拉嗪组小鼠血清 IL-8 含量显著降低( $P < 0.01$ ),其他药物干预组血清 IL-10 含量明显升高,IL-8 含量明显降低( $P < 0.05$ )。见表 4。

**3.4 对 IBD 小鼠肠组织 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达的影响** IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  免疫阳性主要定位在胞浆中表

表 4 参苓白术散对 IBD 小鼠血清炎症因子 IL-10 和 IL-8 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 4 Effect of SLBZS on IL-10 and IL-8 level of intestines of IBD mice ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-10	IL-8
正常	-	396.80 ± 55.51	139.48 ± 16.84
模型	-	196.63 ± 36.30 <sup>1)</sup>	299.65 ± 25.86 <sup>1)</sup>
参苓白术散	3	293.30 ± 67.31 <sup>3)</sup>	187.31 ± 21.88 <sup>3)</sup>
	6	315.37 ± 67.52 <sup>2)</sup>	210.61 ± 30.47 <sup>2)</sup>
	12	353.66 ± 40.10 <sup>3)</sup>	206.56 ± 27.87 <sup>3)</sup>
美沙拉嗪	2	321.43 ± 52.99 <sup>2)</sup>	184.57 ± 15.26 <sup>3)</sup>
雷帕霉素	4 × 10 <sup>-3</sup>	294.80 ± 43.89 <sup>2)</sup>	193.99 ± 33.22 <sup>2)</sup>

达,成呈黄色至褐色,与正常组比较,模型组小鼠肠组织中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的表达显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,参苓白术散及其他药物干预组能够明显降低 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的表达 ( $P < 0.05$ )。见表 5 及图 2,3。

表 5 参苓白术散对 IBD 小鼠肠组织 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的 IA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of SLBZS on IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  expression of intestines of IBD mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$
正常	-	3.11 ± 0.78	3.22 ± 0.67
模型	-	8.22 ± 0.67 <sup>1)</sup>	8.89 ± 0.33 <sup>1)</sup>
参苓白术	3	4.89 ± 1.05 <sup>2)</sup>	4.56 ± 0.53 <sup>2)</sup>
	6	4.33 ± 0.87 <sup>2)</sup>	4.78 ± 0.53 <sup>2)</sup>
	12	4.56 ± 0.73 <sup>2)</sup>	4.22 ± 0.67 <sup>2)</sup>
美沙拉嗪	2	4.22 ± 0.97 <sup>2)</sup>	4.11 ± 0.78 <sup>2)</sup>
雷帕霉素	4 × 10 <sup>-3</sup>	3.11 ± 0.93 <sup>2)</sup>	4.33 ± 0.50 <sup>2)</sup>

### 3.5 对 IBD 小鼠结肠上皮细胞的自噬情况的影响

免疫荧光显示 LC3-I/II 阳性显色为绿色,主要表达在细胞质中,细胞核为蓝色。正常动物中有 LC3-I/II 阳性表达,IBD 模型组动物 LC3-I/II 阳性较少,雷帕霉素、参苓白术散高剂量组动物 LC3-I/II 有强表达,美沙拉嗪及参苓白术散低中剂量组 LC3-I/II 表达相当。见图 4。

### 3.6 对 IBD 小鼠结肠组织中 LC3-II/LC3-I 蛋白表达的影响

正常情况下,哺乳动物发生自噬时,细胞内 LC3 含量以及 LC3-I 向 LC3-II 的转化明显增加,LC3-II 含量的多少反映了细胞的自噬活性。与正常组比较,模型组的 LC3-II/LC3-I 显著降低 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,参苓白术散中、高剂量组与美沙拉嗪及雷帕霉素组可以明显升高 LC3-II/LC3-I 含量 ( $P < 0.05$ )。见图 5,表 6。

