黄芩汤调控自噬干预小鼠肠道急性移植物抗宿主病的机制

https://doi.org/10.12307/2022.144
投稿日期：2020-09-27
送审日期：2020-09-28
采用日期：2020-11-09
在线日期：2021-03-08
中图分类号：
R459.9；R322.45；R932
文章编号：
2095-4344(2022)07-01057-06
文献标识码：B

崔 兴[1]，孙小琪[2]，郑 伟[1]，马德欣[2]

文章快速阅读：

造模：
用 ^{60}Co X射线照射CB6F1小鼠，照射结束4 h以内通过尾静脉输注Balb/c H-2d小鼠的骨髓及脾脏单个核细胞悬液完成单倍体造血干细胞移植。

分组：
将造模CB6F1小鼠随机分为模型对照组、黄芩汤低剂量组、黄芩汤中剂量组、黄芩汤高剂量组，每组16只，另取6只CB6F1小鼠为正常对照组。

干预：
正常对照组及模型对照组给予生理盐水，黄芩汤低、中、高剂量组分别给予黄芩汤4.55，9.1，18.2 g/(kg·d)，移植后即刻开始灌胃，连续15 d。

观察指标：
(1) 小鼠生存时间；
(2) 小鼠急性移植物抗宿主病评分；
(3) 小肠黏膜组织病理学形态；
(4) 小肠黏膜上皮自噬泡结构；
(5) 自噬相关蛋白、mRNA表达。

文章特点—
△ 黄芩汤通过干预自噬相关蛋白，促进肠道急性移植物抗宿主病自噬稳态的恢复，保护肠黏膜屏障从而减轻了移植后肠道的排异，有望成为治疗急性移植物抗宿主病的新方法。

文题释义：
黄芩汤：出自于《伤寒论》辨太阳病脉证并治第172条，原文为太阳与少阳合病，自下利者，与黄芩汤。黄芩汤以发热口苦、下利急迫、腹痛、肛门灼热、舌苔黄、脉弦数等为应用指征。现代临床黄芩汤用于治疗急性胃肠炎、细菌性痢疾、阿米巴痢疾等。黄芩汤主治病症与胃肠道急性移植物抗宿主病的症状十分相似，因此选用黄芩汤进行实验研究。
肠黏膜屏障：肠上皮细胞是肠黏膜屏障的主体，它与细胞间紧密连接是肠黏膜屏障功能的主要决定者。有证据表明，肠道急性移植物抗宿主病患者治疗后的肠上皮细胞中多种自噬相关蛋白表达明显增高，提示肠上皮细胞发生了自噬。自噬是保护肠黏膜屏障、维持肠道稳态的中药影响因素。

摘要
背景：如何应用中药干预肠黏膜屏障损伤后的自噬失衡状态，从而最终干预胃肠道急性移植物抗宿主病的发生是造血干细胞移植后亟需解决的问题。
目的：探讨黄芩汤干预急性肠道移植物抗宿主病的具体机制。
方法：CB6F1小鼠随机分成正常对照组、模型对照组、黄芩汤低剂量组、黄芩汤中剂量组、黄芩汤高剂量组，每组16只。模型对照组及黄芩汤低、中、高剂量组小鼠在^{60}Co全身照射后4 h内(照射总剂量8 Gy)，经尾静脉输注Balb/c H-2d小鼠单个核细胞悬液(骨髓细胞8×10^7/只+脾细胞8×10^7/只)。造模后当天开始分别给予不同浓度黄芩汤灌胃，模型组及正常对照组灌胃等容量的生理盐水，连续应用15 d。最后一次灌胃后8 h取材，每组取6只小鼠小肠组织，采用PCR和Western blot检测LC3Ⅱ/Ⅰ、Beclin 1、P62表达水平，苏木精-伊红染色进行小肠黏膜病理分级评分，透射电镜观察小肠黏膜上皮细胞自噬泡结构；每组剩余10只(除正常对照组)小鼠进行临床急性移植物抗宿主病分级并记录生存时间。
结果与结论：①应用黄芩汤后，小鼠存活时间显著延长，临床急性移植物抗宿主病评分显著降低，小肠黏膜病理分级评分显著下降，黄芩汤中、高剂量组评分较模型对照组下降最显著，且黄芩汤中、高剂量组之间无显著差异；②模型对照组小鼠小肠组织自噬相关指标LC3Ⅱ/Ⅰ、Beclin 1水平显著低于正常对照组($P < 0.01$)，P62水平显著高于正常对照组($P < 0.01$)，黄芩汤可以促进LC3Ⅱ/Ⅰ、Beclin1水平的恢复并下调P62水平($P < 0.01$)；③透射电镜观察黄芩汤治疗组的自噬泡明显比模型对照组增多，且伴有如线粒体等重要细胞器形态的恢复；④结果表明，黄芩汤通过干预自噬相关蛋白，促进肠道急性移植物抗宿主病自噬稳态的恢复，保护肠黏膜屏障从而减轻了移植后肠道的排异，有望成为治疗急性移植物抗宿主病的新方法。
关键词：骨髓；脾脏；单个核细胞；急性移植物抗宿主病；黄芩汤；自噬；肠黏膜屏障

Huangqin Decoction regulates autophagy to intervene with intestinal acute graft-*versus*-host disease in mice

