

苍术多糖与正丁醇部位对脾虚大鼠线粒体自噬的影响

徐慧颖,丁奕辉,董昊,赵雪岑,柏阳,才谦*

辽宁中医药大学药学院,大连 116600

摘要:多糖与正丁醇部位是苍术的健脾活性部位,本文从线粒体自噬的角度探讨苍术活性部位对脾虚大鼠的调节作用,进而阐释其健脾机制。采用透射电镜观察大鼠胃窦组织线粒体超微结构;采用 qRT-PCR 和 Western blot 法检测大鼠胃窦组织线粒体 PINK1、Parkin、LC3 和 P62 mRNA 及蛋白表达水平;采用比色法检测大鼠胃窦组织三磷酸腺苷(adenosine-triphosphate,ATP)、 H_2O_2 水平,JC-1 荧光探针法检测线粒体膜电位(MMP)水平。结果表明,与模型组相比,麸炒苍术多糖(FD)、麸炒苍术正丁醇部位(FZ)、生苍术多糖(SD)与生苍术正丁醇部位(SZ)均不同程度改善了脾虚大鼠胃窦组织线粒体结构损伤,且自噬溶酶体数量增多;FD、FZ、SD 与 SZ 均能显著下调 PINK1、Parkin、p62 mRNA 与蛋白表达,上调 LC3II 蛋白表达、LC3II/I 值;FD 与 FZ 组 ATP、MMP 水平显著上升, H_2O_2 水平显著下降,SZ 组 ATP、MMP 水平显著上升,SD 组 H_2O_2 水平显著下降。综上所述,苍术多糖与正丁醇部位可能是通过改善自噬障碍,恢复线粒体功能,从而调节脾虚,且麸炒后多糖与正丁醇部位效果明显优于生品。

关键词:苍术;麸炒;脾虚;多糖;正丁醇部位

中图分类号:R285;R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)8-1372-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.8.010

Effects of polysaccharides and n-butanol fractions of *Atractylodis Rhizoma* on mitophagy in rats with spleen deficiency

XU Hui-ying, DING Yi-hui, DONG Hao, ZHAO Xue-cen, BAI Yang, CAI Qian*

College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

Abstract: Polysaccharides and n-butanol fractions are effective fractions in *Atractylodis Rhizoma* (AR) for treating spleen deficiency. The study is to explore the mechanism of the effective fractions in AR on treating spleen deficiency from the perspective of mitophagy. The ultrastructure of mitochondria in gastric antrum of rats was observed by transmission electron microscope. The mRNA and protein expression levels of autophagy-related proteins PINK1, Parkin, LC3 and p62 were detected by qRT-PCR and Western blot. The adenosine triphosphate (ATP) and H_2O_2 levels in gastric antrum of rats were detected by biochemical analysis, the level of mitochondrial membrane potential (MMP) were detected by JC-1. The results showed that compared with the model group, the polysaccharides of bran-processed AR (FD), n-butanol fractions of bran-processed AR (FZ), polysaccharides of crude AR (SD) and n-butanol fractions of crude AR (SZ) improved the mitochondrial structure injury and increased the number of autophagic lysosomes in different degrees. FD, FZ, SD and SZ significantly down-regulated the expression of PINK1, Parkin and p62 mRNA and protein, and up-regulated the expression of LC3II protein and LC3II/I value; the levels of ATP and MMP in FD and FZ groups increased significantly, while the levels of H_2O_2 decreased significantly, the levels of ATP and MMP in SZ group increased significantly, while the levels of H_2O_2 in SD group decreased significantly. In summary, the polysaccharides and n-butanol fractions of AR may treat spleen deficiency by promoting mitophagy and improving mitochondrial function of gastric antrum, and the effect of polysaccharides and n-butanol fractions of bran-processed AR were obviously superior to that of crude AR.

Key words: *Atractylodis Rhizoma*; bran-processed; spleen deficiency; polysaccharides; n-butanol fractions

收稿日期:2023-01-09

接受日期:2023-05-29

基金项目:国家自然科学基金(81973478);兴辽英才计划(XLYC2002004)

*通信作者 Tel:86-411-85890125;E-mail:caiqianmail@sina.com

脾虚属脏腑辨证中常见之证型,通常表现为消瘦、食欲不振、胃脘痛、胀气、乏力、面色萎黄、便溏等。脾虚表明机体处于低能量代谢状态,尤其与胃

肠功能障碍有关^[1]。值得关注的是,线粒体是机体胃肠蠕动的重要能量来源,通过氧化磷酸化以 ATP 的形式产生能量,是“脾主运化”的重要环节^[2]。氧化损伤、营养缺乏等外界刺激易导致线粒体损伤,对此,宿主细胞可启动自噬机制清除损伤的线粒体,维持细胞内的环境稳态^[3]。如自噬功能受损不能及时清除损伤的线粒体,可诱导细胞死亡。研究发现,脾虚动物骨骼肌、神经、肝脏、心肌等细胞中均发现线粒体自噬异常^[4,5]。

苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC 为菊科多年生草本植物,具有燥湿健脾之功效。《中国药典》规定其基源为菊科植物茅苍术或北苍术的根茎^[6]。茅苍术野生资源主要分布于湖北、安徽宣城、江西武宁和陕西汉中等地区,北苍术野生资源主要分布东北、内蒙、河北等地区。传统认为江苏茅山地区的苍术质量最好,为道地药材。在泰国、日本等许多国家,苍术也常用来治疗消化系统疾病。现代药理研究表明,苍术可以调节大鼠血清中胃肠激素水平^[7];苍术提取物对胃癌细胞 (bgc-823 和 sgc-7901)^[8] 与幽门螺杆菌的生长^[9] 均有抑制作用。苍术含有多种类型的化学成分,分别为挥发油、多糖、苷类和低极性非挥发物质。课题组之前研究发现,苍术多糖与正丁醇部位(苷类)对脾虚具有治疗作用^[10,11],本实验是在此基础上,首次从线粒体自噬的角度对苍术有效部位调节脾虚的作用机制进行探究,旨在为苍术的合理应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 药物与制备

生茅苍术采自于湖北罗田中药种植基地(非道地药材),番泻叶购自海王星辰药店(生产批号:20210801),经辽宁中医药大学中药鉴定教研组许亮教授鉴定分别为菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 根茎、豆科植物狭叶番泻 *Cassia angustifolia* Vahl 的干燥小叶。

1.1.1 麸炒苍术正丁醇萃取物的制备

取麸炒茅苍术(根据中国药典记载方法炮制),粉碎后过 60 目筛。称取一定量粉末加 8 倍量温水浸泡 1 h,80 ℃ 提取 3 h,提取出挥发油,提取液过滤,滤液减压浓缩作为水提液。药渣加入 8 倍量 70% 的乙醇再次提取 3 h,过滤,滤液减压浓缩作为醇提液。合并上述水提液与醇提液,依次用二氯甲烷、正丁醇萃取 3 次,回收正丁醇溶剂得到麸炒苍术正丁醇萃取物,收率为 3.2%。

1.1.2 麸炒苍术多糖的制备

将上述萃取后的剩余液加入 4.2 倍量的 95% 乙醇,静置 12 h,过滤得沉淀,沉淀冷冻干燥,得麸炒苍术粗多糖,收率为 20%。

1.1.3 药液的配置

根据课题组前期研究结果,苍术在 0.945 mg/g 剂量下对脾虚大鼠有治疗作用,本次试验选取 0.945 mg/g 剂量进行研究。结合收率将正丁醇萃取物加入 0.5% 羧甲基纤维素钠配制成 0.012 g/mL 的药液,折合生药量 0.378 g/mL。结合收率将多糖加入蒸馏水配制成 0.075 6 g/mL 的药液,折合生药量 0.378 g/mL。

1.1.4 番泻叶水煎液的制备

称取适量番泻叶,加 10 倍量水,大火烧开后再改小火煎煮 30 min,过滤,滤液小火浓缩至含生药 0.125 g/mL 的水煎液。

1.2 主要试剂及仪器

ATP 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号:A095-1-1);BCA 总蛋白定量测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号:A045-4-2);H₂O₂ 检测试剂盒(上海 Beyotime 生物公司,货号:S0038);JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒(上海 Beyotime 生物公司,货号:C2006);cDNA 反转录试剂盒(德国 Thermo 公司,货号:#K1622);ECL 化学发光检测试剂盒(武汉百仟度生物科技有限公司,货号:Ba1059);PINK1 抗体(美国 Affinity 公司,货号:DF7742);Parkin 抗体(美国 CST 公司,货号:2132s);p62 抗体(美国 CST 公司,货号:23214S);LC3B 抗体(美国 Abcam 公司,货号:ab192890);β-actin 抗体(美国 Abcam 公司,货号:ab227387);山羊抗兔 II 抗、山羊抗小鼠 II 抗(美国 KPL 公司,货号分别为:074-1506、074-1806)。

HT7700 型透射电子显微镜(日本 hitachi 公司);754 紫外可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司);SpectraMax Gemini XPS 型荧光酶标仪(上海美谷分子仪器有限公司);荧光定量 PCR 仪(上海宏石医疗器械有限公司);TGL-16 型冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);L4158 型扫描仪(EPSON 公司)。

