

茯苓新酸 A 通过调节 AMPK/mTOR 介导的自噬来减轻葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠结肠炎

乔通^{1,3}, 尹林¹, 张可妮¹, 牛民主³, 黄菊², 耿志军², 李静^{1,2}, 胡建国^{1,2}

蚌埠医科大学第一附属医院¹检验科,²炎症相关性疾病基础与转化研究安徽省重点实验室, 安徽蚌埠 233004,³基础医学院免疫学教研室, 安徽蚌埠 233030

摘要:目的 探讨茯苓新酸 A(PAA)调控肠上皮细胞自噬对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的小鼠结肠炎的作用和机制。方法 18 只 C57BL/6 小鼠随机分为对照组(WT 组)、DSS 模型组(DSS 组)及 PAA 干预组(10 mg/kg), 6 只/组, 评估小鼠体质量、结肠长度、疾病活动指数(DAI)及组织病理学评分等变化; 构建 DSS 诱导的 Caco-2 细胞损伤模型, 检测肠屏障蛋白(ZO-1、Claudin-1)、凋亡相关蛋白(Bcl-2/Bax/C-caspase3)及自噬标志物(LC3-II/I、P62)表达。通过分子对接和 Western blotting 分析 PAA 的作用机制。结果 PAA 显著改善 DSS 小鼠的体质量下降($P<0.05$)、结肠缩短($P<0.05$)及 DAI 评分升高($P<0.05$), 并降低结肠组织中促炎因子 IL-1 β 和 TNF- α 水平($P<0.05$)。此外, HE 染色显示 PAA 缓解结肠隐窝损伤, 降低炎症细胞浸润和炎症评分($P<0.05$), AB-PAS 染色显示 PAA 干预小鼠肠黏膜杯状细胞数量显著高于 DSS 组。PAA 抑制了 DSS 诱导的紧密连接蛋白(ZO-1 和 Claudin-1)表达降低($P<0.05$)和肠上皮细胞凋亡(降低 Bax、C-caspase3, 上调 Bcl-2, $P<0.05$)。进一步分析发现, PAA 可显著激活肠上皮细胞自噬水平(LC3-II/I 比值升高, P62 水平降低, $P<0.05$)。机制研究表明, PAA 可通过靶向调控 AMPK/mTOR 信号, 激活自噬并抑制肠上皮细胞凋亡。结论 PAA 通过 AMPK/mTOR 介导的自噬激活与肠上皮细胞凋亡途径, 保护肠屏障功能和改善 DSS 诱导的小鼠结肠炎。

关键词: 炎症性肠炎; 茯苓新酸 A; 自噬; 凋亡; 肠屏障

Poricoic acid A alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by regulating AMPK/mTOR-mediated autophagy and inhibiting intestinal epithelial cell apoptosis

QIAO Tong^{1,3}, YIN Lin¹, ZHANG Keni¹, NIU Minzhu³, HUANG Ju², GENG Zhijun², LI Jing^{1,2}, HU Jianguo^{1,2}

¹Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Bengbu Medical University; ²Anhui Key Laboratory of Basic and Translational Research on Inflammatory Related Diseases, Bengbu 233004, China; ³Department of Immunology, School of Laboratory Medicine, Bengbu Medical University, Bengbu 233030, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of poricoic acid A (PAA) for alleviating dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. **Methods** Eighteen C57BL/6 mice were randomly divided into control group, DSS-induced colitis model group, and PAA intervention (10 mg/kg) group. The changes in body weight, colon length, disease activity index (DAI), and histopathological scores of the mice were evaluated. In a DSS-induced Caco-2 cell model, the changes in expressions of ZO-1, claudin-1, Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3, LC3-II/I, and P62 were detected. Molecular docking and Western blotting were used to analyze the mechanisms underlying the ameliorating effect of PAA on DSS-induced colitis. **Results** In the mouse models of DSS-induced colitis, PAA significantly ameliorated DSS-induced weight loss, colon shortening, and elevation of DAI scores while reducing colonic IL-1 β and TNF- α levels. HE staining showed that PAA obviously alleviated colonic crypt damage, reduced inflammatory cell infiltration, and lowered histopathological scores of the colon. AB-PAS staining revealed significantly increased goblet cell counts in PAA-treated mice compared to those in DSS group. In DSS-induced Caco-2 cells, PAA treatment effectively inhibited DSS-induced downregulation of the tight junction proteins, reduced Bax and cleaved caspase-3 expressions, increased Bcl-2 expression and the LC3-II/I ratio, and decreased P62 expression. Mechanistic study suggested that PAA targeted the AMPK/mTOR pathway to activate autophagy and suppress cell apoptosis. **Conclusion** PAA protects intestinal barrier function and alleviates DSS-induced colitis in mice by activating AMPK/mTOR-mediated autophagy and inhibiting intestinal epithelial cell apoptosis.

Keywords: inflammatory bowel disease; poricoic acid A; autophagy; apoptosis; intestinal barrier

炎症性肠病(IBD)是一种以慢性肠道炎症和屏障破坏为特征性疾病,其发病与肠上皮细胞自噬功能受损和凋亡过度密切相关^[1-3]。大量研究表明,肠上皮细胞的

命运很大程度上取决于自噬与凋亡之间的精细平衡,自噬与凋亡的失衡是导致肠屏障功能障碍的关键环节^[4-6]。临床数据显示,超过 80% 的 IBD 患者表现腹痛、血便及体质量下降等症状。反复的炎症发作不仅造成肠道功能持续恶化,还带来沉重的身心与经济负担^[7,8]。此外,约 30% 的患者对现有生物制剂应答不佳^[9],因此亟待探索针对上皮细胞稳态的新型治疗策略。腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)作为细胞能量稳态的核心调控因子,可通过抑制 mTOR 促进保护性自噬,并抑制 Caspase-3 介

收稿日期:2025-05-19

基金项目:安徽省临床医学研究转化专项(202427b10020093);安徽省卫生健康委科研项目(AHWJ2024Aa40007);安徽省高校优秀科技创新团队项目(2023AH010067)

作者简介:乔通,在读硕士研究生, E-mail: qt1231126@163.com

通信作者:胡建国,教授,博士生导师, E-mail: jghu9200@bbmu.edu.cn

导的过度凋亡,已成为IBD潜在治疗靶点^[10-12]。茯苓作为“健脾渗湿药”,早在《神农本草经》中已有记载其在防治肠道疾病方面的显著疗效。现代研究表明,含茯苓的复方(如参苓白术散)可通过调节Th17/Treg平衡缓解实验性结肠炎^[13]。其活性成分茯苓新酸A(PAA)作为一种三萜类成分,在多种模型中显示出抗炎^[14]和自噬调控^[15]等活性。值得注意的是,PAA在肾纤维化和糖尿病模型中均能激活AMPK通路^[16,17],提示其具有跨疾病通路的调控潜力。然而,PAA能否直接调控肠上皮细胞自噬-凋亡平衡(如影响LC3-II)尚不明确,且现有研究多集中于复方^[18],而PAA单独作用机制仍有待阐明。基于以上背景,本研究提出PAA可能通过AMPK/mTOR通路协调自噬与凋亡,从而改善IBD肠屏障功能。本研究的创新性在于:首次在IBD模型中验证PAA对自噬和凋亡的双向调控作用;综合运用体内外模型阐明其机制,为靶向AMPK/mTOR通路治疗IBD提供新依据。

1 材料和方法

1.1 材料

18只SPF级C57BL/6雄性小鼠(6~8周龄,体质量20~25g,江苏集萃药康生物科技股份有限公司);Caco-2细胞(中国医学科学院肿瘤细胞库);茯苓新酸(分析标准品,纯度≥98%,上海陶术科技有限公司);DSS(Dextran sulfate sodium,DSS,MW 36~50 000,MP Biomedicals);AB-PAS染色试剂盒(Solarbio);酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(武汉博士德生物工程公司);抗ZO-1抗体、抗Claudin-1抗体(Invitrogen);抗Bcl-2抗体、抗Bax抗体、抗LC3B抗体、抗P62抗体、抗p-mTOR抗体(Proteintech);抗C-caspase3抗体(abbkine);抗AMPK抗体、抗p-AMPK抗体、TUNEL细胞凋亡检测试剂(Servicebio);抗mTOR抗体、山羊抗兔IgGH&L(AlexaFlour®555)抗体、山羊抗兔IgGH&L(FITC)、山羊抗小鼠IgGH&L(FITC)(Abcam);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔/小鼠IgG(中杉金桥);快速制胶试剂盒(雅酶);BCA蛋白试剂盒(碧云天);SBI-0206965(MCE)。