Cui Xing[1], Sun Xiaoqi[2], Zheng Wei[1], Ma Dexin[2]
[1]Department of Hematology, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250000, Shandong Province, China; [2]Department of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250000, Shandong Province, China
Cui Xing, MD, Associate chief physician, Department of Hematology, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250000, Shandong Province, China

[1] 山东中医药大学附属医院血液科，山东省济南市 250000；[2] 山东中医药大学中医学(八年制)，山东省济南市 250000
第一作者：崔兴，男，1980年生，山东省济南市人，汉族，2011年山东中医药大学毕业，博士，副主任医师，主要从事血液病临床与实验研究。
通讯作者：崔兴，博士，副主任医师，山东中医药大学附属医院血液科，山东省济南市 250000
https://orcid.org/0000-0002-8771-5898(崔兴)
基金资助：国家自然科学基金(81774080)，项目负责人：崔兴；泰山学者计划(tsqn201812145)，项目负责人：崔兴；山东省重点研发计划(2019GSF108162)，项目负责人：崔兴
引用本文：崔兴，孙小琪，郑伟，马德欣. 黄芩汤调控自噬干预小鼠肠道急性移植物抗宿主病的机制[J]. 中国组织工程研究，2022，26(7):1057-1062.

Corresponding author: Cui Xing, MD, Associate chief physician, Department of Hematology, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250000, Shandong Province, China

Abstract

BACKGROUND: How to use traditional Chinese medicine to intervene the imbalance of autophagy after intestinal mucosal barrier injury, so as to ultimately intervene the occurrence of gastrointestinal acute graft-*versus*-host disease, is an urgent problem to be solved after hematopoietic stem cell transplantation.
OBJECTIVE: To verify the precise mechanism by which *Huangqin* Decoction interferes with acute intestinal graft-*versus*-host disease.
METHODS: CB6F1 mice were randomly divided into normal control group, model control group, low-dose *Huangqin* Decoction group, medium-does *Huangqin* Decoction group and high-does *Huangqin* Decoction group, with 16 mice per group. CB6F1 mice in the model control group, low-dose *Huangqin* Decoction group, medium-does *Huangqin* Decoction group and high-does *Huangqin* Decoction group were infused with mononuclear cell suspension (bone marrow cell 8×10^7 + spleen cell 8×10^7) obtained from Balb/c mice via caudal vein within 4 hours after ^{60}Co whole body irradiation (radiation dose was 8 Gy). Different concentrations of *Huangqin* Decoction were given by gavage on the same day after modeling. The rats in the model control group and the normal control group were given the same volume of normal saline by gavage for 15 days. Eight hours after the last gavage, the small intestine tissues of six mice in each group were collected. PCR and western blot assay were used to detect the expression levels of LC3II/I, Beclin1 and P62. The pathological grading of small intestinal mucosa was scored by hematoxylin-eosin staining. The autophagic vesicle structure of small intestinal mucosal epithelial cells was observed by transmission electron microscope. The remaining 10 rats in each group (except the normal control group) were used to observe the clinical grading of acute graft-*versus*-host disease and record the survival time.
RESULTS AND CONCLUSION: (1) After the application of *Huangqin* Decoction, the survival time of mice was significantly prolonged; the clinical acute graft-*versus*-host disease score was significantly decreased, and the pathological grading score of small intestinal mucosa was significantly decreased. The score of medium-does *Huangqin* Decoction group and high-does *Huangqin* Decoction group was significantly lower than that of model control group, but there was no significant difference between medium-does *Huangqin* Decoction group and high-does *Huangqin* Decoction group. (2) The LC3II/I and Beclin1 expression was significantly lower in the model control group than that in the normal control group ($P < 0.01$), and P62 expression was significantly higher than that in the normal control group ($P < 0.01$). *Huangqin* Decoction could promote the recovery of LC3II/I and Beclin1 levels and downregulate p62 levels ($P < 0.01$). (3) Under transmission electron microscope, the number of autophagic vesicles in the treatment group was significantly higher than that in the model control group, accompanied by the recovery of important organelles such as mitochondria. (4) The results confirm that by interfering autophagy related proteins, *Huangqin* Decoction can promote the recovery of autophagy in acute graft-*versus*-host disease, protect intestinal mucosal barrier and reduce intestinal rejection after transplantation and has promise as a new treatment for acute graft-*versus*-host disease.
Key words: bone marrow; spleen; mononuclear cells; acute graft-*versus*-host disease; *Huangqin* Decoction; autophagy; intestinal mucosal barrier

Funding: *the National Natural Science Foundation of China, No. 81774080 (to CX); the Taishan Scholar Program, No. tsqn201812145 (to CX); the Key Research & Development Plan of Shandong Province, No. 2019GSF108162 (to CX)*
How to cite this article: *CUI X, SUN XQ, ZHENG W, MA DX. Huangqin Decoction regulates autophagy to intervene with intestinal acute graft-versus-host disease in mice . Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2022;26(7):1057-1062.*

