

基于 PINK1/Parkin 信号通路探讨加味济生肾气汤对肝纤维化大鼠线粒体自噬的影响

阮博文¹, 周晓玲^{2*}, 冯丽娟³, 覃凤传⁴, 翟怀乐⁵, 刘家玲¹

(1. 广西中医药大学, 广西南宁 530000; 2. 广西中医药大学第一附属医院, 广西南宁 530000; 3. 柳江区人民医院, 广西柳州 545000; 4. 柳州市中医医院, 广西柳州 545000; 5. 柳州市人民医院河东街道社区卫生服务中心, 广西柳州 545000)

摘要: 目的 探讨加味济生肾气汤对肝纤维化大鼠线粒体自噬的影响。方法 将大鼠随机分为空白组和造模组, 造模组大鼠通过腹腔注射 CCl₄ (0.2 mL/kg, 每周2次, 持续6周) 建立肝纤维化模型。造模成功的大鼠随机分为模型组、秋水仙碱组 (0.2 mg/kg) 及加味济生肾气汤低、中、高剂量组 (7.79、15.57、31.14 g/kg), 每组8只。第7周起, 各组灌胃给予相应剂量药物。干预4周后, 观察大鼠一般情况; HE、Masson 染色观察肝组织病理学变化; 采用试剂盒检测血清肝功能 (ALT、AST) 水平; ELISA 法检测血清纤维化标志物 (PCⅢ、COL4、HA、LN) 水平; 免疫组化法检测肝组织 α -SMA、COL-1 蛋白表达; 免疫荧光法检测肝组织 Beclin1、LC3B、p62 蛋白表达; Western blot 法检测肝组织 PINK1、Parkin、TOM20、HSP60 蛋白表达; RT-qPCR 法检测肝组织 PINK1、Parkin、Beclin1、LC3B、p62、 α -SMA、COL-1 mRNA 表达。结果 与空白组比较, 模型组大鼠精神、饮食等情况欠佳, 体质量减轻 ($P < 0.05$); 肝组织细胞结构紊乱、炎症细胞浸润、胶原沉积、纤维间隔形成; 血清 ALT、AST、HA、LN、PCⅢ、COL4 水平升高 ($P < 0.05$); 肝组织 α -SMA、COL-1、p62 蛋白及 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$), PINK1、Parkin、Beclin1、LC3B 蛋白及 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$); 肝组织 TOM20、HSP60 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 各给药组大鼠精神、饮食等情况好转, 体质量增加 ($P < 0.05$); 肝组织细胞结构紊乱改善, 炎症细胞、胶原沉积、纤维间隔减少; 血清 ALT、AST、HA、LN、PCⅢ、COL4 水平均降低 ($P < 0.05$); 肝组织 α -SMA、COL-1、p62 蛋白及 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$), PINK1、Parkin、Beclin1、LC3B 蛋白及 mRNA 表达均升高 ($P < 0.05$); 肝组织 TOM20、HSP60 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$)。结论 加味济生肾气汤可改善肝纤维化大鼠症状, 其作用可能与通过激活 PINK1/Parkin 信号通路增强线粒体自噬, 抑制肝星状细胞活化及细胞外基质沉积有关。

关键词: 加味济生肾气汤; 肝纤维化; PINK1/Parkin 信号通路; 线粒体自噬; 肝星状细胞; 细胞外基质

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)06-1847-10

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.06.010

Effects of Modified Jisheng Shenqi Decoction on mitophagy in hepatic fibrosis rats based on the PINK1/Parkin signaling pathway

RUAN Bo-wen¹, ZHOU Xiao-ling^{2*}, FENG Li-juan³, QIN Feng-chuan⁴, ZHAI Huai-le⁵,
LIU Jia-ling¹

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China; 2. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China; 3. Liujiang District People's Hospital, Liuzhou 545000, China; 4. Liuzhou Traditional Chinese Medicine Hospital, Liuzhou 545000, China; 5. Community Health Service Center of Hedong Street, Liuzhou People's Hospital, Liuzhou 545000, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the effects of Modified Jisheng Shenqi Decoction on mitophagy in rats with hepatic fibrosis. **METHODS** Rats were randomly divided into the blank group and the model establishment

收稿日期: 2025-06-22

基金项目: 国家自然科学基金 (81760855); 广西自然科学基金面上项目 (2025GXNSFAA069382); 广西研究生教育创新计划项目 (YCBZ2024145); 中医药服务体系与能力建设专项经费-中医特色优势重点项目专项经费 (2026012-04)

作者简介: 阮博文 (1993—), 男, 博士在读, 主治医师, 从事中医药防治消化系统疾病的研究。E-mail: 2986644302@qq.com

* 通信作者: 周晓玲 (1977—), 女, 博士, 主任医师, 广西名中医, 博士生导师, 从事中医药防治消化系统疾病的研究。E-mail: zxl_LZ@163.com

group, hepatic fibrosis model was established by intraperitoneal injection of CCl_4 (0.2 mL/kg, twice weekly for 6 weeks). Rats with successful modeling were randomly divided into the model group, the colchicine group (0.2 mg/kg), and the low-, medium-, and high-dose Modified Jisheng Shenqi Decoction groups (7.79, 15.57, 31.14 g/kg), with 8 rats in each group. From week 7 onward, rats in each group received corresponding drugs by intragastric administration. After 4 weeks of intervention, the general condition of rats was observed; histopathological changes in liver tissue were examined by HE and Masson staining; serum liver function (ALT, AST) were detected by commercial kits; serum fibrosis markers (PC III, COL4, HA, LN) were measured by ELISA; protein expressions of α -SMA and COL-1 in liver tissue were determined by immunohistochemistry; protein expressions of Beclin1, LC3B, and p62 were detected by immunofluorescence; protein expressions of PINK1, Parkin, TOM20, and HSP60 were measured by Western blot; mRNA expressions of *PINK1*, *Parkin*, *Beclin1*, *LC3B*, *p62*, α -SMA, and *COL-1* were determined by RT-qPCR. **RESULTS** Compared with the blank group, the model group showed poor mental state and food intake with decreased body weight ($P < 0.05$); disordered hepatic cellular structure, inflammatory cell infiltration, collagen deposition, and fibrous septum formation in liver tissue; elevated serum levels of ALT, AST, HA, LN, PC III and COL4 ($P < 0.05$); upregulated protein and mRNA expressions of α -SMA, COL-1 and p62 ($P < 0.05$) as well as upregulated protein expressions of TOM20 and HSP60 ($P < 0.05$); whereas downregulated protein and mRNA expressions of PINK1, Parkin, Beclin1 and LC3B ($P < 0.05$) in liver tissue. Compared with the model group, all treatment groups exhibited improved mental state and food intake with increased body weight ($P < 0.05$); alleviated structural disorder, reduced inflammatory cell infiltration, collagen deposition, and fibrous septa in liver tissue; decreased serum levels of ALT, AST, HA, LN, PC III and COL4 ($P < 0.05$); downregulated protein and mRNA expressions of α -SMA, COL-1 and p62 ($P < 0.05$) as well as downregulated protein expressions of TOM20 and HSP60 ($P < 0.05$); whereas upregulated protein and mRNA expressions of PINK1, Parkin, Beclin1 and LC3B ($P < 0.05$) in liver tissue. **CONCLUSION** Modified Jisheng Shenqi Decoction can alleviate symptoms in hepatic fibrosis rats. Its mechanism may be related to enhancing mitophagy *via* activating the PINK1/Parkin signaling pathway, thereby inhibiting hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition.

