·实验研究·

苍术及其炮制品对脾虚大鼠线粒体自噬的影响

曾琬婷[1],徐慧颖[1],丁奕辉[2],才谦[1]

(1.辽宁中医药大学药学院,辽宁 大连 116600;2.吉林省药品审核查验中心,吉林 长春 130033)

摘要:目的 从线粒体自噬的角度,明确生苍术、麸炒苍术与米泔水制苍术的健脾作用机制。**方法** 将50只大鼠随机分为空白组、模型组、生苍术组、麸炒苍术组与米泔水制苍术组,每组10只。除空白组外,其余4组采用过度劳倦、饮食失节加苦寒泻下的复合因素造模方法复制脾虚大鼠模型,各给药组予以对应药液灌胃干预7 d。采用反转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)法检测各组大鼠胃窦组织PINK1、Parkin和P62的mRNA表达,免疫印记实验(Western blotting)法检测各组大鼠胃窦组织PINK1、Parkin、LC3和P62的蛋白表达,免疫荧光法检测PINK1、LC3与线粒体的共定位情况。**结果** 与空白组相比,模型组PINK1、Parkin、P62 mRNA与蛋白表达量均增加,LC3-Ⅱ蛋白表达量与LC3-Ⅱ/Ⅰ比值降低($P<0.001$)。与模型组相比,3种苍术给药后均可下调PINK1、Parkin、P62 mRNA及蛋白表达,上调LC3-Ⅱ蛋白表达与LC3-Ⅱ/Ⅰ比值($P<0.001$,$P<0.01$,$P<0.05$)。降低PINK1和COX Ⅳ(线粒体标记物)共定位,增加LC3和COX Ⅳ共定位($P<0.001$,$P<0.01$,$P<0.05$)。麸炒苍术与米泔水制苍术对上述指标的调节作用优于生苍术。**结论** 生苍术及两种炮制品均可通过改善线粒体自噬障碍从而调节脾虚,且炮制后的苍术对线粒体自噬的改善作用优于生苍术。

关键词:苍术;麸炒;米泔水制;脾虚;线粒体自噬

中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**2095-5375(2026)09-0961-07

doi:10.13506/j.cnki.jpr.2026.09.001

Effects of atractylodes and its processed preparations on mitochondrial autophagy in rats with spleen deficiency

ZENG Wanting[1],*XU Huiying*[1],*DING Yihui*[2],*CAI Qian*[1]

(*1.College of Pharmacy,Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Dalian 116600,China;2.Jilin Provincial Drug Audit and Inspection Center,Changchun 130033,China*)

Abstract:Objective To clarify the spleenstrengthening mechanism of crude *Atractylodis Rhizoma*(C-AR) and its two processed products(processing with bran and processing with rice-washed water) from the perspective of mitophagy. **Methods** Fifty rats were randomly divided into control group,model group,C-AR,B-AR and CW-AR with 10 rats in each group.Except for the control group,the rat model of spleen deficiency was established by compound factors of overfatigue,improper diet and purgation with bittercold medicines.Each administration group was given corresponding medicinal liquid by gavage for 7 days.qRTPCR was used to detect the mRNA expressions of PINK1,Parkin and P62 in gastric antrum tissues. Western blotting was applied to determine the protein expressions of PINK1, Parkin, LC3 and P62. Immunofluorescence assay was performed to observe the colocalization of PINK1, LC3 with mitochondria. **Results** Compared with the control group, the mRNA and protein expressions of PINK1, Parkin and P62 were significantly increased,while LC3-Ⅱ protein level and LC3-Ⅱ/Ⅰ ratio were markedly decreased in the model group($P<0.001$). Compared with the model group, three preparations of *Atractylodis Rhizoma* downregulated the mRNA and protein expressions of PINK1,Parkin and P62,and upregulated LC3-Ⅱ protein expression and LC3-Ⅱ/Ⅰ ratio($P<0.001$,$P<$

基金项目:国家自然科学基金项目(No.81973478)

作者简介:曾琬婷,女,硕士,助理实验师,研究方向:中药学,E-mail:z17866559442@163.com

通信作者:才谦,女,博士,教授,博士生导师,研究方向:中药化学,E-mail:caiqianmail@sina.com

0.01, $P<0.05$). Meanwhile, the colocalization of PINK1 with COX Ⅳ (mitochondrial marker) was reduced, whereas the colocalization of LC3 with COX Ⅳ was enhanced ($P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.05$). The regulatory effects of branfried and ricewaterprocessed *Atractylodis Rhizoma* were superior to those of crude *Atractylodis Rhizoma*. **Conclusion** Crude *Atractylodis Rhizoma* and its two processed products can ameliorate spleen deficiency by relieving mitophagy disorder, and processed *Atractylodis Rhizoma* exerts better improvement on mitophagy than the crude one.