0 引言 Introduction

肠道急性移植物抗宿主病是造血干细胞移植后早期最致命的并发症之一[1]，主要表现为顽固性腹泻，严重者还可出现肠绞痛、便血和肠梗阻，甚或危及生命。自噬是通过囊泡包被自身细胞质蛋白或细胞器，使其与溶酶体融合形成自噬溶酶体，从而降解损坏的蛋白或细胞器，以满足细胞自身稳态的过程。研究证实，通过促进自噬改善受损的肠黏膜屏障，可以减轻急性移植物抗宿主病的发生[2]。

黄芩汤作为治疗热痢泄泻的经方，能调节 Th17/Treg 平衡，减轻肠黏膜屏障损伤[3]。黄芩汤由黄芩、芍药、炙甘草、大枣组成，近年发现黄芩汤治疗肠道炎症的疗效确切。黄芩汤可以通过调控 STAT3/NF-κB/IL-6[4]、Nrf2 等通路减轻氧化应激[5]、降低炎性因子从而干预溃疡性结肠炎。还有研究表明，LC3B Ⅱ、Beclin 1 的表达改变会促进自噬进而对移植物抗宿主病产生治疗效果[6]。课题组的前期研究已经证实黄芩汤的主要有效成分黄芩苷，可以通过降低活性氧的产生，提高小肠黏膜细胞的自噬水平，保护肠黏膜屏障，进而降低移植后肠道急性移植物抗宿主病的发病率[7]。然而黄芩汤影响自噬相关途径进而干预急性移植物抗宿主病进程的研究尚不多见，因此，该实验对黄芩汤干预肠道急性移植物抗宿主病的机制进行相关研究，以探索治疗急性移植物抗宿主病的新方法。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于 2019 年 1–7 月在北京科忠智实验有限公司完成。

1.3 材料

1.3.1 实验药材、抗体、仪器 黄芩 (Scutellaria baicalensis Georgi)、芍药 (Paeonia lactiflora Pall)、炙甘草 (Glycyrrhiza ura-lensis Fisch)、大枣 (Ziziphus jujuba Mill) 购自山东中医药大学附属医院中药房。LC3- Ⅱ、LC3- Ⅰ、Beclin 1 和 P62 抗体购自 Affinity Biosciences 公司 (俄亥俄州辛辛那提市，美国)；透射电子显微镜、小动物辐照仪 X-RAD225 由山东省肿瘤医院提供 (中国山东济南)。

1.3.2 实验动物 健康 SPF 级 Balb/c H-2d 雄性小鼠 15 只为供鼠，体质量 18–22 g，鼠龄 8–10 周；SPF 级 CB6F1 雌性小鼠 70 只为受鼠，体质量 18–22 g，鼠龄 8–10 周；另取 6 只 SPF 级 CB6F1 雌性小鼠为正常对照组。所有小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司，动物生产许可证编号为 SCXK2012-0001(北京)。该动物实验由山东中医药大学附属医院伦理委员会审批通过，伦理号：AWE-2019-037。

1.4 实验方法

1.4.1 黄芩汤的制备方法 参照《伤寒论》组方，黄芩汤由黄芩、芍药、甘草和大枣配伍而成，称取黄芩 30 g、芍药 20 g、甘草 20 g 和大枣 24 g，加药材总质量 10 倍体积的水，煎煮 1 h 后，趁热过滤药液，药渣加 8 倍体积的水继续煎煮 1 h，合并 2 次药液，浓缩成 2 g/mL 药液，用时稀释，黄芩汤低剂量组每只 4.55 g/(kg·d)，黄芩汤中剂量组每只 9.1 g/(kg·d)，黄芩汤高剂量组每只 18.2 g/(kg·d)。

1.4.2 骨髓和脾单个核细胞的制备 参照文献 [8]，采用脱颈椎法处死近交系 Balb/c H-2d 小鼠，无菌取骨髓和脾单个核细胞。

1.4.3 小鼠模型的建立及分组处理 用 ^{60}Co X 射线照射 CB6F1 小鼠，剂量 3.7 cGy/s，焦皮距 50 cm，共照射 1 次，总剂量 8 Gy，照射结束 4 h 以内通过尾静脉注射法将供鼠的骨髓及脾脏单个核细胞悬液 (8×10^7 骨髓细胞 +8×10^7 脾细胞) 输入受鼠体内完成移植 [8]。移植后第 2，7 天，分别取 3 只小鼠，脱颈椎处死，取得骨髓细胞，常规进行染色体制片，运用染色体 G 显带技术观测 XY 染色体是否存在，若存在 Y 染色体显带，则证明单倍体造血干细胞移植建模成功。

将造模 CB6F1 小鼠随机分为模型对照组、黄芩汤低剂量组、黄芩汤中剂量组、黄芩汤高剂量组，每组 16 只，另取 6 只 CB6F1 小鼠为正常对照组。正常对照组及模型对照组给予生理盐水，根据前期实验数据，黄芩汤低、中、高剂量组分别给予黄芩汤 4.55，9.1，18.2 g/(kg·d)，移植后即刻开始灌胃，连续 15 d。第 15 天灌胃后 8 h 取材，每组取 6 只小鼠用于取小肠组织进行各项指标检测，剩余 10 只 (除正常对照组) 小鼠进行临床急性移植物抗宿主病分级并记录生存时间。

1.4.4 临床急性移植物抗宿主病分级标准 通过观察移植后第 15 天所有小鼠的体质量、姿势、活动度、毛发、皮肤完整性和腹泻等情况，按照 LE TEXIER 等 [9] 的急性移植物抗宿主病的临床评分标准计算分数，见**表 1**。