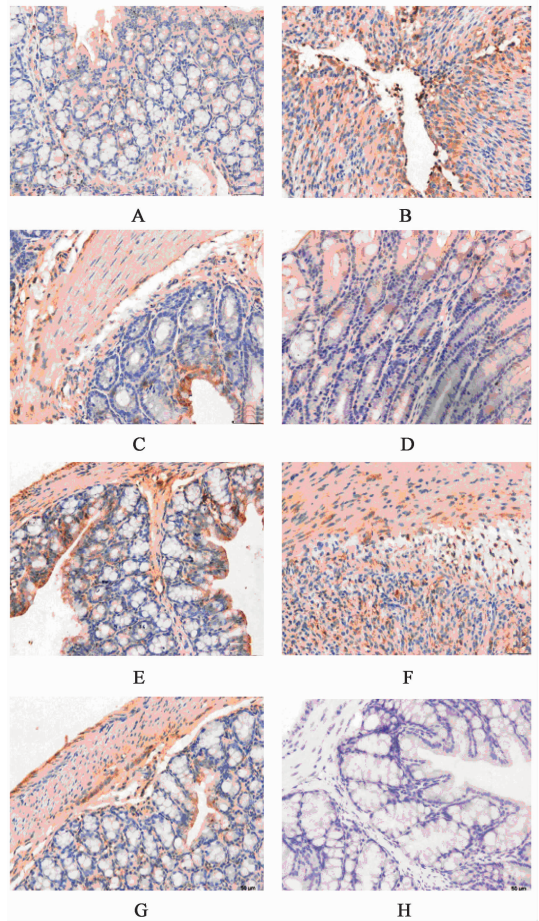


图 2 参苓白术散对 IBD 小鼠肠组织 IL-1 $\beta$  的表达的影响 (免疫组化, ×200)

Fig.2 Effect of SLBZS on IL-1 $\beta$  expression of intestines of IBD mice (IHC, ×200)

## 4 讨论

本研究发现,参苓白术散明显改善 IBD 小鼠的隐血,便血,体质量下降,DAI 积分,病理改变等,升高小鼠血清 IL-10 含量,显著降低降低 IL-8 含量,IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的含量,显著升高 LC3-II/LC3-I 值,增加肠上皮细胞自噬。

正常情况下,肠道组织中促炎症 (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8) 与抗炎 (IL-10) 处于平衡,当出现炎症时,嗜中性粒细胞、肠上皮细胞与其他类型细胞一起通过分泌促炎症细胞因子启动炎症来进一步激活适应性免疫系统。TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8 含量显著升高在炎性肠病和炎症过程中发挥核心作用,而抗炎因子 IL-10 也在 IBD 和炎症过程中下降<sup>[12-13]</sup>。实验结果发现参苓白术散降低促炎因子 IL-8 及 TNF- $\alpha$ , IL-1 含量的表达,增加抗炎因子 IL-10 含量,从而减轻 IBD 过

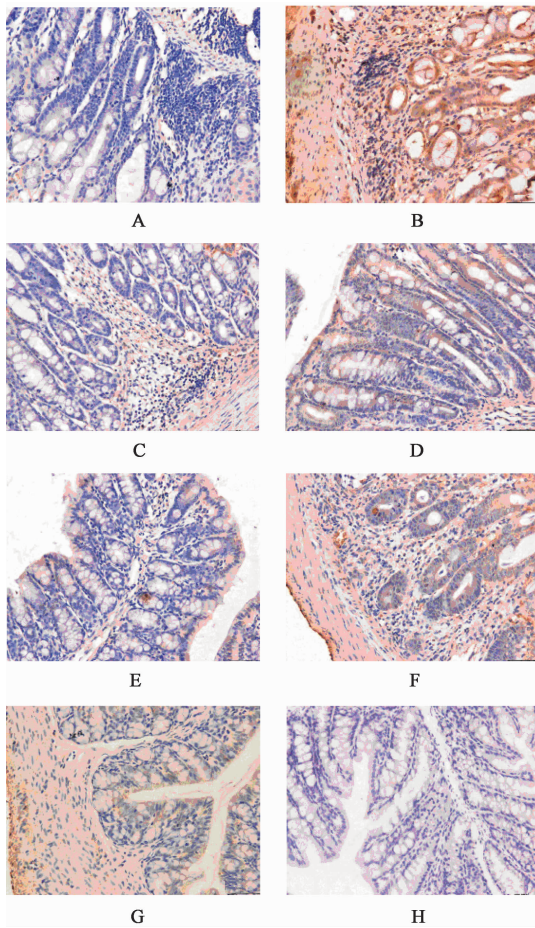
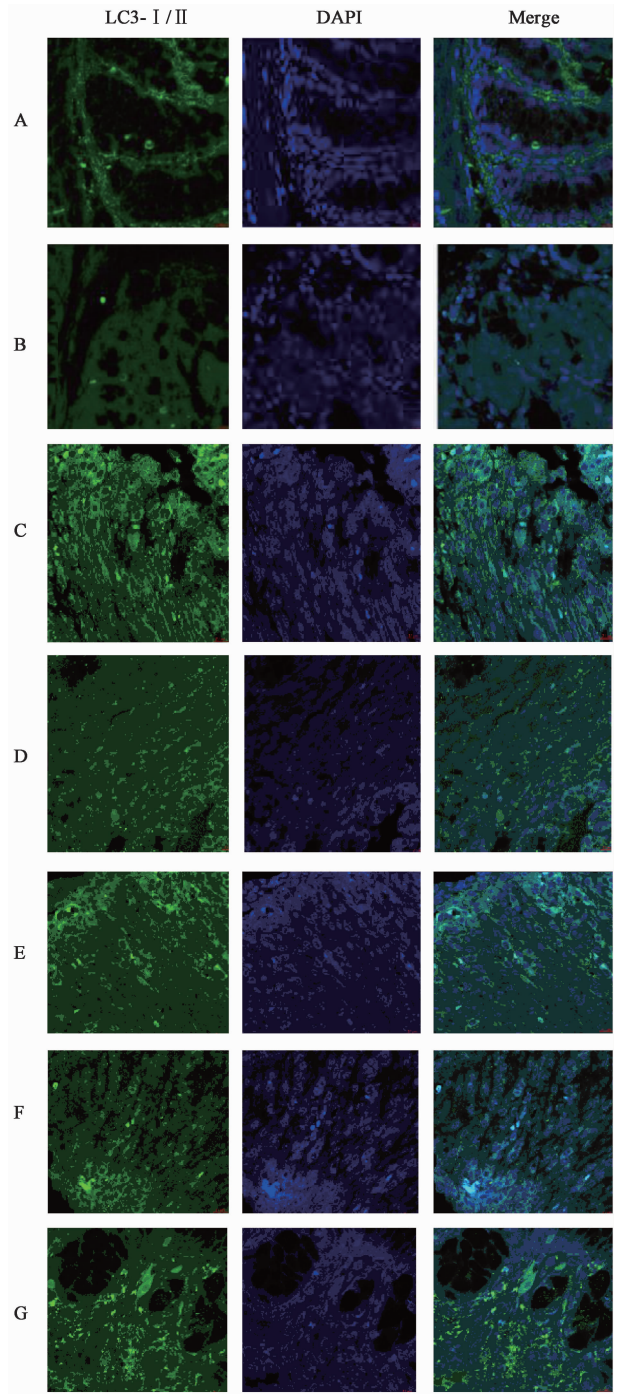