KEY WORDS: Modified Jisheng Shenqi Decoction; hepatic fibrosis; PINK1/Parkin signaling pathway; mitophagy; hepatic stellate cells; extracellular matrix

肝纤维化是慢性肝病演变为肝硬化、肝癌的关键病理环节,其主要病理特征是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过量沉积,而肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)的过度活化是ECM的主要来源,并在肝纤维化的发生发展中扮演着重要角色,故HSCs被视为治疗肝纤维化的主要靶点^[1-2]。目前尚缺乏公认的治疗肝纤维化的有效药物,肝移植被认为是晚期肝纤维化或肝硬化患者的唯一有效的治疗方法,但因为肝源缺乏、价格昂贵、免疫排斥等因素限制其广泛应用^[3]。

线粒体自噬功能障碍与肝纤维化进展密切相关,PTEN诱导的激酶1(PTEN-induced putative kinase 1, PINK1)/E3泛素连接酶(Parkin)作为调控线粒体自噬的经典通路,起到了关键作用^[4]。中医药可以通过调控PINK1/Parkin信号通路,介导线粒体自噬,从而发挥抗肝纤维化作用,如中药

复方柔肝化纤颗粒通过活化miR-135a/叉头框蛋白(forkhead box protein O1, FOXO1)/PINK1信号通路,促进线粒体自噬,有效抑制HSC-T6生存^[5]。现代医学所描述的“自噬功能降低”与传统中医学“阳气亏虚”之核心病机高度契合^[6-7]。加味济生肾气汤具有温补肾阳、化痰利湿功效,前期临床及实验研究证实该方可以改善肝纤维化,但其作用靶点尚未明确^[8-9]。因此,本研究拟探究加味济生肾气汤对肝纤维化大鼠的可能干预环节及具体作用靶点,以期加味济生肾气汤临床应用及后续中成药的开发提供科学依据。

1 材料

1.1 实验动物 雄性SPF级SD大鼠52只,2~4周龄,体质量180~200 g,购于长沙市天勤生物技术有限公司[实验动物生产许可证号SCXK(湘)2021-0002],饲养于广西中医药大学第一附属医院

实验大鼠饲养室，自然光照，温度 20~25 ℃，相对湿度 50%~65%。动物实验已通过广西中医药大学实验动物福利伦理委员会审核（伦理号 GXTCMU-ECKS20250000-608）。

1.2 药物 加味济生肾气汤组方药材肉桂 6 g、熟地黄 30 g、泽泻 15 g、制附子 6 g（先煎）、丹皮 15 g、车前子 20 g、山茱萸 30 g、山药 30 g、川牛膝 10 g、三七粉 2 g（冲服）、茯苓 15 g、醋鳖甲 20 g（先煎），以上饮片均由广西中医药大学第一附属医院提供，加水常规煎煮，浓缩至生药量 15.57 g/mL，大鼠给药剂量参照徐叔云教授主编《药理实验方法学》，按“人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值”附表进行换算，高、中、低剂量分别为 7.79、15.57、31.14 g/kg。秋水仙碱片（国药准字 H20003842）购于北京嘉林药业股份有限公司。

1.3 试剂 HE 染色试剂盒、Masson 三色染色试剂盒、RIPA 裂解液（货号 G1140、G1340、R0020）购于北京索莱宝科技有限公司；丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天门冬氨酸氨基转移酶（AST）试剂盒（批号 20240124、20240123）购于南京建成生物工程研究所；PINK1、Parkin、微管相关蛋白轻链 3B（light chain 3B, LC3B）、苜蓿素 1（Beclin1）、p62、 α -平滑肌肌动蛋白（ α -smooth muscle actin, α -SMA）、GAPDH 抗体（货号 bs-22173R、bs-23687R、bs-55024R、bs-4843R、bs-55207R、bs-10196R、bs-10900R）购于北京博奥森生物技术有限公司；I 型胶原蛋白（Collagen I, COL-1）抗体（货号 GB11022-50）购于武汉赛维尔生物科技有限公司；线粒体外膜转位酶 20（translocase of outer mitochondrial membrane 20, TOM20）、热休克蛋白 60（heat shock protein 60, HSP60）抗体（货号 YP-Ab-00750、YP-Ab-03405）购于深圳市优品生物科技有限公司；山羊抗兔 IgG 二抗（货号 A23710）购于英国 Abcam 公司；通用两步法试剂盒（货号 PV-9000）购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.4 仪器 1645050 型电泳仪（美国 Bio-Rad 公司）；CKX41 型倒置相差显微镜（日本 Olympus 公司）；酶标仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；Roche（Light Cycler）480 型 PCR 仪（上海罗氏制药有限公司）；低温高速离心机（美国 Beckman Coulter 公司）；HT7800 透射电子显微镜（日本 Hitachi 公司）。

2 方法

2.1 分组、造模及给药 52 只大鼠适应性饲养 1 周，采用随机数字表法选取 8 只作为空白组，剩下 44 只大鼠腹腔注射 40% CCl₄ 橄榄油溶液，剂量 2.0 mL/kg，每周 2 次，连续注射 6 周，建立肝纤维化大鼠模型。造模结束后，随机取 4 只大鼠，观察其肝组织病理形态，以判断模型是否建立成功。将造模成功的大鼠随机分为模型组、秋水仙碱组和加味济生肾气汤低、中、高剂量组，每组 8 只。第 7 周开始给药，秋水仙碱组灌胃给予秋水仙碱 0.2 mg/kg；加味济生肾气汤低、中、高剂量组分别灌胃给予加味济生肾气汤混悬液 7.79、15.57、31.14 g/kg；空白组和模型组灌胃给予生理盐水，每天 1 次，连续给药 4 周。期间观察各组大鼠精神状态、进食及饮水情况、毛发色泽、行为变化、有无受伤及死亡，每隔 3 d 称定大鼠体质量。

2.2 取材 给药结束后，大鼠禁食但不禁水过夜，次日腹腔注射 2% 戊巴比妥钠进行麻醉，经腹主动脉取血，静置 1 h 后，3 000 r/min 离心 10 min，取上层血清，于 -80 ℃ 冰箱保存备用。采血结束后，取肝脏组织，剪取约 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 大小，液氮速冻后于 -80 ℃ 冰箱保存备用，用于 Western blot 及 RT-qPCR 检测；其余组织块放入 10% 甲醛中进行固定，用于肝组织病理、免疫组化及免疫荧光观察。