1.2 方法

1.2.1 DSS诱导动物模型建立及分组 将18只C57BL/6雄性小鼠随机分为对照组(WT)、DSS模型组(DSS)及PAA干预组(PAA),6只/组。对照组:自由饮水+每日灌胃含0.1% DMSO的生理盐水(100 μL);DSS组:自由饮用2.5% DSS从第1天至第7天,第8天更换回正常饮用水,直至第11天,灌胃干预同对照组。PAA组:DSS处理同模型组+每日灌胃10 mg/kg PAA(溶解于含0.1% DMSO的生理盐水,100 μL)。第11天处死小鼠,取小鼠结肠组织,所有结肠组织都进行长度测量。测量后将

结肠沿中轴线抛开,一半保存于-80℃用作分子生物学检测,另外一半放置在福尔马林中浸泡用于组织病理学检测。本实验经蚌埠医科大学伦理委员会批准(伦理批号:伦动科批字[2024]第369号)。

1.2.2 Caco-2细胞培养及分组处理 采用MEM完全培养基(组成为:20%热灭活胎牛血清,1%抗生素混合液)培养Caco-2单层细胞,培养环境严格控制在37℃恒温、5% CO₂平衡气体及饱和湿度条件下。每48 h更换新鲜培养基。当细胞融合度达70%~80%时,弃旧培养基,PBS清洗后加入0.25%胰蛋白酶-EDTA消化5 min,加入含血清培养基终止消化,离心(1000 r/min,5 min)收集细胞并重悬为单细胞悬液,以1:3比例传代培养。将细胞随机分为3组($n=3$ 重复/组),Control组:正常培养基培养24 h;C-DSS组:加入含2% DSS的培养基处理24 h^[19];C-PAA组:2% DSS与20 μmol/L PAA^[15]共处理24 h;C-PAA+SBI组:C-PAA组的基础上加入5 μmol/L的SBI-0206965^[20]。

1.2.3 小鼠体质量、结肠长度及疾病活动度的评估 每日记录小鼠体质量变化、粪便形状及便血程度,根据既往报道计算结肠炎的疾病活动度指数(DAI)评分标准评估结肠炎症状^[21]。取检当天测量并记录小鼠直肠近肛门处到回盲部的结肠长度。

1.2.4 AB-PAS染色以及HE染色评估小鼠结肠组织病理变化 将小鼠结肠组织塑型为瑞士卷式结构,经梯度脱水处理后进行石蜡浸渍包埋,最终制备成组织学分析用蜡块^[22]。随后使用石蜡切片机将蜡块制成厚度为3 μm的石蜡切片。AB-PAS染色:将石蜡切片依次浸入二甲苯脱蜡,梯度乙醇(100%、95%、80%)水化至纯水。然后将切片浸入1%过碘酸溶液8 min,避光条件下用Schiff试剂染色20 min,复染苏木精1 min后,经梯度乙醇脱水,最后用中性树脂进行封片。HE染色:将石蜡切片依次浸入二甲苯脱蜡,梯度乙醇(100%、95%、80%)水化至纯水。切片浸入苏木精染液8 min,用1%分化液液化2 s,流水冲洗后以氨水返蓝,以及浸入伊红染液2 min,再经梯度乙醇脱水(80%、95%、100%)组织透明化处理采用梯度二甲苯渗透方案,封固使用环氧树脂包埋剂。基于全自动数字切片扫描系统获取高分辨率影像数据,运用图像分析软件定量评估黏膜损伤指数,执行双盲法组织学评分。评分标准^[23]如下:根据组织病理学改变的程度,该评分标准将病变严重程度分为0至4分,具体描述如下:0分:组织未见炎症反应,也无隐窝结构损伤。1分:表现为基底层中约三分之一隐窝出现损伤,黏膜层可见少量炎症细胞浸润。2分:基底层约三分之二的隐窝受损,黏膜下层可见中等量炎症细胞浸润。3分:隐窝缺失严重,大量炎症细胞浸润并穿透肠道壁全层。4分:

隐窝结构完全消失,肠绒毛结构出现严重紊乱。

1.2.5 ELISA 检测小鼠结肠组织炎症因子的表达情况 将保存于 -80°C 冰箱中的结肠组织取出后,需预先在配制的裂解液中加入磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂,随后按照每100 mg组织对应1 mL RIPA裂解液的比例进行裂解处理。结肠组织经机械均质化处理后,于12 000 r/min条件下离心10 min获取上清液。依照ELISA试剂盒标准化流程,采用酶标仪测定450 nm波长处吸光度值,通过标准化校准曲线计算促炎细胞因子白细胞介素- 1β (IL- 1β)与肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的蛋白浓度。

1.2.6 免疫荧光检测PAA对肠屏障的保护以及自噬蛋白的表达 石蜡切片经梯度脱蜡复水处理后,采用热诱导抗原修复技术进行表位暴露。经去离子水漂洗后,以5%牛血清白蛋白(BSA)封闭非特异性结合位点60 min,分别孵育特异性一抗[紧密连接蛋白ZO-1(1:200)、Claudin-1(1:400)、自噬标志物LC3B(1:500)]于 4°C 湿盒内过夜。次日复温后,应用磷酸盐缓冲液(PBS)行三次循环洗涤(5 min/次),继而避光条件下孵育荧光标记二抗[FITC标记山羊抗兔IgG(1:1000)、Alexa Fluor® 555标记山羊抗小鼠IgG(1:1000)]120 min。核染色采用DAPI(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)孵育8 min, PBS清洗后以抗淬灭封片剂固载样本,最终通过Leica倒置荧光显微镜进行多通道图像采集。Caco-2细胞样本依次完成4%多聚甲醛固定(30 min)、0.2% Triton X-100膜通透(15 min)及5% BSA封闭(30 min)预处理流程,后续染色步骤同结肠组织。

1.2.7 TUNEL 染色观察PAA对肠上皮细胞凋亡的改善作用 石蜡切片和固定后的Caco-2细胞按照依据TUNEL细胞凋亡检测试剂盒标准化流程执行染色实验,染色终止后使用抗荧光淬灭封片剂固载样本,采用Leica倒置荧光显微镜多视野随机捕获图像。每组通过双盲法选取6张代表性图像,应用ImageJ图像分析系统进行半定量评估,细胞凋亡指数(细胞凋亡率(%))=(凋亡细胞数/总细胞数) $\times 100\%$ 。

1.2.8 Western blotting 检测紧密连接蛋白、凋亡相关蛋白、自噬蛋白以及通路蛋白的表达水平 使用RIPA裂解液(含磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂)对小鼠结肠黏膜组织与Caco-2细胞进行裂解。裂解后的细胞悬液于 4°C 条件下以12 000 r/min离心10 min,最终收集含有总蛋白的上清液。采用BCA法对总蛋白浓度进行定量分析,随后与蛋白上样缓冲液按比例混合,调整至 $1\times$ 终浓度体系,经 100°C 沸水浴热变性处理10 min制备成变性蛋白样品。使用快速制胶盒配制凝胶,于200 V电泳30 min,蛋白经转膜转移至PVDF膜上,再使用5%的

脱脂牛奶封闭1 h,与一抗(ZO-1, 1:1000;Claudin-1, 1:1000;Bcl-2, 1:1000;Bax, 1:2000;C-caspase3, 1:1000; p62, 1:1000;LC3II/I, 1:1000; p-AMPK, 1:500;AMPK, 1:500; p-mTOR, 1:500; mTOR, 1:1000; β -actin, 1:3000)进行孵育。 4°C 过夜后使用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔/小鼠IgG(1:3000)孵育,最后经底物显色并采集图片。

