

白术内酯Ⅲ通过调节自噬水平清除过氧化物减轻小鼠溃疡性结肠炎*

任燕^{1**}, 黄明进², 蒋雯文¹, 罗春丽², 张晓涵¹

(1. 贵州大学药学院 贵阳 550025; 2. 贵州大学农学院贵阳 550025)

摘要:目的 探讨白术内酯Ⅲ是否通过调节自噬水平清除过氧化物减轻小鼠溃疡性结肠炎(UC)。方法 将32只健康雄性BALB/c小鼠随机分为空白组($n=8$)和造模组($n=24$),造模组小鼠均采用2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)/乙醇诱导造UC小鼠模型,造模成功后小鼠随机分为模型组、白术内酯Ⅲ组($20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、白术内酯Ⅲ+自噬抑制剂组($20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}+2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),造模成功后第2天起按相应剂量给药,连续给药14天。进行小鼠疾病活动指数(Disease activity index, DAI)及结肠黏膜损伤指数(Colonial mucosal damage index, CMDI)评分;测量小鼠结肠长度及重量;苏木精-伊红(Hematoxylin-eosin, HE)染色观察结肠组织病理学变化;酶联免疫吸附(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测结肠组织超氧化物歧化酶(Superoxidedismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathioneperoxidase, GSH-PX)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量;蛋白质免疫印迹(Western Blot, WB)检测结肠组织Beclin-1、LC3 II/I、p62蛋白表达;透射电镜观察结肠上皮细胞中的自噬泡。结果 与空白组比较,模型组小鼠DAI、CMDI评分、单位结肠重量、结肠组织MDA含量及p62蛋白表达明显升高($P<0.05$),小鼠结肠长度明显缩短、结肠组织SOD、GSH-PX含量及Beclin-1、LC3 II/LC3 I蛋白表达明显降低($P<0.05$)。与模型组比较,白术内酯Ⅲ组小鼠DAI、CMDI评分、单位结肠重量、结肠组织MDA含量及p62蛋白表达明显降低($P<0.05$),小鼠结肠长度、结肠组织SOD、GSH-PX含量及Beclin-1、LC3 II/LC3 I蛋白表达明显升高($P<0.05$)。自噬抑制剂阻止白术内酯Ⅲ诱导的Beclin-1、LC3 II/LC3 I蛋白表达升高,抑制结肠组织SOD、GSH-PX含量。结论 白术内酯Ⅲ可明显改善UC病理损伤,通过调节自噬水平清除过氧化物发挥对UC小鼠的治疗作用。

关键词:小鼠 溃疡性结肠炎 白术内酯Ⅲ 自噬

doi: 10.11842/wst.20210704004 中图分类号: R285.5 文献标识码: A

溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)是一种累及直肠和结肠粘膜及粘膜下层的慢性炎症性疾病,严重影响患者的日常生活^[1]。临床上用于症状控制的药物,如糖皮质激素、5-氨基水杨酸类药物和免疫调节剂仍不能达到令人满意的疗效,亟需开发更有效的潜在治疗药物^[2]。研究报道UC的发病是由多因素引起的,具有典型的肠上皮屏障功能缺陷,自噬是一种细

胞内降解途径,有助于神经退行性疾病、癌症、衰老和免疫中的细胞存活^[3]。自噬发生在正常结肠的粘膜中,与UC的发病机制有关,且已证明在存在炎症的情况下可以抑制细胞凋亡^[4]。研究发现与未受损的粘膜相比,炎症性肠病患者受损的粘膜中自噬通常受到损害^[5]。鉴于自噬异常可能参与炎症性肠病的发病过程及在肠上皮细胞的损伤修复和维持肠道内环境的稳态

收稿日期:2021-07-04

修回日期:2021-12-23

* 贵州省科学技术厅科技计划项目基础研究课题(黔科合LH字[2017]7295号):基于IEC-6细胞探索白术茯苓有效成分治疗克罗恩病机理的实验研究,负责人:任燕;铜仁市科技局支撑计划项目课题研究(铜科成合[2020]02号):道地药材黄精高端产品研发及产业化应用研究,负责人:罗春丽。

