DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.04.024

补肺汤对慢性阻塞性肺疾病肺气虚证模型大鼠PINK1/Parkin信号通路介导的线粒体自噬的影响

褚璨灿[1,2],陈光磊[1],郑宇皓[1],杨长福[1],朱星[1]
(1.贵州中医药大学,贵州 贵阳 550025;2.安顺市人民医院,贵州 安顺 561000)

摘要:目的 探讨补肺汤通过调控张力素同源物诱导的激酶蛋白1(phosphatase and tensin homolog-induced putative kinase protein 1,PINK1)/RBR结构域的E3泛素连接酶(parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase,Parkin)信号通路介导的线粒体自噬水平干预慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)肺气虚证的作用机制。方法 将大鼠随机分为对照组和造模组,采用被动吸入烟雾联合气道内滴注脂多糖的方法制造COPD肺气虚证大鼠模型。造模结束后,将造模组大鼠随机分为模型组、补肺汤中剂量组、补肺汤高剂量组、3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine,3-MA)组。补肺汤中、高剂量组给予补肺汤药液灌胃(7.29、14.58 g·kg^{-1}),3-MA组以3-MA(15 mg·kg^{-1})腹腔注射给药,每组每日药物干预1次,连续干预28 d。苏木素-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色观测肺组织病理改变;透射电镜下观测肺组织中肺泡Ⅱ型上皮细胞超微结构的变化;免疫组化(immunohistochemistry,IHC)检测肺组织中PINK1、Parkin、自噬受体蛋白P62(sequestosome 1,P62/SQSTM1)、微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3,LC3)蛋白的阳性表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肺组织线粒体中PINK1、Parkin、P62、LC3Ⅱ/LC3I蛋白表达;流式细胞术检测肺组织中线粒体膜电位变化情况;活性氧荧光探针(dichloro-dihydro-fluorescein diacetate,DCFH-DA)、线粒体超氧化物(mitochondrial superoxide,MitoSOX)红色荧光探针经流式细胞仪分别测定肺组织内活性氧(reactive oxygen species,ROS)、线粒体活性氧(mitochondrial reactive oxygen species,mtROS)水平;Western blot检测肺组织中核转录因子-κB P65(nuclear factor-κB P65,NF-κB P65)、磷酸化核转录因子-κB P65(phosphorylation of nuclear factor-κB P65,p-NF-κB P65)蛋白的表达。结果 与对照组相比,模型组的肺组织损伤严重;与模型组相比,补肺汤中、高剂量组和3-MA组的病理损伤均有不同程度改善。与对照组相比,模型组肺组织中肺泡Ⅱ型上皮细胞及其线粒体结构损伤严重,线粒体减少,自噬小体增多;与模型组相比,补肺汤中、高剂量组和3-MA组肺泡Ⅱ型上皮细胞及其线粒体结构损伤程度较轻,线粒体相对增多,自噬小体减少。与对照组相比,模型组肺组织及肺组织线粒体中的PINK1、Parkin、LC3、LC3Ⅱ/LC3I的蛋白表达上调($P<0.01$)、P62蛋白表达下调($P<0.01$);与模型组相比,补肺汤中、高剂量组和3-MA组肺组织及肺组织线粒体中的PINK1、Parkin、LC3、LC3Ⅱ/LC3I的蛋白表达下调($P<0.05$,$P<0.01$)、P62蛋白表达上调($P<0.01$)。与对照组相比,模型组肺组织的线粒体膜电位降低($P<0.01$)、ROS和mtROS水平均上调($P<0.01$)、NF-κB P65蛋白表达差异无统计学意义、p-NF-κB P65蛋白表达上调($P<0.01$);与模型组相比,补肺汤中、高剂量组和3-MA组肺组织的线粒体膜电位升高($P<0.01$)、ROS和mtROS水平均下调($P<0.01$)、NF-κB P65蛋白表达差异无统计学意义、p-NF-κB P65蛋白表达下调($P<0.01$)。结论 补肺汤能抑制肺组织ROS水平以及NF-κB P65的激活,从而减轻COPD肺气虚证肺部氧化损伤和炎症反应,其作用机制可能与抑制PINK1/Parkin信号通路介导的线粒体自噬水平有关。

关键词:补肺汤;慢性阻塞性肺疾病;线粒体自噬;PINK1/Parkin信号通路;活性氧;核转录因子-κB
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)04-0110-16

Effect of Bufei Decoction(补肺汤) on Mitochondrial Autophagy Mediated by PINK1/Parkin Signaling Pathway in COPD Lung Qi Deficiency Syndrome Model Rats

CHU Cancan[1,2],CHEN Guanglei[1],ZHENG Yuhao[1],YANG Changfu[1],ZHU Xing[1]
(1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine,Guiyang 550025,Guizhou,China;
2. People's Hospital of Anshun,Anshun 561000,Guizhou,China)

Abstract:*Objective* To investigate the mechanism of action of Bufei Decoction(补肺汤) in intervening chronic obstructive pulmonary disease(COPD) lung Qi deficiency by modulating the levels of mitochondrial autophagy mediated by phosphatase and tensin homolog-induced putative kinase protein 1(PINK1)/RBR domain E3 ubiquitin protein ligase(Parkin) signaling path-

基金项目:国家自然科学基金项目(81960830);贵州中医药大学-贵中医创新团队项目(贵中医TD合字〔2023〕002号)
作者简介:褚璨灿(1993-),女,贵州普定人,主治医师,博士在读,研究方向:中医防治肺系疾病基础。
通讯作者:朱星(1975-),男(土家族),贵州思南人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:中医防治肺系疾病基础。E-mail:11863362@qq.com。

way. *Methods* The rats were randomly divided into the control group and the modeling group, and a rat model of COPD lung Qi deficiency was created by using passive smoke inhalation combined with intra - airway lipopolysaccharide drip. At the end of modeling, the rats in the modeling group were randomly divided into the model group, Bufei Decoction medium - dose group, Bufei Decoction high - dose group and 3 - methyladenine (3 - MA) group. The Bufei Decoction medium - and high - dose groups were given Bufei Decoction drug solution by gavage (7.29, 14.58 g · kg^{-1}), and 3 - MA group was given 3 - MA (15 mg · kg^{-1}) by intraperitoneal injection, and each group was intervened with the drug once daily for 28 d consecutively. Hematoxylin - eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes in lung tissues. The transmission electron microscopy was used to observe ultrastructural changes in alveolar type Ⅱ epithelial cells in lung tissues. The immunohistochemistry (IHC) method was used to detect the positive expressions of PINK1, Parkin, autophagy receptor protein P62 (sequestosome 1, P62/SQSTM1) and microtubule - associated protein 1 light chain 3 (LC3) proteins in lung tissues and protein immunoblotting (Western blot) to detect the expressions of PINK1 in mitochondria in lung tissues, Parkin, P62, LC3 Ⅱ/LC3I protein expression in mitochondria of lung tissues. Flow cytometry detected the changes of mitochondrial membrane potential in lung tissues. The reactive oxygen species fluorescent probe dichloro - dihydro - fluorescein diacetate (DCFH - DA) and mitochondrial superoxide (MitoSOX) red fluorescent probe were used to determine the levels of reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) in lung tissues by flow cytometry, respectively. Western blot detected the expressions of nuclear factor - κB P65 (NF - κB P65) and phosphorylation of nuclear factor - κB P65 (p - NF - κB P65) proteins in lung tissues. *Results* Compared with that in the control group, the lung tissue damage in the model group was severe. Compared with that in the model group, the pathological damages in the Bufei Decoction medium - and high - dose groups and 3 - MA group were improved to different degrees. Compared with those of the control group, the lung tissue of the model group showed severe damage to alveolar type Ⅱ epithelial cells and their mitochondrial structure, with a decrease in mitochondria and an increase in autophagic vesicles. Compared with those of the model group, the alveolar type Ⅱ epithelial cells and their mitochondrial structure of the model group showed a lesser degree of damage in the Bufei Decoction medium - and high - dose groups and the 3 - MA group, with a relatively higher increase in mitochondria and a decrease in autophagic vesicles. Compared with those in the control group, the protein expressions of PINK1, Parkin, LC3 and LC3 Ⅱ/LC3I were up - regulated ($P<0.01$) and the protein expression of P62 was down - regulated ($P<0.01$) in the lung tissues and mitochondria of lung tissue in the model group. Compared with those in the model group, the protein expressions of PINK1, Parkin and LC3 Ⅱ/LC3I were up - regulated ($P<0.01$) and the protein expression of P62 was down - regulated ($P<0.01$) in the lung tissues and mitochondria of lung tissue in the Bufei Decoction medium - and high - dose groups and 3 - MA group. The protein expressions of PINK1, Parkin, LC3 and LC3 Ⅱ/LC3I were down - regulated ($P<0.05$, $P<0.01$) and P62 protein expression was up - regulated ($P<0.01$). Compared with those in the control group, the mitochondrial membrane potential of lung tissues in the model group was decreased ($P<0.01$), the levels of ROS and mtROS were up - regulated ($P<0.01$), the difference in the expression of NF - κB P65 protein was not statistically significant, and the expression of p - NF - κB P65 protein was up - regulated ($P<0.01$). Compared with those of the model group, the mitochondrial membrane potential in the lung tissues of the Bufei Decoction medium - and high - dose groups and the 3 - MA group were elevated ($P<0.01$), the levels of ROS and mtROS were down - regulated ($P<0.01$), and the differences in the expression of NF - κB P65 proteins were not statistically significant, and the expression of p - NF - κB P65 protein was down - regulated ($P<0.01$). *Conclusion* Bufei Decoction inhibited lung tissue ROS levels and the activation of NF - κB P65, thereby attenuating the oxidative damage and inflammatory responses in the lung of COPD lung Qi deficiency, and its mechanism of action may be related to the inhibition of the level of mitochondrial autophagy mediated by the PINK1/Parkin signaling pathway.

