DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.05.025

基于PHB2/PGAM5/PINK1/Parkin信号轴探讨安肠汤改善溃疡性结肠炎大鼠肠上皮细胞线粒体自噬的作用机制

段晓鑫,刘嘉琪,宋胡丹,董杰,潘娜婷,张培源,文亦磊,孙平良
(广西中医药大学第一附属医院,广西 南宁 530023)

摘要:目的 观察安肠汤(Anchang decoction,ACD)通过PTEN诱导假定激酶1(PTEN-induced putative kinase 1,PINK1)/帕金森病蛋白(Parkin)/抗增殖蛋白2(Prohibitin2,PHB2)/磷酸甘油酸变位酶5(Phosphoglycerate mutase family member 5,PGAM5)信号轴改善溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis,UC)大鼠肠上皮细胞线粒体自噬的作用机制。方法 将48只Wistar大鼠随机分为空白组(Control)、模型组(Model)、美沙拉嗪组(Mesalazine,0.42 g·kg^{-1})以及安肠汤低、中、高剂量组(ACD-L、ACD-M、ACD-H,11.55、23.1、46.2 g·kg^{-1}),每组各8只。除空白组外,其余各组大鼠采用2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid,TNBS)建立UC模型,模型构建成功后,Control组、Model组予以生理盐水灌胃,其余各组分别进行相应药物灌胃,灌胃14 d。干预结束后,观察各组大鼠一般情况并记录体质量,计算疾病活动指数(Disease activity index,DAI)评分,通过苏木素-伊红(Hematoxylin-eosin staining,HE)染色观察大鼠肠道病理变化,酶联免疫吸附测定法(Enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)检测白细胞介素(Interleukin,IL)-6、IL-18水平,透射电镜观察结肠上皮细胞(Intestinal epithelial cells,IECs)线粒体超微结构,免疫荧光(Immunofluorescence,IF)检测线粒体微管相关蛋白1轻链3(Microtubule-associated protein 1 light chain 3,LC3)、选择性自噬接头蛋白62(Selective autophagy adaptor protein 62,p62)表达,蛋白质印迹检测结肠组织PHB2、PGAM5、PINK1、Parkin、LC3、p62蛋白表达水平,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR,RT-PCR)检测结肠组织PHB2、PGAM5、PINK1、Parkin mRNA表达量。结果 与Control组相比,Model组一般情况变差,体质量明显降低,DAI评分明显升高($P<0.01$),结肠组织病理损伤变化明显,血清中IL-6、IL-18含量升高($P<0.01$),IECs线粒体结构缺失明显,数量减少,线粒体嵴出现断裂,线粒体形态肿胀和空泡化,LC3蛋白以及PHB2、PGAM5、PINK1、Parkin蛋白和mRNA表达水平明显下降,p62蛋白表达明显升高($P<0.05$,$P<0.01$)。与Model组相比,Mesalazine组及ACD各剂量组大鼠状态明显好转体质量增加,DAI评分明显降低($P<0.05$,$P<0.01$),结肠黏膜结构均有不同程度的恢复,血清中IL-6、IL-18含量降低($P<0.05$,$P<0.01$),IECs线粒体膜较完整,数量增加,肿胀程度降低,线粒体嵴结构改善,ACD-M、ACD-H更为明显出现自噬小体或自噬溶酶体,LC3蛋白以及PHB2、PGAM5、PINK1、Parkin蛋白和mRNA表达水平均有不同程度上升,p62蛋白水平不同程度降低($P<0.05$,$P<0.01$)。结论 安肠汤降低UC炎症反应、促进肠黏膜恢复以改善UC症状的作用机制,可能通过调控PHB2/PGAM5/PINK1/Parkin轴促进IECs线粒体自噬有关。

关键词:安肠汤;PTEN诱导假定激酶1/帕金森病蛋白/抗增殖蛋白2/磷酸甘油酸变位酶5轴;溃疡性结肠炎;线粒体自噬

中图分类号:R289.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-7717(2026)05-0132-09

Mechanism of Anchang Decoction(安肠汤) on Improving Mitophagy in Intestinal Epithelial Cells of Rats with Ulcerative Colitis Based on PHB2/PGAM5/PINK1/Parkin Signaling Axis

DUAN Xiaoxin,LIU Jiaqi,SONG Hudan,DONG Jie,PAN Nating,ZHANG Peiyuan,WEN Yilei,SUN Pingliang
(The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine,Nanning 530023,Guangxi,China)

Abstract:*Objective* To observe the effect of Anchang Decoction(安肠汤,ACD) on mitophagy in intestinal epithelial cells of the rats with ulcerative colitis(UC) through PTEN inducing putative kinase 1(PINK1)/Parkinson's disease protein(Parkin)/an-

基金项目:国家自然科学基金项目(82160906,82160880);广西中医药大学桂派杏林拔尖人才资助项目(2022C001);广西中医药大学研究生教育创新计划项目(YCBXJ2023012)

作者简介:段晓鑫(1997-),女,安徽阜阳人,博士,研究方向:中医药防治肛肠疾病。

通讯作者:孙平良(1976-),男,广西南宁人,主任医师,博士研究生导师,博士,研究方向:肛肠疾病。E-mail:sunpl2000@163.com。

tiproliferative protein 2(PHB2)/phosphoglycinate mutase 5(PGAM5) signaling axis. *Methods* Forty-eight Wistar rats were randomly divided into Control group, Model group, Mesalazine group(0.42 g·kg^{-1}) and ACD low, medium and high groups(ACD-L, ACD-M, ACD-H; 11.55, 23.1, 46.2 g·kg^{-1}), 8 rats in each group. Except for the Control group, the UC model was established by 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid(TNBS). After the model was successfully established, the blank group and the model group were given the normal saline by gavage, and the other groups were given the corresponding drugs by gavage for 14 days. After the intervention, the general condition of the rats in each group was observed and the body weight was recorded, the disease activity index(DAI) score was calculated, the pathological changes of intestinal tract were observed by hematoxylin-eosin staining, and the levels of interleukin-6(IL-6) and interleukin-18(IL-18) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The mitochondrial ultrastructure of colonic epithelial cells(IECs) was observed by transmission electron microscopy. The expressions of mitochondrial microtubule-associated protein 1 light chain 3(LC3) and selective autophagy receptor(p62) were detected by immunofluorescence. The protein expression levels of PHB2, PGAM5, PINK1, Parkin, LC3 and p62 in colon tissues were detected by Western Blot. The mRNA expression levels of PHB2, PGAM5, PINK1 and Parkin in colon tissues were detected by Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction. *Results* Compared with those of the Control group, the general condition of the Model group was worse, the body weight was significantly decreased, the DAI score was significantly increased($P<0.01$), the pathological changes of colon tissue were obvious, the serum levels of IL-6 and IL-18 were increased($P<0.01$), the mitochondrial structure of IECs was obviously missing, the number of Iecs was decreased, and the mitochondrial cristae was broken. The mitochondrial morphology was swollen and vacuolated, the protein and mRNA expression levels of LC3, PHB2, PGAM5, PINK1 and Parkin were decreased, and the protein expression level of p62 was increased in the treatment group($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with those in the Model group, the rats in the Mesalazine group and each dose group of ACD were significantly improved, the body weight increased, the DAI score increased significantly($P<0.05$, $P<0.01$), the colonic mucosal structure recovered to varying degrees, and the serum levels of IL-6 and IL-18 decreased($P<0.05$, $P<0.01$). The mitochondrial membrane of IECs was more complete, the number was increased, the swelling degree was decreased, and the structure of mitochondrial cristae was improved. ACD-M and ACD-H showed more obvious autophagosomes or autolysosomes. The expression levels of LC3 protein, PHB2, PGAM5, PINK1 and Parkin protein and mRNA were increased in varying degrees. The p62 protein levels were decreased in different degrees($P<0.05$, $P<0.01$). *Conclusions* ACD reduces inflammatory response and promotes intestinal mucosal recovery to improve UC symptoms possibly by regulating the PHB2/PGAM5/PINK1/Parkin axis to promote mitophagy in IECs.