** 通讯作者:任燕,副教授,主要研究方向:中药及民族药研发及中药药理研究等。

上发挥重要作用,干预自噬过程可能作为潜在的治疗UC药物。白术内酯Ⅲ(Atractylenolide Ⅲ)是从中药白术中提取的,白术具有健脾益气、燥湿利水、止汗、安胎的功效^[6]。现代医学研究显示白术具有抗炎、抗肿瘤、调节免疫等作用,包括对不明原因引起的肠炎有显著疗效^[7]。然而白术有效成分白术内酯Ⅲ对溃疡性结肠炎疗效及作用机制尚不清晰。因此,本研究拟从细胞自噬清除过氧化物角度探究白术内酯Ⅲ对UC的保护作用机制。

1 材料

1.1 动物

实验选取雄性SPF级BALB/c小鼠32只,6-8周,体质量18-20 g,购自成都达硕实验动物有限公司,使用许可证号为SYXK(川)2019-189,生产许可证号为SCXK(川)2020-030。所有小鼠饲养于相对湿度45-55%,温度(24±2)℃、12:12 h的暗/光周期的环境中,小鼠可以自由饮水和饮食。

1.2 主要试剂及仪器

白术内酯Ⅲ(CAS:73069-13-3,规格20 mg/支)购自成都德思特生物;2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS,货号:P2297)购自美国Sigma公司;自噬抑制剂3-MA(货号:CD-07263-ML)购自武汉纯度生物;超氧化物歧化酶(SOD,货号:ZC-38036)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX,货号:ZC-38196)、丙二醛(MDA,货号:ZC-38015)ELISA试剂盒购自上海茁彩生物;相关一抗Beclin-1(货号:ab210498)、LC3 I(货号:ab192890)、LC3 II(货号:ab48394)、p62(货号:ab109012)及生物素化山羊抗兔IgG(H+L)(货号:ab6721)购自英国Abcam;Western细胞裂解液(批号:89901)、BCA蛋白定量试剂盒(货号:23227)、ECL发光试剂盒(货号:WP20005)购自上海Thermo Scientific;多功能酶标仪MK3(美国Thermo Fisher仪器)。

2 方法

2.1 溃疡性结肠炎小鼠模型制备

采用TNBS/乙醇法建溃疡性结肠炎小鼠模型^[8]。小鼠适应性饲养1周后,随机选取8只作为空白组,剩余24只作为造模组。造模小鼠使用7 g·L⁻¹的戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,摆放成头低脚高位(30°),自肛门注入0.1 mL TNBS 500 mL·L⁻¹的乙醇溶液(单只小

鼠TNBS剂量为150 mg·kg⁻¹),保持体位30 min。空白组小鼠麻醉后,结肠仅注入乙醇溶液(0.1 mL)。7天后,小鼠精神萎靡、活动量下降、排便次数增加且出现稀便甚至血便等现象,提示造模成功。造模成功后小鼠随机分为模型组、白术内酯Ⅲ组、白术内酯Ⅲ+自噬抑制剂组。

2.2 给药方法

小鼠造模成功后第2天开始给药治疗。空白组和模型组按体质量每10 g灌胃无菌生理盐水0.1 mL;白术内酯Ⅲ组按20 mg·kg⁻¹剂量每日灌胃1次;白术内酯Ⅲ+自噬抑制剂组在灌胃期间,腹腔注射自噬抑制剂3-MA(2 mg·kg⁻¹),连续治疗14天。

2.3 小鼠疾病活动指数(DAI)

小鼠DAI评分标准由体质量下降分数、大便性状分数、便血分数3部分组成,计算公式:DAI=(体质量下降分数+大便性状分数+便血分数)/3^[9]。

2.4 结肠黏膜损伤指数(CMDI)评分

治疗结束后将截取的结肠段用预冷的生理盐水冲净,肉眼观察并评分。CMDI评分标准:无损伤为0分;水肿、轻度充血为1分;水肿、充血、糜烂或肠粘连为2分;水肿、高度充血、坏死及溃疡(纵径<1 cm)形成为3分;水肿、高度充血、黏膜坏死及溃疡(纵径>1 cm)形成或全肠壁坏死为4分。