Keywords: Bufei Decoction (补肺汤); chronic obstructive pulmonary disease; mitochondrial autophagy; PINK1/Parkin signaling pathway; reactive oxygen species; nuclear transcription factor - κB

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种以持续的慢性咳嗽、喘息、胸闷等为临床特征的常见慢性疾病[1],以慢性气道炎症、肺气肿等为病理表现[2],随着病情的进展,最终导致呼吸衰竭[3]。COPD作为全球第三大常见的导致死亡的疾病及全球性社会公共卫生问题,严重影响患者生活质量,并造成巨大的社会经济负担[1]。探索新的治疗途径及治疗方法,从而改善COPD患者的生活质量,延长COPD患者的寿命是呼吸系统疾病领域亟待解决的首要问题。近年的研究已经揭示出线粒体自噬水平异常与COPD氧化应激、炎症反应等病理机制密切相关。张力素同源物诱导的激酶蛋白1(phosphatase and tensin homolog - induced putative kinase protein 1, PINK1)/RBR结构域的E3泛素连接酶(parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase, Parkin)信号通路是介导线粒体自噬的关键通路,PINK1/Parkin信号通路介导的线粒体自噬水平异常可加剧COPD的进展[4]。因此,调控PINK1/Parkin通路介导的线粒体自噬水平对于COPD的防治具有重要意义。

COPD属于中医学"肺胀"的范畴。中医药治疗COPD疗效确切,已在临床普遍使用。补肺汤最早记载于元代李仲南所著的《永类铃方》,全方由人参、黄芪、熟地黄、五味子、紫菀、桑白皮六味药物组成。在临床,补肺汤主要用于治疗COPD、慢性支气管炎等呼吸系统疾病的肺气虚证。既往多以调节炎症反应、免疫失衡、氧化应激等为研究方向探讨补肺汤治疗COPD的作用机制,然而,以线粒体自噬为方向探索中医药治

疗 COPD 的研究是鲜少的。本研究以 PINK1/Parkin 通路介导的线粒体自噬与氧化损伤、炎症反应的相关性为切入点，进一步揭示补肺汤治疗 COPD 的作用机制，为其临床治疗 COPD 肺气虚证提供更充分的科学依据。

1 材料

1.1 动物

48 只 SPF 级雄性 Wistar 大鼠，6～8 周龄，体质量（220 ± 20）g，均购自湖北省实验动物研究中心，许可证号 SCXK（鄂）2020－0018。本研究动物实验及操作经湖北省疾病预防控制中心实验动物管理与使用委员会批准，批准号：安评中心动（福）第 202 420 198 号。

1.2 药物与试剂

补肺汤药物组成：黄芪 24 g，熟地黄 24 g，人参 9 g，蜜紫菀 9 g，桑白皮 9 g，五味子 6 g，中药饮片购于贵州中医药大学第一附属医院中药房，经贵州中医药大学药学院孙庆文教授鉴定为正品。补肺汤药物采用水煎法并浓缩成生药含量 1.5 g·mL^{-1}的浓缩液；异氟烷（瑞沃德，批号 20221004）；红金龙香烟（湖北中烟工业有限责任公司，焦油量 9 mg、烟气烟碱量 0.8 mg、烟气一氧化碳量 11 mg）；脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）（biosharp，货号 BS904）；3－甲基腺嘌呤（3－methyladenine，3－MA）（MCE，货号 HY－19312）；二甲苯、30% 过氧化氢（国药集团，货号 10023418、10011218）；伊红染液、Mayer 苏木素染液、JC－1 线粒体膜电位检测试剂盒（旗赛生物，货号 BT－P109、BT－P107、QS－S313）；包埋石蜡、中性树胶（国药集团，货号 69019361、10004160）；兔多抗 PINK1（生工，货号 D160935）；兔多抗 Parkin、兔多抗 P62、兔多抗 PINK1（Bioss，货号 bs－23687R、bs－2951R、bs－22173R）；兔多抗微管相关蛋白 1 轻链 3（microtubule－associated protein 1 light chain 3，LC3）B、兔多抗磷酸化核转录因子－κB P65（phosphorylation of nuclear factor－κB P65，p－NF－κB P65）（Bioworld，货号 AP0762、BS66162）；免疫显色试剂盒（安捷伦，货号 K5007）；正常山羊血清（BOSTER，货号 AR1009）；PBS（biosharp，货号 BL551A）；BCA 蛋白浓度测定试剂盒（广州捷倍斯生物科技有限公司，货号 G3522）；兔多抗 Parkin、兔多抗 LC3B、小鼠单抗 GAPDH、兔多抗核转录因子－κB P65（nuclear factor－κB P65，NF－κB P65）、HRP 标记羊抗小鼠二抗（武汉三鹰生物技术有限公司，货号 14060－1－AP、14600－1－AP、60004－1－Ig、10745－1－AP、SA00001－1）；兔多抗 P62（CST，货号 39749T）；兔多抗 VDAC1（Affinity，货号 AF5478）；HRP 标记羊抗兔二抗、组织线粒体分离试剂盒、细胞活性氧（reactive oxygen species，ROS）检测试剂盒（碧云天生物技术有限公司，货号 A0208、C3606、S0033S）；线粒体超氧化物（mitochondrial superoxide，MitoSOX）Red Mitochondrial Superoxide Indicator 线粒体超氧化物红色荧光探针（翌圣，货号 40778ES50）。

1.3 仪器

F500 Series 型麻醉机（EZVET）；JT－12J 型组织脱水机、JB－L6 型组织包埋机（武汉俊杰电子有限公司）；FLEXACAM C1 型显微镜、RM 2016 型生物组织石蜡切片机（Leica）；H22－X2 型抗原修复用电陶炉（九阳）；HT7800 型透射电镜（Hitachi TEM）；DYCZ－40 型电转仪（北京六一仪器厂）；WIX－easyPRO4 型垂直电泳槽（韦克斯）；MQX200 型酶标仪（BIO－Tek）；H1－16K 型离心机（湖南可成仪器设备有限公司）；Tissvelyser－24L 型自动研磨仪（上海净信）；CytoFLEX 型流式细胞仪（BECKMAN）；BPN－150CH（UV）型 CO_2 恒温培养箱（上海一恒）。

2 方法

2.1 分组与模型制备

将 48 只大鼠适应性喂养后随机分为对照组 8 只和造模组 40 只。参照文献[5]采用香烟和锯末点燃烟熏联合气管内滴注 LPS 的方法，建立 COPD 肺气虚证大鼠模型。第 1 天和第 14 天，大鼠以异氟烷麻醉。麻醉后剃除颈部毛发，碘伏消毒，于颈部正中作切口暴露气管，造模组大鼠向气管内注射 100 μL LPS（2 mg·mL^{-1}），对照组注射等量生理盐水；注射完毕后，使大鼠直立并左右旋转 15 s。术毕，缝合伤口，再次消毒后放回笼盒正常饲养。术后第 2～13 天和第 15～23 天，造模组使用 50 g 锯末加入香烟烟丝 7.11 g 混合点燃烟熏，烟熏 1 次/d，30 min/次；第 24～30 天，烟熏 3 次/d，30 min/次。以大鼠肺组织病理学改变作为判断 COPD 模型成功标准依据，肺气虚证模型成功依据以生物学体征变化为判定标准[6]。

2.2 给药干预

造模结束后，将 32 只造模组大鼠再随机分为模型组、补肺汤中剂量组、补肺汤高剂量组、3－MA 组，每组 8 只。因前期研究结果表明补肺汤中、高剂量组干预 COPD 肺气虚证模型大鼠的效果优于低剂量组[7]，故本研究中未设置补肺汤低剂量组。参照大鼠等效剂量相当于人的 6.3 倍，补肺汤中、高剂量组按人体临床常用剂量的 1、2 倍折算。补肺汤中剂量组给予 7.29 g·kg^{-1}生药量的补肺汤灌胃，补肺汤高剂量组给予 14.58 g·kg^{-1}生药量的补肺汤灌胃，参考文献[8]3－MA 组以 15 mg·kg^{-1}的 3－MA 腹腔注射给药。同时，对照组、模型组、3－MA 组以 10 mL·kg^{-1}生理盐水灌胃，对照组、模型组、补肺汤中、高剂量组给予腹腔注射等体积的 3－MA 溶剂。每组每日药物干预 1 次，连续干预 28 d。

2.3 标本采集

所有大鼠末次给药结束 24 h 后，麻醉、开胸，心脏采血。左肺取边缘位置 3 个 1 mm^3 大小的组织块，用预冷的 2.5% 多聚甲醛固定后用于电镜检测，剩余组织以 4% 多聚甲醛固定用于病理染色；右肺分成 3 份，其中 2 份用新鲜 PBS 浸泡，4 ℃短暂保存用于细胞分离及线粒体分离，1 份液氮速冻后，保存于－80 ℃用于后续蛋白免疫印迹法（Western blot）检测。

2.4 指标检测

2.4.1 苏木素－伊红（hematoxylin－eosin，HE）染色观测肺组织病理改变 对肺组织进行梯度酒精脱水处理后，使用二甲苯使组织透明，再进行浸蜡、包埋，包埋好的蜡块进行切片、烤箱烤片。切片脱蜡、复染核，1% 水溶性伊红染液染色，浸洗。脱水、透明，风干后中性树胶封片，光镜下镜检。

2.4.2 透射电镜下观测肺组织中肺泡Ⅱ型上皮细胞超微结构的变化 取新鲜肺脏组织，将取样组织修剪至体积 1 mm^3 内的大小，修剪好的组织块迅速放入电镜固定液中，4 ℃下保存预固定。0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗，1% 的锇酸·0.1 mol/L 磷酸缓冲液室温固定 2 h。酒精上行脱水，渗透、包埋后进行超薄切片，切片进行铀铅双染色室温干燥过夜。透射电镜观察。

2.4.3 免疫组化（immunohistochemistry，IHC）检测肺组织中 PINK1、Parkin、P62、LC3 蛋白的阳性表达 取肺组织进行脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、烤片、切片脱蜡，电陶炉进行抗原修复，3% 过氧化氢滴加于切片组织上以阻断内源性过氧化物酶，

实验正常山羊血清室温封闭。分别滴加稀释好的一抗 PINK1(1∶100)、Parkin(1∶100)、P62(1∶100)、LC3(1∶200),4 ℃孵育过夜。滴加 HRP 标记的山羊抗兔二抗,37 ℃孵育 30 min。DAB 显色、mayer 苏木素复染、脱水、封片,在显微镜下观察、采集图像。

2.4.4 Western blot 检测肺组织线粒体中 PINK1、Parkin、P62、LC3Ⅱ/LC3I 蛋白表达 肺组织剪切成细小碎片,加入线粒体分离试剂、匀浆,匀浆液离心、取上清再次离心,去除上清,沉淀即为线粒体。加入线粒体裂解液、离心、收集上清,提取线粒体蛋白。使用 BCA 法测定蛋白浓度、进行蛋白变性。电泳分离、转模、室温摇床封闭 2 h。分别对应加入一抗 PINK1(1∶1000)、Parkin(1∶2000)、P62(1∶1000)、LC3(1∶3000)、VDAC1(1∶1000),4 ℃孵育过夜。加入 HRP 标记羊抗兔二抗(1∶1000)孵育 2 h。将 ECL 试剂中增强液与稳定的过氧化物酶溶液按 1∶1 比例混匀,滴加于 PVDF 膜上,胶片依次进行显影、定影、冲洗、晾干,扫描胶片,用 ipp 分析胶片灰度值。