1.3 实验动物与分组

60 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量(200 ± 10)g,购于辽宁长生生物技术有限公司(合格证号:SCXK-辽-2021-0004)。室温:20 ~ 23 ℃,相对湿度:45% ~ 55%,适应性饲养 1 周后,复制脾虚动物模型。本研

究方案通过辽宁中医药大学实验动物伦理委员会审核(2019YS-DW-028-01)。

60 只大鼠随机分为空白组(control group, Con)、模型组(model group, Mod)、麸炒苍术多糖组(FD)、麸炒苍术正丁醇部位组(FZ)、生苍术多糖组(SD)、生苍术正丁醇部位组(SZ)。除空白组外,均采用饮食不节、疲劳过度加苦寒泻下的复合因素法复制脾虚大鼠模型。方法如下:第 1~14 d, 单日灌胃猪油, 剂量为:10 mL/(kg·d), 给予饲料喂养; 双日游泳, 游至耐力极限, 并喂饲甘蓝不给予饲料。第 15~21 d, 灌胃给予苦寒伤脾药物番泻叶的水煎液, 剂量为:10 mL/(kg·d)。第 22~28 d, FD、FZ、SD、SZ 分别灌胃药液剂量为:10 mL/(kg·d)。给药期间, 空白组和模型组给予相同体积的 0.9% NaCl 溶液。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 取材

末次给药 24 h 后, 各组大鼠采取吸入式麻醉并剖开腹腔, 冰上剪取胃窦组织, 放入预冷的生理盐水中洗去血液, 部分冰上切成约 1 mm³ 小块, 迅速投入 2.5% 戊二醛 4 ℃ 固定, 用于线粒体超微结构观察; 部分分装后 -80 ℃ 冻存用于其他检测。

1.4.2 线粒体超微结构观察

取戊二醛中固定的胃窦组织, 磷酸盐缓冲液漂洗, 1% 的锇酸再固定, 之后进行乙醇、丙酮梯度脱水, 经浸透、包埋、超薄切片(60~80 nm)、铀铅双染色后, 透射电镜下观察胃窦组织线粒体超微结构。

1.4.3 ATP 水平测定

取冻存胃窦组织加入煮沸双蒸水充分匀浆, 沸水浴 10 min 后离心取上清液待测。按照 BCA 蛋白测定试剂盒说明书要求, 取待测样品置于 96 孔板, 加入 BCA 工作液, 37 ℃ 孵育 30 min 后, 使用酶标仪测定 A_{562 nm}, 根据标准曲线计算各样品的蛋白浓度。

按照 ATP 试剂盒说明书要求, 设置空白管、标准管、测定管及对照管, 空白管和标准管分别加入 30 μL 标准液, 对照管和测定管分别加入 30 μL 待测样本, 分别加入不同反应剂, 反应结束后用紫外可见分光光度计测定各管 OD 值(636 nm)。按照如下公式计算样品的 ATP 浓度。

$$\text{ATP 浓度} =$$

$$\frac{(OD_{\text{测定}} - OD_{\text{对照}})}{(OD_{\text{标准}} - OD_{\text{空白}})} \times A \times N / C$$

式中, A: 标准品浓度, N: 测定样本稀释倍数, C: 样品蛋白浓度。

1.4.4 H₂O₂ 水平测定

取冻存胃窦组织加入 H₂O₂ 检测裂解液, 充分

匀浆, 离心取上清。吸取上清与 H₂O₂ 检测试剂置于 96 孔板内, 轻轻振荡使溶液混匀, 室温放置 30 min 后使用酶标仪测定 A560 nm, 根据标准曲线计算出样品中 H₂O₂ 的浓度。同时, 采用 BCA 试剂盒测定匀浆液中的蛋白浓度, 并用蛋白浓度校正 H₂O₂ 浓度。蛋白浓度测定方法同“1.4.3”。

1.4.5 线粒体膜电位水平(MMP)测定

按照线粒体提取试剂盒说明书要求, 取冻存胃窦组织加入 Lysis Buffer, 冰上研磨组织 20 余次得到匀浆混悬液, 低速离心取上清, 再高速离心取沉淀, 所得的沉淀即为线粒体粗提物, 加入 Wash Buffer 对线粒体粗提物进行洗涤, 离心后取线粒体沉淀置于 Store Buffer 中重悬, 即得到纯化的线粒体。

按照线粒体膜电位检测试剂盒说明书要求, 将纯化的线粒体与 JC-1 缓冲液混合后使用荧光酶标仪进行检测, 激发波长为 485 nm, 发射波长为 590 nm。红色荧光和绿色荧光分别代表正常线粒体和去极化线粒体。以红色荧光/绿色荧光的比值表示 MMP。