表 1 | 临床急性移植物抗宿主病评分
Table 1 | Clinical score criteria for acute graft-*versus*-host disease

标准	0 分	1 分	2 分
体质量减轻	< 10%	10%–25%	> 25%
姿势	正常	偶尔弓背	严重弓背影响活动
活动度	正常	轻度至中度下降	静止，除非受刺激
毛发	正常	轻度到中度褶皱	严重的褶皱 / 整洁度差
皮肤及溃疡	正常	爪子 / 尾巴脱皮溃疡	明显的区域性脱皮溃疡
腹泻	≤ 1 次	2，3 次	≥ 4 次

1.4.5 小肠黏膜组织学及病理炎症评分 将小肠组织固定在 40 g/L 多聚甲醛中进行苏木精 – 伊红染色，在光学显微镜下观察。通过检查小肠黏膜组织损伤、隐窝破坏、黏膜溃疡程度和炎性细胞浸润程度来确定病理炎症评分及组织学分析 [10]，见**表 2**。

表 2 | 小肠病理评分标准
Table 2 | Pathological inflammation score analysis in small intestine

小肠	0 分	0.5 分	1 分	2 分	3 分	4 分
绒毛隐窝	正常	集中且罕见	集中且轻度	弥漫性且轻度	弥漫性且中度	弥漫性且重度
隐窝再生						
隐窝丢失						
细胞碎片脱落						
固有层炎性细胞浸润						
黏膜溃疡						

1.4.6 PCR 法检测小鼠小肠组织 LC3 Ⅰ、LC3 Ⅱ、Beclin 1、p62 mRNA 表达水平 将小肠组织剪碎后液氮研磨，加入 1 mL Trizol 匀浆，提取 RNA 并反转录、扩增，引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司提供合成，具体序列见**表 3**。以 β-actin 基因作为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对 LC3 Ⅰ、LC3 Ⅱ、Beclin 1、p62 的 mRNA 相对表达量进行分析。

表 3 | PCR 引物序列
Table 3 | Primer sequences for PCR

基因	产物长度 (bp)	上游引物	下游引物
LC3 Ⅰ	139	5'-CCT TCT TCC TGC TGG TGA AC-3'	5'-TTG ACT CAG AAG CCG AAG GT-3'
LC3 Ⅱ	112	5'-GTG TCC ACA CCC ATC TCT GA-3'	5'-AGT CTT ACA CAG CCA GTG CT-3'
Beclin 1	134	5'-GAA TGA GGG CGA CAG TGA AC-3'	5'-CCT GGA CCT TCT CAG GTT T-3'
p62	85	5'-GGG GCT TTG GTT CGT GGA-3'	5'-ACA GTA GGT GGG GGT GGC-3'
β-actin	149	5'-GGA GAT TAC TGC CCT GGC TCC TA-3'	5'-GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG CTG-3'

1.4.7 透射电镜分析 将小肠组织展平后放入电镜固定液中，置于 4 ℃冰箱 2 h，PBS 冲洗 3 次，再用 1% 锇酸 4 ℃固定 2 h，经过 PBS 漂洗和乙醇、丙酮脱水后进行包埋过夜，制成厚度约 4 μm 的切片，用醋酸双氧铀、枸橼酸铅双染后置于透射电镜下观察。

1.4.8 Western blot 检测小鼠小肠组织 LC3 Ⅰ、LC3 Ⅱ、Beclin 1、P62 蛋白表达水平 将十二指肠和空肠分别剪碎成小片，加入蛋白酶进行消化，清洗后再用分散液多次分离，最终得到小肠黏膜上皮细胞悬液，使用 RIPA 裂解缓冲液裂解，收集总蛋白，然后将 20 μg 蛋白质样品加载到 10% 的 SDS-PAGE 凝胶上，在 80 V 下浓缩 20 min，在 120 V 下分离约 1 h，待溴酚蓝标记消失后立即停止电泳，然后用湿吸法将样品在 110 V 下转移到 PVDF 膜上，在 4 ℃下保持 100 min。每个免疫印迹在 5% 脱脂乳 TBST 中阻断 2 h，加入一抗 (LC3 Ⅰ、LC3 Ⅱ、P62、Beclin 1)4 ℃孵育过夜，TBST 冲洗 3 次，每次 10 min，然后在室温下用稀释的二抗在封闭液中孵育 2 h，待二抗溶液完全冲洗干净后，用 PTG-ECL 化学发光检测试剂盒进行印迹，将印迹转移到成像机上进行曝光和分析。由 ImageJ 软件计算条带灰度值，并进行统计分析。

1.5 主要观察指标 ①小鼠生存时间；②小鼠急性移植物抗宿主病评分；③小肠黏膜组织病理学形态；④小肠黏膜上皮自噬泡结构；⑤自噬相关 LC3 Ⅰ、LC3 Ⅱ、Beclin 1、P62 蛋白、mRNA 表达。

1.6 统计学分析 实验结果用 SPSS 20.0 和 GraphPad 8.0 进行分析和绘图。结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，并进行方差分析，$P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