图 3 参苓白术散对 IBD 小鼠肠组织 TNF- $\alpha$  的表达的影响(免疫组化,  $\times 200$ )

Fig. 3 Effect of SLBZS on TNF- $\alpha$  expression of intestines of IBD mice(IHC,  $\times 200$ )

程中炎症损伤的程度。

自噬是指细胞在相关自噬基因的调控下,利用自噬泡、溶酶体降解自身受损的细胞器、变异蛋白质等,为细胞修复、更新提供养分,维持细胞能量稳态的过程<sup>[14-15]</sup>。Atg 在自噬体形成过程中发挥重要的作用,Atg6 亦称 Beclin1,是哺乳动物中首个被发现具有调节细胞自噬的抑癌基因,是自噬启动的重要开关可以调控自噬过程。当细胞自噬启动时,LC3-I 加工后可以与磷脂酰乙醇胺(PE)结合,形成 LC3-II,结合到自噬体膜表面。LC3-II/LC3-I 可以反映出细胞自噬的强弱<sup>[7]</sup>。IBD 是一种慢性、非特异性肠道炎症性疾病,其发病机制与环境、遗传以及免疫等多种因素相关。自噬在细胞稳态和机体免疫中发挥重要作用,自噬异常可能参与 IBD 的发病。基因组研究发现自噬的许多执行基因在 IBD 中发挥重要作用,研究结果显示 Atg16L1 位点的突变与 UC 与 CD 患者的保护机制存在关联,而 IBD 患者的自噬基因 IRGM 表达呈高水平状态<sup>[16-17]</sup>。

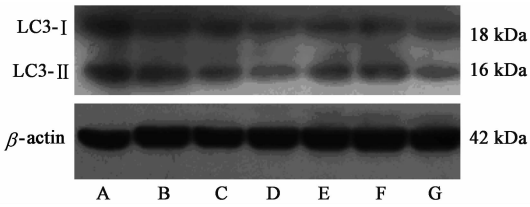


A. 正常组;B. 模型组;C. 雷帕霉素组;D. 美沙拉嗪组;E. 参苓白术散低剂量组;F. 参苓白术散中剂量组;G. 参苓白术散高剂量组

图 4 参苓白术散对 IBD 小鼠结肠肠上皮细胞的自噬体形成的影响(免疫荧光,  $\times 200$ )

Fig. 4 Effect of SLBZS on autophagic formation of colon and intestinal epithelial cells in IBD mice(IF,  $\times 200$ )