2.5 小鼠结肠长度、重量测量

治疗结束后,截取小鼠结肠段,采用游标卡尺准确测量小鼠结肠自然长度并称量体质量。

2.6 HE染色观察结肠组织病理变化

将小鼠结肠组织经4%的多聚甲醛固定,石蜡包埋后,组织切片5 μm的厚度,苏木精-伊红(HE)染色,进行结肠组织的病理变化分析。

2.7 ELISA检测结肠组织SOD、GSH-PX、MDA含量

取小鼠结肠组织,将结肠组织在冰磷酸缓冲液(PBS)中冲洗,滤纸吸干后,加入PBS(5 mL)于冰上匀浆,反复冻融2次,以5000 rpm离心20 min,根据ELISA试剂盒测定结肠组织SOD、GSH-PX、MDA含量。

2.8 Western Blot检测结肠组织Beclin-1、LC3 II/I、p62蛋白表达

使用RIPA裂解缓冲液从冰上的结肠组织中分离总蛋白,采用BCA试剂盒测定每组中的蛋白质浓度。含有50 μg蛋白质的样品在10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳,然后转移到PVDF膜上,用

5%脱脂牛奶室温封闭后,将膜与1:500稀释的一抗(Beclin-1、LC3 II、LC3 I、p62)或1:2500稀释的 β -actin一起在4℃孵育过夜。然后与辣根过氧化物酶(HRP)偶联的抗兔IgG的1:3000稀释液一起室温孵育后,ECL试剂盒显色,通过Image-ProPlus软件对条带的强度进行量化,以 β -actin为内参。

2.9 透射电镜观察结肠上皮细胞中的自噬泡

为了通过透射电镜分析自噬,将结肠组织在4℃的2.5%戊二醛中固定,在1%的锇酸中固定2 h,通过梯度乙醇脱水,然后逐渐嵌入环氧树脂,切片(50 nm)在1%甲苯胺蓝染色,后醋酸铀酰和柠檬酸铅染色,用透射电子显微镜获得显微照片。

2.10 统计学方法

使用SPSS 22.0软件(IBM Corp.)对数据进行统计分析,数据表示为平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$),两组间均数比较采用LSD-*t*检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $p < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 白术内酯Ⅲ对溃疡性结肠炎小鼠DAI、CMDI的影响

与空白组比较,模型组小鼠DAI、CMDI评分明显升高($P < 0.01$),与模型组比较,白术内酯Ⅲ组和白术内酯Ⅲ+3-MA组DAI、CMDI评分均明显降低($P < 0.01$),与白术内酯Ⅲ组比较,白术内酯Ⅲ+3-MA组DAI、CMDI评分明显升高($P < 0.05$),见表1。

3.2 白术内酯Ⅲ对溃疡性结肠炎小鼠结肠长度和重量的影响

与空白组比较,模型组小鼠结肠长度明显缩短且

单位结肠重量明显升高($P < 0.01$),与模型组比较,白术内酯Ⅲ组和白术内酯Ⅲ+3-MA组小鼠结肠长度明显升高,单位结肠重量明显降低($P < 0.05$),与白术内酯Ⅲ组比较,白术内酯Ⅲ+3-MA组小鼠结肠长度明显降低,单位结肠重量明显升高($P < 0.05$),见表2。

3.3 白术内酯Ⅲ对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织病理变化的影响

空白组:结肠组织黏膜层、黏膜下层、肌层及浆膜层结构较完整,未见明显病理变化。模型组:结肠组织大面积溃疡灶,累及黏膜下层、肌层和浆膜层,见黏膜层和黏膜下层分界不清,肠腺结构完全消失,溃疡灶内见渗出纤维素、粘液、坏死组织和大量炎细胞,以核深染圆形的淋巴细胞和分叶核的中性粒细胞为主,

表1 白术内酯Ⅲ对溃疡性结肠炎小鼠DAI、CMDI的影响

组别	DAI	CMDI
空白组	0.22 \pm 0.02	0.25 \pm 0.03
模型组	3.06 \pm 0.07**	3.14 \pm 0.07**
白术内酯Ⅲ	0.38 \pm 0.06###	1.07 \pm 0.07###
白术内酯Ⅲ+3-MA	2.75 \pm 0.09### Δ	2.86 \pm 0.11### Δ

注:与空白组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,### $P < 0.01$;与白术内酯Ⅲ组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