2.4.5 流式细胞术检测肺组织线粒体膜电位变化情况 肺组织细胞分离:取肺组织剪碎,加入 0.25% 胰酶,置于 37 ℃水浴摇床,吹打组织,取上清液,加入完全培养基终止反应;过 200 目的筛网,充分冲洗,收集滤液、离心,弃去上清,收集沉淀。按照 JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒操作说明进行,流式细胞仪上机检测分析。研究中以绿光/红光的比值来判断线粒体膜电位变化情况,比值越高代表线粒体膜电位去极化水平越高、线粒体膜电位越低。

2.4.6 活性氧荧光探针(dichloro-dihydro-fluorescein diacetate,DCFH-DA)经流式细胞仪测定肺组织内 ROS 水平 取肺组织分离提取细胞,加入稀释好的 DCFH-DA,37 ℃培养箱孵育后,用无血清培养基洗涤细胞,离心、去上清、重悬,流式细胞仪上机检测。

2.4.7 MitoSOX 荧光探针经流式细胞仪检测肺组织线粒体活性氧(mitochondrial reactive oxygen species,mtROS)的水平 取肺组织分离提取细胞后,按照细胞 MitoSox Red 线粒体超氧化物检测试剂盒操作说明进行,流式细胞仪上机检测。

2.4.8 Western blot 检测肺组织中 NF-κB P65、p-NF-κB P65 蛋白表达 取肺组织提取总蛋白,使用 BCA 法测定蛋白浓度、进行蛋白变性。电泳分离、转模、室温摇床封闭 2 h。分别对应加入一抗 NF-κB P65(1∶3000)、p-NF-κB P65(1∶1000)、GAPDH(1∶50 000),4 ℃孵育过夜。分别加入对应的 HRP 标记二抗 1∶1000(羊抗兔)、1∶10 000(羊抗小鼠)孵育 2 h。将 ECL 试剂中增强液与稳定的过氧化物酶溶液按 1∶1 比例混匀,滴加于 PVDF 膜上,胶片依次进行显影、定影、冲洗、晾干,扫描胶片,用 ipp 分析胶片灰度值。

2.5 统计学分析

统计分析软件是 SPSS 21,计量数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间显著性差异比较采用单因素方差分析(One way ANOVA),方差齐者组间比较采用 LSD 检验,方差不齐者采用 Tamhane T2 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般情况及症状、体征的观察

对照组大鼠精神、活动状态佳,毛白、浓密光泽,呼吸正常、鼻部未见分泌物。造模大鼠在造模 2 周后出现毛黄枯槁无光泽、毛量稀疏,饮水、饮食量减少,体质量下降,喷嚏、咳嗽、气喘,呼吸频率加快、呼吸音增粗,流黄色浓稠鼻涕;随着造模时间延长,鼻涕转为清稀透明,并出现蜷伏少动、拱背蜷卧、撮毛,大便干结。给药干预后,相比模型组,各给药组大鼠的上述情况均有改善。造模过程中,造模组大鼠死亡 8 只,给药过程无大鼠死亡。

3.2 光镜下观察各组大鼠肺组织病理学改变

对照组的肺组织内肺泡大小均一,肺泡内无渗出液,气管上皮排列正常,未见明显细胞游离碎片及炎性浸润。与对照组相比,模型组的肺组织损伤严重,视野内肺间隔增厚,部分肺泡萎缩、塌陷、消失,大量气管上皮出现萎缩变形,同时出现较多细胞坏死、细胞游离碎片,细支气管腔内体积扩张,伴随大量炎症细胞浸润。与模型组相比,补肺汤中剂量组的肺组织内少量肺泡萎缩、塌陷,肺间隔轻度增厚,伴随少量炎症细胞浸润,气管上皮轻微脱落,整体病变较中等;补肺汤高剂量组的肺组织内肺泡大小基本均一,肺间隔轻微增厚,未见明显渗出液,气管结构基本完整,视野内少量炎症细胞浸润;3-MA 组肺组织内出现轻度肺间隔增厚,部分视野肺泡结构消失,气管上皮微量空泡出现,整体病变中等。见插页Ⅶ图 1。

3.3 透射电镜下肺组织中肺泡Ⅱ型上皮细胞超微结构的变化

对照组肺组织中肺泡Ⅱ型上皮细胞板层小体结构无明显损伤,内质网无扩张,线粒体正常分布、线粒体脊结构完整,未见明显自噬结构。与对照组相比,模型组肺组织中肺泡Ⅱ型上皮细胞板层小体出现明显的聚团甚至断裂、空泡样,内质网扩张严重,整个胞浆松散,线粒体损伤严重,线粒体脊结构明显增厚甚至断裂,线粒体极少,自噬小体增多。与模型组相比,补肺汤中、高剂量组和 3-MA 组肺泡Ⅱ型上皮细胞板层小体结构损伤相对较轻,线粒体结构损伤程度较轻,线粒体相对增多,自噬小体减少。见插页Ⅷ图 2。

3.4 各组大鼠肺组织中 PINK1、Parkin、P62、LC3 蛋白阳性表达的变化

PINK1、Parkin、P62、LC3 蛋白在肺泡上皮细胞、气道上皮细胞、巨噬细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞、内皮细胞中均有表达。与对照组相比,模型组的 PINK1、Parkin、LC3 的蛋白表达上调($P<0.01$)、P62 蛋白表达下调($P<0.01$);与模型组相比,补肺汤中、高剂量组和 3-MA 组的 PINK1、Parkin、LC3 的蛋白表达下调($P<0.01$)、P62 蛋白表达上调($P<0.01$)。图像中蓝色为细胞核,棕黄色或棕褐色为目标蛋白。见表 1、插页Ⅸ图3-插页Ⅻ图 6。

表 1 各组大鼠肺组织中 PINK1、Parkin、P62、LC3 蛋白的表达($\bar{x}\pm s$)

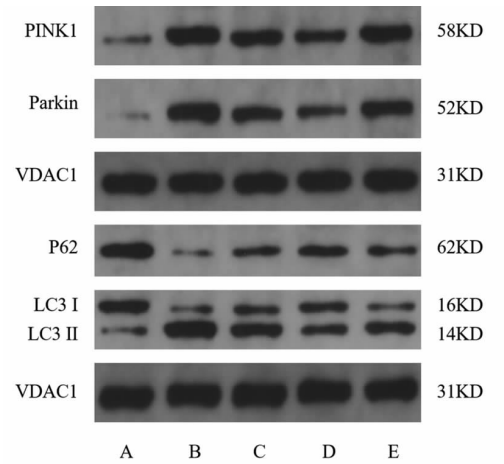
组别	n	PINK1	Parkin	P62	LC3
对照组	3	0.005 00±0.003 30	0.028 82±0.007 48	0.116 99±0.009 88	0.012 39±0.007 71
模型组	3	0.075 37±0.006 84[2)]	0.121 89±0.017 76[2)]	0.022 97±0.003 48[2)]	0.115 29±0.016 36[2)]
补肺汤中剂量组	3	0.045 80±0.006 12[4)]	0.076 15±0.005 64[4)]	0.056 11±0.013 82[4)]	0.075 16±0.002 35[4)]
补肺汤高剂量组	3	0.025 96±0.005 92[4)]	0.058 42±0.006 61[4)]	0.081 55±0.005 58[4)]	0.047 04±0.008 97[4)]
3-MA 组	3	0.044 09±0.009 13[4)]	0.076 33±0.007 16[4)]	0.062 08±0.005 08[4)]	0.067 74±0.017 08[4)]

注:2)与对照组比较,$P<0.01$;4)与模型组比较,$P<0.01$。

表2 各组大鼠肺组织线粒体中PINK1、Parkin、P62、LC3Ⅱ/LC3I蛋白的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PINK1/VDAC1	Parkin/VDAC1	P62/VDAC1	LC3Ⅱ/LC3I
对照组	5	0.133±0.020	0.121±0.034	0.817±0.068	0.221±0.073
模型组	5	0.822±0.080[2)]	0.674±0.037[2)]	0.167±0.050[2)]	4.808±0.205[2)]
补肺汤中剂量组	5	0.677±0.117[3)]	0.508±0.037[4)]	0.355±0.081[4)]	2.151±0.332[4)]
补肺汤高剂量组	5	0.468±0.122[4)]	0.343±0.050[4)]	0.558±0.086[4)]	1.076±0.180[4)]
3-MA组	5	0.653±0.116[4)]	0.509±0.042[4)]	0.342±0.078[4)]	2.270±0.519[4)]

注：2)与对照组比较，$P<0.01$；3)与模型组比较，$P<0.05$；4)与模型组比较，$P<0.01$。



注：A. 对照组，B. 模型组，C. 补肺汤中剂量组，D. 补肺汤高剂量组，E. 3-MA组。

图7 各组大鼠肺组织线粒体中PINK1、Parkin、P62、LC3Ⅱ、LC3I的蛋白电泳

3.5 各组大鼠肺组织线粒体中PINK1、Parkin、P62、LC3Ⅱ/LC3I蛋白表达

与对照组相比，模型组的PINK1、Parkin、LC3Ⅱ/LC3I的蛋白表达上调($P<0.01$)、P62蛋白表达下调($P<0.01$)；与模型组相比，补肺汤中、高剂量组和3-MA组的PINK1、Parkin、LC3Ⅱ/LC3I的蛋白表达下调($P<0.05$，$P<0.01$)、P62蛋白表达上调($P<0.01$)。见表2、图7。

3.6 各组大鼠肺组织中线粒体膜电位的水平

与对照组相比，模型组的绿/红荧光强度比值显著升高($P<0.01$)，表示线粒体膜电位降低；与模型组相比，补肺汤中、高剂量组和3-MA组的绿/红荧光强度比值显著降低($P<0.01$)，表示线粒体膜电位升高。见表3、插页Ⅻ图8。

表3 各组大鼠肺组织中线粒体膜电位的水平($\bar{x} \pm s$)

组别	n	绿/红荧光强度比值/(%)
对照组	5	0.34±0.020 096
模型组	5	1.18±0.036 288[2)]
补肺汤中剂量组	5	0.73±0.040 064[4)]
补肺汤高剂量组	5	0.52±0.036 624[4)]
3-MA组	5	0.73±0.051 529[4)]

注：2)与对照组比较，$P<0.01$；4)与模型组比较，$P<0.01$。

3.7 各组大鼠肺组织中ROS、mtROS的水平

与对照组相比，模型组肺组织的ROS、mtROS水平均上调($P<0.01$)；与模型组相比，补肺汤中、高剂量组和3-MA组的肺组织ROS、mtROS水平均下调($P<0.01$)。见表4、插页ⅩⅣ图9、插页ⅩⅤ图10。

3.8 各组大鼠肺组织中NF-κB P65、p-NF-κB P65蛋白的表达

与对照组相比，模型组的NF-κB P65蛋白表达差异无统计意义、p-NF-κB P65蛋白表达上调($P<0.01$)；与模型组相比，补肺汤中、高剂量组和3-MA组的NF-κB P65蛋白表达差异无统计意义、p-NF-κB P65蛋白表达下调($P<0.01$)。见表5、图11。