1.4.6 RT-PCR 法检测 PINK1、Parkin、p62、LC3 mRNA 表达水平

采用 Trizol 法提取各组大鼠胃窦组织总 RNA, 使用 cDNA 反转录试剂盒合成 RNA 样品的第一链 cDNA, 并用 PCR 仪进行 qRT-PCR 分析采用 Trizol 法提取各组大鼠胃窦组织总 RNA, 使用 cDNA 反转录试剂盒合成 RNA 样品的第一链 cDNA, 并用 PCR 仪进行 qRT-PCR 分析。PCR 反应体系: 2 (SYBR Gree qPCR Master Mix 5 μL, 上、下游引物各 0.2 μL, cDNA 2 μL, 灭菌去离子水 2.6 μL, 共 10 μL。PCR 反应条件: 预变性(95 ℃ 300 min), 40 次循环(95 ℃ 10 s, 60 ℃ 30 s), 溶解曲线(65~105 ℃)。

所有引物由天一辉远公司合成, 结果用 2^{-ΔΔCt} 方法进行分析, 各基因引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称 Primer name	序列(5'→3') Sequence(5'→3')
β-actin	F: CCCCGAGTACAACCTTCTTG R: TCATCCATGGCGAACTGGTGG
PINK1	F: GGCCAGATGTCGTCTCAA R: TGGAGGATCTGCCGAGATA
Parkin	F: TCCTTGGAGAAGAGCAGTACAAC R: CTTTCTCTGGCCCTGTTC
P62	F: CAGCTGCTGTCCGTAGAAATTG R: CAGGGATCACTACCCGCTCT

1.4.7 Western blot 法检测 PINK1、Parkin、p62、LC3 蛋白表达水平

使用 RIPA 裂解缓冲液提取各组大鼠胃窦组织中总蛋白,并通过 BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳分离蛋白,将蛋白转至 PVDF 膜,用 5% 脱脂牛奶在 0.1% TBST 中封闭 1 h,洗膜,加入一抗 PINK1(1:2 500)、Parkin(1:1 000)、LC3B(1:2 500)、p62(1:2 500)、 β -actin(1:6 000),4 °C 孵育过夜,加入二抗(1:50 000)室温孵育 1 h。采用 ECL 试剂盒检测条带,并用 ImageJ 分析目标条带。

1.5 统计方法

采用 SPSS17.0 统计软件,计量数据以均值 \pm 标

准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,并选择 LSD 方法校正进行多组之间的两两差异比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模型评价

空白组大鼠体格、活动、饮食与大便均正常;造模后各组大鼠体格消瘦,反应迟钝,大便溏泄,被毛蓬起枯槁无光泽,弓背,神态萎靡,蜷缩聚堆等,造模后的大鼠行为状态如图 1 所示。参考中医脾虚临床症状及相关文献对脾虚模型的评判标准,认为造模成功^[12]。经麸炒多糖、麸炒正丁醇部位、生多糖、生正丁醇部位给药干预后,造模大鼠症状逐渐正常。



图 1 造模后的大鼠行为状态

Fig. 1 Behavioral status of rats with spleen deficiency

2.2 线粒体超微结构的变化

空白组大鼠胃窦组织线粒体形态规则完整,自噬溶酶体个别存在。模型组大鼠线粒体肿胀,形状不规则,嵴减少,未见典型自噬结构,提示脾虚导致胃窦组织线粒体损伤与自噬功能障碍。经麸炒苍术多糖、麸炒苍术正丁醇部位、生苍术多糖给药治疗

后,线粒体结构损伤分别呈不同程度改善,且自噬溶酶体数量明显增加。生苍术正丁醇部位给药治疗后线粒体结构损伤未见改善,线粒体肿胀明显、膜内基质局部溶解,嵴减少、消失,自噬溶酶体少量存在(见图 2)。