表2 白术内酯Ⅲ对溃疡性结肠炎小鼠结肠长度和重量的影响

组别	结肠长度(cm)	结肠重量($g \cdot cm^{-1}$)
空白组	9.25 \pm 1.03	0.028 \pm 0.001
模型组	7.29 \pm 1.04**	0.037 \pm 0.002**
白术内酯Ⅲ	8.68 \pm 1.02##	0.031 \pm 0.001##
白术内酯Ⅲ+3-MA	7.62 \pm 1.14## Δ	0.035 \pm 0.001 Δ

注:与空白组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$,* $P < 0.05$;与白术内酯Ⅲ组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

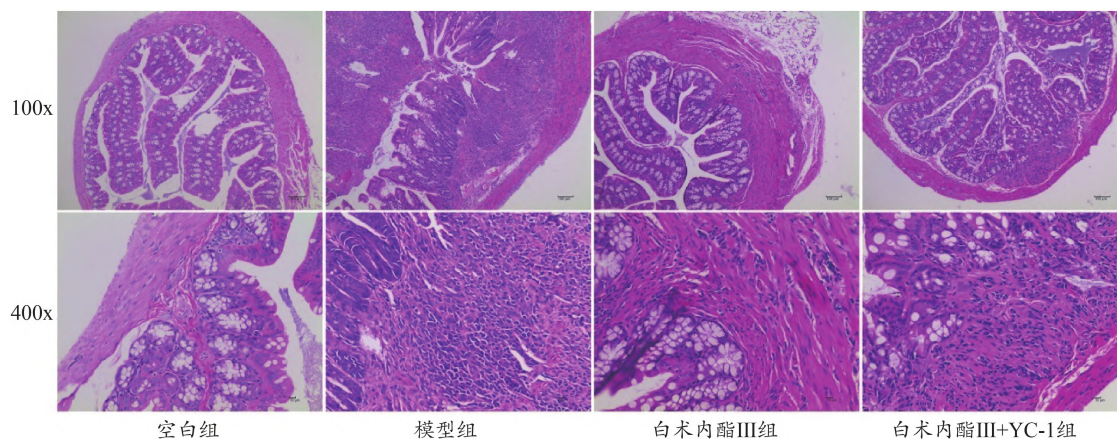


图1 白术内酯Ⅲ对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织病理变化的影响(HE)

大量纤维组织增生,见较多核呈长椭圆形深染的成纤维细胞。白术内酯Ⅲ组:结肠组织黏膜表面被覆单层柱状上皮,黏膜固有层内大肠腺排列较为密集,局部黏膜下层少量纤维组织增生,肌纤维之间少量炎性细胞浸润,以淋巴细胞为主。白术内酯Ⅲ+3-MA组:黏膜表面被覆单层柱状上皮,黏膜固有层内大肠腺排列较为密集,局部黏膜下层细胞变性坏死,见坏死区域肠腺萎缩、坏死,有少量的炎性细胞浸润及较多的纤维组织增生,见图1。

3.4 白术内酯Ⅲ对溃疡性结肠炎小鼠SOD、GSH-PX、MDA含量的影响

与空白组比较,模型组小鼠SOD、GSH-PX含量明显降低,MDA含量明显升高($P<0.01$),与模型组比较,白术内酯Ⅲ组SOD、GSH-PX含量明显升高,MDA含量明显降低($P<0.05$),与白术内酯Ⅲ组比较,白术内酯Ⅲ+3-MA组SOD、GSH-PX含量明显降低($P<0.05$),MDA含量无差异统计学意义($P>0.05$),见表3。

3.5 白术内酯Ⅲ对溃疡性结肠炎小鼠细胞自噬水平的影响

与空白组比较,Beclin-1、LC3 II/LC3 I蛋白表达

在模型组中明显降低,p62蛋白表达在模型组中明显升高($P<0.05$),与模型组比较,白术内酯Ⅲ组 Beclin-1、LC3 II/LC3 I 蛋白表达明显升高,p62蛋白表达明显降低($P<0.05$),与白术内酯Ⅲ组比较,白术内酯Ⅲ+3-MA组 Beclin-1、LC3 II/LC3 I 蛋白表达明显降低($P<0.05$),p62蛋白表达无差异统计学意义($P>0.05$)(图2A)。透射电镜观察结果显示,空白组小鼠线粒体无自噬现象。模型组小鼠线粒体肿胀及边缘不规则紊乱或消失,见少量自噬小体吞噬受损线粒体以及与溶酶体融合的受损线粒体。白术内酯Ⅲ组小鼠线粒