Keywords: Anchang Decoction(安肠汤); PTEN inducing putative kinase 1(PINK1)/Parkinson's disease protein(Parkin)/antiproliferative protein 2(PHB2)/phosphoglycinate mutase 5(PGAM5) axis; ulcerative colitis; mitophagy

溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)属于难治性非特异性肠道炎症疾病,其特征是腹泻、脓血便、腹痛、体质量下降和结直肠的黏膜炎症[1]。UC发病率在世界范围内逐年上升,其年发病率约为每10万人中有10~20人,已成为全球最常见的肠道疾病[2],严重危害人类的身心健康。UC患者经治疗后症状可以缓解,但仍有患者会对药物治疗无应答,甚至出现不良反应[3]。因此寻求广泛的治疗对于研究UC至关重要。目前,该病的发病机制尚未完全明确,线粒体自噬受损可能参与UC的发病机制,与UC的发生发展密不可分[4-5]。许多研究表明,在UC中,线粒体自噬受损,导致肠上皮细胞(Intestinal epithelial cells, IECs)去除受损线粒体能力不足[6]。PTEN诱导假定激酶1(PTEN-induced putative kinase 1, PINK1)/帕金森病蛋白(Parkin)是线粒体自噬的经典途径[7]。抗增殖蛋白2(Prohibitin2, PHB2)是线粒体内膜支架蛋白,影响线粒体自噬、裂变/融合,在线粒体自噬中起到关键作用,可以通过稳定PINK1和增加Parkin的线粒体募集来促进PINK1-Parkin介导的线粒体自噬[8],而PHB2介导PINK1的稳定性又依赖于磷酸甘油酸变位酶5(Phosphoglycerate mutase family member 5, PGAM5), PGAM5可以在线粒体外膜中保留和稳定PINK1[9]。但有关PHB2通过PGAM5调控PINK1/Parkin介导的线粒体自噬在UC中的研究尚未有报道。因此,研究PHB2/PGAM5/PINK1/Parkin轴以调节IECs线粒体自噬的作用,并缓解肠道炎症改善肠黏膜损伤对于治疗UC具有重要意义。

安肠汤(Anchang decoction, ACD)是广西中医药大学第一附属医院肖振球教授治疗UC的经验方,前期课题组应用安肠汤在临床实践与动物实验都取得明显的疗效,证实安肠汤可以改善巨噬细胞吞噬功能,抑制相关炎症通路,降低炎症因子表达,减少溃疡面积及溃疡数,缓解UC肠黏膜损伤[10-12]。目前,ACD治疗UC的具体分子机制仍未明晰,因此,本研究从线粒体自噬角度出发,探讨ACD通过PHB2/PGAM5/PINK1/Parkin轴调节IECs线粒体自噬发挥改善UC大鼠肠道炎症、缓解肠黏膜损伤的作用机制,为安肠汤治疗UC从分子层面提供基础数据支持。

1 材料

1.1 动物

SPF雄性Wistar大鼠48只,体质量(200±20) g,6~8周龄,购于长沙天勤生物技术有限公司,合格证号:SCXK(湘)

2022-0011,大鼠饲养于广西中医药大学实验中心SPF级动物房,许可证号:SYXK桂2019-0001,环境温度20~26℃,湿度50%~60%,明暗各12 h交替,大鼠适应性喂养1周,自由摄水和摄取食物。本研究经广西中医药大学动物伦理委员会审查通过(批准编号:DW20240603-161)。

1.2 药物

ACD药物(熟附子15 g,干姜10 g,黄芪20 g,党参15 g,白茯苓15 g,白术10 g,补骨脂25 g,白头翁15 g,地榆15 g,赤芍15 g,槟榔15 g,薏苡仁10 g,鸡内金10 g,木香10 g,延胡索10 g,甘草10 g)采购于广西中医药大学第一附属医院仙葫院区药房,药材经广西中医药大学第一附属医院药学部制备并鉴定合格。药材均洗净、浸泡30 min,熟附子先煎30 min,再加入剩余药物共煎30 min,整方分2次煎煮,最后加热浓缩至含有原药材5 g·mL^{-1}至4 ℃冰箱备用。美沙拉嗪肠溶片(葵花药业集团佳木斯鹿灵制药有限公司),批号国药准字H19980149,将美沙拉嗪肠溶片压粉后与蒸馏水混合,制备成0.42 g·mL^{-1}浓度的美沙拉嗪混悬液。

1.3 主要试剂

苏木素染色液(珠海贝索,BA-4041);伊红染液(珠海贝索,BA-4024);2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS,Sigma,SLCN9362);PHB2抗体(proteintech,12295-1-AP);PGAM5抗体(Abclonal,A22203);PINK1抗体(proteintech,23274-1-AP);Parkin抗体(proteintech,14060-1-AP);p62抗体(Abcam,ab314504);LC3B抗体(Abcam,ab192890);TOM20抗体(proteintech,11802-1-AP);GAPDH抗体(proteintech,10494-1-AP);HRP标记的山羊抗兔IgG(Servicebio,GB23303);无水乙醇(国药集团,10009218)、二甲苯(国药集团,10023418);中性树胶(北京中杉金桥生物技术有限公司,Zli-9555);三色预染蛋白Marker(雅酶,WJ103);DAPI染色液(博士德生物公司,AR1177);大便隐血测定试剂盒(迪培思);RNA抽提试剂(莫纳,MI20201S);RNA逆转录试剂盒(诺唯赞,R333);RT-PCR试剂盒(诺唯赞,Q711)。