2.3 肝功能检测 严格按照试剂盒说明书操作，检测大鼠血清 ALT 和 AST 水平。

2.4 ELISA 法检测血清 PCⅢ、COL4、HA、LN 水平 按照 ELISA 试剂盒说明书操作，检测大鼠血清Ⅲ型前胶原蛋白（PCⅢ）、Ⅳ型胶原蛋白（COL4）、透明质酸（HA）、层黏连蛋白（LN）水平。

2.5 肝脏病理学观察 取于 10% 甲醛中固定的肝组织，脱水、包埋后制备组织切片，脱蜡至水，分别进行 HE 染色（苏木素染色 7~8 min，反蓝液反蓝 3 s，伊红染色 1 min，流水冲洗）和 Masson 染色（铁苏木素液染色 10 min，Masson 蓝化液复染 5 min，丽春红染色 1 min，苯胺蓝染液先染 5 min，再复染 2 min，流水冲洗），乙醇逐级脱水，透明，封片，于显微镜下观察肝组织病理情况。采用 Image J 软件分析 Masson 染色肝组织纤维化程度。

2.6 免疫组化法检测肝组织 α -SMA、COL-1 蛋白表达 取肝组织石蜡切片，脱蜡至水，进行热抗原修复，加入内源性过氧化物酶阻断剂室温孵育 10 min，滴加 α -SMA、COL-1 抗体 37 ℃ 孵育 60 min，

滴加反应增强液 37 °C 孵育 20 min, 滴加二抗 37 °C 孵育 20 min, DAB 显色, 自来水冲洗终止显色, 苏木素复染细胞核 20 s, 脱水、透明、封片, 于光学显微镜下观察切片并拍照。

2.7 免疫荧光法检测肝组织 Beclin1、LC3B、p62 蛋白表达 取肝组织石蜡切片, 4% 多聚甲醛固定, 0.1% TritonX-100 透化 30 min, 滴加 Beclin1、LC3B、p62 抗体孵育过夜, 次日洗涤后滴加荧光二抗孵育 2 h, 用 1 μg/mL DAPI 染细胞核, 封片, 于荧光显微镜下拍摄图像。采用 Image J 软件分析 Beclin1、LC3B 及 p62 蛋白荧光强度。

2.8 Western blot 法检测肝组织 PINK1、Parkin、TOM20、HSP60 蛋白表达 称取肝组织 30 mg, 加入裂解液裂解, 离心后提取总蛋白, 加入样品缓冲液加热 5 min 进行变性。10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白后, 转移至 PVDF 膜, TBST 洗膜后用 BSA 封闭, 加入稀释后的 PINK1、Parkin、TOM20、HSP60、GAPDH 抗体 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜后加入二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜后采用 ECL 发光试剂进行显影, 采用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.9 RT-qPCR 法检测肝组织 PINK1、Parkin、Beclin1、LC3B、p62、α-SMA、COL-1 mRNA 表达 称取约 10 mg 肝组织, TRIzol 法提取总 RNA, 严格按照说明书操作, 将 RNA 逆转录成 cDNA, 并以此为模板, 采用 SYBR Green 试剂盒进行扩增反应, 反应体系 (20 μL) 为 cDNA 产物 2 μL, 正、反向引物各 0.8 μL, 2 × NovoStart® SYBR qPCR SuperMix Plus 10 μL, ROX 0.4 μL, RNase Free Water 6.8 μL。扩增反应条件为 95 °C 预变性 60 s; 95 °C 变性 20 s, 60 °C 退火延伸 60 s, 共 40 个循环。引物由武汉赛维尔生物科技有限公司设计并合成, 序列见表 1。

2.10 统计学分析 通过 SPSS 26.0 软件进行处理, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 服从正态分布且方差齐的数据, 组间比较采用 LSD-*t* 检验, 方差不齐的数据, 组间比较采用 Tamhane's T2 检验; 非正态分布数据采用 Kruskal-Wallis 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 加味济生肾气汤对肝纤维化大鼠一般情况的影响 空白组大鼠精神状态佳, 正常进食、饮水, 活动行为正常, 毛发光泽, 体质量增加; 与空白组比较, 模型组大鼠精神状态差, 倦卧, 毛发粗糙无

光泽, 进食、饮水量减少, 体质量减轻 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组大鼠精神状态好转、毛发尚且光泽, 进食、饮水量增加, 体质量增加 ($P < 0.05$), 以加味济生肾气汤高剂量组改善最佳, 见表 2。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因	序列(5'→3')	产物长度/bp
PINK1	正向 AAGGCCAGATGTCGTCTCA	108
	反向 TGGAGGATCCTGCCGAGATA	
Parkin	正向 CAGTTTGTCCACGACGCTCA	125
	反向 TGCTGTACCTGTTGTACTGCTC	
Beclin1	正向 AGATGCGCTATGCCAGATG	96
	反向 TCGTGCCAAATTGTCGGCTG	
LC3B	正向 CTGCCCTGCTGGATAAG	167
	反向 TAGATGTCACGGATGGGT	
p62	正向 ACATGAAGCTGAAAGAGCGGG	149
	反向 CGAACCCTTCCCAAGACAG	
α-SMA	正向 TCCGACCTTGCTAACGAGAG	123
	反向 AGGGACAGCACAGCTGAAT	
COL-1	正向 GAGCCTGAGCCAGCAGATTG	123
	反向 TCGATCCAGTACTCTCCGCT	
GAPDH	正向 TCTCTGCTCCTCCCTGTCT	95
	反向 ATCCGTTACACCGACCTTC	

表 2 各组大鼠体质量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

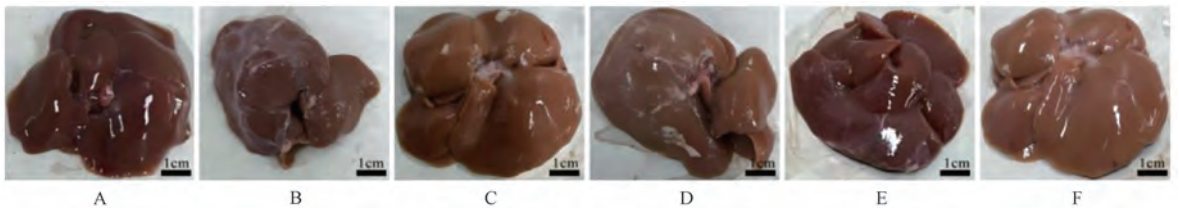
Tab. 2 Comparison of body weight of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	体质量/g
空白组	247.50 ± 12.01
模型组	121.38 ± 5.66 [#]
秋水仙碱组	216.63 ± 8.28 [*]
加味济生肾气汤低剂量组	158.75 ± 6.30 [*]
加味济生肾气汤中剂量组	194.25 ± 7.32 [*]
加味济生肾气汤高剂量组	226.50 ± 10.35 [*]

注: 与空白组比较, [#]P < 0.05; 与模型组比较, ^{*}P < 0.05。

3.2 加味济生肾气汤对肝纤维化大鼠肝脏形态的影响 空白组大鼠肝脏大小适中, 呈红褐色, 表面光滑、有光泽、无粘连, 无凹凸不平, 边缘完整, 质地柔软、有弹性; 模型组大鼠肝脏体积变小, 呈暗红色、无光泽, 表面、边缘凹凸不平、有粘连, 质地硬、粗糙、有结节感、无弹性; 各给药组大鼠肝脏较模型组颜色浅, 表面边缘、较光滑, 粘连减轻, 质地较软, 以加味济生肾气汤高剂量组改善最明显, 见图 1。