Key words: *Atractylodis Rhizoma*; Processing with bran; Processing with rice-washed water; Spleen deficiency; Mitophagy

脾虚是中医临床常见的综合征,临床主要表现为形体消瘦、食欲缺乏、胃脘隐痛、脘腹胀满、神疲乏力、面色无华及便溏等症状。现代研究表明,脾虚证与机体能量代谢低下密切相关,尤其涉及胃肠功能的异常[1]。从细胞生物学角度来看,线粒体作为细胞能量代谢的核心细胞器,在胃肠动力维持中扮演关键角色,这也为中医"脾主运化"理论提供了科学依据[2]。然而,在氧化应激、营养不良等病理因素作用下,线粒体极易发生结构和功能损伤[3]。为应对这种情况,细胞会启动选择性自噬过程—即线粒体自噬,通过清除受损线粒体来调控线粒体质量和数量[4],这一机制对维持细胞稳态具有重要作用。值得注意的是,多项实验研究证实,脾虚模型动物的多种组织(包括骨骼肌、神经组织、肝脏及心肌等)均存在线粒体自噬功能紊乱的现象[5-9]。胃窦含有丰富 Cajal 间质细胞与平滑肌细胞,是调控胃动力、胃排空的关键区域;既往脾虚大鼠相关研究表明[10],脾虚损伤状态下胃窦线粒体损伤与线粒体自噬通路改变显著,是研究脾虚胃组织线粒体质量控制的代表性组织,故本研究选取胃窦组织作为检测样本,开展线粒体自噬相关指标检测。

苍术为菊科植物茅苍术[*Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.]或北苍术[*Atractylodes chinensis* (DC.) Koidz.]的干燥根茎,具有燥湿健脾之功效[11]。苍术生品具有辛味和燥烈之性。根据传统炮制理论,通过适当的炮制加工可有效降低其辛燥特性,使其药性趋于和缓。历代中医药典籍记载了丰富的苍术炮制方法,如炭制、酒制、米泔水制、醋制、麸炒等。目前,《中国药典》2020 年版收录的苍术炮制方法仅为麸炒[11]。课题组前期研究表明,苍术具有健脾的作用,且麸炒和米泔水制的苍术能降低生苍术的燥性,健脾效果更优[12],但炮制后的健脾机制尚未明确。因此,本研究是在药效学的基础上从线粒体自噬的角度探讨苍术调节脾虚的作用机制,并比较生苍术与两种苍术炮制品(麸炒和米泔水制)对脾虚大鼠线粒体自噬的调节效果,旨在为苍术的临床应用提供理论基础。

1　仪器、试药与动物

1.1　主要仪器　紫外可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司,型号:754);荧光酶标仪(上海美谷分子仪器有限公司,型号:SpectraMax Gemini XPS);荧光定量 PCR 仪(上海宏石医疗器械有限公司,型号:SLAN);标准试剂型纯水仪(青岛富勒姆科技有限公司型号:FBZ2001-up-p);扫描仪(EPSON 公司,型号:L4158)。

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

cDNA 反转录试剂盒(德国 Thermc)兔来源一抗:Parkin(CST 公司,批号:2132S);PINK1(Affinity 公司,批号:DF7742);P62(CST 公司,批号:23214S);LC3B(批号:ab192890)、内参 β-actin(批号:ab227387)均购自 Abcam 公司;山羊抗兔 IgG 二抗(批号:074-1506)、山羊抗小鼠 IgG 二抗(批号:074-1806)均购自 KPL 公司。

1.3　实验动物　实验选用 50 只 SPF 级健康雄性 SD 大鼠,体质量(200±10)g,由辽宁长生生物技术有限公司提供[实验动物生产许可证号:SCXK(辽)2020-0001]。实验动物饲养于温度 20~23 ℃、相对湿度 45%~55%的环境中[实验动物使用许可证号:SYXK(辽)2019-0004]。本研究通过辽宁中医药大学实验动物伦理委员会审核,批准编号 2019YS-DW-028-01,经 7 d 适应性喂养后,建立脾虚大鼠模型。