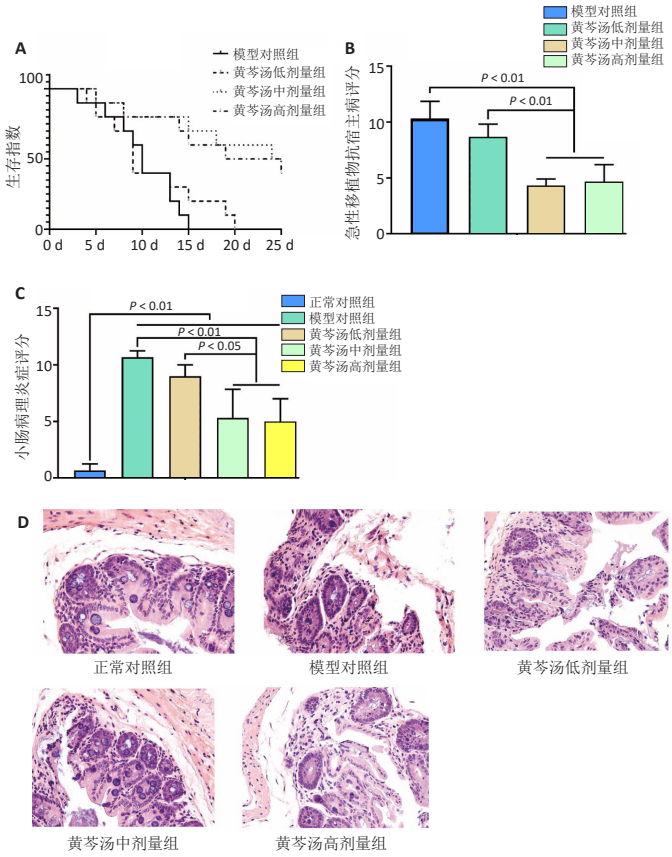
2 结果 Results

2.1 小鼠生存时间 用于记录生存时间的 40 只小鼠中，模型对照组 10 只小鼠均死于 15 d 内，黄芩汤低剂量组生存时间有所延长，均死于 20 d 内，黄芩汤中剂量组及黄芩汤高剂量组小鼠存活时间明显延长，至移植后 28 d 依旧有部分小鼠存活，见**图 1A**，这表明黄芩汤治疗能延长急性移植物抗宿主病小鼠的生存时间，中、高剂量黄芩汤的效果更为明显。

2.2 急性移植物抗宿主病评分 模型对照组第 3 天开始出现排便次数增多的情况，第 5 天出现软便，黄芩汤低、中、高剂量组大便形状较于模型对照组有所改善，且黄芩汤各治疗组急性移植物抗宿主病评分显著低于模型对照组，见图 **1B**，表明黄芩汤治疗能有效降低急性移植物抗宿主病的发病率。

2.3 小肠黏膜病理评分 与模型对照组相比，黄芩汤高、中、低剂量组的病理炎症评分明显降低 ($P < 0.01$)，见图 **1C**，其中黄芩汤高剂量组评分最低。

2.4 小肠黏膜组织学分析 正常对照组小肠黏膜上皮结构最为完整，模型对照组和黄芩汤各剂量组均有不同程度的炎性细胞浸润，模型对照组肠黏膜炎性细胞浸润较严重，符合肠道急性移植物抗宿主病的病理特征。经黄芩汤治疗后，小肠黏膜上皮结构完整性部分恢复，表现为炎性细胞浸润减少，腺细胞排列更规则，杯状细胞增多，细胞碎片脱落减少，肠黏膜上皮细胞坏死较少，其中黄芩汤中剂量组小肠黏膜上皮结构完整性最好，见图 **1D**。



图注：图中 A 为各组小鼠生存曲线；B 为各组小鼠急性移植物抗宿主病评分；C 为各组小鼠小肠病理炎症评分；D 为各组小鼠小肠黏膜上皮组织病理图 (×200)

图 1 ｜黄芩汤对肠道急性移植物抗宿主病的影响

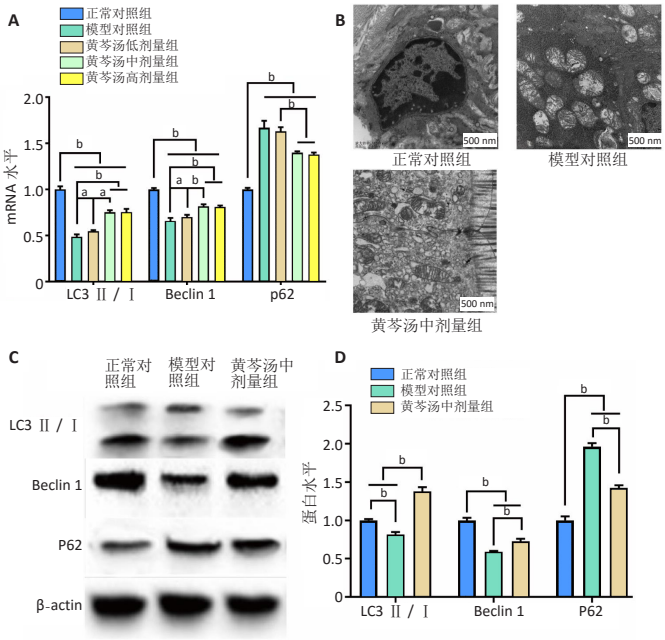
Figure 1 ｜ Effect of *Huangqin* Decoction on intestinal acute graft-*versus*-host disease