表3 白术内酯Ⅲ对溃疡性结肠炎小鼠SOD、GSH-PX、MDA含量的影响

组别	SOD($U \cdot mL^{-1}$)	GSH-Px($U \cdot mL^{-1}$)	MDA($nmol \cdot mL^{-1}$)
空白组	19.54 ± 2.54	36.74 ± 1.19	3.13 ± 0.11
模型组	15.44 ± 1.33**	32.51 ± 1.47**	3.44 ± 0.11**
白术内酯Ⅲ	19.28 ± 0.61#	35.50 ± 1.55#	3.21 ± 0.12#
白术内酯Ⅲ+3-MA	15.63 ± 0.44 ^Δ	31.40 ± 1.61 ^Δ	3.36 ± 0.13

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$;与白术内酯Ⅲ组比较,^Δ $P<0.05$ 。

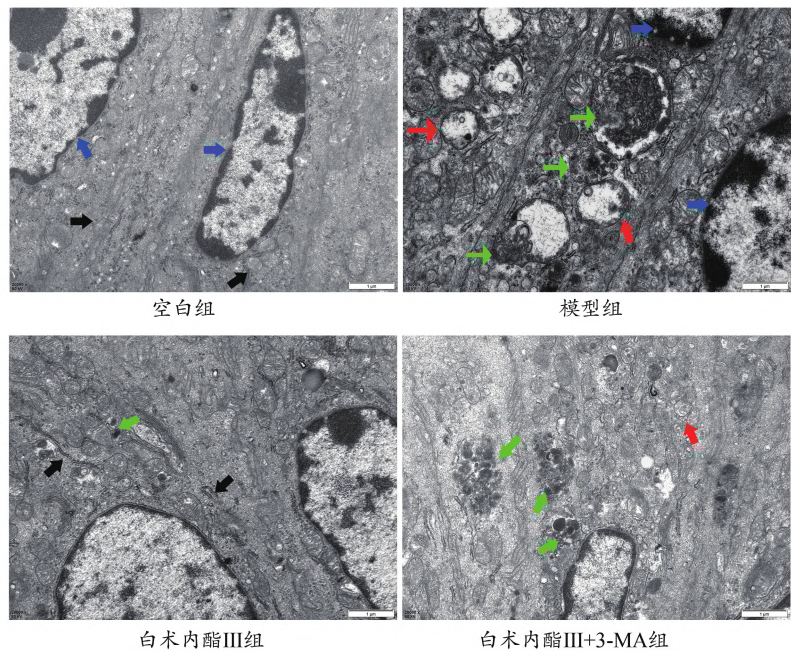
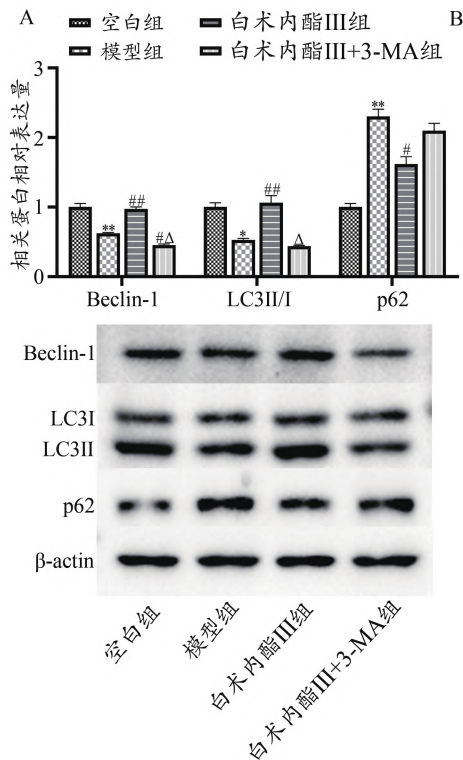


图2 白术内酯Ⅲ对溃疡性结肠炎小鼠细胞自噬水平的影响

注:透射电镜(20000 \times),自噬(\uparrow)、细胞核(\uparrow)、粗面内质网(\uparrow)、肿胀的线粒体(\uparrow),与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与白术内酯Ⅲ组比较,^Δ $P<0.05$ 。