2　方法

2.1　药液制备

2.1.1　麸炒苍术饮片的制备　根据《中国药典》2020 年版规定的工艺,取同一批次的生苍术进行麸炒。将苍术药材除去杂质后,切成厚度为 2~4 mm 的苍术饮片[12]。将 30 g 麦麸放入热锅中,麦麸冒

烟后立即将 300 g 生苍术饮片倒入锅中,快速翻炒至苍术表面呈暗黄色,从锅中取出,将麸皮筛出,苍术冷却,即得麸炒苍术饮片。

2.1.2 米泔水制苍术饮片的制备 取同一批次生苍术,参考建昌帮米泔水漂苍术[13]传统炮制思路制备饮片。配制米泔水溶液(糯米粉 2 kg,加水 100 kg 混匀),米泔水溶液与药材料液比 100∶1,室温浸漂 36 h;取出后清水二次漂洗 3 h 以除去表面吸附的米泔淀粉杂质,该浸漂、漂洗时间参数经课题组前期实验优化得到[12],70 ℃恒温鼓风干燥,即得米泔水制苍术饮片。

2.1.3 苍术混悬液的制备 将生苍术饮片、麸炒苍术饮片、米泔水制苍术饮片分别粉碎,过 180 目筛。基于各饮片制备时原始生苍术投料量折算生药量,加入 0.5%CMC-Na 溶液研磨分散,制得混悬液供大鼠灌胃,现配现用。

剂量换算:人临床苍术常用日剂量:6~10 $g\cdot d^{-1}$(生药量)本实验选取临床中效剂量 8 g/60 kg·d 作为换算基准。成人单位体重剂量:8 g÷60 kg≈0.133 $g\cdot kg^{-1}$,根据体表面积换算系数 6.3,得到大鼠等效剂量:0.133 $g\cdot kg^{-1}\times$ 6.3≈0.84 $g\cdot kg^{-1}$。结合本课题组前期预实验及脾虚模型药物耐受情况,最终确定大鼠给药剂量为 0.375 $g\cdot mL^{-1}$(生药量),灌胃体积 10 $mL\cdot kg^{-1}$,即大鼠给药剂量 3.75 $g\cdot(kg\cdot d)^{-1}$(生药量),该剂量处于中药药理动物实验常用有效剂量区间,药效稳定、无明显毒性反应。

2.1.4 番泻叶水煎液的制备 取定量番泻叶药材,加入 10 倍体积蒸馏水,先武火煮沸后转文火维持煎煮 30 min。趁热过滤后,将滤液用文火浓缩至终浓度为 0.125 $g\cdot mL^{-1}$的提取液,放入冰箱冷藏备用。

2.2 分组、造模与给药 50 只大鼠随机分为空白组(Control)、模型组(Model)、生苍术组(C-AR)、麸炒苍术组(B-AR)与米泔水制苍术组(RW-AR),每组 10 只。除空白组外,其余 4 组均采用过度疲劳、饮食不节与苦寒泻下的复合因素法复制脾虚大鼠模型。方法如下:第 1~14 天,单日采用猪油对大鼠进行灌胃(10 $mL\cdot kg^{-1}$,每天 1 次),当日正常喂养饲料;双日大鼠进行游泳,游至大鼠体力耗尽,当日喂饲甘蓝代替饲料。采用番泻叶的水煎液(10 $mL\cdot kg^{-1}$,每天 1 次)对大鼠进行灌胃,番泻叶与猪油给药间隔时间为 4 h,造模完成。造模结束后,各给药组分别灌胃相应苍术混悬液,给药浓度统一以生药量计为 0.375 $g\cdot mL^{-1}$,灌胃体积 10 $mL\cdot kg^{-1}$,每天 1 次,给药 7 d。所有炮制品给药称样量均经炮制折算系数校正,保证各组大鼠单位体重等效生药量一致。给药期间,空白组和模型组给予 0.9% 氯化钠溶液(10 $mL\cdot kg^{-1}$,每天 1 次)。