3.3 加味济生肾气汤对肝纤维化大鼠肝组织病理变化的影响 HE 染色结果显示, 空白组大鼠肝小叶结构保持完整, 肝细胞围绕中央静脉呈放射状分布, 未观察到肝细胞变性坏死及炎症细胞浸润; 模型组大鼠肝小叶结构被破坏, 中央静脉或汇管区增大, 肝细胞排列紊乱, 肝细胞肿胀, 炎症细胞大量浸润, 纤维组织增生; 与模型组比较, 各给药组大



注：A 为空白组，B 为模型组，C 为秋水仙碱组，D~F 为加味济生肾气汤低、中、高剂量组。

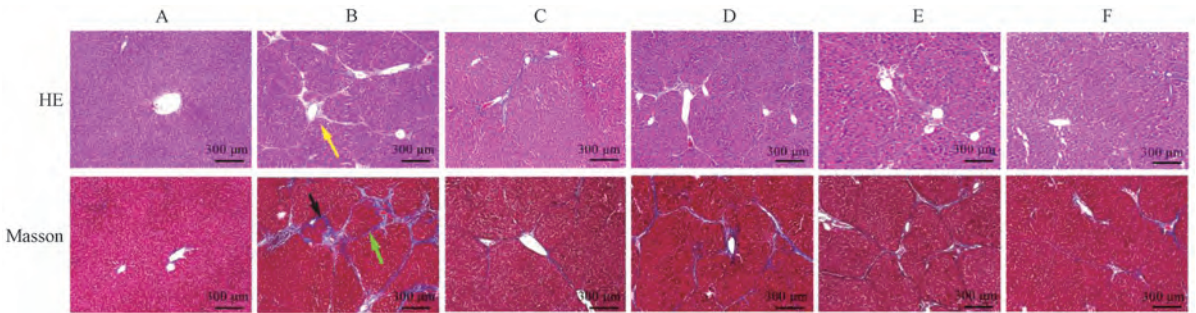
图 1 各组大鼠肝脏形态

Fig. 1 Liver morphology of rats in each group

鼠肝小叶结构改善，炎症细胞减少，细胞肿胀减轻，纤维化增生程度减轻，以加味济生肾气汤高剂量组改善最明显，见图 2。

Masson 染色结果显示，空白组大鼠肝脏中央静脉或汇管区少量胶原纤维，无纤维纵隔；与空白组比较，模型组大鼠肝脏中央静脉或汇管区胶原纤

维明显增生，形成纤维间隔，可见多个假小叶，纤维化面积增加 ($P<0.05$)；与模型组比较，各给药组大鼠肝脏纤维化程度均减轻，肝脏胶原纤维减少，纤维间隔变细，假小叶数量减少，纤维化面积减少 ($P<0.05$)，以加味济生肾气汤高剂量组改善最明显，见图 2、表 3。



注：A 为空白组，B 为模型组，C 为秋水仙碱组，D~F 为加味济生肾气汤低、中、高剂量组。黄色箭头指向炎症细胞，红色箭头指向胶原纤维沉积，绿色箭头指向假小叶。

图 2 各组大鼠肝组织 HE 染色和 Masson 染色 ($\times 100$)

Fig. 2 HE staining and Masson staining of liver tissues of rats in each group ($\times 100$)

表 3 各组大鼠肝组织纤维化面积比较 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Tab. 3 Comparison of fibrosis area of liver tissue in rats of each group ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	纤维化面积/%
空白组	0.79±0.16
模型组	14.70±1.65 [#]
秋水仙碱组	4.16±0.87 [*]
加味济生肾气汤低剂量组	11.21±1.29 [*]
加味济生肾气汤中剂量组	8.08±0.99 [*]
加味济生肾气汤高剂量组	3.08±0.76 [*]

注：与空白组比较，[#] $P<0.05$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ 。

3.4 加味济生肾气汤对肝纤维化大鼠血清 ALT、AST 水平的影响 与空白组比较，模型组大鼠血清 AST 和 ALT 水平升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，各给药组大鼠血清 AST 和 ALT 水平降低 ($P<0.05$)，以加味济生肾气汤高剂量组改善最明显，见表 4。

3.5 加味济生肾气汤对肝纤维化大鼠血清 PC III、COL4、HA、LN 水平的影响 与空白组比较，模

型组大鼠血清 PC III、COL4、HA、LN 水平升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，各给药组大鼠血清 PC III、COL4、HA、LN 水平降低 ($P<0.05$)，以加味济生肾气汤高剂量组改善最明显，见表 5。

表 4 各组大鼠血清 ALT 和 AST 水平比较 (U/L, $\bar{x}\pm s, n=8$)

Tab. 4 Comparison of serum ALT and AST levels of rats in each group (U/L, $\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	ALT	AST
空白组	29.88±2.07	59.22±6.93
模型组	175.29±16.72 [#]	339.92±35.32 [#]
秋水仙碱组	44.03±5.62 [*]	83.44±13.43 [*]
加味济生肾气汤低剂量组	123.02±13.30 [*]	252.82±24.87 [*]
加味济生肾气汤中剂量组	98.26±11.71 [*]	186.40±16.60 [*]
加味济生肾气汤高剂量组	41.62±3.43 [*]	79.68±10.11 [*]

注：与空白组比较，[#] $P<0.05$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ 。

3.6 加味济生肾气汤对肝纤维化大鼠肝组织 α -SMA、COL-1 蛋白表达的影响 正常组大鼠肝组织中无棕黄色沉淀；模型组大鼠肝组织中可见较多分

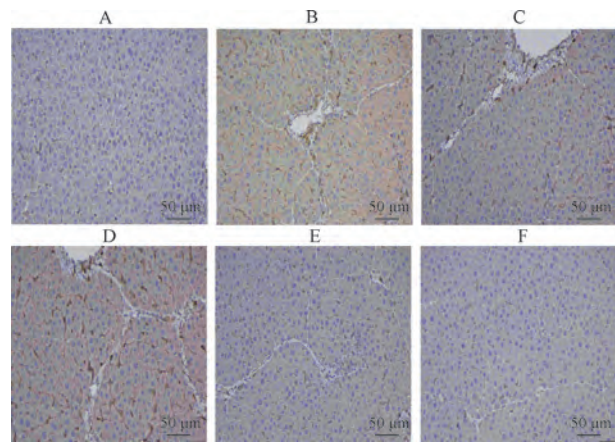
表5 各组大鼠血清COL4、PCIII、HA、LN水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Tab. 5 Comparison of serum COL4, PCIII, HA and LN levels of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	PC III/(ng·mL ⁻¹)	COL4/(ng·mL ⁻¹)	HA/(ng·mL ⁻¹)	LN/(pg·mL ⁻¹)
空白组	2.49±0.20	2.86±1.12	65.86±5.79	83.18±7.35
模型组	14.36±5.21 [#]	47.93±8.33 [#]	216.12±27.79 [#]	346.71±33.22 [#]
秋水仙碱组	4.88±1.17 [*]	7.39±2.27 [*]	86.54±8.52 [*]	99.64±13.74 [*]
加味济生肾气汤低剂量组	11.02±3.28 [*]	32.51±4.40 [*]	155.97±20.29 [*]	254.37±29.11 [*]
加味济生肾气汤中剂量组	7.29±2.14 [*]	17.21±3.82 [*]	123.96±14.09 [*]	157.66±24.70 [*]
加味济生肾气汤高剂量组	4.49±1.12 [*]	7.18±1.86 [*]	84.33±7.43 [*]	96.59±11.35 [*]