1.4 仪器

组织包埋机(Thermo);切片机(德国徕卡,RM2016);摊烤片机(德国莱卡,LEICA HI1210);荧光显微镜(日本OLYMPUS,BX43);全波长酶标仪系统(Thermo,型号mμlISKANMK3);透射电子显微镜(HITACHI HT7700、HITACHI HT7800)等。

2 方法

2.1 动物造模、分组

参考造模方法[13]并稍加修改,模型组、美沙拉嗪组、ACD组采用TNBS(70 mg·kg^{-1})和50%乙醇按1∶1体积混合灌肠,建立UC大鼠模型。根据大鼠一般状态及疾病活动指数(DAI)评分判断模型是否制备成功,造模成功后大鼠禁食,自由饮水。48只Wistar大鼠随机分为空白组(Control)、模型组(Model)、美沙拉嗪组(Mesalazine)以及安肠汤低、中、高剂量组(ACD-L、ACD-M、ACD-H),每组8只。

2.2 给药及样本采集

根据大鼠与人的体表面积比例折算及前期实验结果进行等效换算中药剂量,得出ACD低、中、高剂量组分别用11.55、23.1、46.2 g·kg^{-1}的剂量灌胃;Mesalazine组给予美沙拉嗪0.42 g·kg^{-1},灌胃容积为10 mL·kg^{-1};Control、Model两组按等体积生理盐水灌胃,均灌胃14 d。全部干预结束后,禁食不禁水24 h,用3%戊巴比妥钠(30 mg·kg^{-1})腹腔注射麻醉大鼠,并采集各大鼠腹主动脉血液,离心后提取上清液储存在-20 ℃。取出结肠分别用4%多聚甲醛固定及-80 ℃冷冻保存备用。

2.3 观察指标及检测方法

2.3.1 疾病活动指数(Disease activity index,DAI)评分 自实验开始,每日观察各组大鼠的一般情况,包括精神活动状态、皮毛毛量色泽及饮食等,记录各组大鼠每日体质量、粪便性状及便血情况,其中便血情况采用大便隐血测定试剂盒测定进行评判,最后计算DAI评分,参照评分标准[14],DAI=(体质量减轻分值+大便性状分值+便血情况分值)/3。

2.3.2 苏木精-伊红染色法(Hematoxylin-eosin staining,HE)观察结肠组织病理变化 结肠组织浸泡于4%多聚甲醛固定后行石蜡包埋,切片机切厚度约为3 μm的石蜡切片,经苏木素染色3 min后再伊红复染5 min,脱水透明封片等处理后,光学显微镜下观察各组大鼠结肠切片病理改变。

2.3.3 酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)检测大鼠血清白细胞介素(Interleukin,IL)-6、IL-18水平 采集的各组大鼠腹主动脉血液,静置2 h后,3000 r·min^{-1}离心15 min,分离血清提取上清液。按照ELISA试剂盒说明手册进行IL-6、IL-18浓度的检测。

2.3.4 透射电镜观察线粒体形态及自噬小体 取结肠组织用2.5%戊二醛固定6 h,在0.1 mol·L^{-1}磷酸缓冲液(pH 7.4)漂洗3次,然后放入1%锇酸避光固定2 h后,再用磷酸缓冲液漂洗3次,不同梯度乙醇脱水,渗透包埋,聚合48 h后定位,超薄切片机切片染色,透射电镜观察。

2.3.5 免疫荧光(Immunofluorescence,IF)检测结肠组织线粒体LC3、p62表达 取结肠石蜡切片常规脱蜡至水,置于3%柠檬酸修复液高压修复10 min,自来水中冷却至室温,蒸馏水洗3次,封闭30 min,分别加入p62(1∶120)抗体、LC3(1∶100)抗体4 ℃孵育过夜,PBS洗3次,加二抗37℃孵育30min,PBS再次洗3次,滴加DAPI室温孵育10 min,水溶性封片剂封片,荧光倒置显微镜下观察并拍摄。

2.3.6 蛋白质印迹(Western blot)法检结肠组织PHB2、PGAM5、PINK1、Parkin、LC3、p62蛋白表达 取各组大鼠30~40 mg的结肠组织加入400 μL裂解液RIPA与蛋白酶抑制剂PMSF,研磨机4 ℃研磨5次,每次60 s,研磨后冰上静置20 min,然后4 ℃离心后取上清液,采用BCA试剂盒测蛋白浓度。加5×上样蛋白缓冲液后在100 ℃水浴锅中加热8 min蛋白变性。制胶上样,电泳、转膜后TBST洗涤3次,快速封闭液封闭15 min,加入一抗PHB2(1∶7000)、PGAM5(1∶30 000)、PINK1(1∶2000)、Parkin(1∶2000)、LC3(1∶1500)、p62(1∶1500)4 ℃孵育过夜,TBST洗膜3次,加入二抗(1∶5000)常温摇床孵育1 h,再次洗膜3次,ECL超敏发光液显影,用Image J分析各条带的灰度值。

2.3.7 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR,RT-PCR)法分析结肠组织 PHB2、PGAM5、PINK1、Parkin mRNA 表达 总 RNA 以及 miRNA 分别严格按照 RNA 抽提试剂盒说明提取,测定 OD 值,逆转录合成为 cDNA,合成程序:50 ℃、15 min,85 ℃、5 s,1 个循环。扩增程序:95 ℃预变性 30 s,循环反应 95 ℃、10 s,60 ℃、30 s,40 个循环,溶解曲线 95 ℃、15 s,60 ℃、60 s,95 ℃、15 s,1 个循环。$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算最终各基因 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

表1 各基因引物序列

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
PHB2	GCGTCCGTAGTCCGTAAT	GTCTTTGGAGCCTGTGGG
PGAM5	GAGCCACTGTCACTCATTA	CTTGTAGCCTTTGCCTTAT
PINK1	CTGTCAGGAGATCCAGGCAATT	TGGGCATGGTGGCTTCATA
Parkin	TGTCCACGACGCTCAACT	CACTCCTCGGCACCATAC
GAPDH	CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT

2.4 统计学方法

所有数据采用 SPSS 27.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用 One-way ANOVA 分析,进行两两比较。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 ACD 对 UC 大鼠一般状况及 DAI 评分的影响

Control 组大鼠精神良好,毛发亮白柔顺,活动灵活,饮食正常;与 Control 组相比,Model 组大鼠精神萎靡,身体弓背蜷缩,毛发枯燥,活动迟缓,聚堆抱团相依,粪便呈稀烂状伴黏液脓血便,体质量明显降低($P<0.01$),大鼠在造模后期,体质量缓慢回升,但回升较慢;Mesalazine 组与 ACD 各组大鼠与 Model 组相比,大鼠精神状态逐日恢复,毛发、活动状态、反应性和饮食均有所改善,大便后期也逐渐不见血便且成型,体质量日渐增加,并且经 Mesalazine 与 ACD 干预后,均能明显增加 UC 大鼠体质量以及降低 UC 大鼠的 DAI 评分($P<0.05$,$P<0.01$)。见表 2。