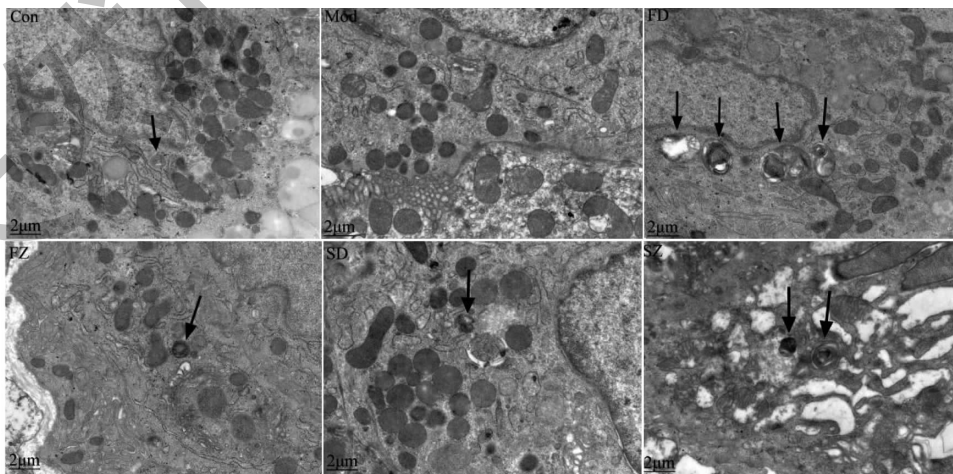


图 2 各组大鼠胃窦组织线粒体超微结构变化

Fig. 2 Ultrastructural changes of mitochondria in gastric antrum of rats in each group

注:黑色箭头表示自噬溶酶体;Note:Black arrows indicate autolysosomes.

2.3 线粒体基本功能的变化

与空白组比较,模型组大鼠胃窦组织 ATP 与 MMP 水平明显下降($P < 0.001$), H_2O_2 水平上升($P < 0.001$)。经麸炒苍术多糖、麸炒苍术正丁醇部位、生苍术多糖、生苍术正丁醇部位给药后均能显著

逆转脾虚模型所致的 ATP、MMP、 H_2O_2 水平的异常变化。其中,麸炒苍术多糖对 ATP、MMP、 H_2O_2 的改善效果优于生苍术多糖($P < 0.05$),麸炒苍术正丁醇部位对 H_2O_2 的改善效果优于生苍术正丁醇部位($P < 0.05$)(见图 3)。

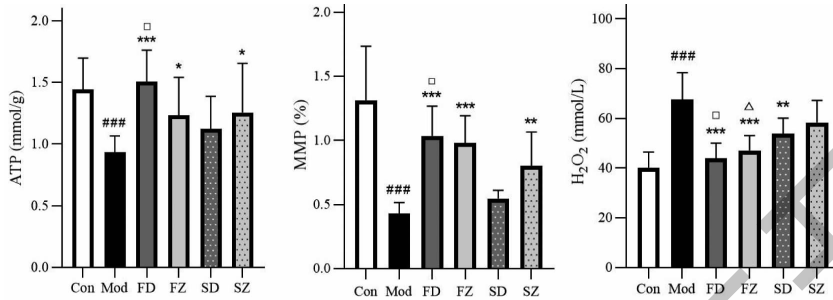


图 3 各组大鼠胃窦组织线粒体功能变化($\bar{x} \pm s, n = 9$)

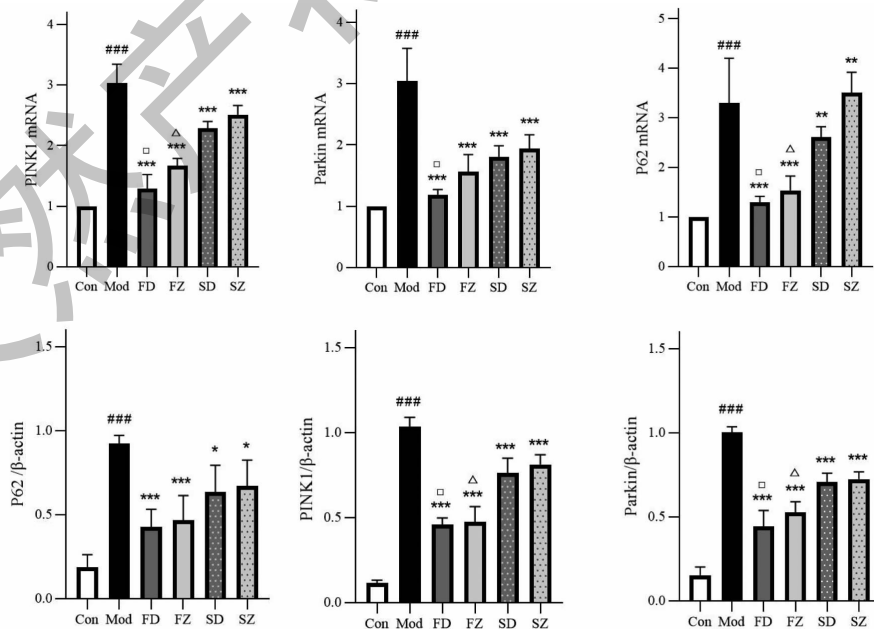
Fig. 3 Changes of mitochondrial function in gastric antrum of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 9$)

注:与空白组比较,### $P < 0.001$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;与生苍术多糖组比较,□ $P < 0.05$;与生苍术正丁醇部位组比较,△ $P < 0.05$ (图 4 同)。Note:Compared with Con,### $P < 0.001$;Compared with Mod,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;Compared with SD,□ $P < 0.05$;Compared with SZ,△ $P < 0.05$ (the same as Fig. 4)。