1.2.9 分子对接 通过PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)检索目标生物活性成分的二维化学结构(SDF格式)作为对接配体,同时从PDB数据库(<https://www.rcsb.org/>)获取靶标蛋白的高分辨率晶体结构作为受体。基于CB-Dock2分子对接平台的自动化流程,对配体-受体复合物进行结合构象预测及结合自由能(ΔG)计算^[24]。

1.2.10 统计学分析 利用软件SPSS26.0对以上实验数据进行分析统计,计量资料以均数 \pm 标准差表示,组间差异比较采用单因素方差分析或 t 检验,以 $P<0.05$ 时认为差异具有统计学意义。本研究动物实验样本量通过预实验确定。基于预实验中DSS组与对照组结肠长度差异(2.0 ± 0.4 cm, Cohen's $d=5.0$),通过G*Power软件($\alpha=0.05$, Power=80%)计算得出最小样本量为5只/组。最终设定6只/组以提升统计稳定性并参考同类研究。实验完成后,我们进一步对如结肠长度进行事后检验效能分析,结肠长度方面(DSS组 vs PAA组)实际差异:1.0 cm (DSS组 6.6 ± 0.294 vs PAA组 7.6 ± 0.298),效应量Cohen's $d=3.38$ (合并SD=0.296),检验效能: $>99.9\%$ ($\alpha=0.05$, 双样本 t 检验)上述样本量设计与同类研究样本量的选取保持一致。

2 结果

2.1 PAA 干预缓解DSS诱导的小鼠结肠炎症状

DSS干预显著诱发结肠炎特征性病理改变:与对照组相比,模型组小鼠自干预第4天起出现体质量下降($P<0.05$,图1A),同时DAI持续升高($P<0.05$,图1B)。PAA干预缓解了体质量下降趋势($P<0.05$),并有效抑制DAI评分的升高($P<0.05$)。解剖学结果显示,DSS模型组结肠长度较对照组明显缩短($P<0.05$),而PAA组结肠长度较模型组恢复($P<0.05$,图1C、D)。

2.2 PAA 干预缓解了DSS诱导的肠道炎症

ELISA检测结果显示:与对照组相比,DSS组结肠组织中IL- 1β 和TNF- α 浓度升高($P<0.05$);而PAA组这两种炎症因子水平较DSS组降低($P<0.05$,图2A、B)。AB-PAS染色分析表明:DSS组结肠杯状细胞数量较对照组减少,酸性黏液蛋白分泌明显下降,中性黏液蛋白分泌则异常增多;经PAA治疗后,杯状细胞数量及酸性黏液蛋白分泌均恢复,同时中性黏液蛋白分泌量明显减少(图2C)。HE染色显示,DSS组小鼠结肠组织呈现肠

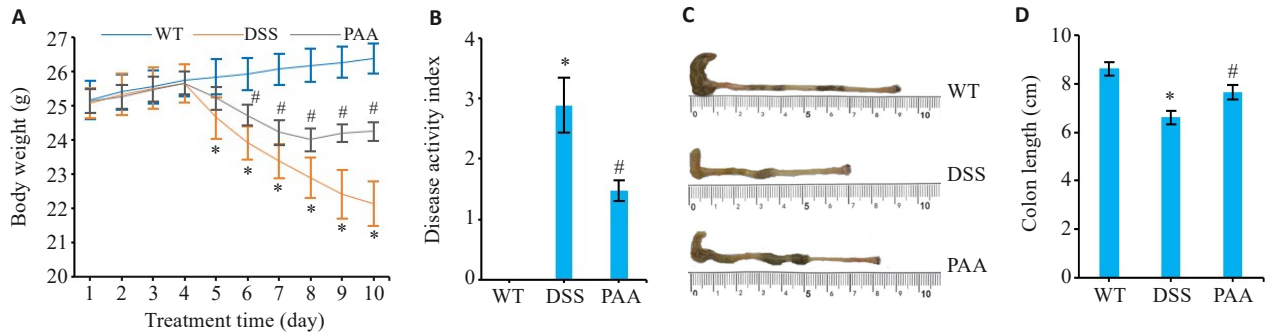


图1 PAA干预对DSS小鼠结肠炎症症状的影响

Fig.1 Therapeutic effects of PAA on DSS-induced colitis in mice. **A:** Changes in body weight of the mice. **B:** Disease activity index (DAI) scoring. **C:** Macroscopic evaluation of colon morphology. **D:** Quantitative analysis of colon length. WT: Wild type group; DSS: DSS-induced model group; PAA: Treatment group DSS. *n*=6, **P*<0.05 vs WT group. [#]*P*<0.05 vs DSS group.

绒毛结构紊乱、隐窝严重损伤及大量炎症细胞浸润 (图2D),其组织病理学评分高于对照组(*P*<0.05,图2E);

而PAA干预后结肠黏膜结构损伤改善,炎症细胞浸润减少,病理学评分明显下降(*P*<0.05)。

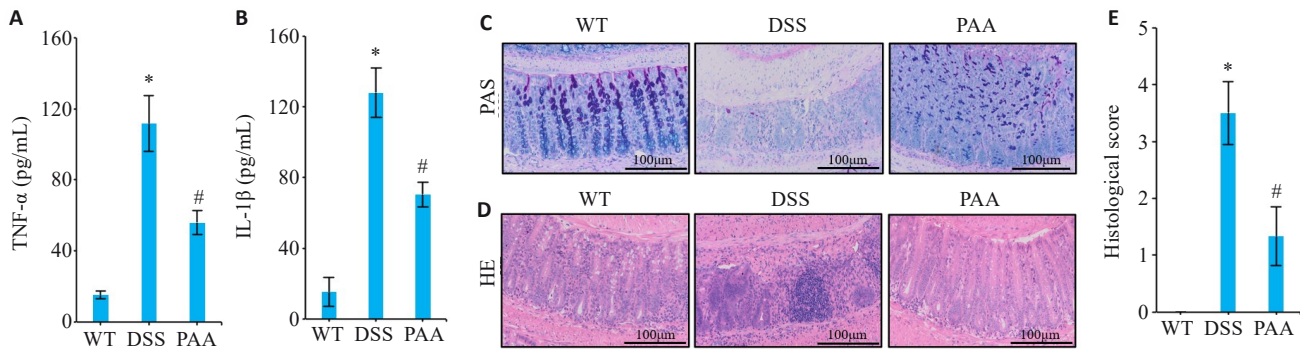


图2 PAA干预对DSS小鼠肠道炎症因子表达和组织病理损伤的影响

Fig.2 Effects of PAA intervention on intestinal histopathological damage and expression of inflammatory factors in DSS mice. **A, B:** ELISA results of TNF- α (**A**) and IL-1 β (**B**) in mice intestinal mucosa. **C:** AB-PAS staining of colon tissues in different groups. **D:** HE staining of colon tissues in different groups. **E:** Histopathological scores of colon tissues. *n*=6, **P*<0.05 vs WT group. [#]*P*<0.05 vs DSS group.

2.3 PAA干预缓解了DSS诱导的肠屏障的损伤

免疫荧光染色结果表明,DSS组中ZO-1及Claudin-1的细胞膜表达连续性中断,并出现异常胞内聚集(图3A),而这两种蛋白在PAA组的结肠组织中细

胞膜定位特征得到了恢复。Western blotting定量检测证实,DSS组ZO-1、Claudin-1蛋白表达量较对照组下降(*P*<0.05),而PAA治疗组两种蛋白表达量较DSS组均上调(*P*<0.05,图3B、C)。