表4 各组大鼠肺组织中ROS、mtROS的水平($\bar{x} \pm s$)

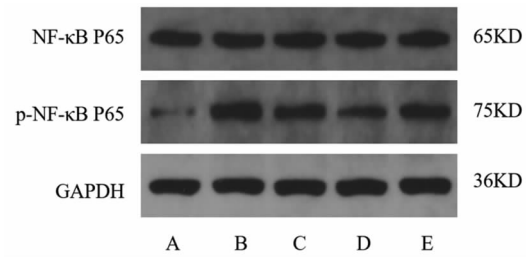
组别	n	肺组织ROS	肺组织mtROS
对照组	5	7 748.58±537.70	8 932.1±208.6
模型组	5	35 813.96±1 986.74[2)]	34 718.7±878.1[2)]
补肺汤中剂量组	5	21 116.08±1 978.21[4)]	25 903.6±2 013.7[4)]
补肺汤高剂量组	5	15 632.54±1 767.32[4)]	19 396.4±1 605.8[4)]
3-MA组	5	21 553.46±2 029.90[4)]	26 299.8±1 408.1[4)]

注：2)与对照组比较，$P<0.01$；4)与模型组比较，$P<0.01$。

表5 各组大鼠肺组织中NF-κB P65、p-NF-κB P65蛋白的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NF-κB P65/GAPDH	p-NF-κB P65/GAPDH
对照组	5	0.880±0.076	0.122±0.035
模型组	5	0.882±0.080	0.736±0.055[2)]
补肺汤中剂量组	5	0.880±0.104	0.512±0.037[4)]
补肺汤高剂量组	5	0.844±0.087	0.348±0.033[4)]
3-MA组	5	0.867±0.086	0.500±0.051[4)]

注：2)与对照组比较，$P<0.01$；4)与模型组比较，$P<0.01$。



注：A. 对照组，B. 模型组，C. 补肺汤中剂量组，D. 补肺汤高剂量组，E. 3-MA组。

图11 各组大鼠肺组织中NF-κB P65、p-NF-κB P65的蛋白电泳

4 讨论

香烟烟雾、环境污染等多种外源性因素导致肺中的氧化应激水平显著增加是COPD的主要致病因素[9-10]。氧化应激被定义为"促氧化剂和抗氧化剂之间的不平衡，伴随着氧化还原回路的失调和分子损伤"，其中包含ROS水平增加在内的化学反应[11]。ROS增加可导致线粒体结构和功能受损，受损线粒体是内源性ROS的主要来源，其通过释放更多的mtROS进一步激活氧化应激，直接损伤肺与气道的同时又将加重对线粒体的损害[12-17]。mtROS的增加还可进一步导致慢性肺部疾病中的炎症反应。核转录因子-κB(nuclear factor-κB，NF-κB)是一种广泛存在体内调节各种促炎细胞因子转录的核转录因子，其活化与COPD的发生发展密切相关[18]。NF-κB激活的

关键步骤依赖于磷酸化，P65是NF－κB家族的成员之一[19]。mtROS通过激活NF－κB从而激活下游的炎性细胞因子[白细胞介素－1β(interleukin－1β，IL－1β)、白细胞介素－6(interleukin－6，IL－6)、肿瘤坏死因子－α(tumor necrosis factor－α，TNF－α)]，引发肺部级联炎症反应，增强COPD患者肺部的炎症，导致COPD进展[15－16]。线粒体自噬作为应对mtROS的一种机制，可调节mtROS的水平[20]，亦可以发挥调节炎症的作用[21]。

线粒体自噬是通过选择性降解受损线粒体来控制线粒体质量的一种自噬方式，COPD患者与动物、细胞模型中发现COPD的发病机理与线粒体自噬的过度增加有关，可导致上皮细胞、支气管细胞的程序性死亡[22－23]。PINK1/Parkin信号通路是最典型的介导线粒体自噬的信号通路，在线粒体自噬过程中发挥关键作用[24]。氧化应激导致线粒体损伤后，线粒体膜电位去极化从而激活该信号通路介导的线粒体自噬[25]。线粒体损伤导致膜电位去极化诱导PINK1稳定在线粒体外膜上，并招募Parkin到线粒体上，Parkin泛素化线粒体蛋白，泛素化蛋白通过自噬受体蛋白P62(sequestosome 1，P62/SQSTM1)与自噬体上的LC3连接[26]。LC3可分解成LC3I，在自噬过程中，LC3I与磷脂酰乙醇胺的结合可将LC3I转化为LC3Ⅱ，LC3Ⅱ附着在自噬体膜的两侧，诱导自噬体伸长、闭合最终包裹线粒体，从而形成线粒体自噬体，再通过微管轨道运输到溶酶体被降解[27－29]。

COPD属于中医学“肺胀”的范畴，病位在肺，涉及脾肾，久则病及于心[30]。“肺胀”早期肺气郁滞，随着病情加重，逐渐转变为肺气虚损，久病迁延不愈，终致肺脾肾三脏均虚[31]。“肺主气，司呼吸”，肺气是维持肺正常生理功能的核心。肺气亏损引起气机升降出入的异常，导致水液代谢障碍，出现痰浊、水饮、瘀血等病理产物伏聚于肺，又将进一步阻滞气机，耗伤肺气，从而加重“肺胀”，故本虚标实是该病的病机本质，痰、饮、瘀是其发生发展的主要病理因素。补肺汤最早记载于元代李仲南所著的《永类铃方》，全方由人参、黄芪、熟地黄、五味子、紫菀、桑白皮六味药物组成，方中黄芪补益肺气，人参健脾益气，培土生金，熟地滋肾填精，五味子收敛肺气，桑白皮与紫菀消痰止咳、降气平喘。全方攻补兼施，以补益肺气为主、兼顾脾肾，共奏补肺益气、消痰止咳、降气平喘的功效，是临床治疗COPD肺气虚证的经典方剂。我们的前期研究及既往研究表明补肺汤治疗COPD的作用机制与抑制氧化应激和炎症反应、调节免疫失衡等相关[7,32]。线粒体自噬异常与COPD发病机制密切相关，本研究通过香烟烟雾联合气道内滴注LPS的方法制造COPD肺气虚证大鼠模型，以线粒体自噬与氧化损伤、炎症反应的相关性为切入点，进一步探索补肺汤治疗COPD的作用机制。

研究结果显示，模型组大鼠肺组织损伤严重，肺泡Ⅱ型上皮细胞及其线粒体结构损伤、线粒体减少、自噬体增加，肺组织中线粒体膜电位降低，肺组织及肺组织线粒体中线粒体自噬通路蛋白PINK1、Parkin表达增加，P62的表达水平显著降低，LC3、LC3Ⅱ/LC3I的水平显著升高，肺组织ROS、mtROS、p－NF－κB P65的表达升高。P62的积累可解释为线粒体损伤加重而线粒体自噬水平不足导致受损线粒体未被充分清除[33]。结合线粒体损伤、线粒体膜电位降低、PINK1和Parkin表达增加、P62的表达水平降低、LC3和LC3Ⅱ/LC3I的水平显著升高、自噬体增多，表明本研究中模型组PINK1/Parkin信号通路被激活、线粒体自噬水平增强。该结果与近年的一项研究的结果是一致的，该研究通过PM2.5与香烟结合分别诱导人支气管上皮细胞(bronchial epithelial cells，Beas－2b)和大鼠制造COPD体内、外模型，其体内外研究结果均显示大量ROS的产生，线粒体结构损伤，PINK1和Parkin的表达水平升高，P62表达水平降低，LC3Ⅱ表达水平升高，线粒体自噬过度激活，细胞活力抑制、组织损伤[34]。3－MA作为自噬抑制剂，通过阻止自噬体的形成起到抑制自噬的作用[35]。我们的研究使用3－MA对造模后大鼠进行干预，发现3－MA组PINK1/Parkin信号通路及线粒体自噬水平被抑制，同时也降低了肺组织ROS、mtROS的水平、抑制了NF－κB P65的激活、减轻了肺泡Ⅱ型上皮细胞、线粒体、肺组织的损伤。我们的研究结果与目前的一些研究结果是一致的，这些研究通过使用3－MA抑制自噬的同时也抑制了ROS、mtROS的产生[36－37]。

补肺汤中、高剂量组的作用趋势与3－MA组是一致的，能抑制PINK1/Parkin信号通路及线粒体自噬水平、降低肺组织ROS和mtROS水平、抑制NF－κB P65的激活，减轻肺泡Ⅱ型上皮细胞、线粒体、肺组织的损伤。与3－MA组相比，补肺汤高剂量组的总体作用趋势更为显著。其他研究表明，补肺汤组成药物的有效成分具有抑制线粒体自噬、抑制ROS和炎症的作用。人参皂苷Rg1与黄芪甲苷降低炎症反应的作用机制与抑制PINK1/Parkin介导的线粒体自噬有关[38]；人参皂苷、黄芪甲苷、黄芪多糖、五味子醇提取物能减少ROS，降低线粒体损坏情况，地黄有保护因缺氧而致的线粒体功能下降的作用[39－42]。并且，目前用于治疗COPD的药物，如地塞米松、乙酰半胱氨酸都表现出对自噬的抑制作用[43－44]。

综上所述，补肺汤通过抑制ROS水平、NF－κB P65的激活，从而减轻COPD肺气虚证肺部氧化损伤和炎症反应，其作用机制可能与抑制PINK1/Parkin信号通路介导的线粒体自噬水平有关。我们将通过体外实验进一步验证补肺汤对PINK1/Parkin信号通路介导的线粒体自噬的影响，并通过基因干扰技术进一步明确补肺汤是否通过抑制PINK1/Parkin信号通路介导的线粒体自噬水平，从而发挥治疗COPD的作用。

参考文献

[1] FAIRLEY L H，DAS S，DHARWAL V，et al. Mitochondria－targeted antioxidants as a therapeutic strategy for chronic obstructive pulmonary disease[J]. Antioxidants (Basel)，2023，12(4)：973.

[2] BECKETT E L，STEVENS R L，JARNICKI A G，et al. A new short－term mouse model of chronic obstructive pulmonary disease identifies a role for mast cell tryptase in pathogenesis[J]. J Allergy Clin Immunol，2013，131(3)：752－762.

[3] LV X X，LI K，HU Z W. Chronic obstructive pulmonary disease and autophagy[J]. Adv Exp Med Biol，2020，1207：559－567.

[4] ARAYA J，TSUBOUCHI K，SATO N，et al. PRKN－regulated mitophagy and cellular senescence during COPD pathogenesis[J]. Autophagy，2019，15(3)：510－526.