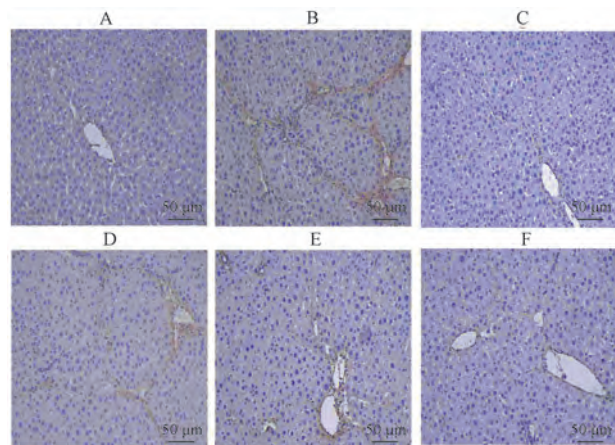
注：与空白组比较，[#]*P*<0.05；与模型组比较，^{*}*P*<0.05。

布的棕黄色沉淀，α-SMA和COL-1蛋白表达升高 (*P*<0.05)；与模型组比较，各给药组大鼠肝组织中棕黄色沉淀明显减少，α-SMA和COL-1蛋白表达降低 (*P*<0.05)，以加味济生肾气汤高剂量组改善最明显，见图3~4、表6。



注：A为空白组，B为模型组，C为秋水仙碱组，D~F为加味济生肾气汤低、中、高剂量组。

图3 各组大鼠肝组织α-SMA蛋白免疫组化染色 (×200)
Fig. 3 Immunohistochemical staining of α-SMA protein in liver tissue of rats in each group (×200)



注：A为空白组，B为模型组，C为秋水仙碱组，D~F为加味济生肾气汤低、中、高剂量组。

图4 各组大鼠肝组织COL-1蛋白免疫组化染色 (×200)
Fig. 4 Immunohistochemical staining of COL-1 protein in liver tissue of rats in each group (×200)

表6 各组大鼠肝组织α-SMA、COL-1蛋白阳性面积比较 (% , $\bar{x}\pm s, n=8$)

Tab. 6 Comparison of positive areas of α-SMA and COL-1 proteins in liver tissues of rats in each group (% , $\bar{x}\pm s, n=8$)

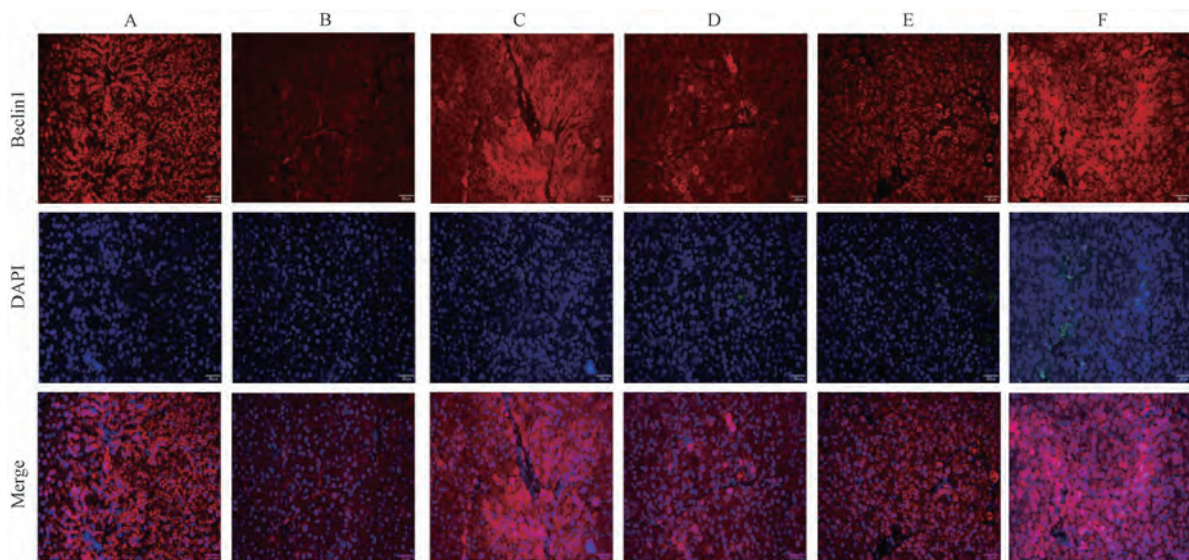
组别	α-SMA 阳性面积	COL-1 阳性面积
空白组	2.63±0.27	2.01±0.21
模型组	33.13±4.09 [#]	38.50±3.82 [#]
秋水仙碱组	14.25±1.98 [*]	12.63±1.41 [*]
加味济生肾气汤低剂量组	26.88±3.36 [*]	32.50±2.88 [*]
加味济生肾气汤中剂量组	19.75±2.49 [*]	21.75±2.25 [*]
加味济生肾气汤高剂量组	10.38±1.41 [*]	9.25±1.17 [*]

注：与空白组比较，[#]*P*<0.05；与模型组比较，^{*}*P*<0.05。

3.7 加味济生肾气汤对肝纤维化大鼠肝组织Beclin1、LC3B、p62蛋白表达的影响 与空白组比较，模型组大鼠肝组织Beclin1和LC3B蛋白表达降低 (*P*<0.05)，p62蛋白表达升高 (*P*<0.05)；与模型组比较，各给药组大鼠肝组织Beclin1和LC3B蛋白表达明显升高 (*P*<0.05)，p62蛋白表达降低 (*P*<0.05)，以加味济生肾气汤高剂量组改善最为明显，见图5~7、表7。

3.8 加味济生肾气汤对肝纤维化大鼠肝组织PINK1、Parkin、TOM20、HSP60蛋白表达的影响 与空白组比较，模型组大鼠肝组织PINK1、Parkin蛋白表达降低 (*P*<0.05)，TOM20、HSP60蛋白表达升高 (*P*<0.05)；与模型组比较，各给药组大鼠肝组织PINK1、Parkin蛋白表达升高 (*P*<0.05)，TOM20、HSP60蛋白表达降低 (*P*<0.05)，以加味济生肾气汤高剂量组改变最明显，见图8、表8。