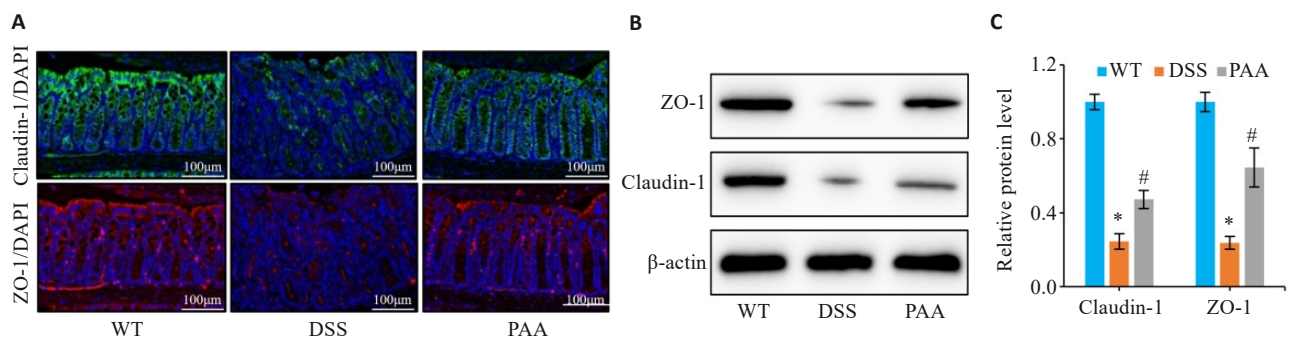


图3 PAA干预对DSS小鼠肠屏障的影响

Fig.3 Effect of PAA on intestinal barrier function in DSS-induced colitis mice. **A:** Immunofluorescence staining of ZO-1 and claudin-1 in the colon. **B, C:** Quantitative analysis of ZO-1 and claudin-1 expression levels in the intestinal mucosa by Western blotting. *n*=6, **P*<0.05 vs WT group; [#]*P*<0.05 vs DSS group.

2.4 PAA 抑制 DSS 刺激的小鼠肠道细胞凋亡

TUNEL 实验结果显示;DSS 组小鼠结肠组织中肠上皮细胞凋亡率较对照组增加 ($P<0.05$), 而 PAA 干预后降低 ($P<0.05$, 图 4A、B)。Western blotting 定量分析

进一步显示,DSS 组促凋亡蛋白 Bax 和 C-caspase3 的表达量高于对照组, 同时抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达量下降; PAA 干预逆转了这些变化, 表现为 Bax 和 C-caspase3 表达水平降低, 同时 Bcl-2 表达量回升 ($P<0.05$, 图 4C、D)。

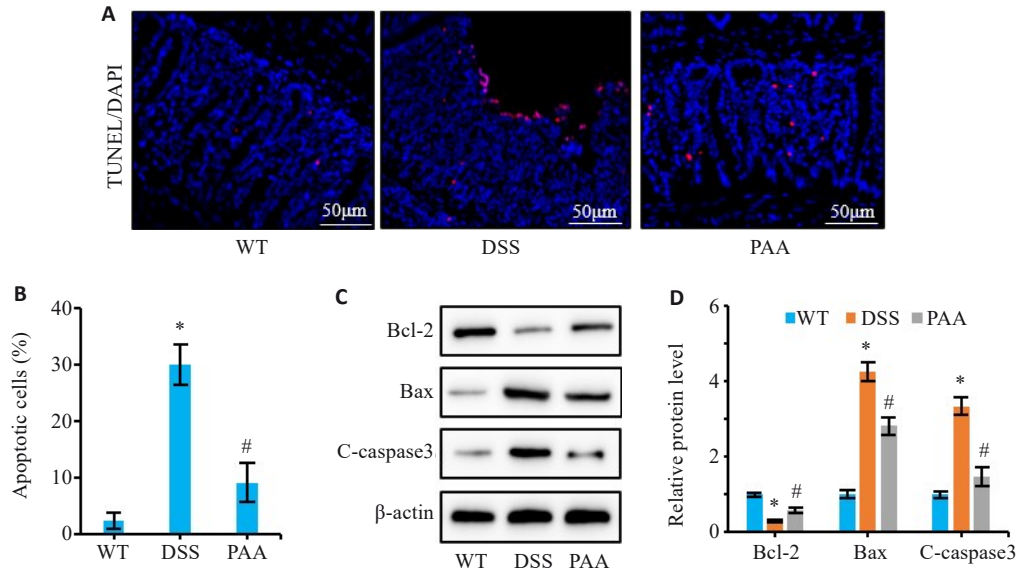


图4 PAA对DSS小鼠肠上皮细胞凋亡的影响

Fig. 4 Effect of PAA on intestinal epithelial cell apoptosis in DSS-induced colitis mice. A: TUNEL staining of colon tissues. B: Quantitative analysis of intestinal epithelial cell apoptosis rate. C, D: Western blotting of Bcl-2, Bax, and cleaved caspase-3 (C-caspase3) expression levels in colonic mucosa. $n=6$, * $P<0.05$ vs WT group; # $P<0.05$ vs DSS group.

2.5 PAA 增强了 DSS 小鼠肠上皮细胞的自噬

免疫荧光分析显示,与对照组相比,DSS 组小鼠肠道细胞中 LC3B 自噬蛋白的荧光强度降低;而 PAA 干预后 LC3B 荧光强度较 DSS 组增强,表明自噬信号被重新激活(图 5A)。Western blotting 结果进一步验证:DSS 组自噬标志物 LC3-II/LC3-I 比值下降 ($P<0.05$), 同时自噬底物 P62 蛋白表达水平升高 ($P<0.05$, 图 5B、C、D); 经 PAA 治疗后, LC3-II/LC3-I 比值较 DSS 组回升 ($P<0.05$), 而 P62 蛋白表达量同步降低 ($P<0.05$)。

2.6 PAA 促进了 DSS 诱导 Caco-2 细胞的自噬

免疫荧光分析显示,与 C-DSS 组相比,C-PAA 组肠道细胞中自噬蛋白 LC3B 的荧光信号增强(图 6A)。Western blotting 检测表明,与对照组相比,C-DSS 组 LC3-II/LC3-I 比值降低 ($P<0.05$), P62 蛋白水平升高 ($P<0.05$); 经 PAA 干预后, LC3-II/LC3-I 比值较 C-DSS 组回升 ($P<0.05$), 同时 P62 蛋白水平下降 ($P<0.05$, 图 6B、C)。

2.7 PAA 抑制 DSS 诱导 Caco-2 的细胞凋亡

TUNEL 染色显示,与 C-DSS 组相比,C-PAA 组 Caco-2 细胞的凋亡比例降低 ($P<0.05$, 图 7A、B)。Western blotting 检测显示,DSS 刺激升高 Caco-2 细胞促凋亡蛋白 (C-caspase3 和 Bax) 表达水平和降低了

Bcl-2 的表达 ($P<0.05$), 而 PAA 干预逆转了这些蛋白的水平(与 C-DSS 组相比, $P<0.05$, 图 7C、D)。

2.8 PAA 恢复 DSS 诱导的 Caco-2 细胞紧密连接损伤并上调 ZO-1 及 Claudin-1 的膜定位与表达

免疫荧光分析结果表明,DSS 处理可破坏 Caco-2 细胞紧密连接结构,表现为 ZO-1 和 Claudin-1 的膜定位连续性中断;而 PAA 干预后,两种蛋白的膜分布特征恢复(图 8A)。通过 Western blotting 定量分析显示,与对照组相比,C-DSS 组 ZO-1 和 Claudin-1 蛋白表达水平下降 ($P<0.05$); PAA 干预后, ZO-1 和 Claudin-1 的表达量较 C-DSS 组回升 ($P<0.05$, 图 8B、C)。

2.9 PAA 可能靶向 AMPK/mTOR 通路调控自噬-凋亡平衡改善结肠炎

分子对接分析显示,PAA 与 AMPK 活性口袋形成稳定结合(结合自由能 $\Delta G=-7.9$ kcal/mol; 图 9A)。Western blotting 结果表明,DSS 干预抑制 AMPK 磷酸化 ($P<0.05$), 并激活其下游 mTOR 信号 ($P<0.05$); 经 PAA 干预后, p-AMPK 表达量回升 ($P<0.05$), p-mTOR 表达量下降 ($P<0.05$, 图 9B、C)。

2.10 PAA 通过调控 AMPK/mTOR 信号通路改善肠上皮细胞损伤

在 Caco-2 细胞模型中同样验证了该通路的变化:

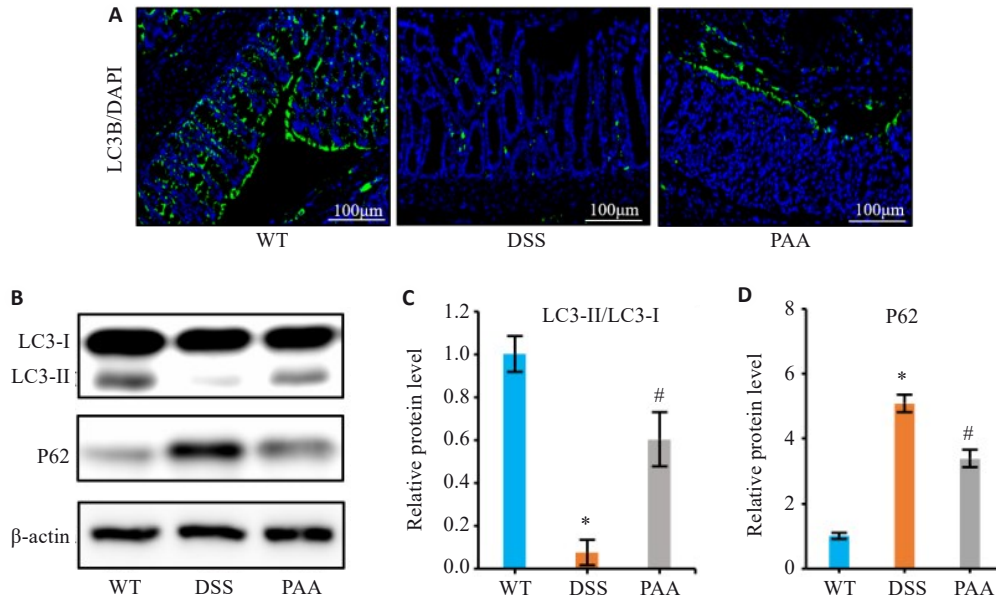


图5 PAA对DSS诱导的IBD小鼠模型中细胞自噬的影响

Fig. 5 Effects of PAA on cellular autophagy in DSS-induced colitis mouse models. **A:** Immunofluorescence images of LC3B in the colon. **B:** Western blotting of LC3-I, LC3-II, and P62 expressions in the intestinal mucosa. **C:** Quantitative analysis of the LC3-II/LC3-I protein ratio. **D:** Quantitative analysis of P62 protein expression. $n=6$, * $P<0.05$ vs WT group; # $P<0.05$ vs DSS group.

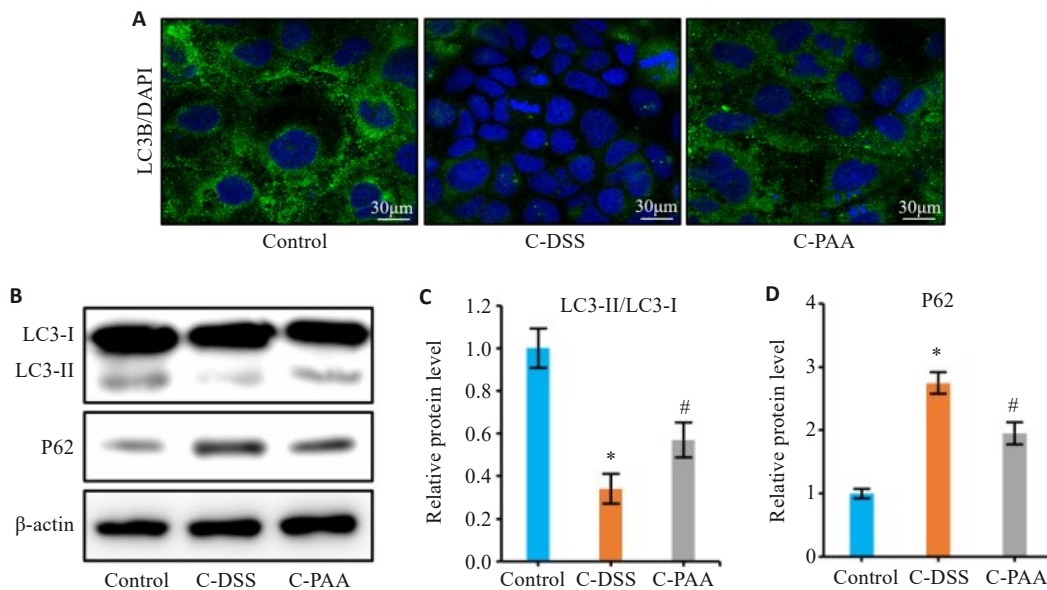


图6 PAA对DSS诱导的模型中Caco-2细胞自噬的影响

Fig. 6 Effect of PAA on autophagy in DSS-induced Caco-2 cells. **A:** Immunofluorescence staining of LC3B in Caco-2 cells. **B:** Western blotting of LC3-I, LC3-II, and P62 expression. **C:** Quantitative analysis of the LC3-II/LC3-I ratio. **D:** Quantitative analysis of P62 protein level. Control: Normal control group; C-DSS: DSS-induced model group; C-PAA: PAA treatment group. $n=3$, * $P<0.05$ vs Control group; # $P<0.05$ vs C-DSS group.

C-DSS组较对照组 AMPK 磷酸化水平降低($P<0.05$),同时激活下游p-mTOR信号($P<0.05$,图10A、B)。经PAA干预后,AMPK磷酸化水平较模型组升高($P<0.05$),而p-mTOR表达量降低($P<0.05$)。

2.11 PAA通过激活AMPK/mTOR通路来调节Caco-2细胞的自噬与凋亡

免疫荧光染色分析显示,经SBI-0206965处理后的

C-PAA组细胞,其LC3B蛋白荧光强度表达降低(图11A)。Western blotting分析进一步表明,该抑制剂处理导致自噬相关指标发生变化:LC3-II/LC3-I比值降低($P<0.05$),同时P62蛋白表达升高($P<0.05$,图11B、C)。此外,SBI-0206965的加入还逆转了PAA的抗凋亡作用,TUNEL染色发现C-PAA+SBI组细胞凋亡数量增多($P<0.05$,图11D、E),促凋亡蛋白(C-caspase3和Bax)

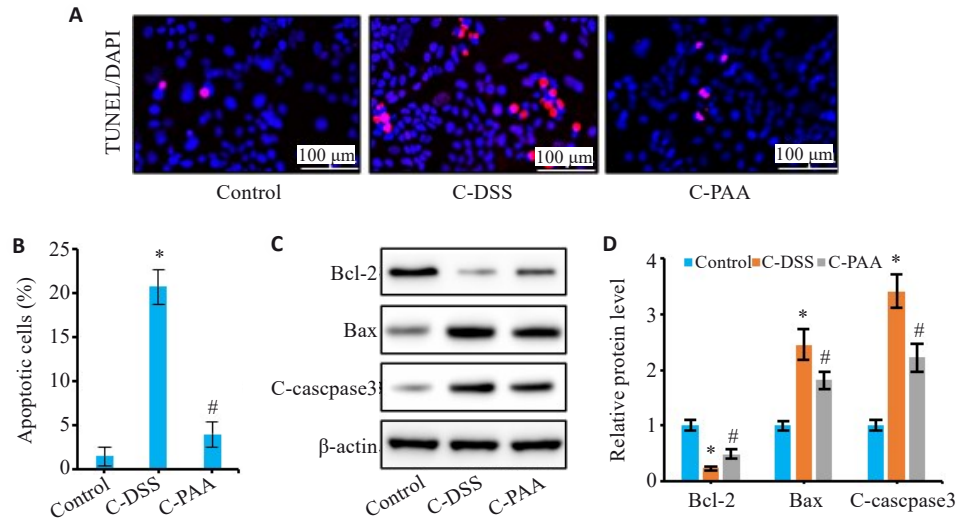


图7 PAA抑制DSS诱导的Caco-2细胞凋亡
 Fig.7 Effect of PAA on DSS-induced apoptosis of Caco-2 cells. A: TUNEL staining of Caco-2 cells. B: Quantitative analysis of apoptosis rate. C: Western blotting of Bcl-2, Bax, and C-caspase3 expressions. D: Relative protein expression levels of Bcl-2, Bax, and C-caspase3. *n*=3, **P*<0.05 vs Control group; #*P*<0.05 vs C-DSS group.