[5] 王成阳，李泽庚. 六味补气胶囊对COPD肺气虚证大鼠JAK/STAT通路、MMPs/TIMP的影响[J]. 中华中医药杂志，2014，29(5)：1384－1390.

[6] 李瑞祥，陈斯宁，黎展华，等. 利金方对肺气虚证COPD大鼠$CD4^+$T细胞向Th17细胞分化的影响[J]. 时珍国医国药，2021，32(5)：1032－1034.

[7] 沈俊希，朱星，陈云志，等. 补肺汤对慢性阻塞性肺疾病肺气虚证大鼠肺－肠轴的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2023，29(7)：47－56.

[8] SHI Y F, TAO M, MA X Y, et al. Delayed treatment with an autophagy inhibitor 3 - MA alleviates the progression of hyperuricemic nephropathy[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(6): 467.
[9] ADELOYE D, SONG P G, ZHU Y J, et al. Global, regional, and national prevalence of, and risk factors for, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in 2019: a systematic review and modelling analysis[J]. Lancet Respir Med, 2022, 10(5): 447 - 458.
[10] BOUKHENOUNA S, WILSON M A, BAHMED K, et al. Reactive oxygen species in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 5730395.
[11] ALBANO G D, GAGLIARDO R P, MONTALBANO A M, et al. Overview of the mechanisms of oxidative stress: impact in inflammation of the airway diseases[J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(11): 2237.
[12] BULUA A C, SIMON A, MADDIPATI R, et al. Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1 - associated periodic syndrome (TRAPS)[J]. J Exp Med, 2011, 208(3): 519 - 533.
[13] 吕娜, 强丽霞, 赵婷婷, 等. 氧化应激在慢性阻塞性肺疾病发病机制中作用的研究进展[J]. 临床肺科杂志, 2016, 21(4): 746 - 749.
[14] BARNES P J, BAKER J, DONNELLY L E. Cellular senescence as a mechanism and target in chronic lung diseases[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2019, 200(5): 556 - 564.
[15] ARANDA - RIVERA A K, CRUZ - GREGORIO A, APARICIO - TREJO O E, et al. Mitochondrial redox signaling and oxidative stress in kidney diseases[J]. Biomolecules, 2021, 11(8): 1144.
[16] KIYOKAWA H, HOSHINO Y, SAKAGUCHI K, et al. Redox regulation in aging lungs and therapeutic implications of antioxidants in COPD[J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(9): 1429.
[17] ALFAHAD A J, ALZAYDI M M, ALDOSSARY A M, et al. Current views in chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis and management[J]. Saudi Pharm J, 2021, 29(12): 1361 - 1373.
[18] CHEN S, WANG Y, ZHANG H L, et al. The antioxidant MitoQ protects against CSE - induced endothelial barrier injury and inflammation by inhibiting ROS and autophagy in human umbilical vein endothelial cells[J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(7): 1440 - 1451.
[19] YU H, LIN L B, ZHANG Z Q, et al. Targeting NF - κB pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study[J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 209.
[20] PICKLES S, VIGIÉ P, YOULE R J. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance [J]. Curr Biol, 2018, 28(4): 170 - 185.
[21] DANIEL TAN W S, SHEN H M, FRED WONG W S. Dysregulated autophagy in COPD: a pathogenic process to be deciphered[J]. Pharmacol Res, 2019, 144: 1 - 7.
[22] ORNATOWSKI W, LU Q, YEGAMBARAM M, et al. Complex interplay between autophagy and oxidative stress in the development of pulmonary disease[J]. Redox Biol, 2020, 36: 101679.
[23] RACANELLI A C, KIKKERS S A, CHOI A M K, et al. Autophagy and inflammation in chronic respiratory disease[J]. Autophagy, 2018, 14(2): 221 - 232.
[24] ITO A, HASHIMOTO M, TANIHATA J, et al. Involvement of Parkin - mediated mitophagy in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease - related sarcopenia[J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2022, 13(3): 1864 - 1882.
[25] GEISLER S, HOLMSTRÖM K M, SKUJAT D, et al. PINK1/Parkin - mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1[J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(2): 119 - 131.
[26] HARA H, KUWANO K, ARAYA J. Mitochondrial quality control in COPD and IPF[J]. Cells, 2018, 7(8): 86.
[27] NARENDRA D, TANAKA A, SUEN D F, et al. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy[J]. J Cell Biol, 2008, 183(5): 795 - 803.
[28] VARGAS J N S, WANG C X, BUNKER E, et al. Spatiotemporal control of ULK1 activation by NDP52 and TBK1 during selective autophagy[J]. Mol Cell, 2019, 74(2): 347 - 362.
[29] NARENDRA D P, JIN S M, TANAKA A, et al. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin[J]. PLoS Biol, 2010, 8(1): e1000298.
[30] 丁庆刚, 高金良. 慢性阻塞性肺疾病的中医辨治[J]. 中国中医药现代远程教育, 2015, 13(14): 123 - 124.
[31] 杨毅. 基于络病理论探析慢性阻塞性肺疾病的中医药治疗[J]. 医药导报, 2021, 40(9): 1221 - 1224.
[32] 张钰, 朱星, 陈云志, 等. 补肺汤治疗呼吸系统疾病的临床及实验研究进展[J]. 中医学报, 2022, 37(3): 535 - 540.
[33] ITO S, ARAYA J, KURITA Y, et al. PARK2 - mediated mitophagy is involved in regulation of HBEC senescence in COPD pathogenesis[J]. Autophagy, 2015, 11(3): 547 - 559.
[34] FAN X Y, DONG T T, YAN K, et al. $PM_{2.5}$ increases susceptibility to acute exacerbation of COPD *via* NOX4/Nrf2 redox imbalance - mediated mitophagy[J]. Redox Biol, 2023, 59: 102587.
[35] PAN S, SHARMA P, SHAH S D, et al. Bitter taste receptor agonists alter mitochondrial function and induce autophagy in airway smooth muscle cells[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017, 313(1): L154 - L165.
[36] SIOUTAS A, VAINIKKA L K, KENTSON M, et al. Oxidant - induced autophagy and ferritin degradation contribute to epithelial - mesenchymal transition through lysosomal iron[J]. J Inflamm Res, 2017, 10: 29 - 39.
[37] OH S H, YOOK J M, JUNG H Y, et al. Autophagy caused by oxidative stress promotes TGF - β1 - induced epithelial - to - mesenchymal transition in human peritoneal mesothelial cells[J]. Cell Death Dis, 2024, 15(5): 365.
[38] 张东伟, 赵宏月, 李全生, 等. 黄芪甲苷及人参皂苷 Rg1 对高脂大鼠心肌缺血再灌注损伤后心肌线粒体自噬的影响[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(3): 60 - 64.
[39] 高若原, 高靖然, 赵浩宇, 等. 基于"线粒体动力学"探讨中药补气机制[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(13): 3684 - 3692.
[40] 吕艳杭, 吴姗姗, 王振常, 等. 中医药调控活性氧(ROS)抗肝纤维化的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(6): 117 - 121.
[41] 马洪月, 宋琳, 朴钟源, 等. 线粒体自噬在临床疾病中的作用及中药对其影响的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(19): 250 - 257.
[42] 汤依群, 戴德哉, 黄宝. 地黄对缺氧大鼠心脑肾线粒体呼吸功能的保护作用[J]. 中草药, 2002, 33(10): 915 - 917.
[43] ALBANO G D, MONTALBANO A M, GAGLIARDO R, et al. Autophagy/mitophagy in airway diseases: impact of oxidative stress on epithelial cells[J]. Biomolecules, 2023, 13(8): 1217.
[44] XU J, WANG L M, ZHANG L H, et al. Mono - 2 - ethylhexyl phthalate drives progression of PINK1 - parkin - mediated mitophagy *via* increasing mitochondrial ROS to exacerbate cytotoxicity[J]. Redox Biol, 2021, 38: 101776.

补肺汤对慢性阻塞性肺疾病肺气虚证模型大鼠PINK1/Parkin信号通路介导的线粒体自噬的影响

(正文见110－116页)

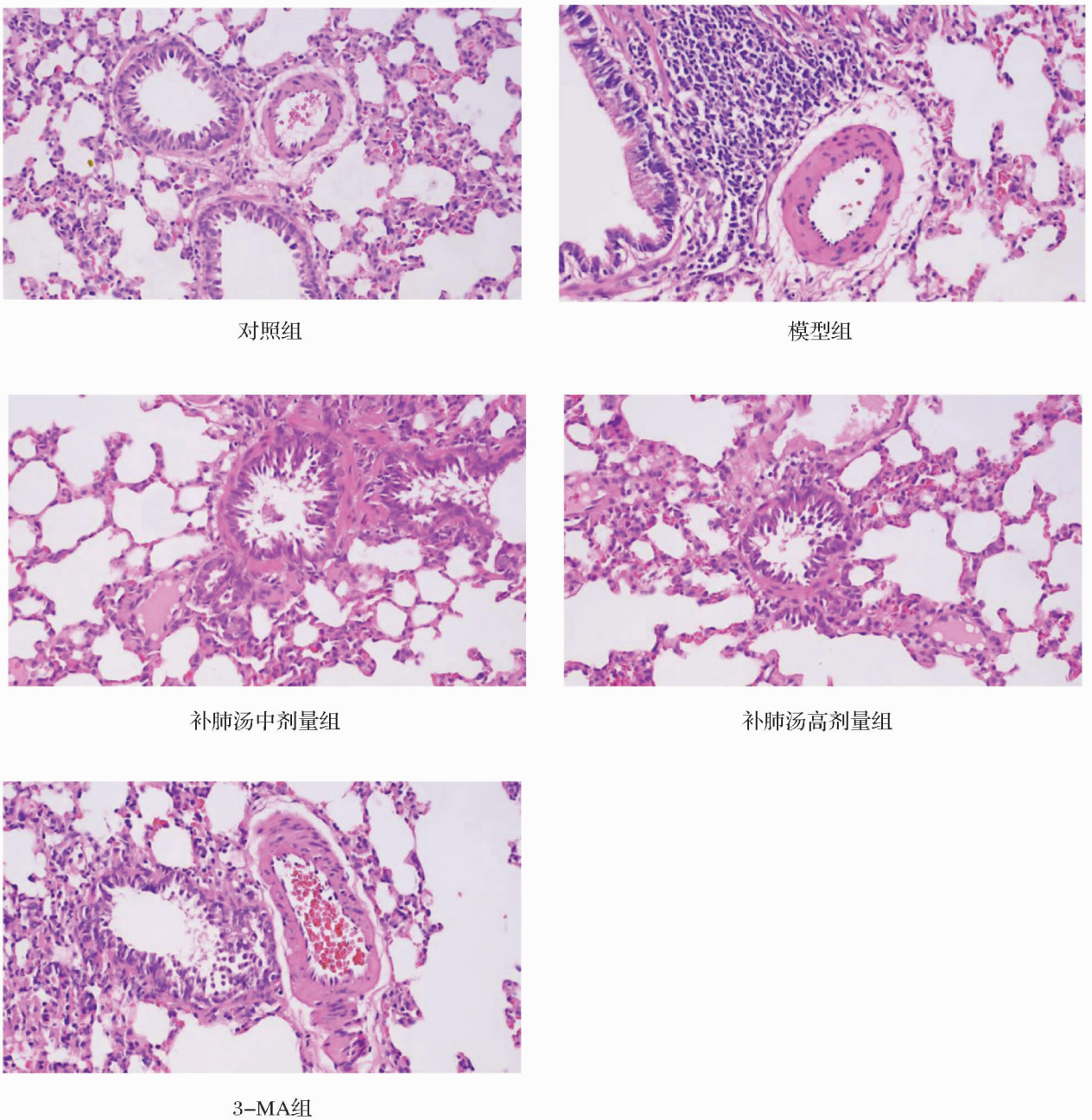
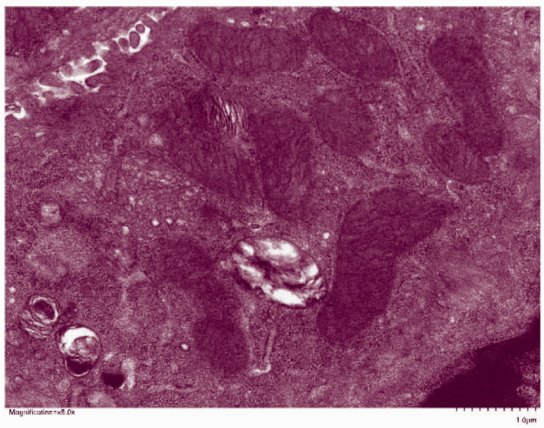
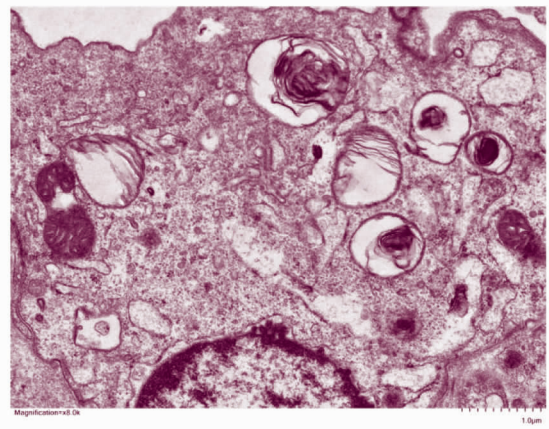