2.3 脾虚大鼠行为状态评分 脾虚大鼠行为状态评分[12]参照《中医实验动物模型方法学》和《中药新药临床研究指导原则》总结脾虚大鼠的行为状态评定标准,并与大鼠的生物学特征结合拟定评价表现在以下 5 个方面:①体毛:柔顺光滑有光泽记 0 分;蓬松晦暗轻度发黄记 1 分;暗淡发黄无光泽记 2 分。②游泳耐力:游泳 3~5 min 进行游泳耐力半定量评分,用于动态评估脾虚模型进展。评分标准:0 分,活动敏捷,游动有力,可自主维持头部浮出水面;1 分,耐力下降,游动迟缓,间歇停歇,尚能自主保持头部露出水面;2 分,耐力明显下降,游动乏力,频繁下沉,需多次努力才可将头部浮出水面。游泳造模终点以体力耗尽为判定依据:大鼠水下沉没>10 s 无法自主浮出水面,立即捞出,结束游泳。③粪便状态:呈坚硬椭圆形记 0 分;呈柔软椭圆形记 1 分;呈溏稀状态,久泻不止记 2 分。④体质量变化:缓慢增加记 0 分;平均下降>0 g 且≤10 g 记 1 分;平均下降>10 g 且≤20 g 记 2 分。⑤肛温:正常记 0 分;平均下降>0 ℃且≤2 ℃记 1 分;平均下降>2 ℃且≤5 ℃记 2 分。评分明显增加($P<0.05$),表明症状加重。

2.4 样品收集 末次给药后,大鼠禁食不禁水 24 h,称量大鼠体质量,接取粪便,记录状态,准备取材。各组大鼠采取吸入式麻醉并剖开腹腔,剪取部分胃窦组织,-80 ℃冻存用于指标检测。

2.5 检测指标与方法

2.5.1 qRT-PCR 法检测 PINK1、Parkin、P62 mRNA 表达量 采用 Trizol 法提取组织中的总 RNA 后采用 cDNA 反转录试剂盒合成 RNA 样品的第一链 cDNA,并用 PCR 仪进行 qRT-PCR 分析。PCR 反应体系:2 ×SYBR Green qPCR Master Mix 5 μL,上、下游引物各 0.2 μL,cDNA 2 μL,灭菌去离子水 2.6 μL,共 10 μL。PCR 反应条件:预变性(95 ℃ 300 s),40 次循环(95 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s),溶解曲线(65~105 ℃)。

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

2.5.2 Western blotting 法检测 PINK1、Parkin、P62、LC3 蛋白表达量 取各组大鼠胃窦组织,加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液冰上充分裂解,提取组织总蛋白,采用 BCA 蛋白定量法测定各样品蛋白浓度,统一蛋白上样量。配制 SDS-PAGE 凝胶,

经电泳浓缩胶 80 V、分离胶 120 V 恒压电泳分离蛋白样品。电泳结束后采用湿转法进行转膜,转膜条件为恒流 200 mA,90 min,将蛋白样品转移至 PVDF 膜。转膜完成后,将膜置于含 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭液中,室温摇床低速封闭 60 min。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

引物名称	序列
β-actin	F:CCCGCGAGTACAACCTTCTTG
	R:TCATCCATGGCGAACTGGTGG
PINK1	F:GGCCCAGATGTCGTCTCAAA
	R:TGGAGGATCCTGCCGAGATA
Parkin	F:TCCTTGGAGAAGAGCAGTACAAC
	R:CTTTCCTCTGGCCCTGTTCA
P62	F:CAGCTGCTGTCCGTAGAAATTG
	R:CAGGGATCAGTACCCGCTCT

封闭结束后 TBST 充分洗涤(每次 5 min,洗涤 3 次),分别加入对应兔来源一抗:Parkin(稀释比例 1∶1000)、PINK1(稀释比例 1∶2500)、P62(稀释比例 1∶2500)、LC3B(稀释比例 1∶2500)及内参 β-actin(稀释比例 1∶6000),4 ℃摇床低速孵育 12 h。

一抗孵育结束后,TBST 漂洗 3 次(每次 5 min),分别加入山羊抗兔 IgG 二抗、山羊抗小鼠 IgG 二抗,稀释比例均为 1∶50000,室温摇床低速孵育 60 min。二抗孵育结束后 TBST 充分洗膜 3 次,每次 5 min。滴加 ECL 化学发光工作液避光显色,于化学发光成像系统采集条带图像,使用 Image J 软件分析各目标蛋白条带灰度值,以 β-actin 为内参校正,计算各目标蛋白相对表达量。

2.5.3 免疫荧光法测定 PINK1 与线粒体共定位及 LC3 与线粒体共定位情况 胃窦组织切片去蜡、水合并用柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)进行抗原修复,用 3%BSA 封闭,并在室温下孵育一抗(LC3B、PINK1、COX Ⅳ),用 PBS 洗涤切片后加入荧光二抗室温避光孵育 1 h,清洗二抗,然后对切片进行染色。采用荧光显微镜进行观察分析。