表2 安肠汤对 UC 大鼠体质量及 DAI 评分的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(g·kg^{-1})	第0天体质量/(g)	第14天体质量/(g)	末次DAI评分
Control 组	8		235.23±12.02	286.01±10.11	0.00±0.00
Model 组	8		238.01±10.62	228.88±11.39[1)]	2.49±0.31[1)]
Mesalazine 组	8	0.42	230.86±13.18	247.05±9.23[2)]	0.85±0.24[3)]
ACD-L 组	8	11.55	233.01±10.45	232.68±11.24[2)]	1.03±0.31[2)]
ACD-M 组	8	23.10	231.86±12.27	248.76±13.33[3)]	0.91±0.26[2)]
ACD-H 组	8	46.20	233.28±9.36	238.41±12.25[2)]	0.79±0.28[3)]

注:1)与 Control 组相比,$P<0.01$;2)与 Model 组相比,$P<0.05$;3)与 Model 组相比,$P<0.01$。

3.2 ACD 对 UC 大鼠结肠组织病理变化的影响

各组 UC 大鼠结肠组织病理变化所示,发现 Control 组结肠无明显的病理改变,结肠组织排列紧密、结构完整;对比 Control 组,Model 组结肠组织损伤明显增加,黏膜排列紊乱、严重溃疡和隐窝畸形,各层炎症细胞浸润;与 Model 组相比,Mesalazine 组与 ACD 各治疗组均降低了结肠上皮组织的损伤,不同程度地改善了结肠病理形态,黏膜结构清晰,炎症细胞浸润降低并减少了隐窝异常。见插页XXXⅢ图 1。

3.3 ACD 对 UC 大鼠血清 IL-6、IL-18 的影响

与 Control 组相比,Model 组大鼠血清中 IL-6、IL-18 的含量均有显著提升($P<0.01$);经干预后,对比 Model 组,Mesalazine 组可显著降低 IL-6、IL-18 的含量($P<0.01$);安肠汤各剂量组相关炎症因子含量也均低于 Model 组,显著降低了 IL-6、IL-18 的含量($P<0.05$,$P<0.01$)。见表 3。

表3 各组 UC 大鼠血清 IL-6、IL-18 结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(g·kg^{-1})	IL-6	IL-18
Control 组	8		69.26±8.5	127.56±11.41
Model 组	8		214.36±12.27[1)]	203.58±18.44[1)]
Mesalazine 组	8	0.42	78.47±6.9[3)]	144.15±14.74[3)]
ACD-L 组	8	11.55	133.55±9.97[3)]	170.34±12.91[2)]
ACD-M 组	8	23.10	107.24±7.79[3)]	149.33±16.66[3)]
ACD-H 组	8	46.20	88.58±8.57[3)]	151.92±11.53[3)]

注:1)与 Control 组相比,$P<0.01$;2)与 Model 组相比,$P<0.05$;3)与 Model 组相比,$P<0.01$。

3.4 ACD 对 UC 大鼠结肠上皮细胞线粒体自噬的影响

透射电子显微镜观察大鼠结肠组织,Control 组线粒体形态正常,排列密集,线粒体膜完整,线粒体嵴清晰规则分布。Model 组线粒体结构缺失数量减少,线粒体嵴断裂,出现肿胀和空泡化。与 Model 组相比,Mesalazine 组和 ACD 各剂量组给药后,线粒体数量增加,线粒体膜较完整,肿胀程度降低,线粒体嵴结构得到改善,出现自噬小体或自噬溶酶体,尤以 ACD-M、ACD-H 明显。见插页XXXⅢ图 2。

3.5 ACD 对 UC 大鼠结肠组织线粒体相关蛋白表达的影响

IF 显示,与 Control 组相比,Model 组中 LC3 蛋白表达降低,p62 蛋白表达增加;经过 Mesalazine 组和 ACD 各剂量组干预后,LC3 阳性表达较 Model 组强度明显增加,p62 表达降低,Mesalazine 组、ACD-M 组与 ACD-H 组更为显著。见插页XXXⅣ图 3。此外 Western Blot 也显示,与 Control 组相比,Model 组大鼠结肠组织 PHB2、PGAM5、PINK1、Parkin、LC3B Ⅱ/LC3B Ⅰ蛋白表达水平明显降低,p62 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$,$P<0.01$);与 Model 组相比,Mesalazine 组与 ACD 各剂量组可明显升高 PHB2、PGAM5、PINK1、Parkin 蛋白水平,降低 p62 蛋白水平($P<0.05$,$P<0.01$),ACD-L 组结肠组织 LC3B Ⅱ/LC3B Ⅰ蛋白表达差异无统计学意义。见表 4、图 4。

3.6 ACD 对 UC 大鼠结肠组织 PHB2、PGAM5、PINK1、Parkin mRNA 的影响

与 Control 组相比,Model 组大鼠结肠组织 PHB2、PGAM5、PINK1、Parkin mRNA 相对表达量降低($P<0.05$,$P<0.01$);经 Mesalazine 组与 ACD 各剂量组干预后,与 Model 组相比,PHB2、PGAM5、PINK1、Parkin mRNA 明显升高($P<0.05$,$P<0.01$)。见表 5。

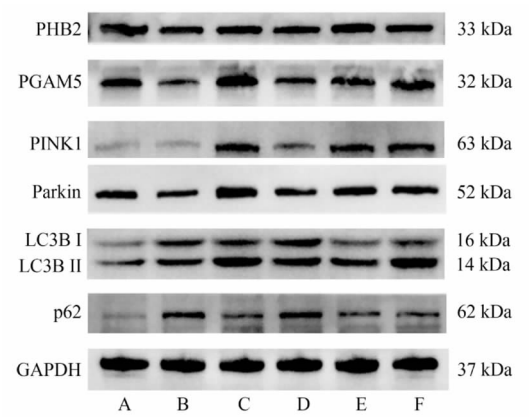
4 讨论

中医学中并无溃疡性结肠炎相对应的病名,根据 UC 的临床特征及发病特点,中医将其归属为"痢疾""肠澼""便血"等范畴。UC 病位在大肠,但对 UC 病因病机的认识,中医各学者持不同观点,广西名老中医肖振球教授经过多年临床实践经验的积累,总结出UC的病因病机,主要是本虚标实,虚实夹杂之