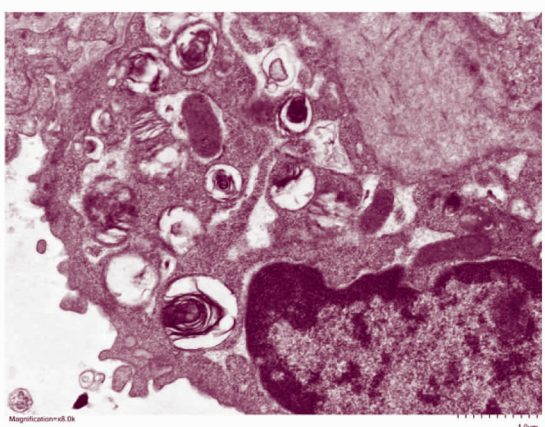
图1 各组大鼠肺组织的病理改变(HE,×200)



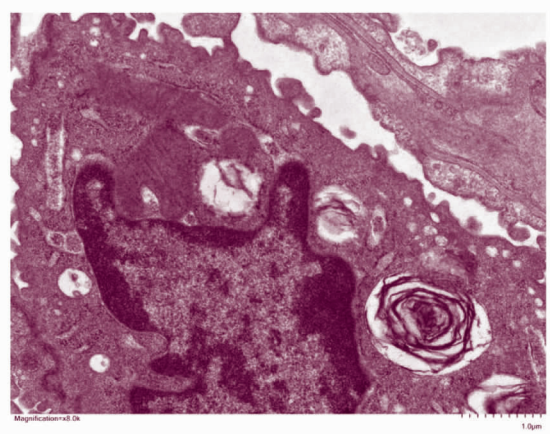
对照组



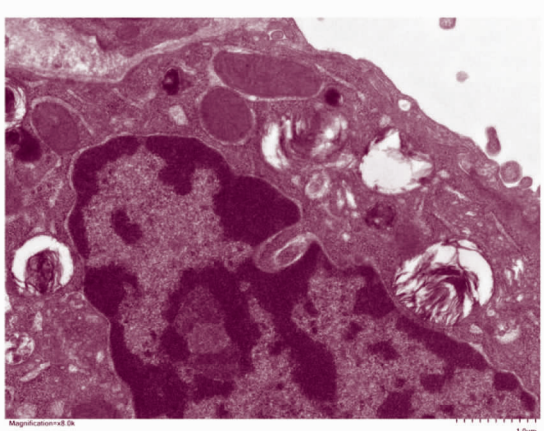
模型组



补肺汤中剂量组



补肺汤高剂量组



3-MA组

图2 各组肺组织中肺泡Ⅱ型上皮细胞超微结构的变化(×8 k)

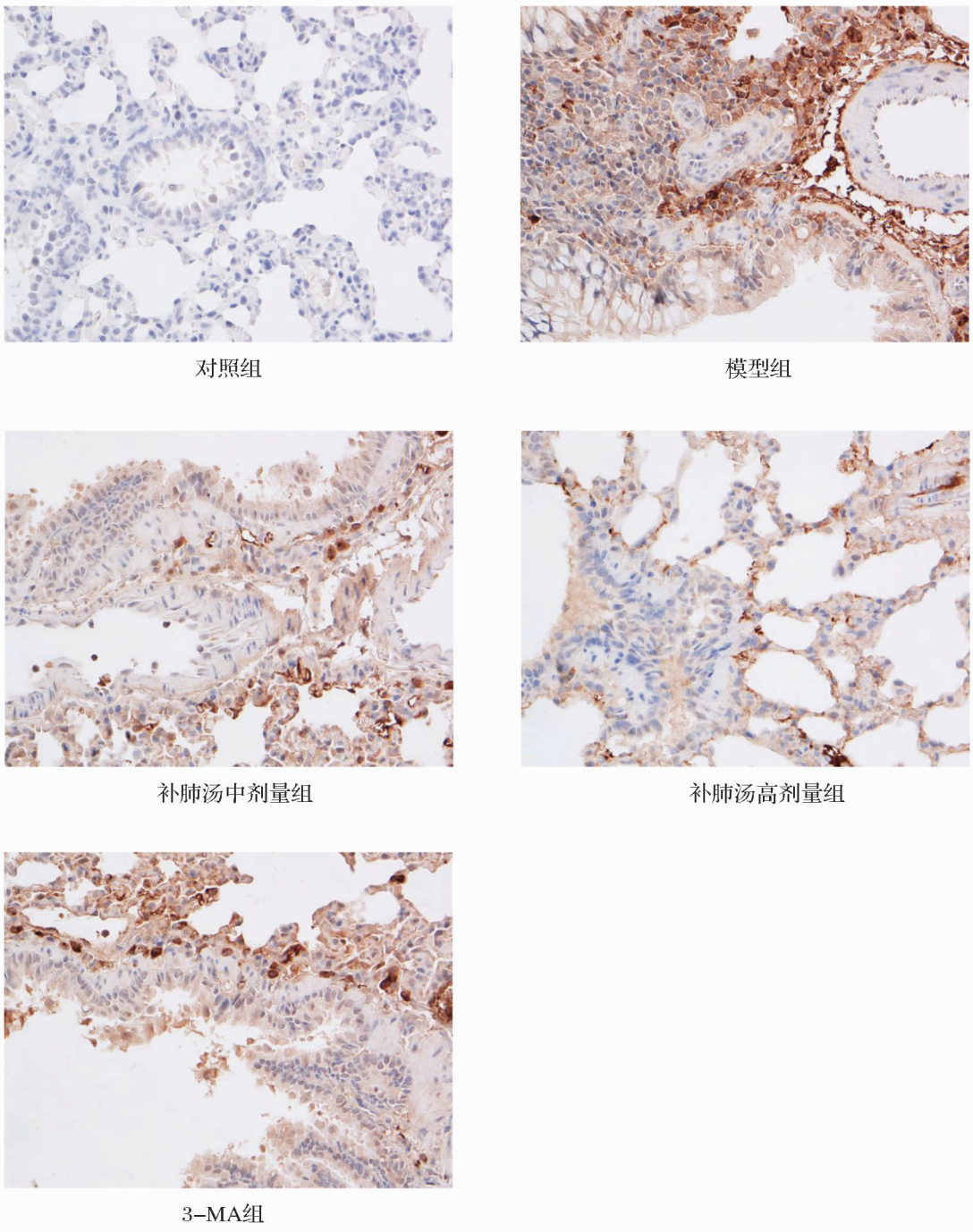


图 3 各组大鼠肺组织中 PINK1 蛋白的阳性表达(IHC, ×400)