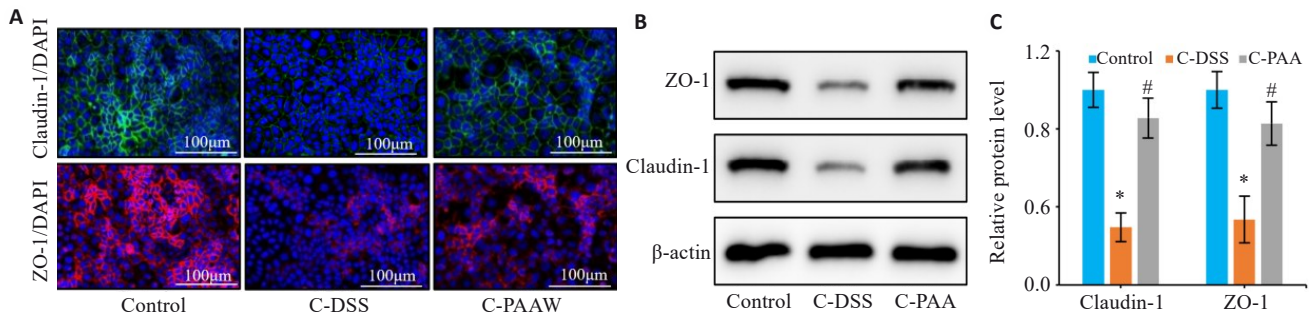


图8 PAA干预对DSS诱导的Caco-2细胞屏障损伤的影响
 Fig. 8 Therapeutic effects of PAA on DSS-induced barrier damage in Caco-2 cells. A: Immunofluorescence staining of ZO-1 and claudin-1 in Caco-2 cells (Scale bar=100 μm). B, C: Western blotting for detecting protein expression levels of ZO-1 (B) and claudin-1 (C) in Caco-2 cells. *n*=3, **P*<0.05 vs Control group. #*P*<0.05 vs C-DSS group.

表达上调,而抗凋亡蛋白Bcl-2表达则降低(*P*<0.05,图11F、G)。

3 讨论

本研究首次证实茯苓新酸A(PAA)对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的肠炎具有显著缓解作用。动物模型研究表明,PAA治疗可有效改善DSS小鼠的病理表型,具体表现为:体质量下降趋势逆转、结肠长度缩短缓解,以及DAI评分下降。组织病理学评估进一步揭示,PAA通过三重机制改善肠黏膜完整性:重建隐窝-绒毛结构;上调紧密连接蛋白表达;促进杯状细胞再生。这些发现共同提示,PAA可能通过多靶点协同作用干预肠炎病理进程。

促炎因子IL-1β和TNF-α的过度释放被证实是DSS诱导肠炎的核心特征^[25]。本研究显示,DSS刺激显著升高结肠组织中IL-1β和TNF-α水平,而PAA干预后

其表达显著降低,这一发现与Zhang^[26]团队报道的茯苓三萜类成分可通过抑制PI3K/AKT通路抑制炎症的机制形成功能互补。值得注意的是,TNF-α不仅驱动炎症反应,还可通过破坏紧密连接蛋白ZO-1的膜定位,加剧肠屏障通透性^[27]。本研究发现,PAA可能通过调控促炎因子表达介导其肠屏障修复效应。肠屏障功能障碍可直接导致肠黏膜通透性增加,导致肠道内有害物质(如细菌毒素)渗入黏膜下层,进一步引发炎症扩散和组织损伤^[28]。DSS处理可诱导Caco-2细胞紧密连接蛋白ZO-1和Claudin-1的膜定位紊乱及表达下调,而PAA干预通过维持两种关键蛋白的膜分布稳定性,有效保护肠上皮屏障结构完整性。上述结果证实PAA通过"炎症抑制-屏障加固"的双轨策略实现肠黏膜保护,这种多维度作用模式与肠屏障"损伤-修复"动态平衡理论高度吻合。

肠上皮细胞凋亡失衡是肠炎病理损伤的关键环

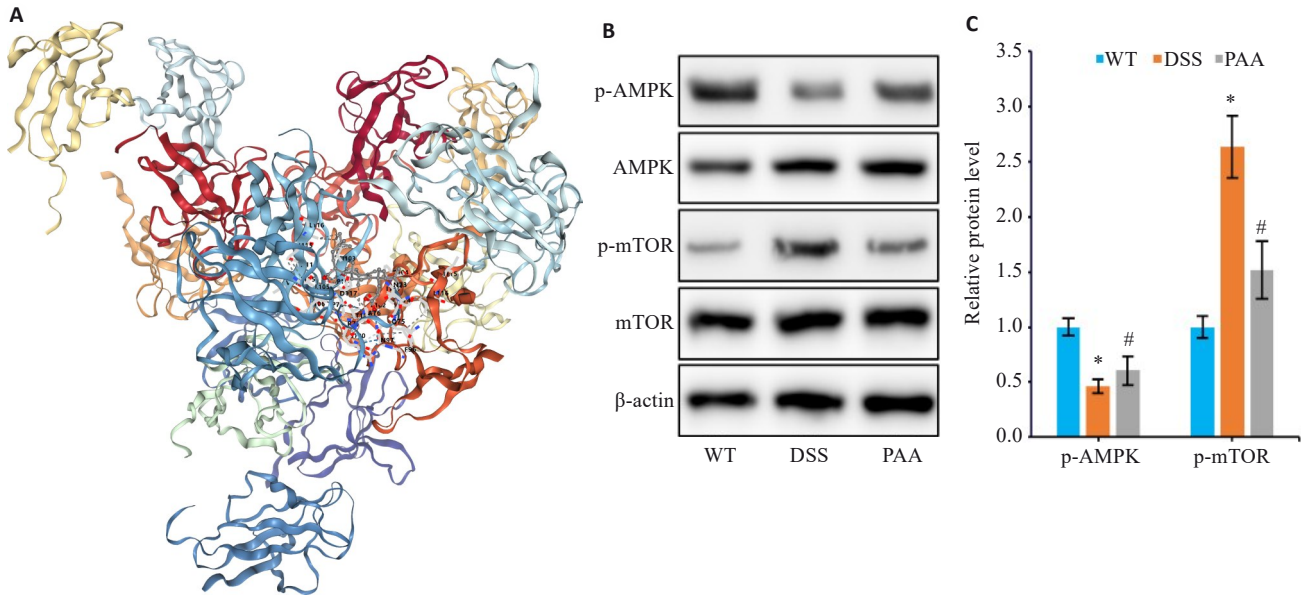


图9 PAA干预对体内AMPK通路的影响

Fig.9 Effect of PAA on the AMPK/mTOR pathway in the mouse models. A: Molecular docking analysis of PAA with AMPK. B, C: Western blotting for detecting protein expression levels of p-AMPK, AMPK, p-mTOR, and mTOR in mouse colon tissues. *n*=6, **P*<0.05 vs WT group; #*P*<0.05 vs DSS group.

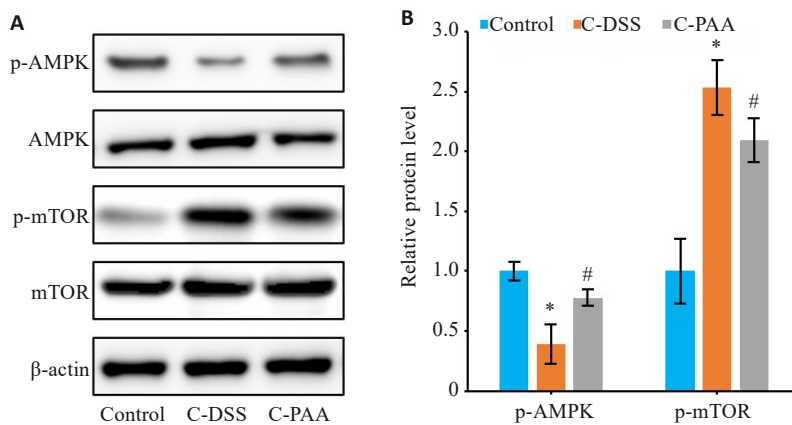


图10 PAA干预对体外AMPK/mTOR通路的影响

Fig.10 Effects of PAA treatment on AMPK/mTOR signaling in DSS-induced Caco-2 cells. A: Western blotting for p-AMPK, AMPK, p-mTOR, and mTOR expressions. B: Quantitative analysis of p-AMPK/AMPK and p-mTOR/mTOR protein expression ratios. *n*=3, **P*<0.05 vs Control group. #*P*<0.05 vs C-DSS group.