表4 各组大鼠结肠组织 PHB2、PGAM5、PINK1、Parkin、LC3、p62 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/($g \cdot kg^{-1}$)	PHB2/GAPDH	PGAM5/GAPDH	PINK1/GAPDH	Parkin/GAPDH	LC3B Ⅱ/LC3B Ⅰ	p62/GAPDH
Control 组	8		1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.08
Model 组	8		0.73 ± 0.06[2)]	0.67 ± 0.05[2)]	0.81 ± 0.04[1)]	0.82 ± 0.07[1)]	0.47 ± 0.04[2)]	1.88 ± 0.16[2)]
Mesalazine 组	8	0.42	0.83 ± 0.01[4)]	0.94 ± 0.12[4)]	1.88 ± 0.12[4)]	1.41 ± 0.05[4)]	0.64 ± 0.13[3)]	1.25 ± 0.06[4)]
ACD－L 组	8	11.55	0.79 ± 0.04[3)]	0.79 ± 0.06[3)]	1.21 ± 0.06[4)]	1.07 ± 0.12[3)]	0.58 ± 0.07	1.67 ± 0.08[3)]
ACD－M 组	8	23.1	0.84 ± 0.03[4)]	0.92 ± 0.02[4)]	1.9 ± 0.04[4)]	1.35 ± 0.06[4)]	0.74 ± 0.11[3)]	1.19 ± 0.06[4)]
ACD－H 组	8	46.2	0.8 ± 0.02[4)]	0.93 ± 0.04[4)]	1.42 ± 0.11[4)]	1.25 ± 0.02[4)]	0.68 ± 0.09[3)]	1.22 ± 0.07[4)]

注：1）与 Control 组相比，$P < 0.05$；2）与 Control 组相比，$P < 0.01$；3）与 Model 组相比，$P < 0.05$；4）与 Model 组相比，$P < 0.01$。



注：A：Control 组；B：Model 组；C：Mesalazine 组；D：ACD－L 组；E：ACD－M 组；F：ACD－H 组。

图4 各组大鼠结肠组织 PHB2、PGAM5、PINK1、Parkin、LC3、p62 蛋白表达电泳

表5 各组大鼠结肠组织 PHB2、PGAM5、PINK1、Parkin mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/($g \cdot kg^{-1}$)	PHB2	PGAM5	PINK1	Parkin
Model 组	8		0.27 ± 0.07[2)]	0.29 ± 0.06[2)]	0.84 ± 0.04[1)]	0.83 ± 0.02[1)]
Mesalazine 组	8	0.42	0.56 ± 0.03[4)]	0.67 ± 0.03[4)]	3.33 ± 0.11[4)]	2.87 ± 0.08[4)]
ACD－L 组	8	11.55	0.47 ± 0.03[4)]	0.42 ± 0.02[3)]	2.12 ± 0.08[4)]	1.37 ± 0.03[4)]
ACD－M 组	8	23.1	0.75 ± 0.02[4)]	0.74 ± 0.11[4)]	3.61 ± 0.06[4)]	3.05 ± 0.03[4)]
ACD－H 组	8	46.2	0.55 ± 0.04[4)]	0.55 ± 0.03[4)]	2.83 ± 0.1[4)]	2.02 ± 0.1[4)]

注：设所有指标 Control 组 mRNA 相对表达量为 1。1）与 Control 组相比，$P < 0.05$；2）与 Control 组相比，$P < 0.01$；3）与 Model 组相比，$P < 0.05$；4）与 Model 组相比，$P < 0.01$。

证，认为脾肾阳虚为本，瘀血阻滞为标，肾阳虚则温煦功能减退，脾阳失于温养，运化功能减弱，脾肾阳虚致使气血运行不畅，瘀血阻滞，胃肠功能失调。针对此病因病机，肖教授提出治标以活血化瘀，治本以温补脾肾为主，创立中药复方安肠汤，该方中熟附子、干姜共为君药，以温煦脾肾之阳；黄芪、白术、党参、茯苓为臣药，共奏健中焦元气、资气血化生之源之效；佐以补骨脂，以增强君药温补肾阳、温暖脾土、固涩止泻之力，薏苡仁利水渗湿，兼能健脾止泻，鸡内金、地榆凉血止血止痢，白头翁以祛湿止痢，槟榔行气止痛止泻，赤芍活血止痛，延胡索与木香行气止痛；甘草作为使药，调和诸药协同发挥作用。综观全方，共奏扶正祛邪、标本同治、脾肾共补、祛除阻滞之邪功效。

UC 通常表现为持续的炎症和肠上皮细胞（IECs）损伤，而线粒体在维持肠上皮稳态方面具有至关重要的作用[15]。线粒体自噬是细胞内重要的质量控制机制，可以清除功能失调的线粒体，防止线粒体副产物的积累[16]。在溃疡性结肠炎患者中发现存在线粒体功能障碍，有效的线粒体自噬对于维持 IECs 的平衡以及减轻结肠炎症状至关重要，当线粒体自噬功能受损，可能会加剧应激引起的细胞损伤，进而触发细胞炎症反应[17]。PHB 是线粒体内膜蛋白的一种，能调节线粒体机能活动及合成分解，PHB2 被发现为其中一亚型，近年来被认为是线粒体内膜自噬受体，在稳定线粒体结构与功能上起着不可或缺的作用[18]。研究表明，PHB2 是 PINK1 介导有丝分裂的受体，通过稳定 PINK1 和增加 Parkin 的线粒体募集来促进 PINK1－Parkin 介导的线粒体自噬[19]。且 PHB 还被发现在 IECs 中发挥抗炎与抗氧化作用[20]。一项临床研究发现，与正常结肠组织相比，UC 组结肠组织的 PHB2 的 IHC 评分较低，反映出 PHB2 与 UC 的发生密切相关[21]。PGAM5 是一种线粒体蛋白磷酸酶，参与调控线粒体自噬[22]，是 PINK1/Parkin 介导的有丝分裂中不可或缺的上游蛋白，PGAM5 通过作用于受损线粒体上的 PINK1，实现 PINK1 的稳定[23]。有研究发现，PGAM5 与 UC 相关联，在 PGAM5 敲低小鼠中会加重 UC 小鼠的疾病严重程度[24]。PINK1/Parkin 通路是调节线粒体自噬的关键通路，可以促进线粒体自噬，在 UC 疾病中参与消除功能障碍的线粒体[25]。值得关注的是，研究发现 PHB2 通过与全长形式 PGAM5 结合并维持，发挥对线粒体 PINK1/Parkin 聚集和稳定作用，继而诱导线粒体自噬[26]，抑制 PHB2 则减少全长形式 PGAM5，导致 PINK1 降解，从而抑制 PINK1/Parkin 通路依赖性线粒体自噬[27]。LC3B 与 P62 是自噬相关蛋白，线粒体自噬开始时，LC3B 从游离形式（LC3B Ⅰ）转变为膜结合形式（LC3B Ⅱ），因此 LC3B Ⅱ/LC3B Ⅰ比值上升被视为是线粒体自噬的标志[28]。p62 介导 LC3 与线粒体外膜上的泛素化蛋白的结合，以促进线粒体和自噬体的融合，随之被自噬溶酶体吞噬降解，即当线粒体自噬增强时，p62 表达下降[29]。因此，我们认为 UC 的发生与 IECs 上线粒体自噬有关，并且调控 PHB2 介导的 PGAM5/PINK1/Parkin 通路对修复 IECs、减轻 UC 症状至关重要。