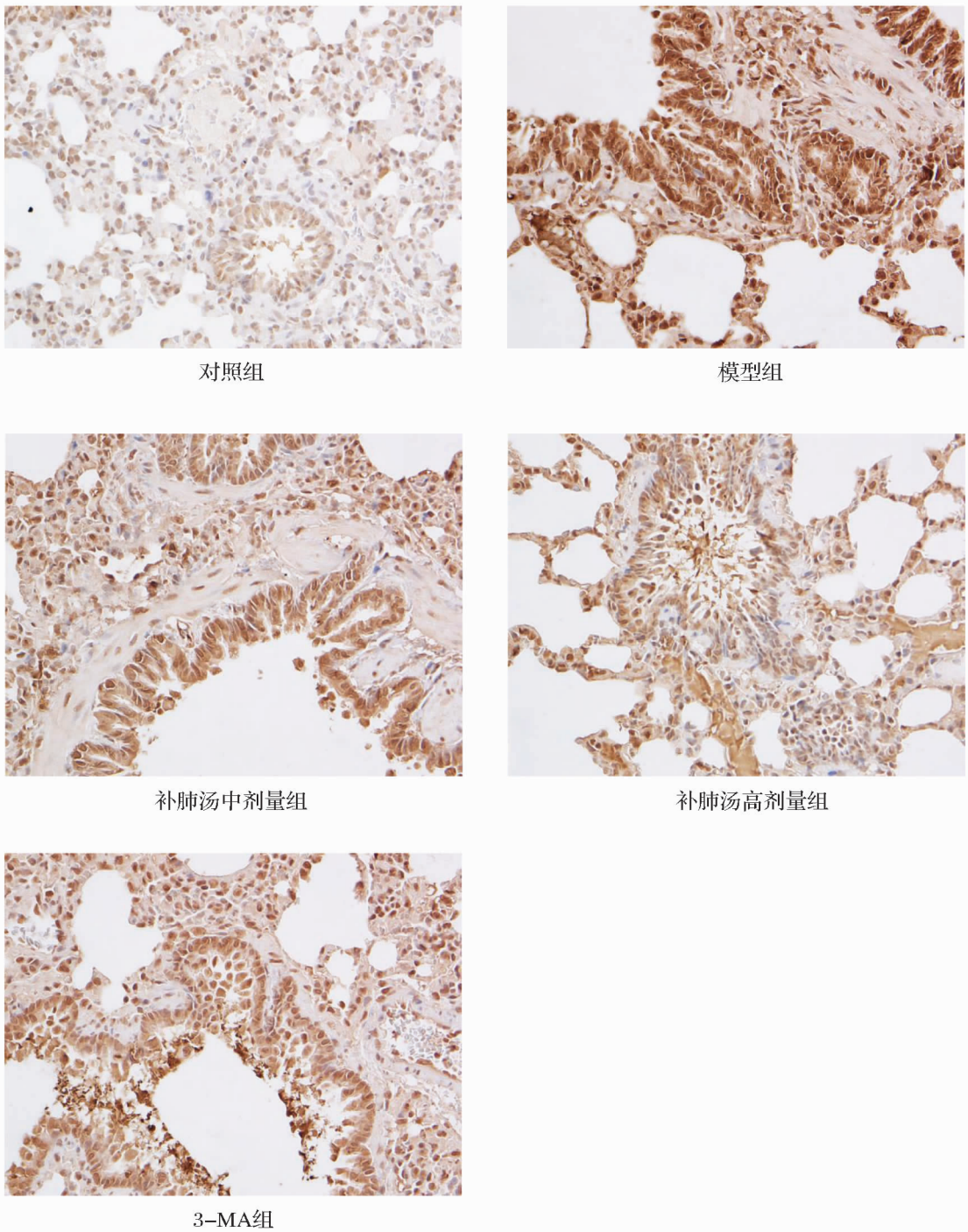
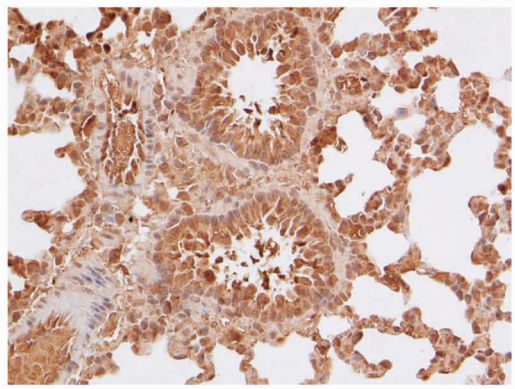
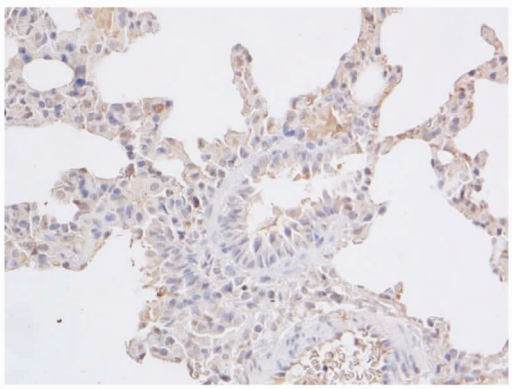


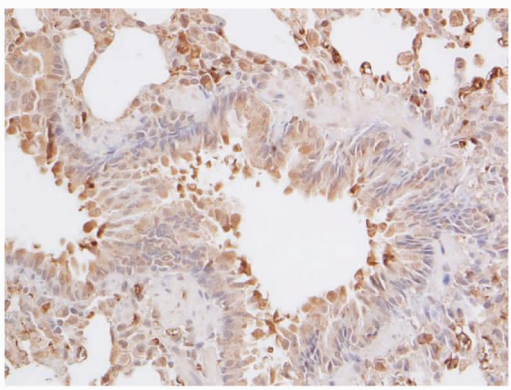
图4 各组大鼠肺组织中 Parkin 蛋白的阳性表达(IHC, ×400)



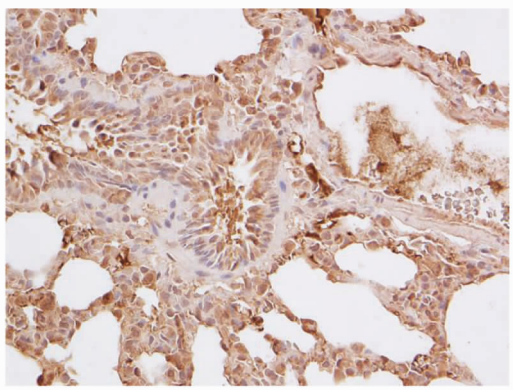
对照组



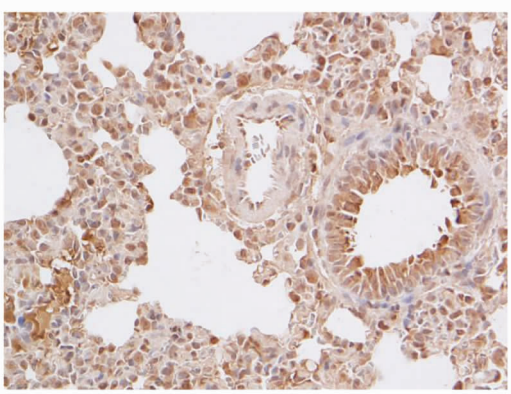
模型组



补肺汤中剂量组



补肺汤高剂量组



3-MA组

图 5　各组大鼠肺组织中 P62 蛋白的阳性表达(IHC, ×400)

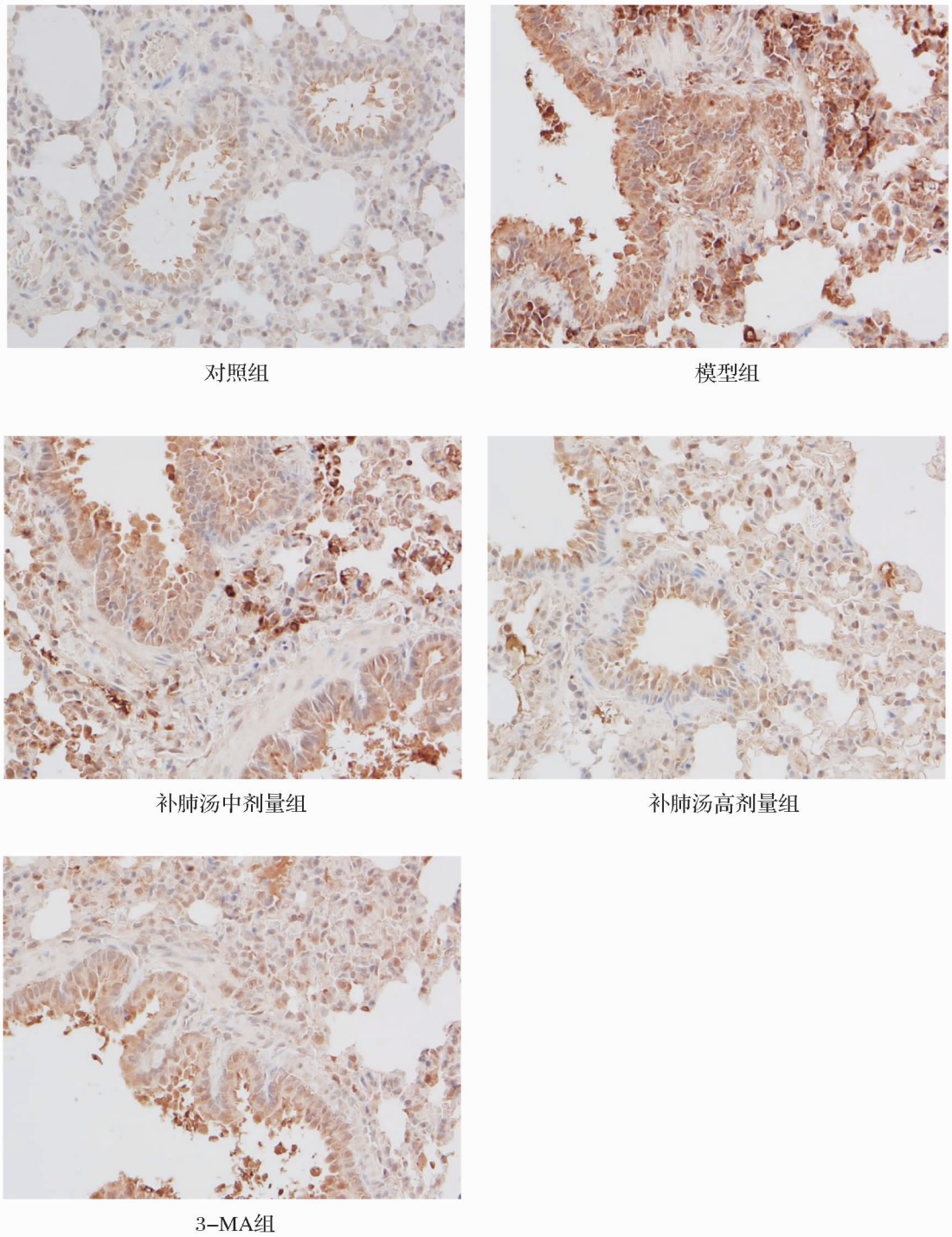


图6 各组大鼠肺组织中LC3蛋白的阳性表达(IHC,×400)