2.6 统计方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析,实验数据以平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,实验数据首先进行 Shapiro-Wilk 正态性检验和 Levene 方差齐性检验,满足正态分布且方差齐,选择 *LSD* 方法校正进行多组之间的两两差异比较。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 模型评价 在临床上,脾虚患者常会表现食欲减退,脘腹隐痛,倦怠乏力,畏寒肢冷等症状[14]。参考中医脾虚临床症状及相关文献对脾虚模型的评判标准[15],本实验中[16],造模后大鼠消瘦、弓背、神态萎靡以及蜷缩聚堆,反映出脾虚模型的外观行为变化。各组大鼠造模前体毛柔顺光滑有光泽、活动敏捷、粪便呈坚硬椭圆形,肛温正常;造模后体质量、肛温均降低($P<0.05$),宏观指标计分升高($P<0.05$),结果见表 2,并呈现游泳耐力下降、粪便变稀等现象,与中医描述的脾虚的症状相似,表明造模成功。

表 2 大鼠造模前后形态学变化

Tab.2 Morphological changes of rats before and after model establishment

组别	体质量/g	肛温/ ℃	宏观指标/分
造模前	220.80±10.22	36.38±1.40	0
造模后	182.34±12.42$^{\#}$	33.56±2.43$^{\#}$	9.60±0.45$^{\#}$

注:与造模前比较,$^{\#}P<0.05$。

Note:Compared with before modeling,$^{\#}P<0.05$.

3.2 qRT-PCR 与 Western blotting 的测定结果 如表 3、图 1A 所示,与空白组相比,模型组 PINK1、Parkin、P62 的 mRNA 表达量增加($P<0.001$);与模型组相比,生苍术、麸炒苍术与米泔水制苍术给药后 PINK1、Parkin、P62 mRNA 表达量均下调($P<0.001$)。蛋白结果与 mRNA 基本一致,如表 4、图 1B 所示,与空白组相比,模型组 PINK1、Parkin、P62 蛋白表达量增加,LC3-Ⅱ蛋白表达量减少,LC3-Ⅱ/Ⅰ降低($P<0.001$,$P<0.01$,$P<0.05$),说明脾虚状态下胃窦组织自噬体生成不足,整体自噬通量下降。与模型组相比,生苍术、麸炒苍术与米泔水制苍术给药后 PINK1、Parkin、P62 蛋白表达量均下调,LC3-Ⅱ蛋白表达量与 LC3-Ⅱ/Ⅰ升高($P<0.001$,$P<0.01$,$P<0.05$),有助于自噬体的生成。麸炒苍术与米泔水制苍术对上述指标的调节作用优于生苍术。

表 3 PINK1、Parkin、P62 mRNA 表达量的测定结果($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

Tab.3 Determination results of PINK1,Parkin and P62 mRNA expression levels($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

组别	PINK1	Parkin	P62
空白组	1	1	1
模型组	3.04±0.31$^{\#\#\#}$	3.04±0.53$^{\#\#\#}$	3.30±0.89$^{\#\#\#}$
生苍术组	1.83±0.13***	2.50±0.27*	1.76±0.14***
麸炒苍术组	1.32±0.22$^{***\triangle}$	1.14±0.17$^{***\triangle}$	1.28±0.07***
米泔水制苍术组	1.64±0.10***	2.26±0.12**	1.52±0.02***

注:与空白组比较,$^{\#\#\#}P<0.001$;与模型组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$;与生苍术组比较,$^{\triangle}P<0.05$。

Note:Compared with control group,$^{\#\#\#}P<0.001$;Compared with model group,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$;Compared with raw *Atractylodes Rhizoma* group,$^{\triangle}P<0.05$.