近年国内外的动物实验及临床试验表明自噬介导了 IBD 的病理生理过程。研究表明自噬可下调核转录因子(NF)- $\kappa$ B,而 NF- $\kappa$ B 信号通路的活化是大多数炎症形成的关键,同时自噬能明显减少 IL-1 $\alpha$



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. 美沙拉嗪组; F. 雷帕霉素组; G. 模型组

图 5 小鼠结肠组织中 LC3-I, LC3-II 蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of LC3-II, LC3-I expression of intestines in mice

表 6 参苓白术散对 IBD 小鼠肠组织 LC3-II, LC3-I 的表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 6 Effect of SLBZS on LC3-II, LC3-I expression of intestines of IBD mice ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	LC3-II/LC3-I
正常	-	1.00
模型	-	$0.65 \pm 0.06^{1)}$
参苓白术	3	$0.69 \pm 0.07$
	6	$1.03 \pm 0.08^{2)}$
	12	$1.36 \pm 0.7^{2)}$
美沙拉嗪	2	$0.78 \pm 0.08^{2)}$
雷帕霉素	$4 \times 10^{-3}$	$1.15 \pm 0.09^{2)}$

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

和 IL-1 $\beta$  等促炎细胞因子的分泌<sup>[18-19]</sup>。本实验结果证实,参苓白术散显著升高 LC3-II/LC3-I 含量,增加肠上皮细胞自噬的同时,降低促炎因子 IL-8 的含量及 TNF- $\alpha$ , IL-1 的含量,增加抗炎因子 IL-10 水平,从而减轻 IBD 过程中炎症损伤的程度。

综上所述,参苓白术散抗 DSS 诱导 IBD 的作用与抑制炎症及调节肠上皮细胞自噬有关。

#### [参考文献]

[1] Singh S, Chowdhry M, Umar S, et al. Variations in the medical treatment of inflammatory bowel disease among gastroenterologists[J]. Gastroenterol Rep, 2018, 6(1): 61-64.

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

[3] 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.

[4] 张琮,王嘉正,沈玉洁,等.自噬诱导剂 pp242 对肿瘤坏死因子- $\alpha$  所致肠屏障损伤的影响[J]. 胃肠病学, 2017, 22(6): 337-340.

[5] 陆忠凯,陈志荣.炎症性肠病患者自噬相关 IRGM 基因的表达变化及临床意义[J]. 胃肠病学和肝病学杂

志, 2013, 22(10): 1010-1012.

[6] 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.

[7] 焦延娜,韩淑燕. 抗癌中药单体对肿瘤细胞自噬的调控[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(7): 206-214.

[8] 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.

[9] 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.

[10] YOU Y, FU J J, MENG J, et al. Effect of N-acetylcysteine on the murine model of colitis induced by dextran sodium sulfate through up-regulating PON1 activity[J]. Dig Dis Sci, 2009, 54(8): 1643-1650.

[11] YEN Y H, PU C M, LIU C W, et al. Curcumin accelerates cutaneous wound healing via multiple biological actions: the involvement of TNF- $\alpha$ , MMP-9,  $\alpha$ -SMA, and collagen[J]. Int Wound J, 2018, 5(4): 605-617.

[12] Majumder K, Mine Y, WU J. The potential of food protein-derived anti-inflammatory peptides against various chronic inflammatory diseases[J]. J Sci Food Agric, 2016, 96(7): 2303-2311.

[13] Manresa M C, Taylor C T. Hypoxia inducible factor (HIF) hydroxylases as regulators of intestinal epithelial barrier function[J]. Cell Mol Gas Hep, 2017, 3(3): 303-315.

[14] 郑晴,包怡敏. 中药对心肌缺血再灌注损伤过程中自噬的调控[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(15): 2925-2929.

[15] 涂玥,孙伟,陈涤平,等. 自噬调控肾脏衰老的分子机制及中药的干预作用[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(21): 3914-3918.

[16] Serbati N, Senhaji N, Diakite B, et al. IL23R and ATG16L1 variants in moroccan patients with inflammatory bowel disease[J]. BMC Res Notes, 2014, 26(7): 570.

[17] Baskaran K, Pugazhendhi S, Ramakrishna B S. Association of IRGM gene mutations with inflammatory bowel disease in the Indian population[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e106863.

[18] Paul S, Kashyap A K, JIA W, et al. Selective autophagy of the adaptor protein Bcl10 modulates T cell receptor activation of NF- $\kappa$ B [J]. Immunity, 2012, 36(6): 947-958.

[19] Castillo F, Dekonenko A, Arko-Mensah J, et al. Autophagy protects against active tuberculosis by suppressing bacterial burden and inflammation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(46): 3168-3176.

[责任编辑 周冰冰]