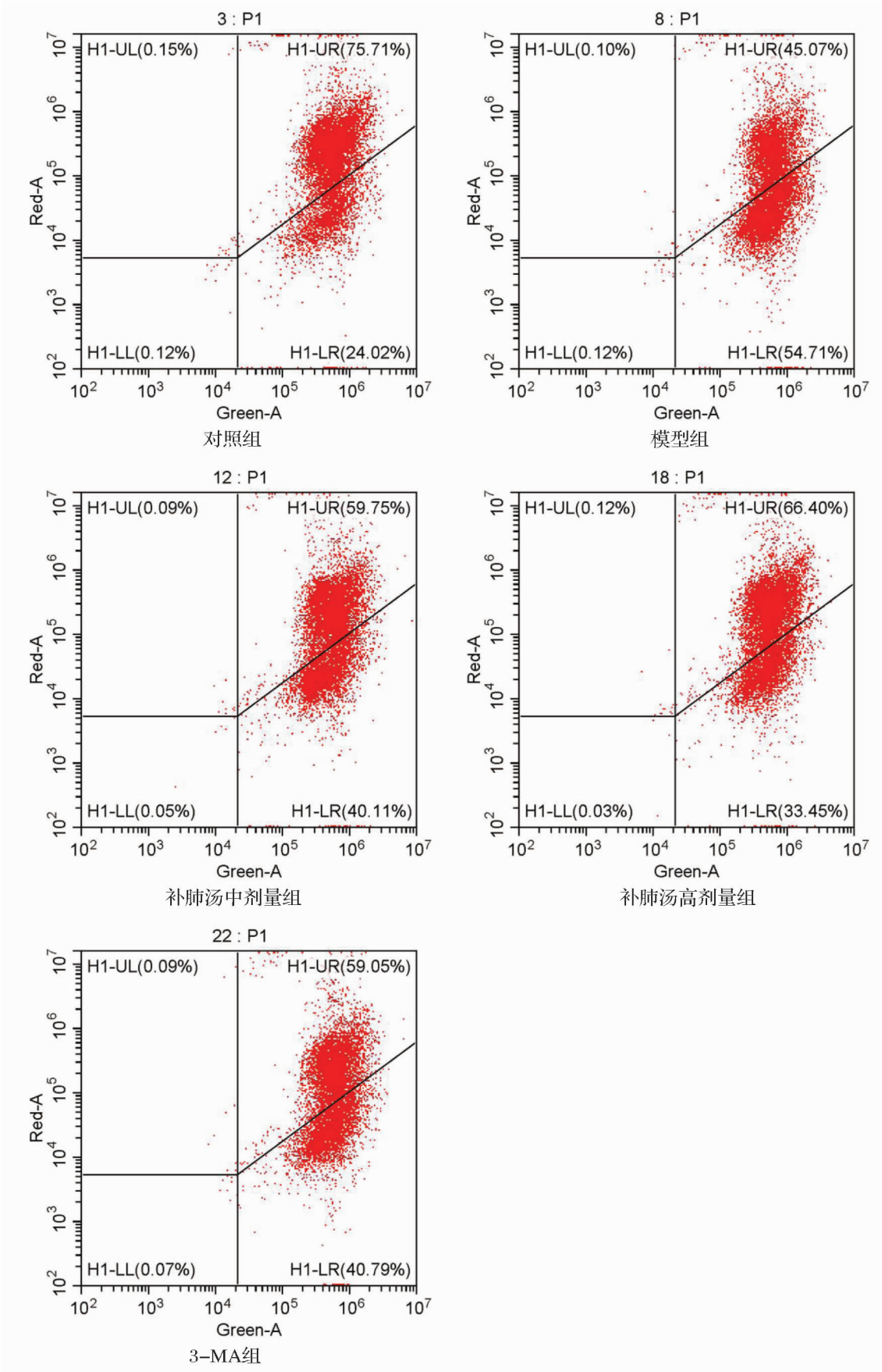


图8 各组大鼠肺组织中线粒体膜电位流式细胞图

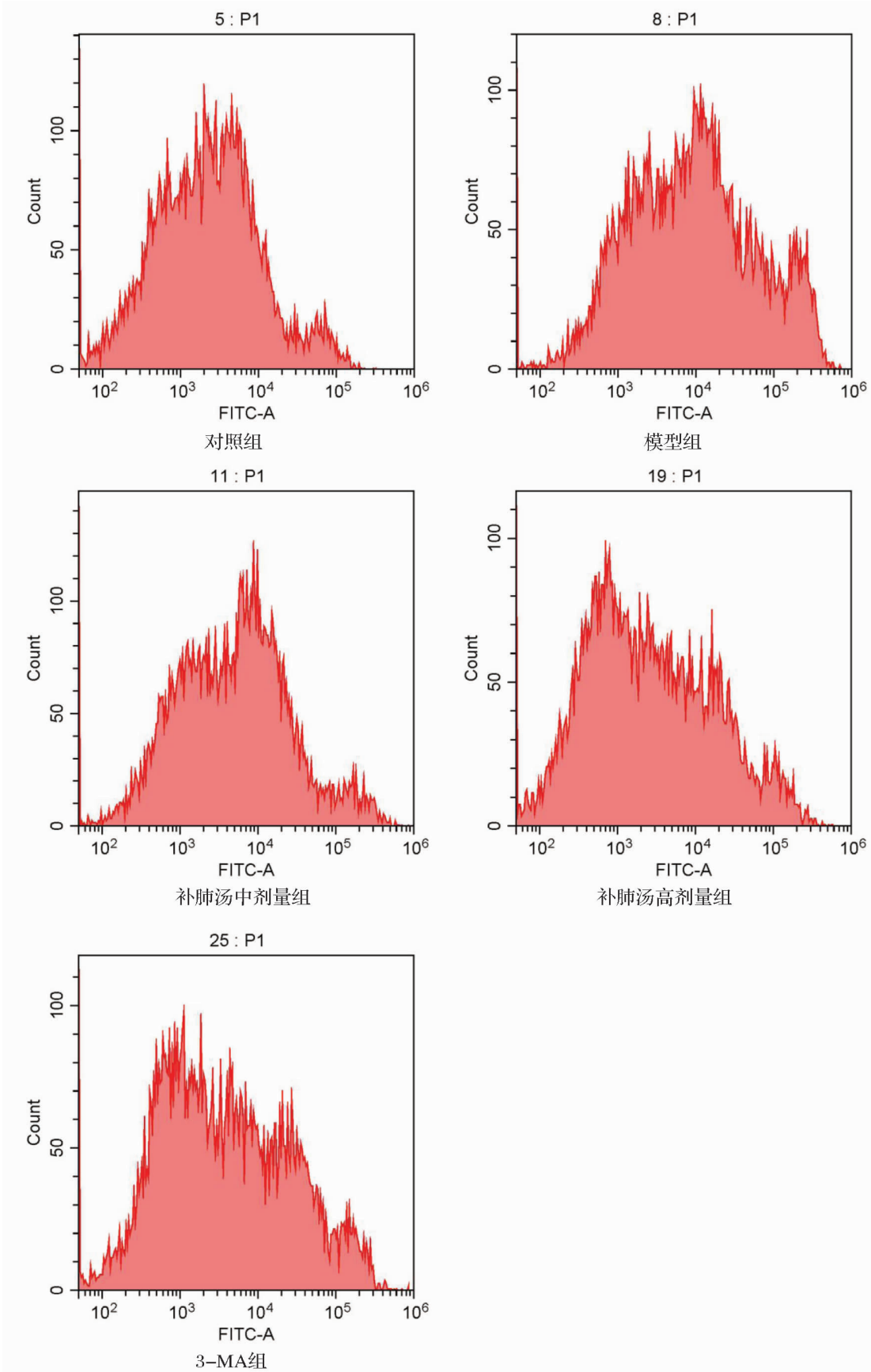


图 9 各组大鼠肺组织 ROS 流式细胞图

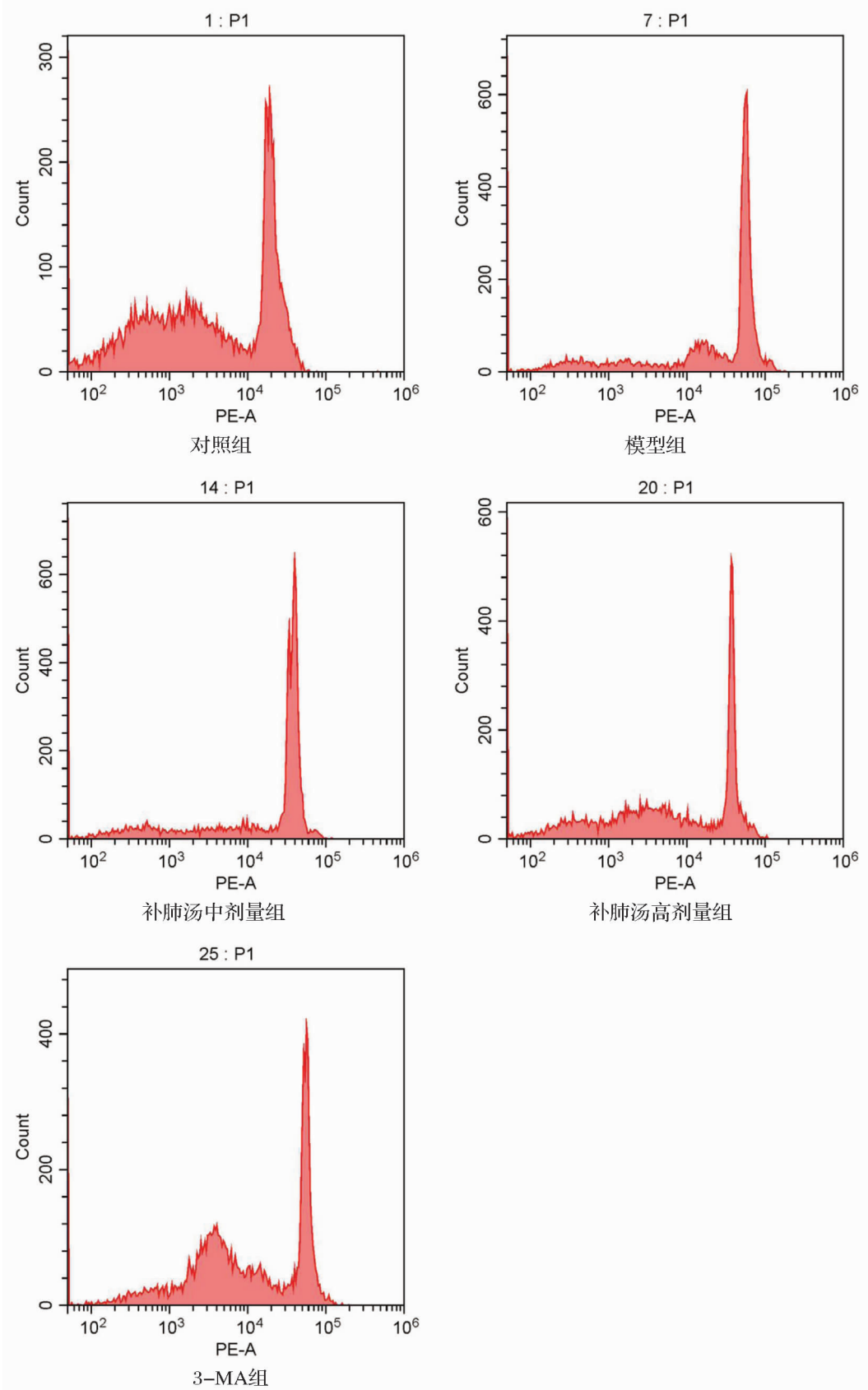


图 10 各组大鼠肺组织 mtROS 流式细胞图