体肿胀变形、见受损线粒体被自噬小体吞噬,以及溶酶体与受损线粒体融合。白术内酯Ⅲ+3-MA组小鼠线粒体组小鼠脊紊乱、消失同时可见一些自噬小体吞噬受损(图2B)。

4 讨论

针对UC的治疗目前尚无统一有效的药物,治疗方法仍在不断探索及更新中。已有证据表明中医药在治疗UC方面具有独特优势,并且具有治疗方式灵活多样、毒副作用较小等优点,且中医药界对于UC的治疗也在积极寻找疗效确切的药物^[8,10]。白术内酯Ⅲ为中药白术成分,白术药用历史悠久,在《神农本草经》中已有记载,列为上品^[11],《医学启源》记载白术“除湿益燥、和中益气、温中、去脾胃中湿。除胃热、强脾胃、进饮食、和胃、生津液、主肌热、四肢困倦、目不欲开、怠惰嗜卧、不思饮食、止渴、安胎”^[12],白术活性成分丰富,有较突出的药理作用。前期研究证实白术内酯Ⅲ可减少体外和体内哮喘模型中核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)炎症小体的激活和Th1/Th2失衡^[13]。白术内酯Ⅲ可通过激活Nrf2/NQO1/HO-1通路减轻博来霉素诱导的实验性肺纤维化和氧化应激^[14]。此外,白术内酯Ⅲ可通过抑制成纤维细胞生长因子受体-1、-2和-4的表达来增强多西紫杉醇对胃癌细胞的抗肿瘤作用^[15]。由此看出,白术内酯Ⅲ是通过多个靶点起作用,但由于更进一步机制研究尚缺乏,故本研究采用小鼠UC模型探讨白术内酯Ⅲ的疗效并初步探讨其作用机制,为白术内酯Ⅲ临床应用于UC防治提供理论基础。首先从小鼠疾病活动指数、结肠黏膜损伤指数评分及结肠长度和重量角度观察发现UC模型小鼠疾病活动指数、结肠黏膜损伤指数评分明显升高,结肠长度明显缩短且单位结肠重量明显升高,而白术内酯Ⅲ明显降低了小鼠疾病活动指数、结肠黏膜损伤指数评分并增加了小鼠结肠长度,相反,白术内酯Ⅲ自噬抑制剂3-MA明显升高小鼠疾病活动指数、结肠黏膜损伤指数评分,降低小鼠结肠长度。其次从病理角度观察发现UC模型小鼠结肠组织大面积溃疡灶,溃疡灶内见渗出纤维素、粘液、坏死组织和大量炎细胞。白术内酯Ⅲ治疗后小鼠结肠组织黏膜表面被覆单层柱状上皮,黏膜固有层内大肠腺排列较为密集,肌纤维之间少量炎性细胞浸润。提