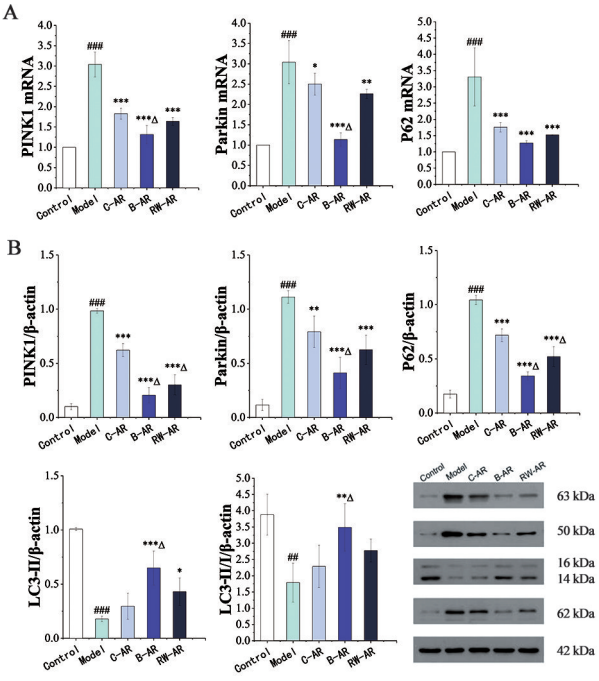
表 4 PINK1、Parkin、P62、LC3 蛋白表达量的测定结果($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

Tab.4 Protein expression levels of PINK1, Parkin, P62 and LC3($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	PINK1/β-actin	Parkin/β-actin	P62/β-actin	LC3-Ⅱ/β-actin	LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ
空白组	0.10±0.03	0.11±0.05	0.17±0.04	1.01±0.01	3.87±0.63
模型组	0.98±0.02$^{\#\#\#}$	1.11±0.06$^{\#\#\#}$	1.04±0.04$^{\#\#\#}$	0.18±0.03$^{\#\#\#}$	1.79±0.60$^{\#\#}$
生苍术组	0.62±0.06***	0.79±0.15**	0.72±0.06***	0.30±0.12	2.29±0.65
麸炒苍术组	0.21±0.07$^{***\triangle}$	0.41±0.14$^{***\triangle}$	0.34±0.04$^{***\triangle}$	0.65±0.16$^{***\triangle}$	3.49±0.73$^{**\triangle}$
米泔水制苍术组	0.30±0.09$^{***\triangle}$	0.62±0.13***	0.52±0.09$^{***\triangle}$	0.43±0.13*	2.78±0.35

注:与空白组比较,$^{\#\#}P<0.01$,$^{\#\#\#}P<0.001$;与模型组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$;与生苍术组比较,$^{\triangle}P<0.05$。

Note: Compared with control group, $^{\#\#}P<0.01$, $^{\#\#\#}P<0.001$; Compared with model group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$; Compared with raw *Atractylodes Rhizoma* group, $^{\triangle}P<0.05$.



A.mRNA 表达量的测定结果;B.蛋白表达量测定结果

图 1 PINK1、Parkin、P62、LC3 的 mRNA 与蛋白表达量测定结果($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

注:与空白组比较,$^{\#\#}P<0.01$,$^{\#\#\#}P<0.001$;与模型组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$;与生苍术比较,$^{\triangle}P<0.05$。

A. Results of mRNA expression analysis; B. Results of protein expression analysis

Fig.1 Determination results of mRNA and protein expression levels of PINK1, Parkin, P62 and LC3($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Note: Compared with control group, $^{\#\#}P<0.01$, $^{\#\#\#}P<0.001$; Compared with model group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$; Compared with C-AR group, $^{\triangle}P<0.05$.