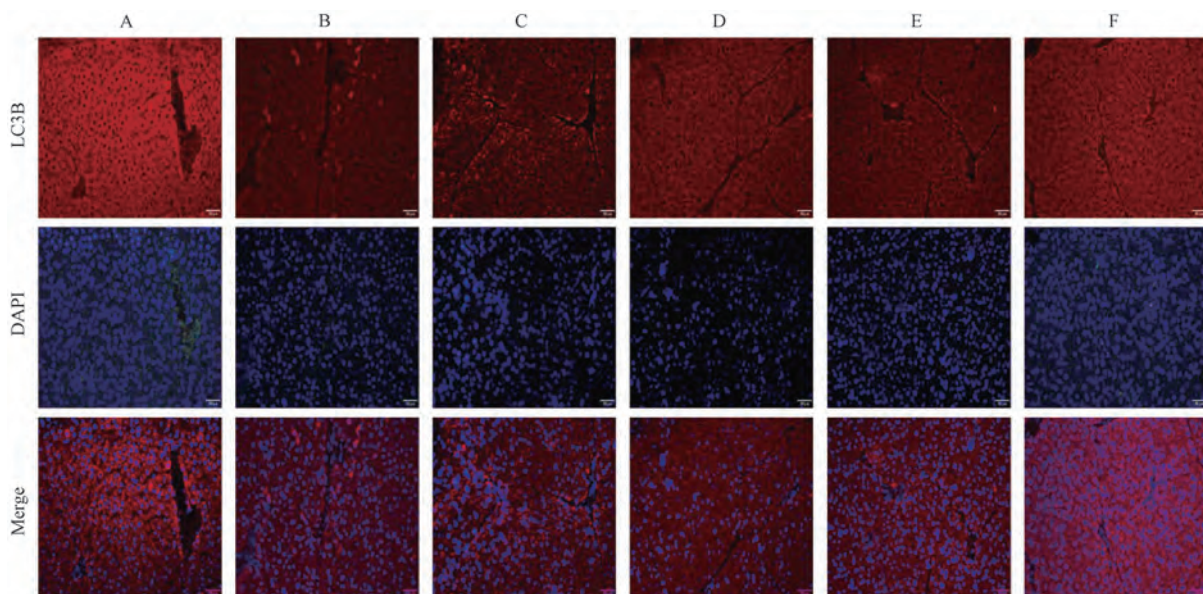
3.9 加味济生肾气汤对肝纤维化大鼠肝组织PINK1、Parkin、Beclin1、LC3B、p62、α-SMA、COL-1 mRNA表达的影响 与空白组比较，模型组大鼠肝组织PINK1、Parkin、Beclin1、LC3B mRNA表达降低 (*P*<0.05)，p62、α-SMA、COL-1 mRNA表达升高 (*P*<0.05)；与模型组比较，各给药组大鼠肝组织PINK1、Parkin、Beclin1、LC3B mRNA表



注：A 为空白组，B 为模型组，C 为秋水仙碱组，D~F 为加味济生肾气汤低、中、高剂量组。

图 5 各组大鼠肝组织 Beclin1 蛋白免疫荧光染色 (×200)

Fig. 5 Immunofluorescence staining of Beclin1 protein in liver tissue of rats in each group (×200)



注：A 为空白组，B 为模型组，C 为秋水仙碱组，D~F 为加味济生肾气汤低、中、高剂量组。

图 6 各组大鼠肝组织 LC3B 蛋白免疫荧光染色 (×200)

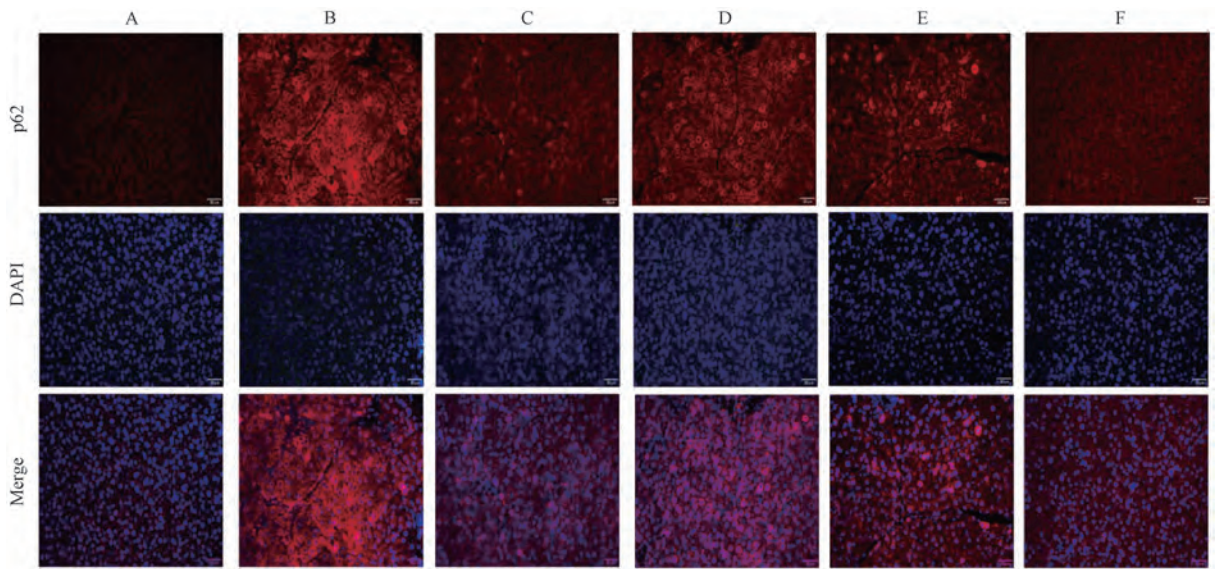
Fig. 6 Immunofluorescence staining of LC3B protein in liver tissue of rats in each group (×200)

达升高 ($P < 0.05$), $p62$ 、 α -SMA、COL-1 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$), 以加味济生肾气汤高剂量组改善作用最明显, 见表 9。

4 讨论

中医学将肝硬化归属于胁痛、积聚、黄疸等范畴。广西名中医周晓玲教授提出, 肝纤维化的核心病机为虚瘀共患, 以肾阳虚为本、瘀血阻络为标; 阳气亏虚则痰饮水湿内生、瘀血内停, 壅滞肝脉而发病。前期临床研究表明, 加味济生肾气汤可

以改善阳虚血瘀型肝硬化患者的临床症状, 恢复其肝功能、降低其肝脏硬度及肝纤维化指标^[10]。动物实验亦证实, 本方对 CCl₄ 诱导大鼠肝纤维化具有明显改善作用^[11]。CCl₄ 肝纤维化模型是目前公认的模拟人类肝纤维化的经典动物模型^[12]。基于以方测证研究发现, 模型大鼠可出现肝肾亏虚、瘀血阻络等证型^[13]。因此, 本研究以 CCl₄ 诱导肝纤维化大鼠为对象, 采用加味济生肾气汤干预, 初步探讨其抗肝纤维化效应及潜在作用机制。



注：A 为空白组，B 为模型组，C 为秋水仙碱组，D~F 为加味济生肾气汤低、中、高剂量组。

图 7 各组大鼠肝组织 p62 蛋白免疫荧光染色 (×200)

Fig. 7 Immunofluorescence staining of p62 protein in liver tissue of rats in each group (×200)

表 7 各组大鼠肝组织 Beclin1、LC3B、p62 蛋白荧光强度比较 (% , $\bar{x}\pm s$, n=8)

Tab. 7 Comparison of fluorescence intensity of Beclin1, LC3B and p62 proteins in liver tissues of rats in each group (% , $\bar{x}\pm s$, n=8)