本次研究中，UC 大鼠结肠黏膜多处溃疡以及明显炎症细胞浸润，IECs 中受损线粒体增加，外膜破裂，出现线粒体空泡化和嵴断裂；结肠组织中 PHB2、PGAM5、PINK1、Parkin mRNA 和蛋白表达水平以及 LC3B Ⅱ/LC3B Ⅰ比值均降低，p62 蛋白表达水平升高。经过安肠汤以及美沙拉嗪干预后，UC 大鼠结肠黏膜溃疡数和炎症细胞浸润得到明显改善，线粒体损伤减轻，受损线粒体被自噬体吞噬，自噬体数量增加，结肠组织中 PHB2、PGAM5、PINK1、Parkin mRNA 和蛋白表达水平以及 LC3B Ⅱ/LC3B Ⅰ比值不同程度的升高，p62 蛋白表达水平降

低。提示安肠汤治疗UC降低炎症反应、促进肠黏膜恢复以及改善UC症状的作用机制可能与调控PHB2/PGAM5/PINK1/Parkin轴促进IECs线粒体自噬有关。

安肠汤可能通过调控PHB2/PGAM5/PINK1/Parkin轴的表达,促进线粒体自噬,改善IECs修复功能及平衡,从而缓解肠黏膜损伤,为运用中医药以线粒体自噬为靶点治疗UC提供了一定的参考依据。上述研究结果揭示了安肠汤治疗UC具有一定优势,然而,本研究也存在一定的局限性,并未对PHB2如何通过PGAM5调控PINK1/Parkin轴进行更深一步分子调控机制的研究,有待后续进行深入探索。

参考文献

[1] YAO D B, DONG M, DAI C L, et al. Inflammation and inflammatory cytokine contribute to the initiation and development of ulcerative colitis and its associated cancer[J]. Inflamm Bowel Dis, 2019, 25(10): 1595-1602.

[2] DU L, HA C. Epidemiology and pathogenesis of ulcerative colitis[J]. Gastroenterol Clin North Am, 2020, 49(4): 643-654.

[3] NEURATH M F, LEPPKES M. Resolution of ulcerative colitis[J]. Semin Immunopathol, 2019, 41(6): 747-756.

[4] BOCK F J, TAIT S W G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(2): 85-100.

[5] SOSNOVSKI K E, BRAUN T, AMIR A, et al. GATA6-AS1 regulates intestinal epithelial mitochondrial functions, and its reduced expression is linked to intestinal inflammation and less favourable disease course in ulcerative colitis[J]. J Crohns Colitis, 2023, 17(6): 960-971.

[6] CHEN Y D, LI J R, LI S, et al. Uncovering the novel role of NR1D1 in regulating BNIP3-mediated mitophagy in ulcerative colitis[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(18): 14222.

[7] LI J, YANG D M, LI Z P, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy in neurodegenerative diseases[J]. Ageing Res Rev, 2023, 84: 101817.

[8] WEI Y J, CHIANG W C, SUMPTER R Jr, et al. Prohibitin 2 is an inner mitochondrial membrane mitophagy receptor[J]. Cell, 2017, 168(1-2): 224-238. e10.

[9] HASSON S A, KANE L A, YAMANO K, et al. High-content genome-wide RNAi screens identify regulators of parkin upstream of mitophagy[J]. Nature, 2013, 504(7479): 291-295.

[10] 廖志远, 孙平良, 兰智妮, 等. 安肠汤联合常规治疗对活动期脾肾阳虚型溃疡性结肠炎患者的临床疗效[J]. 中成药, 2022, 44(7): 2153-2157.

[11] 农评皓, 兰智妮, 孙平良, 等. 安肠汤在重症溃疡性结肠大鼠模型治疗中相关炎症因子表达的研究[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(9): 2049-2052.

[12] 梁运特, 孙平良. 基于miRNA-146a/JAK/STAT/SOCS-3信号通路探讨安肠汤对溃疡性结肠炎大鼠炎症免疫的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(3): 30-38.

[13] 吴东升, 曹晖, 曹晓阳, 等. 芍药汤通过cAMP/PKA/CREB信号通路调控溃疡性结肠炎水液代谢及肠上皮通透性的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(9): 53-60.

[14] TOTSUKA T, KANAI T, IIYAMA R, et al. Ameliorating effect of anti-inducible costimulator monoclonal antibody in a murine model of chronic colitis[J]. Gastroenterology, 2003, 124(2): 410-421.

[15] RATH E, MOSCHETTA A, HALLER D. Mitochondrial function—gatekeeper of intestinal epithelial cell homeostasis[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, 15(8): 497-516.

[16] LING C, VERSLOOT C J, ARVIDSSON KVISSBERG M E, et al. Rebalancing of mitochondrial homeostasis through an NAD+-SIRT1 pathway preserves intestinal barrier function in severe malnutrition[J]. eBioMedicine, 2023, 96: 104809.

[17] NAGATA S. Apoptosis and clearance of apoptotic cells[J]. Annu Rev Immunol, 2018, 36: 489-517.

[18] MISHRA S. Phb1: Phb2 heterodimers in the mitochondria-beyond functional interdependence[J]. J Biol Chem, 2019, 294(40): 14836.

[19] CAI C, LI Z Y, ZHENG Z M, et al. Pgam5-mediated PHB2 dephosphorylation contributes to endotoxemia-induced myocardial dysfunction by inhibiting mitophagy and the mitochondrial unfolded protein response[J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(14): 4657-4671.

[20] ZHOU P, QIAN LP, D'AURELIO M, et al. Prohibitin reduces mitochondrial free radical production and protects brain cells from different injury modalities[J]. J Neurosci, 2012, 32(2): 583-592.

[21] KÜÇÜK İ, TANOĞLU A, ÖNCÜ K, et al. Immunohistochemical activity of Prohibitin-2 and Stomatin-Like Protein-2 in patients with ulcerative colitis[J]. Turk J Gastroenterol, 2016, 27(3): 233-238.

[22] CHENG M Y, LIN N, DONG D L, et al. PGAM5: a crucial role in mitochondrial dynamics and programmed cell death[J]. Eur J Cell Biol, 2021, 100(1): 151144.

[23] LU W, KARUPPAGOUNDER S S, SPRINGER D A, et al. Genetic deficiency of the mitochondrial protein PGAM5 causes a Parkinson's-like movement disorder[J]. Nat Commun, 2014, 5: 4930.

[24] 张晓媛. ANGPTL4和PGAM5在IBD患者肠道中的表达及其参与小鼠肠炎发病的分子机制[D]. 扬州: 扬州大学, 2022.

[25] KONG J R, XIANG Q Z, SHI G X, et al. Licorice protects against ulcerative colitis via the Nrf2/PINK1-mediated mitochondrial autophagy[J]. Immun Inflamm Dis, 2023, 11(1): e757.