2.4 线粒体自噬水平的变化

与空白组相比,模型组 PINK1、Parkin、p62 mRNA 表达显著增加($P < 0.001$)。蛋白结果与 mRNA 基本一致,模型组 PINK1、Parkin、p62 蛋白增加,LC3I 向 LC3II 的转化减少,LC3II/I 表达显著降低($P < 0.001, P < 0.01, P < 0.05$)。与模型组比较,麸

炒苍术多糖、麸炒苍术正丁醇部位、生苍术多糖、生苍术正丁醇部位给药后上述变化明显减轻,PINK1、Parkin、p62 mRNA 与蛋白表达均下调,LC3II/LC3II/I 蛋白表达升高($P < 0.001, P < 0.01, P < 0.05$),其中,麸炒后苍术多糖与正丁醇部位对以上指标的调节作用优于生品($P < 0.05$)(见图 4)。



续图 4(Continued Fig.4)

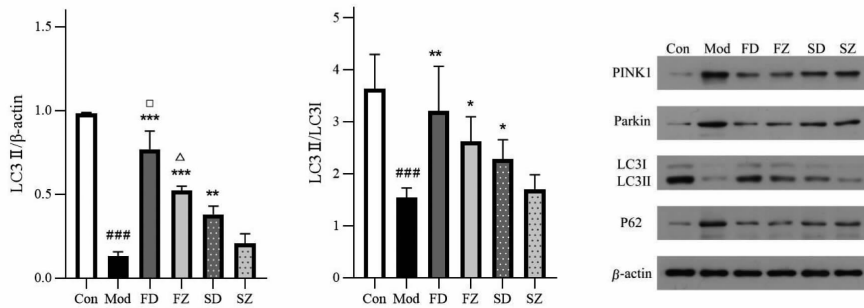


图4 各组大鼠胃窦组织线粒体自噬水平的变化($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Changes of mitophagy level in gastric antrum of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论与结论

脾虚的临床诊断一般是依据症状,脾虚病人常会表现食欲减退,脘腹隐痛,倦怠乏力,畏寒肢冷等症状。食欲减退在脾虚动物中表现为体重下降;脘腹隐痛会表现为弓背;倦怠无力则表现为神态萎靡和易疲劳;畏寒则会表现为扎堆蜷缩。本实验中,造模后大鼠消瘦,弓背,神态萎靡以及蜷缩聚堆,这些外观行为变化证明了所建立的脾虚大鼠模型是成功的。

线粒体自噬调控机制复杂,多种信号通路可介导不同种类的自噬过程,PINK1/Parkin 通路是线粒体最常见、研究最为成熟的自噬信号通路。PINK1 在健康的线粒体中通常是检测不到的,因为 PINK1 进入线粒体后被膜内水解酶(Parl)切割,随后被清除^[13]。如图5所示,当线粒体受损时,由于内膜电位降低,PINK1 进入线粒体路径被阻断,不断聚集在线粒体外膜并将 parkin 募集至受损线粒体^[14]。Parkin 是一种 E3 泛素蛋白连接酶,被 PINK1 激活后能够泛素化受损的线粒体膜蛋白,并被选择性自噬接头蛋白 p62 所识别^[15],再与自噬体膜上的自噬相关蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)连接,启动自噬,最终降解受损的线粒体^[16]。本研究发现,模型组 PINK1 和 Parkin mRNA 与蛋白显著增加,表明存在受损的线粒体,PINK1/Parkin 通路已经激活,但可能由于自噬功能障碍,受损的线粒体未能被自噬降解。生、麸苍术多糖与正丁醇部位治疗后各组大鼠 PINK1 和 Parkin mRNA 与蛋白水平降低,表明一些受损的线粒体已被自噬降解清除。

线粒体自噬受众多自噬相关蛋白严密调控,因此某些关键蛋白的表达常用来判定自噬的强弱,其中较为关键的是 LC3 和 p62 等。未发生自噬时,大多数 LC3 以 LC3I 的形式存在于细胞质中,当自噬