2.5 各组小肠组织 LC3 Ⅰ、LC3 Ⅱ、Beclin 1、p62 mRNA 表达水平 模型对照组小鼠小肠组织自噬相关指标 LC3 Ⅱ / Ⅰ、Beclin 1 水平显著低于正常对照组 ($P < 0.01$)，p62 水平显著高于正常对照组 ($P < 0.01$)，提示急性移植物抗宿主病小鼠小肠组织自噬水平显著下降，见图 **2A**。经过黄芩汤治疗后，自噬相关指标 LC3 Ⅱ / Ⅰ、Beclin1 水平显著升高，p62 水平显著降低，其中黄芩汤中、高剂量组自噬相关指标变化最为显著，提示应用黄芩汤治疗后小肠组织自噬水平显著升高。基于上述检测数据，选用黄芩汤中剂量组进行以下实验。

2.6 透射电镜分析 透射电镜检测各组小肠黏膜上皮细胞自噬水平，相较于正常对照组，模型对照组的自噬泡明显减少，且线粒体结构破坏明显，而黄芩汤治疗组的双层膜结构的自噬泡明显比模型对照组增多，且伴有如线粒体等重要细胞器形态的恢复，见图 **2B**。

2.7 各组小肠组织 LC3 Ⅰ、LC3 Ⅱ、Beclin 1、P62 蛋白表达 与正常对照组相比，模型对照组 LC3 Ⅱ / Ⅰ、Beclin 1 水平显著下降，P62 水平显著上升，提示急性移植物抗宿主病小鼠小肠组织自噬水平下降，黄芩汤治疗组 LC3 Ⅱ / Ⅰ、Beclin 1 水平显著升高，P62 水平显著下调 ($P < 0.01$)，提示黄芩汤治疗后小鼠小肠组织的自噬作用显著增强，见图 **2C**，**D**。

2.8 生物相容性 该研究生物相容性指 Balb/c H-2d 小鼠的骨髓及脾脏细胞在 CB6F1 小鼠的骨髓中能够植入成功。CB6F1 小鼠作为 C57BL/6 小鼠和 Balb/c H-2d 的杂交一代小鼠，用 Balb/c H-2d 小鼠作为供体进行移植是单倍体相合移植，与受体之间的相容性较高，且排异风险较大，造模成功率较高。



图注：图中 A 为 LC3 Ⅰ、LC3 Ⅱ、Beclin 1、p62 mRNA 表达水平；B 为透射电镜观察自噬泡结构；C，D 为 LC3 Ⅰ、LC3 Ⅱ、Beclin 1、P62 蛋白表达水平。$^{a}P < 0.05$；$^{b}P < 0.01$

图 2 ｜黄芩汤对自噬相关蛋白水平的影响

Figure 2 ｜ Effect of *Huangqin* Decoction on the level of autophagy related protein

3 讨论 Discussion

预处理方案导致炎症因子风暴以及化疗后机体免疫力相对较低导致某些细菌产物 (如脂多糖) 和其他病原体分子的系统性易位 [11-12]，诱发的黏膜炎症和感染破坏肠黏膜屏障是肠道急性移植物抗宿主病发病的重要原因 [13]。有研究证实，黄芩汤加减可以治疗溃疡性结肠炎，其作用机制与降低炎症因子水平有关 [14]。因此，如何保护肠黏膜屏障是减轻肠道炎性反应 [15]、治疗肠道急性移植物抗宿主病的关键。研究发现，应用凋亡抑制蛋白后，LC3 水平降低，这表明移植物抗宿主病不仅具有凋亡激活功能，而且还伴随着自噬的抑制 [16]。研究表明，降低 mTOR 水平、增加自噬和降低氧化应激可影响急性移植物抗宿主病的进程 [17]。临床试验显示，在标准风险急性移植物抗宿主病的初始治疗中，mTOR 抑制剂雷帕霉素在第 28 天的完全 / 部分缓解率与泼尼松相似，进一步提示促进自噬是治疗急性移植物抗宿主病的一种可靠方法 [6]。细胞实验表明，使用雷帕霉素和 PP242 诱导自噬后，Caco-2 细胞模型黏膜屏障增强，而通过敲减 ATG16L1 和 ATG7 等基因或加用氯喹等抑制自噬后，会减弱该细胞模型的黏膜屏障 [18]。以上实验都表明了自噬与肠黏膜屏障的密切关系。

另外，自噬介导的免疫细胞异常对肠道黏膜屏障的破坏也有重要作用，比如自噬依赖的 Treg 细胞可以通过促进自噬功能的恢复，维持造血干细胞的植入状态，减少移植物抗宿主病的病理学改变 [19-20]。有研究表明，自噬受损可导致肠道上皮细胞的黏附能力下降，进而使黏膜屏障受损，也反证了自噬在保护肠黏膜屏障中发挥重要作用 [21]。除此之外，多项研究表明自噬相关蛋白在肠黏膜屏障功能中扮演重要角色 [22]。从 Western blot 等结果可以看出，应用黄芩汤后，自噬相关蛋白 LC3 Ⅱ / Ⅰ、Beclin 1、P62 水平明显改变，这证明黄芩汤的应用对自噬有着重要影响。