节^[29]。本研究显示,体内外DSS刺激显著上调促凋亡蛋白Bax和C-caspase3的表达,同时下调抗凋亡蛋白Bcl-2,导致肠上皮细胞凋亡率升高,经PAA处理的DSS诱导小鼠结肠上皮细胞及Caco-2细胞中,抗凋亡蛋白Bcl-2表达上调,促凋亡蛋白Bax和C-caspase3表达下降,凋亡率显著降低。上述结果证实PAA通过抑制肠上皮细胞凋亡保护肠屏障功能,为治疗IBD提供了新方向。Zhao等^[31]在肾纤维化模型中发现PAA抑制肾细胞凋亡^[30],与本研究在肠炎模型中发现PAA抑制肠道细胞凋亡一致。自噬作为细胞存活的重要调控机制,可通过清除受损细胞器及错误折叠蛋白抑制凋亡信号。LC3B和P62是自噬进行的关键标志物^[32];LC3-II/I比值的升

高反映了细胞自噬的进行;P62蛋白的减少指示自噬底物降解,二者联合分析可准确评估自噬活性动态^[33]。本研究中,DSS干预导致自噬标志物LC3-II/I比值下降及P62堆积,表明自噬流受阻;而PAA干预显著恢复自噬活性(LC3-II/I升高、P62降解),从而抑制凋亡,该结果与Hany团队提出的“自噬-凋亡交互调控”理论相契合^[34],与本研究结果一致。上述证据表明,PAA通过激活保护性自噬,有效减少了DSS诱导的肠炎模型中肠道细胞的凋亡。

为进一步解析自噬激活的分子基础,本研究聚焦于AMPK/mTOR这一经典调控通路^[35]。Liu等^[36]在糖尿病肾病模型中发现,AMPK活化通过抑制mTOR信号

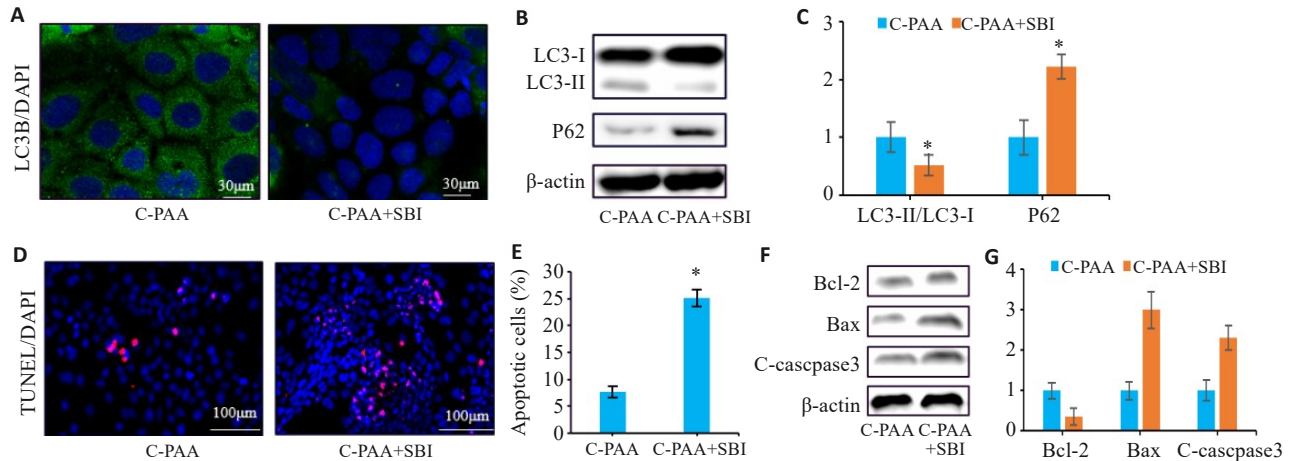


图 11 SBI-0206965 干预后对 PAA 的影响

Fig. 11 PAA regulates autophagy and apoptosis in Caco-2 cells by activating the AMPK/mTOR pathway. **A:** Immunofluorescence staining of LC3B in Caco-2 cells. **B:** Western blotting for LC3-I, LC3-II, and P62 expressions. **C:** Quantitative analysis of the LC3-II/LC3-I ratio. **D:** TUNEL staining of Caco-2 cells. **E:** Quantitative analysis of apoptosis rate. **F:** Western blotting for Bcl-2, Bax, and C-caspase3 expressions. **G:** Relative protein expression levels of Bcl-2, Bax, and C-caspase3. C-PAA: PAA treatment group; C-PAA+SBI: PAA treatment group+SBI-0206965. $n=3$, * $P<0.05$ vs C-PAA group.

促进自噬并抑制凋亡,提示该通路在多器官保护中的普适性。分子对接结果显示,PAA与AMPK激酶结构域的结合能达-7.9 kcal/mol,提示其可能作为变构激活剂发挥作用。Western blotting证实,PAA处理显著激活AMPK磷酸化并抑制mTOR信号。这一发现与Liu团队在糖尿病肾病模型中的研究形成机制呼应^[36],共同揭示了AMPK/mTOR通路在跨器官保护中的枢纽地位。从功能层面,AMPK激活可解除mTOR对自噬起始复合体(ULK1)的抑制作用,促进自噬体形成并加速底物降解。该结果不仅验证了AMPK/mTOR通路的核心调控作用,也为阐释PAA的多器官保护效应提供了统一理论框架^[15-17]。为验证PAA是否通过AMPK/mTOR通路介导其保护作用,我们采用AMPK特异性抑制剂SBI-0206965进行干预。结果显示,抑制AMPK信号显著逆转了PAA对自噬的激活(LC3-II/I比值降低、P62积累)及其抗凋亡作用(Bcl-2下降,Bax与C-caspase3上升)(图11)。这表明PAA的保护作用依赖于AMPK通路激活,与既往在肾纤维化和糖尿病模型中的研究一致^[16,17],进一步支持AMPK/mTOR通路在PAA调控肠上皮细胞自噬-凋亡平衡中的核心机制。

本研究首次将传统中药“健脾渗湿”理论与AMPK/mTOR介导的自噬调控机制相关联,为茯苓的药效物质基础研究提供了新视角。相较于现有生物制剂(如抗TNF- α 单抗),PAA作为天然三萜类化合物展现出独特优势:低毒性特征;多靶点协同作用(同时调控炎症、凋亡和自噬通路);通过宿主细胞稳态重建实现持久疗效。这些特性使其在开发新型IBD治疗药物方面具有重要潜力。

尽管取得创新性发现,本研究仍存在三方面局限:

其一,动物实验采用固定剂量(10 mg/kg),缺乏剂量梯度与时效关系研究;其二,机制研究集中于AMPK/mTOR轴,尚未阐明其与NF- κ B、NLRP3等已知炎症通路的交互作用;其三,未考察PAA对肠道菌群-宿主互作的影响,而菌群代谢物(如短链脂肪酸)可能参与自噬调控^[37]。后续研究可结合类器官共培养模型与空间多组学技术,系统解析PAA的“免疫-代谢-微生物”多维调控网络。

综上所述,本研究构建了PAA缓解DSS诱导结肠炎的完整机制链条:通过激活AMPK/mTOR通路增强自噬活性→清除受损细胞器并抑制Caspase级联反应→降低肠上皮细胞凋亡率→修复紧密连接蛋白网络→重建肠屏障功能。这一“自噬调控-凋亡抑制-屏障修复”的三联机制,不仅深化了对茯苓活性成分药理作用的认识,也为开发基于宿主细胞稳态调控的IBD治疗策略提供了理论依据。后续需开展药代动力学研究及临床前安全性评估,加速PAA的转化应用进程。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] Saha K, Subramenium Ganapathy A, Wang A, et al. Autophagy reduces the degradation and promotes membrane localization of occludin to enhance the intestinal epithelial tight junction barrier against paracellular macromolecule flux [J]. *J Crohns Colitis*, 2023, 17(3): 433-49.
- [2] Xu J, Li S, Jin W, et al. Epithelial Gab1 calibrates RIPK3-dependent necroptosis to prevent intestinal inflammation [J]. *JCI Insight*, 2023, 8(6): e162701.
- [3] Tran S, Juliani J, Fairlie WD, et al. The emerging roles of autophagy in intestinal epithelial cells and its links to inflammatory bowel disease [J]. *Biochem Soc Trans*, 2023, 51(2): 811-26.