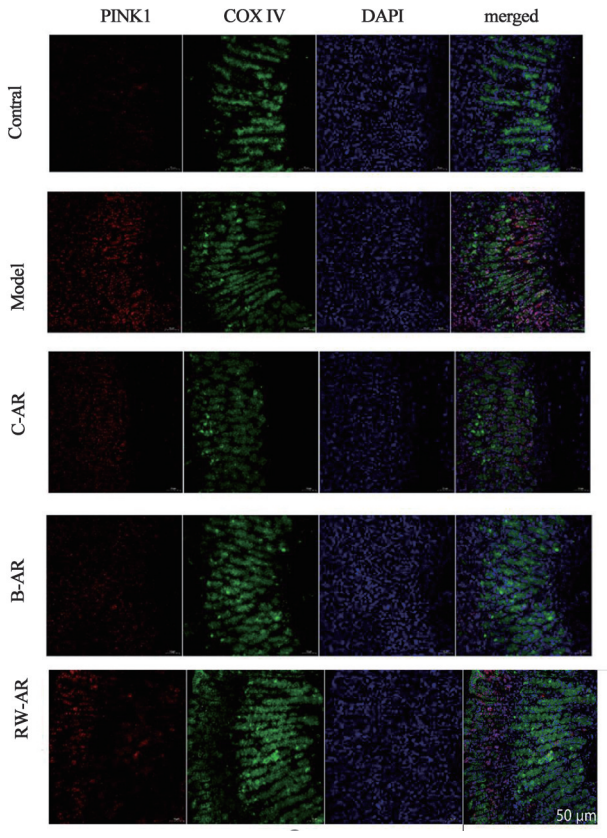


图 2 PINK1 和 COX Ⅳ的共定位表达($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

注:DAPI 为复染细胞核,merged 为各染色合并图。

Fig.2 Co-localization of PINK1 and COX Ⅳ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Note: DAPI represents the counterstaining nucleus, while merged represents the merged images of each staining.

3.3 免疫荧光分析结果 如图 2~4 所示,与模型组相比,生苍术组、麸炒苍术组与米泔水制苍术组中 PINK1 和 COX Ⅳ(线粒体标记物)的共定位降低,LC3 和 COX Ⅳ的共定位增加,与 Western blotting 的测定结果一致。表明生苍术、麸炒苍术与米泔水制苍术在不同程度上促进了线粒体自噬。

4 讨论

线粒体自噬是维持细胞器稳态的重要生理过程,通过选择性清除功能异常或多余的线粒体,使其被自噬体包裹并转运至溶酶体降解。已有研究表明,该过程涉及多种调控途径[17],其中 PINK1/Parkin 通路是最经典的调控机制之一。当线粒体损伤导致内膜电位降低时,PINK1 无法正常进入线粒体,从而在膜表面聚集,并进一步募集胞质中的 Parkin(一种 E3 泛素连接酶)[18]。受损的线粒体被 PINK1 和 Parkin 特异性识别,并通过自噬适配器(P62)标记到自噬体中[19],随后被溶酶体迅速清除,P62 也一起被降解。因此,自噬通量的增加通常

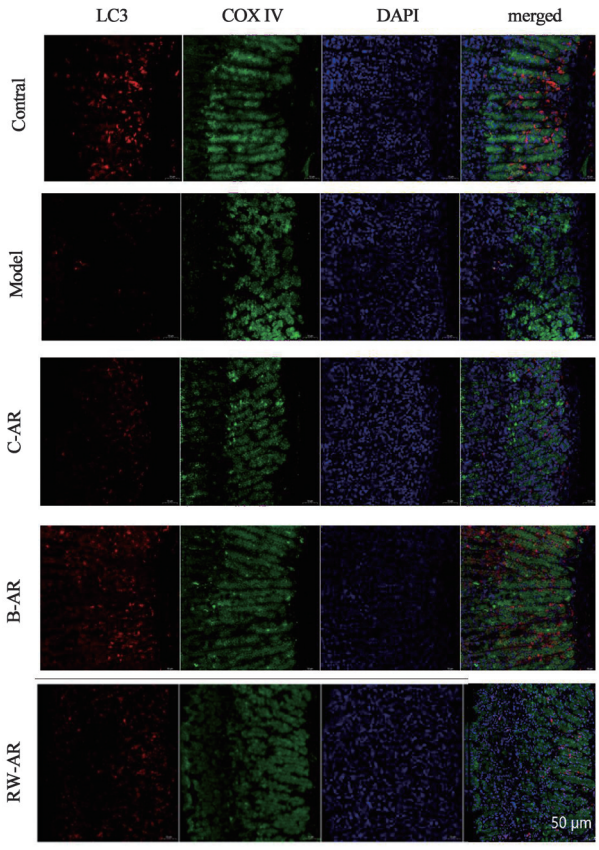


图 3 LC3 和 COX Ⅳ的共定位表达($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

注:DAPI 为复染细胞核,merged 为各染色合并图。

Fig.3 Co-localized expression of LC3 and COX Ⅳ($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

Note: DAPI represents the counterstaining nucleus, while merged represents the merged images of each staining.