肠道急性移植物抗宿主病的中医病机为热邪内迫，大小肠受承传导失司，出现腹痛腹泻等症。根据《黄帝内经》病机十九条中“诸呕吐酸，暴注下迫，皆属于热”，《伤寒论》中的治疗湿热型肠炎有较好疗效的黄芩汤可以用来治疗此类疾病 [23-24]。研究证实，加味黄芩汤可以通过影响溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群失调状态，缓解肠道局部的炎症 [25]。还有研究表明黄芩汤可能通过调节 $CD4^+T$ 细胞的共刺激分子的表达量从而发挥对溃疡性结肠炎的免疫调节作用 [26]，延缓肠道炎症反应，进而修复溃疡性结肠炎的肠黏膜屏障损伤，这都侧面证明黄芩汤对保护肠黏膜屏障有一定作用。

黄芩是黄芩汤的主要药物，常用于治疗腹泻症状。黄芩苷是黄芩的主要有效成分，有研究证实黄芩苷可以通过 PI3K/Akt/mTOR 途径诱导自噬，并发挥抗炎机制作用 [27-28]。在该实验中，黄芩汤治疗后小鼠生存能力提高，临床急性移植物抗宿主病及肠道炎症评分下降，说明黄芩汤具有一定的减轻肠道急性移植物抗宿主病的作用。进一步研究发现，黄芩汤治疗后自噬泡增多，Western blot 结果显示 LC3- Ⅱ / Ⅰ 和 Beclin 1 等自噬相关蛋白水平显著升高。以上都证实了黄芩汤可以促进自噬，增加自噬泡的产生，促进细胞碎片、废弃蛋白质等物质的降解，从而减少小肠黏膜上皮细胞的死亡和脱落。其他学者的研究也证实了激活自噬在减轻肠黏膜屏障功能障碍中的重要作用 [29-31]，这与该研究结果一致。

该研究为黄芩汤通过促进自噬、减少肠黏膜上皮细胞死亡、干扰肠道急性移植物抗宿主病的进展而保护肠黏膜屏障提供了有力的证据。以此推断，胃肠道急性移植物抗宿主病患者服用黄芩汤后，肠黏膜屏障得到修复，其胃肠道症状会减轻，例如腹泻、呕吐、便血等症状可能会有所改善，下一步实验将着重研究黄芩汤对急性移植物抗宿主病模型中非编码 RNA 的影响，以进一步揭示黄芩汤保护肠黏膜屏障的机制，然后进一步明确黄芩汤有效成分，为下一步中药治疗胃肠道急性移植物抗宿主病提供依据，从而减轻病痛，提高患者的生活质量。

结论：黄芩汤调节自噬相关蛋白水平，促进自噬，减轻肠黏膜上皮细胞的死亡和脱落，进而保护肠黏膜屏障，从而干扰急性肠道移植物抗宿主病的进程。

作者贡献：实验设计、实施、评估为崔兴，资料收集为郑伟，数据处理为孙小琪、马德欣。

经费支持：该文章接受了“国家自然科学基金 (81774080)”“泰山学者计划 (tsqn201812145)”及“山东省重点研发计划 (2019GSF108162)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题：实验方案经山东中医药大学附属医院动物实验伦理委员会批准，批准号为 AWE-2019-037。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明：文章统计学方法已经通过山东中医药大学生物统计学专家审核。

文章版权：文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名－非商业性使用－相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

[1] LIU A, MEYER E, JOHNSTON L, et al. Prevalence of graft versus host disease and cytomegalovirus infection in patients post-haematopoietic cell transplantation presenting with gastrointestinal symptoms. Aliment Pharmacol Ther. 2013;38(8):955-966.