[26] PARK Y S, CHOI S E, KOH H C. PGAM5 regulates PINK1/Parkin-mediated mitophagy via DRP1 in CCCP-induced mitochondrial dysfunction[J]. Toxicol Lett, 2018, 284: 120-128.

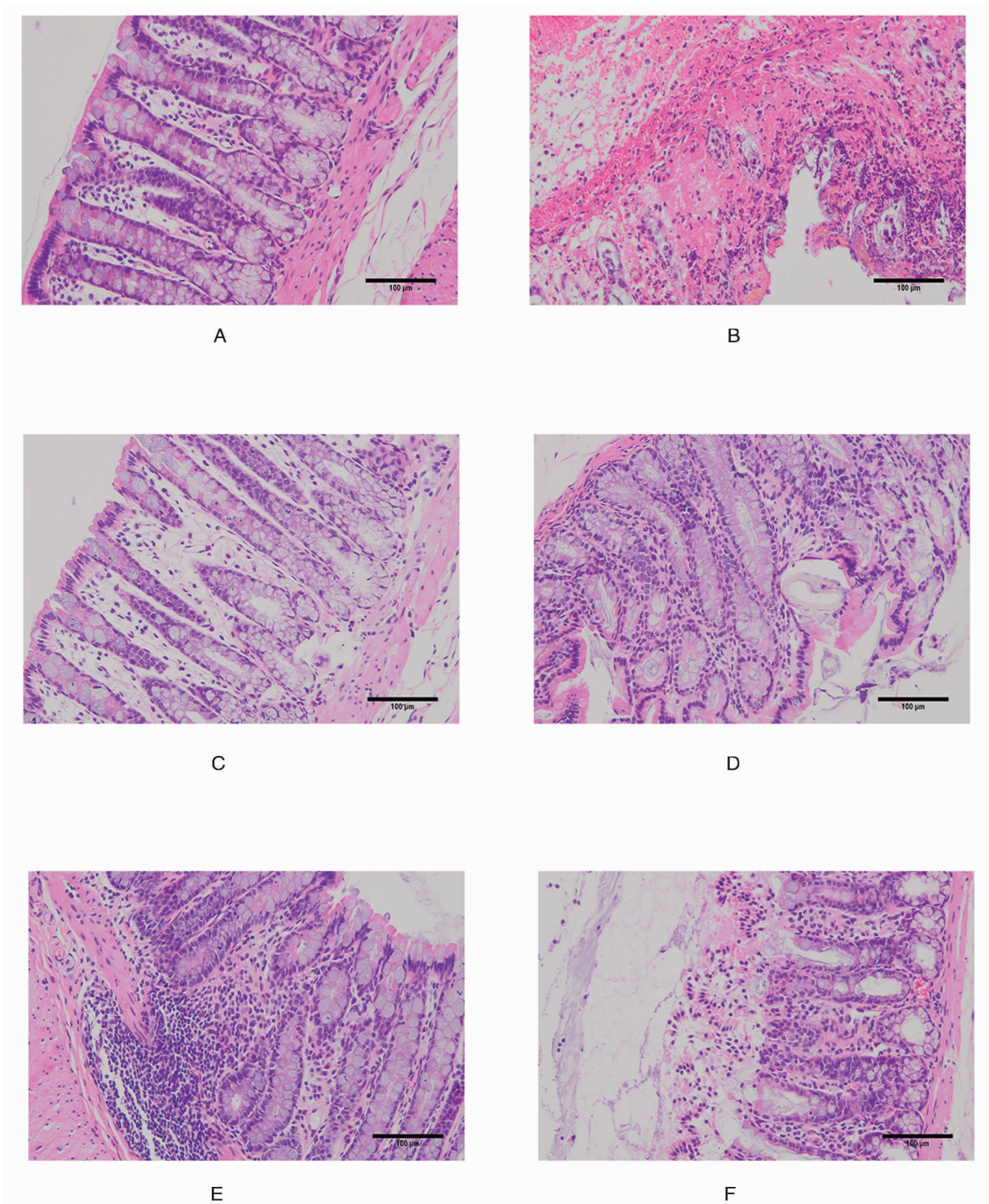
[27] YAN C J, GONG L L, CHEN L, et al. PHB2 (prohibitin 2) promotes PINK1-PRKN/Parkin-dependent mitophagy by the PARL-PGAM5-PINK1 axis[J]. Autophagy, 2020, 16(3): 419-434.

[28] YAN J, DENG D S, WU K M. XinJiaCongRongTuSiZiWan protects triptolide-induced rats from oxidative stress injury via mitophagy mediated PINK1/Parkin signaling pathway[J]. Acta Cir Bras, 2024, 39: e391424.

[29] CHOONG C J, OKUNO T, IKENAKA K, et al. Alternative mitochondrial quality control mediated by extracellular release[J]. Autophagy, 2021, 17(10): 2962-2974.