组别	Beclin1 荧光强度	LC3B 荧光强度	p62 荧光强度
空白组	51.41±5.34	28.25±3.45	1.39±0.44
模型组	9.11±0.52 [#]	2.11±0.52 [#]	32.25±3.01 [#]
秋水仙碱组	40.16±3.23 [*]	19.03±2.13 [*]	8.19±1.46 [*]
加味济生肾气汤低剂量组	18.70±1.07 [*]	6.93±0.78 [*]	25.21±2.65 [*]
加味济生肾气汤中剂量组	30.59±2.24 [*]	13.39±1.30 [*]	16.34±2.19 [*]
加味济生肾气汤高剂量组	44.51±3.51 [*]	22.15±3.04 [*]	5.74±0.73 [*]

注：与空白组比较，[#]P<0.05；与模型组比较，^{*}P<0.05。

表 8 各组大鼠肝组织 PINK1、Parkin、TOM20、HSP60 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, n=8)

Tab. 8 Comparison of protein expressions of PINK1, Parkin, TOM20 and HSP60 in liver tissue of rats in each group ($\bar{x}\pm s$, n=8)

组别	PINK1/GAPDH	Parkin/GAPDH	TOM20/GAPDH	HSP60/GAPDH
空白组	1.000±0.013	1.000±0.015	1.000±0.011	1.000±0.008
模型组	0.710±0.006 [#]	0.560±0.005 [#]	2.080±0.031 [#]	1.810±0.018 [#]
秋水仙碱组	0.890±0.011 [*]	0.810±0.008 [*]	1.200±0.016 [*]	1.200±0.011 [*]
加味济生肾气汤低剂量组	0.820±0.008 [*]	0.660±0.006 [*]	1.730±0.022 [*]	1.570±0.015 [*]
加味济生肾气汤中剂量组	0.860±0.009 [*]	0.770±0.008 [*]	1.410±0.019 [*]	1.370±0.013 [*]
加味济生肾气汤高剂量组	0.930±0.010 [*]	0.870±0.013 [*]	1.120±0.013 [*]	1.150±0.009 [*]

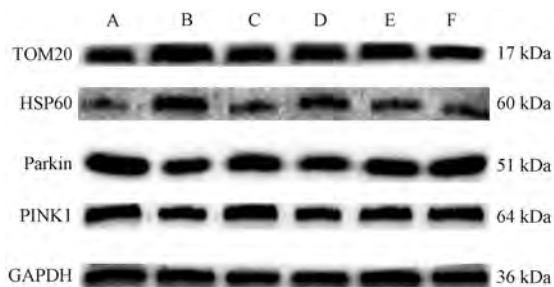
注：与空白组比较，[#]P<0.05；与模型组比较，^{*}P<0.05。

表 9 各组大鼠肝组织 PINK1、Parkin、Beclin1、LC3B、p62、α-SMA、COL-1 mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, n=8)

Tab. 9 Comparison of mRNA expressions of PINK1, Parkin, Beclin1, LC3B, p62, α-SMA and COL-1 in liver tissues of rats in each group ($\bar{x}\pm s$, n=8)

组别	PINK1	Parkin	Beclin1	LC3B	p62	α-SMA	COL-1
空白组	1.00±0.03	1.00±0.03	1.00±0.03	1.00±0.03	1.00±0.02	1.00±0.02	1.00±0.03
模型组	0.40±0.01 [#]	0.62±0.01 [#]	0.50±0.01 [#]	0.51±0.01 [#]	2.06±0.05 [#]	2.18±0.04 [#]	2.64±0.05 [#]
秋水仙碱组	0.84±0.02 [*]	0.91±0.02 [*]	0.79±0.02 [*]	0.84±0.02 [*]	1.27±0.03 [*]	1.48±0.03 [*]	1.59±0.03 [*]
加味济生肾气汤低剂量组	0.58±0.01 [*]	0.73±0.02 [*]	0.60±0.01 [*]	0.61±0.01 [*]	1.66±0.04 [*]	1.84±0.04 [*]	2.35±0.05 [*]
加味济生肾气汤中剂量组	0.72±0.02 [*]	0.82±0.02 [*]	0.71±0.02 [*]	0.71±0.02 [*]	1.45±0.04 [*]	1.65±0.04 [*]	1.85±0.04 [*]
加味济生肾气汤高剂量组	0.90±0.02 [*]	0.95±0.02 [*]	0.86±0.03 [*]	0.90±0.03 [*]	1.16±0.03 [*]	1.31±0.03 [*]	1.43±0.03 [*]

注：与空白组比较，[#]P<0.05；与模型组比较，^{*}P<0.05。



注：A 为空白组，B 为模型组，C 为秋水仙碱组，D~F 为加味济生肾气汤低、中、高剂量组。

图 8 各组大鼠肝组织 PINK1、Parkin、TOM20、HSP60 蛋白条带图

Fig. 8 Protein bands of PINK1, Parkin, TOM20 and HSP60 in liver tissue of rats in each group

ALT、AST 水平的变化与肝脏炎症及肝纤维化进展密切相关^[14]；血清肝纤四项指标包括 HA、LN、PC-III、COL4，其水平变化反映肝脏内胶原纤维合成情况及肝纤维化活动程度^[15-16]；肝组织病理是评价肝纤维化程度的金标准^[17]。本研究发现，经加味济生肾气汤干预后，肝纤维化大鼠血清 ALT、AST、HA、LN、PC-III 和 COL4 水平降低，肝组织炎症及胶原纤维沉积情况减轻，提示加味济生肾气汤可以减轻肝纤维化大鼠肝脏损伤，发挥抗肝纤维化作用。

HSCs 活化是肝纤维化病理发生过程中至关重要的一环^[18]， α -SMA 是 HSCs 活化的重要标志。研究表明^[19]， α -SMA 表达的升高与 HSCs 存活率呈正相关。HSCs 活化后会转化为肌成纤维细胞样细胞，合成 ECM 能力增强，大量 COL-1 沉积^[20]。本研究发现，加味济生肾气汤可减少肝纤维化大鼠肝组织中 α -SMA、COL-1 的表达，表明加味济生肾气汤可能是通过抑制 HSCs 的活化，减少 ECM 的沉积，从而减轻肝纤维化；同时也证明，阳气亏虚会导致 ECM 在肝脏沉积，通过温补肾阳、化痰利湿法能有效减少肝脏 ECM 沉积，减轻肝脏纤维化程度。

线粒体自噬是细胞自动清除受损线粒体的重要方法，在细胞凋亡中起着重要作用，与疾病之间存在紧密关系^[21]。有研究发现，在肝纤维化过程中，粒体损伤积累增加和线粒体自噬功能受损会引起 HSCs 活化并促进胶原沉积^[22]。HSP60 和 TOM20 是线粒体质量要标志物，可以反映线粒体的总量变化^[23]。当线粒体自噬功能受损，会导致损伤线粒体积累，剩余线粒体量增加。本研究发现，加味济生肾气汤可减少肝纤维化大鼠肝组织 HSP60 和

TOM20 蛋白表达，提示加味济生肾气汤抗肝纤维化作用与激活线粒体自噬有关，也验证了前期理论基础“线粒体自噬”与“阳气”相关性的科学性，通过温补肾中“阳气”可以提高线粒体自噬功能，清除受损线粒体。