[2] LIN Y, WANG B, SHAN W, et al. mTOR inhibitor rapamycin induce polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells mobilization and function in protecting against acute graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. Clin Immunol. 2018;187:122-131.
[3] ZOU Y, LI WY, WAN Z, et al. Huangqin-Tang Ameliorates TNBS-Induced Colitis by Regulating Effector and Regulatory CD4(+) T Cells. Biomed Res Int. 2015;2015:102021.
[4] 王康，缪志伟，董筠，等. 基于 STAT3/NF-kB/IL-6 通路研究加味黄芩汤治疗溃疡性结肠炎的作用机制 [J]. 南方医科大学学报，2020,40(2):196-202.
[5] 马旭冉，王彦礼，邹迪新，等. 黄芩汤调控 Nrf2 通路对溃疡性结肠炎大鼠氧化应激作用的影响 [J]. 药学学报，2019,54(4):653-659.
[6] AMARNATH S, FLOMERFELT FA, COSTANZO CM, et al. Rapamycin generates anti-apoptotic human Th1/Tc1 cells via autophagy for induction of xenogeneic GVHD. Autophagy. 2010;6(4):523-541.
[7] 钟萍，崔兴. 黄芩苷调控自噬保护肠黏膜屏障干预肠道急性移植物抗宿主病 [J]. 中国组织工程研究，2020,24(25):4028-4032.
[8] 陈慧瑶，张伟，方芳，等. 肠三叶因子通过自噬在急性移植物抗宿主病中发挥保护作用 [J]. 温州医科大学学报，2017,47(7):480-484.
[9] LE TEXIER L, LINEBURG KE, MACDONALD KP. Harnessing bone marrow resident regulatory T cells to improve allogeneic stem cell transplant outcomes. Int J Hematol. 2017;105(2):153-161.
[10] COOKE KR, KOBZIK L, MARTIN TR, et al. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. Blood. 1996;88(8):3230-3239.
[11] KAWAKAMI K, MINAMI N, MATSUURA M, et al. Osteopontin attenuates acute gastrointestinal graft-versus-host disease by preventing apoptosis of intestinal epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 2017;485(2):468-475.
[12] SATO A, NISHIDA C, SATO-KUSUBATA K, et al. Inhibition of plasmin attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality by suppressing the matrix metalloproteinase-9-dependent inflammatory cytokine storm and effector cell trafficking. Leukemia. 2015;29(1):145-156.
[13] BIAGI E, ZAMA D, RAMPELLI S, et al. Early gut microbiota signature of aGvHD in children given allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematological disorders. BMC Med Genomics. 2019;12(1):49.
[14] VAN MONTFRANS J, SCHULZ L, VERSLUYS B, et al. Viral PCR positivity in stool before allogeneic hematopoietic cell transplantation is strongly associated with acute intestinal graft-versus-host disease. Biol Blood Marrow Transplant. 2015;21(4):772-774.
[15] 首汉蓉，唐建，黄泽林，等. 黄芩汤加减联合补脾益肠丸对溃疡性结肠炎患者 Toll 样受体 4/ 髓样分化因子 88 信号通路的影响 [J]. 陕西中医，2020,41(6):750-753.
[16] BUHNER S, BUNING C, GENSCHEL J, et al. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? Gut. 2006;55(3):342-347.
[17] TOUBAI T, ROSSI C, ORAVECZ-WILSON K, et al. IAPs protect host target tissues from graft-versus-host disease in mice. Blood Adv. 2017;1(19):1517-1532.
[18] BÖTTCHER M, HOFMANN AD, BRUNS H, et al. Mesenchymal Stromal Cells Disrupt mTOR-Signaling and Aerobic Glycolysis During T-Cell Activation. Stem Cells. 2016;34(2):516-521.
[19] NIGHOT PK, HU CA, MA TY. Autophagy enhances intestinal epithelial tight junction barrier function by targeting claudin-2 protein degradation. J Biol Chem. 2015;290(11):7234-7246.
[20] LE TEXIER L, LINEBURG KE, CAO B, et al. Autophagy-dependent regulatory T cells are critical for the control of graft-versus-host disease. JCI Insight. 2016;1(15):e86850.
[21] HUBBARD-LUCEY VM, SHONO Y, MAURER K, et al. Autophagy gene Atg16L1 prevents lethal T cell alloreactivity mediated by dendritic cells. Immunity. 2014;41(4):579-591.
[22] 方健松，马媛萍，刘畅，等. 自噬介导肠黏膜屏障维持肠道稳态在炎症性肠病中的作用 [J]. 实用医学杂志，2016,32(8):1367-1369.
[23] 王彬彬，武承凤，张方信. 自噬在肠黏膜屏障功能作用机制的研究进展 [J]. 基础医学与临床，2017,37(3):405-409.
[24] 邹颖，戴世学，迟宏罡，等 .Th17/Treg 平衡在湿热型结肠炎大鼠中的变化及黄芩汤的调节作用 [J]. 中药药理与临床，2012,28(2):2-5.
[25] 黄继承，王浩，贡钰霞. 黄芩汤合四逆散加减联合西药治疗急性肠炎 (肝郁脾虚夹湿热) 的临床观察 [J]. 中国中医急症，2019,28(3):513-515.
[26] 王倩，别玉龙，范文涛. 加味黄芩汤对 TNBS 诱导的结肠炎大鼠肠道菌群结构及 IL-6/STAT3 信号通路的影响 [J]. 陕西中医，2017,38(4):528-530,539.
[27] 郑学宝，封艳玲，刘洪波，等. 黄芩汤对湿热型溃疡性结肠炎大鼠 CD4+T 细胞及其共刺激分子的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2011,17(1):169-172.
[28] ZHANG Q, SUN J, WANG Y, et al. Antimycobacterial and Anti-inflammatory Mechanisms of Baicalin via Induced Autophagy in Macrophages Infected with Mycobacterium tuberculosis. Front Microbiol. 2017;8:2142.
[29] PIDALA J, HAMADANI M, DAWSON P, et al. Randomized multicenter trial of sirolimus vs prednisone as initial therapy for standard-risk acute GVHD: the BMT CTN 1501 trial. Blood. 2020;135(2):97-107.
[30] HUANG L, JIANG Y, SUN Z, et al. Autophagy Strengthens Intestinal Mucosal Barrier by Attenuating Oxidative Stress in Severe Acute Pancreatitis. Dig Dis Sci. 2018;63(4):910-919.
[31] 吴东升，张彧，陈大光，等. 自噬在炎症性肠病肠黏膜屏障损伤中的作用 [J]. 胃肠病学，2018,23(12):755-758.

(责任编辑：MZH，ZN，JY)