发生时,LC3 I 会经泛素化修饰与自噬泡表面的磷脂酰乙醇胺结合形成位于自噬体膜表面的 LC3 II^[17],因此,LC3II 的出现常作为自噬发生的重要标志^[18]。作为一种关键的选择性自噬适配蛋白,p62 可与 LC3II 结合并作为选择性自噬的底物^[19]。当溶酶体与自噬体处于结合阶段时,p62 可作为溶酶体的供体,引导自噬体与之结合,形成自噬溶酶体,最后底物被溶酶体内的蛋白水解酶降解,p62 随即被一同降解^[20],自噬的发生通常伴随着 p62 的减少。本研究观察到,模型组 LC3II 蛋白表达和 LC3II/I 比值均显著低于空白组,表明脾虚时胃窦组织细胞内的自噬体形成受限。p62 mRNA 与蛋白水平上升,提示自噬活性受到抑制。经生、麸苍术多糖与正丁醇部位给药后各组大鼠 LC3 I 向 LC3 II 的转化增强,p62mRNA 与蛋白水平下降,提示自噬水平上升。透射电镜结果与之对应,模型组大鼠线粒体结构损伤较重,未见自噬结构,表明自噬功能受损可能导致了受损线粒体的积累。给药后各组大鼠线粒体结构损伤减轻,自噬溶酶体数量增多。因此,我们认为脾虚导致大鼠胃窦组织线粒体自噬功能受损,而生、麸苍术多糖与正丁醇部位给药后促进了自噬的发生。

线粒体自噬受阻通常伴随着活性氧(reactiveoxygenspecies,ROS)的产生,细胞内 ROS 水平升高将诱导氧化应激^[21]。氧化应激攻击线粒体膜,导致膜电位降低、线粒体损伤和功能障碍^[22],进而引发能量生成缺陷、ROS 增多,造成恶性循环。受损和功能失调的线粒体被线粒体自噬选择性清除,有助于减少 ROS 的产生并防止正常细胞的氧化损伤^[3]。H₂O₂ 是细胞内主要的内源性 ROS,几乎可以由所有的氧化应激源产生,并且能够自由扩散进出细胞,造成氧化-抗氧化系统的失衡^[23]。因此,本实验通过

检测 H_2O_2 含量,间接评价 ROS 水平。研究表明,脾虚大鼠体内 H_2O_2 水平,膜电位和 ATP 降低,表明线粒体功能受损。而生、麸苍术多糖与正丁醇部位的治疗显著改善了线粒体功能,这可能是通过促进线粒体自噬和增加受损线粒体的清除实现的。