示白术内酯Ⅲ对UC具有治疗效果,且可能通过自噬水平发挥治疗作用。

目前,UC的病理机制尚不明确,然而研究显示炎性细胞因子过度产生和氧化应激是UC发展过程中结肠损伤的一个重要标志,促炎细胞因子会招募和激活免疫细胞,包括调节性T细胞和辅助T细胞,且在肠道中,活性氧作为一种信号分子可以刺激炎症信号,在UC中起着核心作用^[16]。促炎细胞因子和活性氧的过度产生会放大免疫信号,加剧肠道上皮的破坏^[17]。此外,研究证据表明自噬和炎症之间存在关联,自噬通过几种机制调节炎症反应,包括选择性降解促炎复合物或炎症体刺激^[18]。在肠道中,已报道自噬介导先天免疫和获得性免疫中的关键功能^[3]。且自噬是在炎症过程中通过损伤相关的分子模式和几种致炎细胞因子诱导的,其主要目的是控制感染,作为宿主对微生物入侵反应的一部分^[19]。然而,高水平的这些细胞因子或活性氧在损伤后产生,可以破坏控制自噬所需的信号^[20]。研究显示Beclin-1和自噬活化呈正相关,p62是负相关,LC3 II/LC3 I比值可表示自噬的活化程度^[21]。本研究结果显示UC模型小鼠结肠组织SOD、GSH-PX含量明显降低,MDA含量明显升高,白术内酯Ⅲ治疗可抑制小鼠MDA含量的升高,促进SOD、GSH-PX的生成,而白术内酯Ⅲ+自噬抑制剂3-MA干预后SOD、GSH-PX含量明显降低。进一步检测自噬水平结果显示UC模型小鼠自噬受损,Beclin-1、LC3 II/LC3 I蛋白表达明显降低,p62蛋白表达明显升高,白术内酯Ⅲ治疗后Beclin-1蛋白表达明显升高,p62蛋白表达明显降低,白术内酯Ⅲ+自噬抑制剂3-MA干预后Beclin-1、LC3 II/LC3 I蛋白表达明显降低,且透射电镜观察显示白术内酯Ⅲ+3-MA组小鼠脊紊乱、消失,同时可见一些自噬小体吞噬受损,而白术内酯Ⅲ组小鼠线粒体被自噬小体吞噬。表明自噬抑制剂3-MA阻止了白术内酯Ⅲ诱导的p62蛋白表达减少,且自噬抑制剂3-MA干预后小鼠结肠组织SOD、GSH-PX含量明显降低,提示白术内酯Ⅲ可能通过促进自噬清除过氧化物,防止TNBS引起的UC炎症。

5 结论

综上所述,白术内酯Ⅲ可有效地调节细胞自噬进而清除过氧化物,防治溃疡性结肠炎肠黏膜损伤,

具有临床应用的可能性,其更进一步的作用机制尚有待进一步研究。

参考文献

- 1 梁国强,陈江,葛惠男,等.基于Nrf₂通路薏苡附子败酱散联合西药对葡聚糖硫酸钠盐诱导小鼠结肠炎黏膜修复的影响.中国中西医结合消化杂志,2021,29(4):234-239.
- 2 李俊霞,沈钱,柳萍,等.5-氨基水杨酸对溃疡性结肠炎患者结肠上皮细胞增殖与凋亡的影响.中华消化杂志,2016,36(7):475-481.
- 3 Larabi A, Barnich N, Nguyen H T T. New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD. *Autophagy*, 2020, 16(1): 38-51.
- 4 Zhang S L, Li Z Y, Wang D S, et al. Aggravated ulcerative colitis caused by intestinal Metrn1 deficiency is associated with reduced autophagy in epithelial cells. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(6): 763-770.
- 5 Pott J, Kabat A M, Maloy K J. Intestinal epithelial cell autophagy is required to protect against TNF-induced apoptosis during chronic colitis in mice. *Cell Host Microbe*, 2018, 23(2):191-202.e4.
- 6 熊艳玲,钟意文,陈雅茜,等.基于抗炎和氧化应激角度研究参苓白术颗粒对脾虚湿困溃疡性结肠炎大鼠的作用机制.中药新药与临床药理,2021,32(2):149-157.
- 7 杨颖,魏梦昕,伍耀业,等.白术多糖提取分离、化学组成和药理作用的研究进展.中草药,2021,52(2):578-584.
- 8 陈贤家,符士颖,林力森,等.桃红四物汤对溃疡性结肠炎大鼠SCF/c-kit通路及Cajal间质细胞的影响.上海中医药杂志,2021,55(4):79-84.
- 9 孙娟,葛雨竹,李姿慧,等.参苓白术散通过TLR4/NF-κB通路对溃疡性结肠炎小鼠的抑制作用研究.中国免疫学杂志,2020,36(3):294-298.
- 10 Ungaro R, Mehandru S, Allen P B, et al. Ulcerative colitis. *Lancet*, 2017, 389(10080): 1756-1770.
- 11 顾思浩,孔维崧,张彤,等.白术的化学成分与药理作用及复方临床应用进展.中华中医药学刊,2020,38(1):69-73.
- 12 王晶,张世洋,盛永成,等.白术治疗胃肠道疾病药理作用研究进展.中华中医药学刊,2018,36(12):2854-2858.
- 13 Zhu C M, Zhang L, Liu Z M G, et al. Atractylenolide III reduces NLRP3 inflammasome activation and Th1/Th2 imbalances in both in vitro and in vivo models of asthma. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2020, 47(8): 1360-1367.
- 14 Huai B, Ding J Y. Atractylenolide III attenuates bleomycin-induced experimental pulmonary fibrosis and oxidative stress in rat model via Nrf2/NQO1/HO-1 pathway activation. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2020, 42(5):436-444.
- 15 Ji Y X, Kang Z Q, Kang N, et al. Atractylenolide III enhances the anti-neoplastic efficacy of docetaxel in gastric cancer cell by inhibiting fibroblast growth factor receptors 1, -2, and -4 expression. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2019, 38(3): 217-227.
- 16 Nikkhab-Bodaghi M, Maleki I, Agah S, et al. Zingiber officinale and oxidative stress in patients with ulcerative colitis: A randomized, placebo-controlled, clinical trial. *Complement Ther Med*, 2019, 43:1-6.
- 17 Zhou M X, Xu W M, Wang J Z, et al. Boosting mTOR-dependent autophagy via upstream TLR4-MyD88-MAPK signalling and downstream NF-κB pathway quenches intestinal inflammation and oxidative stress injury. *EBioMedicine*, 2018, 35:345-360.
- 18 Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ*, 2015, 22(3):377-388.
- 19 Gao Q. Oxidative stress and autophagy. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1206: 179-198.
- 20 Yun H R, Jo Y H, Kim J, et al. Roles of autophagy in oxidative stress. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9):3289.
- 21 Song X, Lee D H, Dilly A K, et al. Crosstalk between apoptosis and autophagy is regulated by the arginylated BiP/Beclin-1/p62 complex. *Mol Cancer Res*, 2018, 16(7):1077-1091.