- [4] Zhang Y, Li XZ, Li YT, et al. DNA damage-regulated autophagy modulator 1 (DRAM1) mediates autophagy and apoptosis of intestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease[J]. *Dig Dis Sci*, 2021, 66(10): 3375-90.
- [5] Chen SL, Li CM, Li W, et al. How autophagy, a potential therapeutic target, regulates intestinal inflammation[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1087677.
- [6] Khan S, Mentrup HL, Novak EA, et al. Cyclic GMP-AMP synthase contributes to epithelial homeostasis in intestinal inflammation *via* Beclin-1-mediated autophagy[J]. *FASEB J*, 2022, 36(5): e22282.
- [7] Gorrepati VS, Soriano C, Johri A, et al. Abdominal pain and anxious or depressed state are independently associated with weight loss in inflammatory bowel disease[J]. *Crohns Colitis* 360, 2020, 2(2): otaa047.
- [8] Oligschlaeger Y, Yadati T, Houben T, et al. Inflammatory bowel disease: a stressed "gut/feeling"[J]. *Cells*, 2019, 8(7): E659.
- [9] Goll R, Moe ØK, Johnsen KM, et al. Pharmacodynamic mechanisms behind a refractory state in inflammatory bowel disease[J]. *BMC Gastroenterol*, 2022, 22(1): 464.
- [10] Yibcharoenporn C, Muanprasat C, Moonwiriyaakit A, et al. AMPK in intestinal health and disease: a multifaceted therapeutic target for metabolic and inflammatory disorders[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2025, 19: 3029-58.
- [11] Olivier S, Diounou H, Pochard C, et al. Intestinal epithelial AMPK deficiency causes delayed colonic epithelial repair in DSS-induced colitis[J]. *Cells*, 2022, 11(4): 590.
- [12] Accordi B, Galla L, Milani G, et al. AMPK inhibition enhances apoptosis in MLL-rearranged pediatric B-acute lymphoblastic leukemia cells[J]. *Leukemia*, 2013, 27(5): 1019-27.
- [13] 曹霞, 邱榕, 陶云平, 等. 基于Th17/Treg平衡的调节探讨参苓白术散治疗溃疡性结肠炎的疗效及作用机制[J]. *中药材*, 2025, 48(1): 237-41.
- [14] Zhang L, Yin M, Feng X, et al. Anti-inflammatory activity of four triterpenoids isolated from *Poriae cutis*[J]. *Foods*, 2021, 10(12): 3155.
- [15] Jin Q, Yin JZ, Liu ZZ. Poricoic acid A promotes angiogenesis and myocardial regeneration by inducing autophagy in myocardial infarction[J]. *Tissue Cell*, 2024, 88: 102401.
- [16] Chen DQ, Wang YN, Vaziri ND, et al. Poricoic acid A activates AMPK to attenuate fibroblast activation and abnormal extracellular matrix remodelling in renal fibrosis[J]. *Phytomedicine*, 2020, 72: 153232.
- [17] Wu YW, Xu YC, Deng HH, et al. Poricoic acid ameliorates high glucose-induced podocyte injury by regulating the AMPK α /FUNDCl pathway[J]. *Mol Biol Rep*, 2024, 51(1): 1003.
- [18] 程扬, 宾东华, 尹园缘, 等. 参苓白术散对克罗恩病大鼠肠道炎症及PI3K/Akt信号通路的影响[J]. *中医药导报*, 2024, 30(4): 30-4.
- [19] Roselli M, Maruszak A, Grimaldi R, et al. Galactooligosaccharide treatment alleviates DSS-induced colonic inflammation in caco-2 cell model[J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 862974.
- [20] Paquette M, El-Houjeiri L, Zirden LC, et al. AMPK-dependent phosphorylation is required for transcriptional activation of TFE3 and TFE3[J]. *Autophagy*, 2021, 17(12): 3957-75.
- [21] Wirtz S, Popp V, Kindermann M, et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation[J]. *Nat Protoc*, 2017, 12(7): 1295-309.
- [22] 张敏, 刘生宝, 张诺, 等. 改进型“瑞士卷”法在小鼠肠道组织切片中的应用[J]. *中华病理学杂志*, 2024, 53(4): 393-7.
- [23] Li CL, Liu MG, Deng L, et al. Oxyberberine ameliorates TNBS-induced colitis in rats through suppressing inflammation and oxidative stress *via* Keap1/Nrf2/NF- κ B signaling pathways[J]. *Phytomedicine*, 2023, 116: 154899.
- [24] 韩康宁, 胡俊杰, 李娟, 等. 二妙四土汤调控JAK/STAT通路治疗湿热型湿疹大鼠的药效与作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(9): 37-47.
- [25] Gareb B, Otten AT, Frijlink HW, et al. Review: local tumor necrosis factor- α inhibition in inflammatory bowel disease[J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(6): E539.
- [26] 邵荣榕, 杨子, 张文静, 等. 茯苓酸缓解小鼠克罗恩病: 基于抑制PPII3K/AKT信号通路拮抗肠上皮细胞凋亡[J]. *南方医科大学学报*, 2023, 43(6): 935-42.
- [27] 牛民主, 殷丽霞, 段婷, 等. 川续断皂苷VI通过抑制PI3K/AKT/NF- κ B通路拮抗肠上皮细胞凋亡缓解TNBS诱导的小鼠克罗恩病样结肠炎[J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44(12): 2335-46.
- [28] Robles-Vera I, Jarit-Cabanillas A, Brandi P, et al. Microbiota translocation following intestinal barrier disruption promotes Mincle-mediated training of myeloid progenitors in the bone marrow[J]. *Immunity*, 2025, 58(2): 381-96. e9.
- [29] Subramanian S, Geng H, Tan X. Cell death of intestinal epithelial cells in intestinal diseases. *Sheng Li Xue Bao*. 2020. 72(3): 308-24.
- [30] Zhao H, Liu T, Yang CE, et al. Poricoic acid A attenuates renal fibrosis by inhibiting endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2024, 57: e14249.
- [31] Liu SS, Jiang TX, Bu F, et al. Molecular mechanisms underlying the BIRC6-mediated regulation of apoptosis and autophagy[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 891.
- [32] Langer R, Nepl C, Keller MD, et al. Expression analysis of autophagy related markers LC3B, p62 and HMGB1 indicate an autophagy-independent negative prognostic impact of high p62 expression in pulmonary squamous cell carcinomas[J]. *Cancers: Basel*, 2018, 10(9): E281.
- [33] Cui Y, Cao X, Zhang Y, et al. Protein phosphatase 1 regulatory subunit 15 A (PPP1R15A) promoted the progression of gastric cancer by activating cell autophagy under energy stress[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2025, 44(1): 52.
- [34] Arab HH, Al-Shorbagy MY, Saad MA. Activation of autophagy and suppression of apoptosis by dapagliflozin attenuates experimental inflammatory bowel disease in rats: Targeting AMPK/mTOR, HMGB1/RAGE and Nrf2/HO-1 pathways[J]. *Chem Biol Interact*, 2021, 335: 109368.
- [35] Wang Y, Liu Z, Shu S, et al. AMPK/mTOR signaling in autophagy regulation during cisplatin-induced acute kidney injury[J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 619730.
- [36] Liu H, Wang Q, Shi G, et al. Emodin ameliorates renal damage and podocyte injury in a rat model of diabetic nephropathy *via* regulating AMPK/mTOR-mediated autophagy signaling pathway[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2021, 14: 1253-66.
- [37] Zafar H, Saier MH Jr. Gut *Bacteroides* species in health and disease[J]. *Gut Microbes*, 2021, 13: 1848158.