综上,我们推测,苍术多糖与正丁醇部位可能是通过改善胃窦组织自噬障碍,恢复线粒体功能,从而调节脾虚,且麸炒后多糖与正丁醇部位效果明显优于生品。

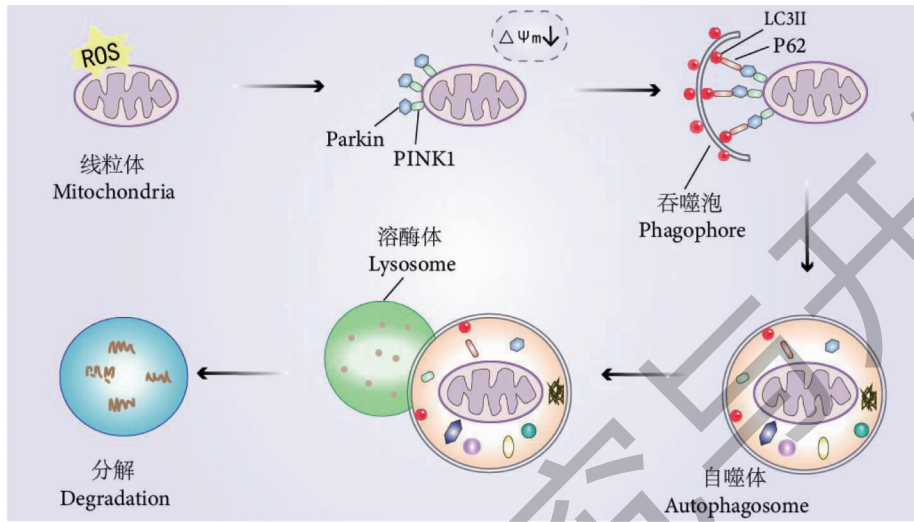


图5 线粒体自噬机制图

Fig. 5 The mechanism of PINK1/Parkin-mediated mitophagy

参考文献

- Zhang J, Wang X, Shi X, et al. Combination of 15 lipid metabolites and motilin to diagnose spleen-deficiency FD [J]. Chin Med, 2019, 14:16.
- Fernández-Vizarra E, Tiranti V, Zeviani M. Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: what we have learned by studying its defects [J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1793:200-211.
- Baechler BL, Bloemberg D, Quadrilatero J. Mitophagy regulates mitochondrial network signaling, oxidative stress, and apoptosis during myoblast differentiation [J]. Autophagy, 2019, 15:1606-1619.
- Chen H, Chen Y, Wang D, et al. A comparative study of the mitophagy and apoptosis of liver in rats with two different Pi deficiency syndromes [J]. Chin J Integr Tradit West Med (中国中西医结合杂志), 2019, 39:1359-1365.
- Dong Y, Li Y, Sun Y, et al. Bufeijianpi granules improve skeletal muscle and mitochondrial dysfunction in rats with chronic obstructive pulmonary disease [J]. BMC Complement Altern Med, 2015, 15:51.
- National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020:168.
- Xue DH, Liu YQ, Cai Q, et al. Comparison of bran-processed and crude *Atractylodes lancea* effects on spleen deficiency syndrome in rats [J]. Pharmacogn Mag, 2018, 14:214-219.
- Jun X, Fu P, Lei Y, et al. Pharmacological effects of medicinal components of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC [J]. Chin Med, 2018, 13:59.
- Yu M, Wang X, Ling F, et al. *Atractylodes lancea* volatile oils attenuated helicobacter pylori NCTC11637 growth and biofilm [J]. Microb Pathog, 2019, 135:103641.
- Zhao XC, Bai Y, Pang J, et al. Effect of polysaccharide of bran-fried *Atractylodes lancea* Rhizoma on rats of spleen deficiency model. [J]. Shanghai J Tradit Chin Med (上海中医药杂志), 2021, 55:85-90.
- Pang X, Liu YQ, Liu XD, et al. Study on the pharmacodynamic comparison of active part in crude *Atractylodes lancea* and *Atractylodes lancea* fried with bran [J]. J China Pharm (中国药房), 2016, 27:1308-1311.
- Li YH, Zhang DM, Wang SY, et al. Development of animal model of spleen deficiency syndrome [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharmacol (中医药导报), 2019, 25:100-102.
- Jin S M, Lazarou M, Wang C, et al. Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL [J]. J Cell Biol, 2010, 191:933-942.

- 14 Iguchi M, Kujuro Y, Okatsu K, et al. Parkin-catalyzed ubiquitin-ester transfer is triggered by PINK1-dependent phosphorylation[J]. *Biol Chem*, 2013, 288:22019-22032.
- 15 Geisler S, Holmström KM, Skujat D, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12:119-131.
- 16 Rüb C, Wilkening A, Voos W. Mitochondrial quality control by the Pink1/Parkin system[J]. *Cell Tissue Res*, 2017, 367:111-123.
- 17 Huang R, Xu Y, Wan W, et al. Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation [J]. *Mol Cell*, 2015, 57:456-466.
- 18 Li FY, Qi B, Bian S, et al. Ginseng root extract enhanced the autophagy level of macrophage RAW 264.7 and increased its proliferation and phagocytosis[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2021, 33:380-385.
- 19 Loos F, Xie W, Sica V, et al. Artificial tethering of LC3 or p62 to organelles is not sufficient to trigger autophagy [J]. *Essays Biochem*, 2017, 61:609-624.
- 20 Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins [J]. *Autophagy*, 2011, 7:279-296.
- 21 Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress[J]. *Curr Biol*, 2014, 24:R453-R462.
- 22 Ning R, Li Y, Du Z, et al. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ attenuated PM (2.5)-induced vascular fibrosis via regulating mitophagy[J]. *Redox Biol*, 2021, 46:102113.
- 23 Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: oxidative eustress [J]. *Redox Biol*, 2017, 11:613-619.

(上接第 1304 页)

- 15 Luo YJ, Dai ZQ, Xu B, et al. Research progress of natural small molecule inhibitors based on aerobic glycolysis [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2023, 35:171-181.
- 16 Nagaraju GP, Bramhachari PV. Role of transcription factors in gastrointestinal malignancies [M]. Singapore: Springer-Verlag Singapore Pte Ltd, 2017.
- 17 Yang MS, Zhou N, Wang ZG, et al. Research progress on the role of transcription factor HIF-1 α and its signal pathway in the pathogenesis [J]. *Biotechnol Bull* (生物技术通报), 2016, 32:8-13.
- 18 Yu L, Chen X, Wang L, et al. The sweet trap in tumors: aerobic glycolysis and potential targets for therapy [J]. *Oncotarget*, 2016, 7:38908-38926.
- 19 Soni S, Padwad YS. HIF-1 in cancer therapy: two decade long story of a transcription factor [J]. *Acta Oncol*, 2017, 56:503-515.
- 20 Hayashi Y, Yokota A, Harada H, et al. Hypoxia/pseudohypoxia-mediated activation of hypoxia-inducible factor-1 α in cancer [J]. *Cancer Sci*, 2019, 110:1510-1517.
- 21 Liu W, Yi DD, Guo JL, et al. Nuciferine, extracted from *Nelumbo nucifera* Gaertn, inhibits tumor-promoting effect of nicotine involving Wnt/ β -catenin signaling in non-small cell lung cancer [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 165:83-93.