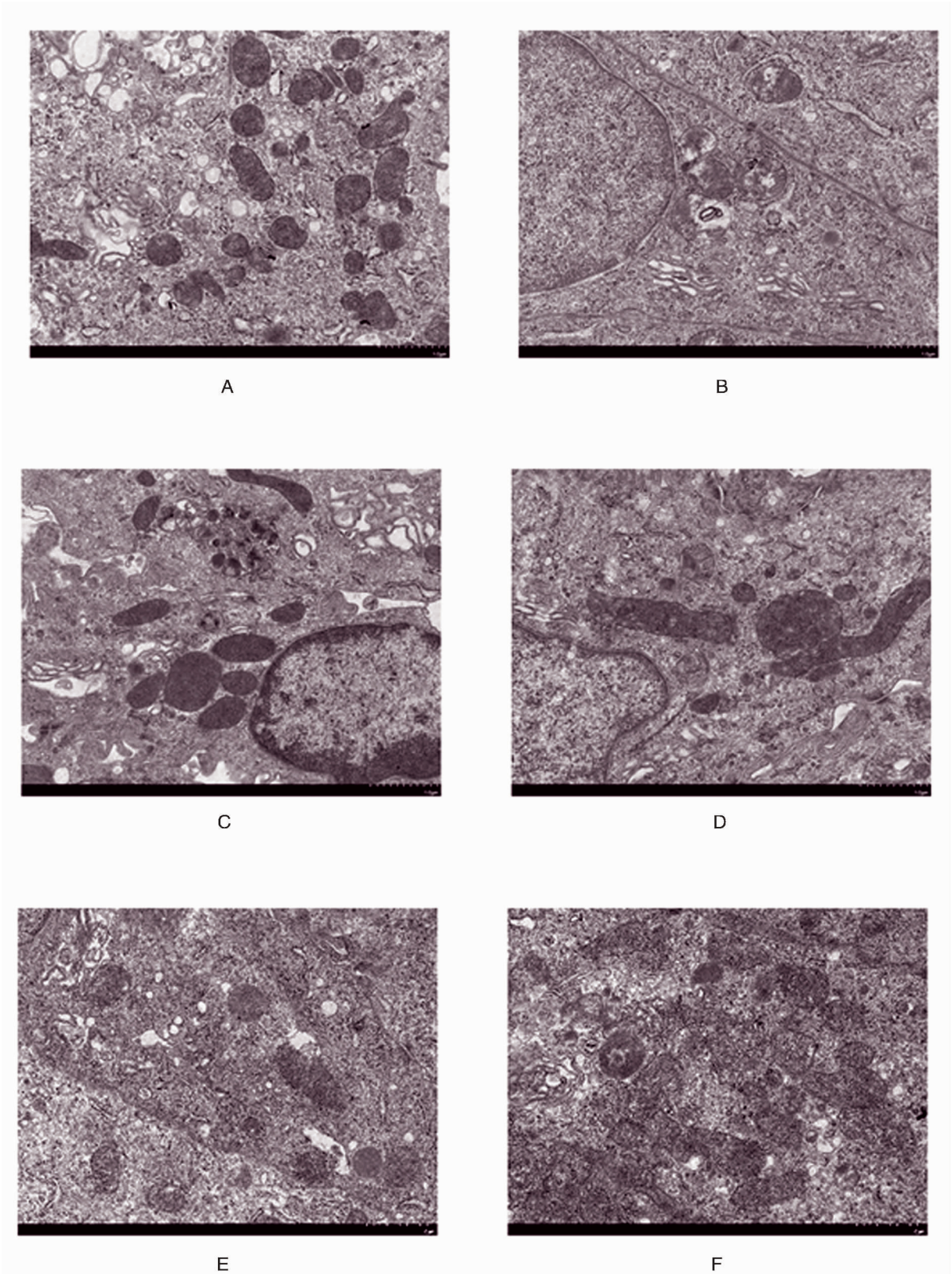
基于 PHB2/PGAM5/PINK1/Parkin 信号轴探讨安肠汤改善溃疡性结肠炎大鼠肠上皮细胞线粒体自噬的作用机制

（正文见 132－137 页）



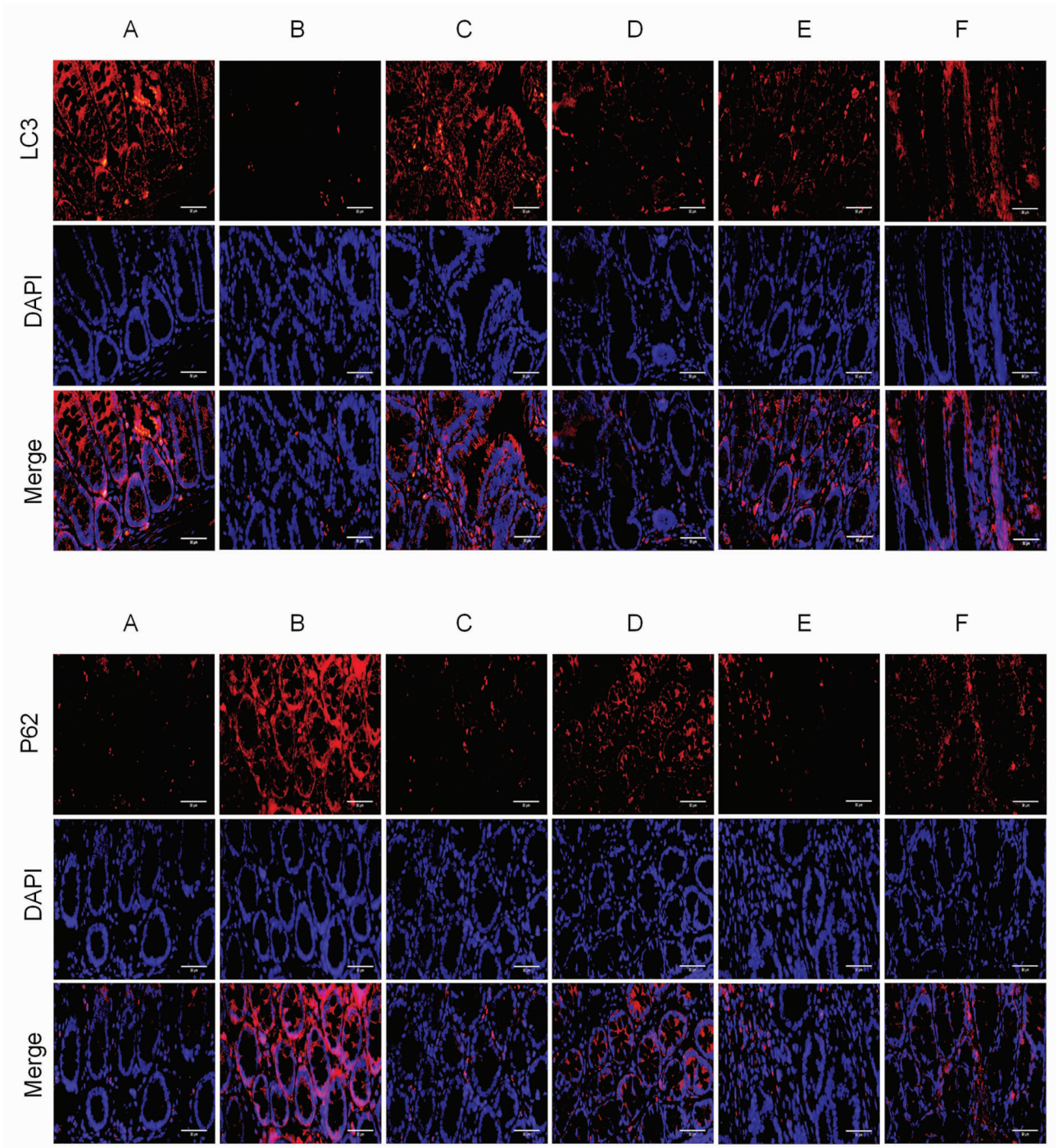
注：A：Control 组；B：Model 组；C：Mesalazine 组；D：ACD－L 组；E：ACD－M 组；F：ACD－H 组。

图 1　各组大鼠结肠组织病理变化（HE 染色，×200）



注：A：Control 组；B：Model 组；C：Mesalazine 组；D：ACD－L 组；E：ACD－M 组；F：ACD－H 组。

图2 ACD 对 UC 大鼠结肠上皮细胞线粒体自噬的影响（透射电镜，×10 000）



注：A：Control 组；B：Model 组；C：Mesalazine 组；D：ACD－L 组；E：ACD－M 组；F：ACD－H 组。

图 3　ACD 对 UC 大鼠结肠组织 LC3、p62 蛋白表达的影响（免疫荧光，×400）