PINK1/Parkin 通路是线粒体自噬经典通路，与各类肝脏疾病，如脂肪肝、药物性肝炎病、肝纤维化、肝癌等发展密切相关^[24]。LC3、Beclin1、p62 是线粒体自噬的核心蛋白^[25]。Dou 等^[26]研究发现，增强 PINK1/Parkin 信号通路介导的 HSCs 线粒体自噬可以降低 HSCs 的活化，降低 α -SMA、COL-1 表达，从而减轻肝纤维化。王苗苗^[27]研究发现，诱导线粒体自噬增强，PINK1、Parkin 蛋白表达升高，线粒体剩余量指标 TOM20、HSP60 表达降低， α -SMA 表达降低，肝功能改善、肝纤维化减轻；反之则加重。本研究发现，加味济生肾气汤可激活 PINK1/Parkin 信号通路，提高线粒体自噬 Beclin1、LC3B 相关蛋白表达，降低线粒体自噬 p62 蛋白表达，提高线粒体自噬水平，减少损伤线粒体剩余量，抑制 HSCs 活化。

综上所述，加味济生肾气汤可改善肝纤维化大鼠症状，其作用可能与通过激活 PINK1/Parkin 信号通路增强线粒体自噬，抑制肝星状细胞活化及细胞外基质沉积有关。本研究创新性揭示“阳气亏虚-线粒体自噬受损-肝纤维化”的病理关联，证实中医“阳气”功能与“线粒体自噬”功能在微观层面高度契合，这与课题组前期研究相类似^[28]。

参考文献：

- [1] 牛媛媛, 樊泽坤, 汪龙德, 等. 诱导肝星状细胞铁死亡在肝纤维化防治中的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(9): 2281-2289.
- [2] Liu X, Brenner D A, Kisseleva T. Human hepatic stellate cells: isolation and characterization[J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2669: 221-232.
- [3] Zhang X, Zeng Y, Zhao L, et al. Targeting hepatic stellate cell death to reverse hepatic fibrosis[J]. *Curr Drug Targets*, 2023, 24(7): 568-583.
- [4] 黄宜贵, 余方流. 褪黑素对四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠线粒体自噬的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(11): 1149-1152.
- [5] 张文富. 基于 miR-135a/FOXO1/PINK1 通路探讨线粒体自噬在柔肝化纤维颗粒抑制肝纤维化中的作用及机制[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2024.
- [6] 周晓玲, 阮博文, 冯丽娟, 等. 基于自噬和中医阴阳微观联系探讨非酒精性脂肪肝病的防治[J]. 中华中医药学刊, 2025, 43(9): 7-10.

- [7] 阮博文, 冯丽娟, 磨奕玲, 等. 基于线粒体自噬探讨“阳化气、阴成形”理论治疗肝纤维化科学内涵[J]. 辽宁中医杂志, 2026, 53(1): 36-40.
- [8] 冯丽娟, 周晓玲, 阮博文, 等. 补肾化痰汤联合恩替卡韦治疗乙型肝炎肝硬化代偿期患者临床研究[J]. 中西医结合肝病杂志, 2023, 33(1): 29-31; 35.
- [9] 王月明. 基于PI3K/AKT/HIF-1 α 信号通路探讨温肾化痰法治疗肝硬化的作用机制[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2022.
- [10] 钟镇康, 周晓玲, 张志杰, 等. 加味济生肾气汤联合穴位注射丹参注射液治疗慢性乙型肝炎肝纤维化患者的临床观察[J]. 中西医结合肝病杂志, 2023, 33(3): 242-246.
- [11] 钟镇康, 周晓玲, 王月明, 等. 济生肾气汤加三七、鳖甲对CCl₄诱导肝纤维化大鼠模型的干预作用及机制[J]. 海南医学院学报, 2022, 28(10): 742-749.
- [12] Amer M A, Othman A I, El-Missiry M A, *et al.* Proanthocyanidins attenuated liver damage and suppressed fibrosis in CCl₄-treated rats[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2022, 29(60): 91127-91138.
- [13] 陶庆, 孙明瑜, 冯琴, 等. 基于以方测证的四氯化碳所致大鼠肝纤维化模型的证型探讨[J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(3): 246-250.
- [14] 张敬博, 陈平平, 于栋华, 等. 黄芩-赤芍药对不同比例配伍抗大鼠肝纤维化模型作用机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(12): 69-77.
- [15] 李 琤. 慢性乙型肝炎后肝硬化患者中医证候与血清TGF- β 1、HA、LN、IV-C、PC-III水平相关性研究[J]. 中医学报, 2017, 32(9): 1749-1752.
- [16] 朱 萍, 路毓峰, 王 丽, 等. 慢性乙型肝炎患者肝纤维化血清标志物与肝组织炎症分级的关系[J]. 河北医药, 2019, 41(16): 2497-2500.
- [17] 赵 晨, 姜美玲, 邱懿雯. 肝纤维化血清学和影像学诊断的研究进展[J]. 国际消化病杂志, 2024, 44(1): 13-16; 35.
- [18] Miao Y, Wu Y, Jin Y, *et al.* Benzoquinone derivatives with antioxidant activity inhibit activated hepatic stellate cells and attenuate liver fibrosis in TAA-induced mice[J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 317: 108945.
- [19] 陶柏楠, 王咏兰, 江 露, 等. 柔肝降酶方含药血清抑制人肝星状细胞的活化及自噬[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(33): 5334-5341.
- [20] 李 艳, 张晓琳, 韦园园, 等. 委陵菜酸调控PI3K/Akt/mTOR通路对肝星状细胞活化增殖的影响[J]. 中成药, 2022, 44(6): 1965-1969.
- [21] Harrington J S, Ryter S W, Plataki M, *et al.* Mitochondria in health, disease, and aging[J]. *Physiol Rev*, 2023, 103(4): 2349-2422.
- [22] An P, Wei L L, Zhao S, *et al.* Hepatocyte mitochondria-derived danger signals directly activate hepatic stellate cells and drive progression of liver fibrosis[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2362.
- [23] 李思怡, 白博文, 张 媚, 等. 雌激素对Min6细胞线粒体自噬的影响[J]. 中国医科大学学报, 2020, 49(11): 969-972.
- [24] 吉布和学莫, 张玉蓉, 吴 霞, 等. PINK1/Parkin信号通路在肝脏疾病中的作用[J]. 生命的化学, 2022, 42(11): 2046-2051.
- [25] 杨 丹, 王 刚, 杨丽君, 等. 川芎嗪通过PINK1/Parkin通路调控自噬对新生大鼠缺氧缺血性脑病的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2023, 25(7): 751-758.
- [26] Dou S D, Zhang J N, Xie X L, *et al.* MitoQ inhibits hepatic stellate cell activation and liver fibrosis by enhancing PINK1/parkin-mediated mitophagy[J]. *Open Med (Wars)*, 2021, 16(1): 1718-1727.
- [27] 王苗苗. 线粒体自噬在肝纤维化中的作用[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2016.
- [28] 孙东琪, 周晓玲, 吴 腾, 等. 理中汤通过调控线粒体自噬改善非酒精性脂肪性肝病的作用机制研究[J]. 海南医学院学报, 2023, 29(21): 1614-1619.