Atractylenolide III Alleviates Ulcerative Colitis in Mice by Regulating Autophagy Levels and Scavenging Peroxide

Ren Yan¹, Huang Mingjin², Jiang Wenwen¹, Luo Chunli², Zhang Xiaohan¹
(1. School of Pharmacy, Guizhou University, Guizhou 550025, China;
2. School of Agriculture, Guizhou University, Guizhou 550025, China)

Abstract: objective To investigate whether Atractylenolide III alleviates ulcerative colitis (UC) in mice by scavenging peroxide through regulating autophagy levels. **Methods** Thirty-two healthy male BALB/c mice were randomly divided

3224 [Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology]

into control group ($n=8$) and modeling group ($n=24$), and the mice in the modeling group were induced with 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)/ethanol to create a UC mouse model. After successful modeling, the mice were randomly divided into model group, Atractylenolide III group ($20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and Atractylenolide III + autophagy inhibitor group ($20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}+2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and administered at the corresponding doses for 14 d after successful modeling. The disease activity index (DAI) and colonic mucosal damage index (CMDI) scores of mice were observed; the length and weight of mouse colon were measured; the histopathological changes of colon were observed by Hematoxylin-eosin staining; the Superoxidedismutase, Glutathioneperoxidase and Malondialdehyde contents of colon tissues were detected by Enzyme-linked immunosorbent assay; the expression of Beclin-1, LC3II/ I and p62 protein in colon tissues were detected by Western Blot; the autophagic vesicles in colon epithelial cells were observed by transmission electron microscopy. Results Compared with the control group, the DAI, CMDI score, unit colon weight, colon tissue MDA content and p62 protein expression were significantly higher in the model group ($P<0.05$), and the colon length, colon tissue SOD, GSH-PX content and Beclin-1, LC3II/LC3 I protein expression were significantly lower in the mice ($P<0.05$). Compared with the model group, the DAI, CMDI score, unit colon weight, colon tissue MDA content and p62 protein expression were significantly lower in mice in the atractylenolide III group ($P<0.05$), and the colon length, colon tissue SOD, GSH-PX content and Beclin-1, LC3II/LC3 I protein expression were significantly higher in mice ($P<0.05$). The autophagy inhibitor prevented the increase of Beclin-1、LC305). T protein expression induced by Atractylenolide III and inhibited the SOD and GSH-PX contents of colon tissue. Conclusion Atractylenolide III significantly ameliorated the pathological injury of UC and exerted therapeutic effects on UC mice by scavenging peroxides through regulating autophagy levels.

Keywords: mice, ulcerative colitis, Atractyloides III, autophagy

(责任编辑:刘玥辰,审稿人:王瑀、张志华)