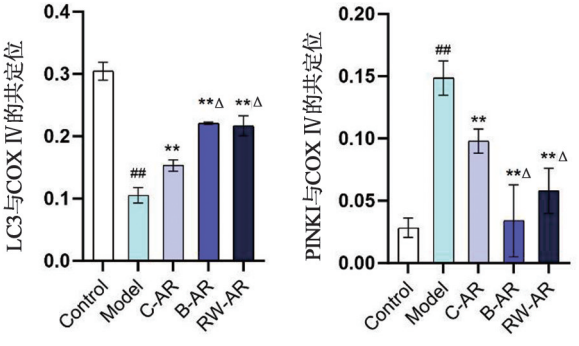


图 4 共定位定量情况

注:与空白组比较,$^{\#\#}P<0.01$;与模型组比较,$^{**}P<0.01$;与生苍术组比较,$^{\triangle}P<0.05$。

Fig.4 Co-localization and quantification results

Note: Compared with control group, $^{\#\#}P<0.01$; Compared with model group, $^{**}P<0.01$; Compared with C-AR group, $^{\triangle}P<0.05$.

伴随着细胞中 P62 的减少,P62 的异常聚集常被视为自噬功能障碍或降解受阻的指标。LC3 蛋白作为酵母 Atg8 的哺乳动物同源物,在自噬体膜形成过程中发挥关键作用。在自噬激活状态下,胞质中的 LC3-Ⅰ会与磷脂酰乙醇胺(PE)共价结合,转化为膜结合形式的 LC3-Ⅱ[20]。与此同时,P62 通过与 LC3 相互作用被募集至自噬体,进而介导线粒体自噬的起始。因此,可通过测定 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ,推断自噬通量的强度。

本研究结果显示,与空白组相比,模型组大鼠的 PINK1 和 Parkin 蛋白表达上调,而 LC3-Ⅰ蛋白含量及 LC3-Ⅱ/Ⅰ比值明显降低,同时 P62 蛋白水平升高。这些数据提示,存在受损的线粒体,尽管 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬途径被激活,但自噬体-溶酶体融合过程可能受阻,导致受损线粒体无法被有效清除,进而加剧线粒体功能紊乱与胃窦组织损伤。然而,经生苍术、麸炒苍术与米泔水制苍术给药后,PINK1、Parkin、P62 的 mRNA 与蛋白表达量均下调,LC3-Ⅰ向 LC3-Ⅱ的转化增加,说明线粒体自噬增强。这些结果表明脾虚导致大鼠胃窦组织线粒体的自噬通量受损,而生苍术及其两种炮制品调节了自噬通量,恢复自噬体-溶酶体的降解功能,促进有效线粒体自噬发生,清除受损线粒体以维持细胞器稳态。

本研究结果提示生苍术、麸炒苍术、米泔水制苍术均可修复脾虚大鼠胃窦线粒体自噬损伤,但药效存在差异。线粒体自噬作为细胞器质量控制手段存在作用限度,适度激活可清除受损线粒体保护细胞稳态,而过度激活则会消耗正常线粒体、造成细胞损伤;本研究中 3 种苍术饮片并非无限制放大线粒体自噬水平,而是校正脾虚状态下受阻的自噬通量,使线粒体自噬回归生理适宜区间,发挥细胞保护效应。苍术挥发油既是药效物质,亦是产生燥性的物质基础。生苍术挥发油含量最高,燥性较强;麸炒高温炮制使部分挥发油散失,健脾作用凸显;米泔水浸漂工艺可溶出部分刺激性成分,缓和燥烈之性,契合脾虚"脾胃本虚"的病理特点。炮制带来的挥发油及组分比例变化,可能是造成 3 种饮片药效差异的潜在物质基础,而何种活性成分直接调控线粒体自噬通路,有待后续深入研究。

5 结论

本研究从线粒体自噬的角度对生苍术、麸炒苍术与米泔水制苍术的健脾作用机制进行探究,明确了生苍术、麸炒苍术与米泔水制苍术可通过改善线粒体自噬障碍从而调节脾虚,且麸炒苍术与米泔水制苍术对线粒体自噬的调节效果优于生苍术。

(下转第 1032 页)

human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients [J]. Sci Immunol, 2016, 1(2):aaf8943.
[57] Wang C,Zheng X,Zhang J,et al.CD300ld on neutrophils is required for tumour-driven immune suppression[J]. Nature,2023,621(7980):830-839.
[58] Blidner A G,Bach C A,García P A,et al.Glycosylation-driven programs coordinate immunoregulatory and pro-angiogenic functions of myeloid-derived suppressor cells [J].Immunity,2025,58(6):1553-1571.
[59] Peng H,Shen J,Long X,et al.Local release of TGF-β inhibitor modulates tumor-associated neutrophils and enhances pancreatic cancer response to combined irreversible electroporation and immunotherapy[J]. Adv Sci(Weinh),2022,9(10):e2105240.
[60] Veglia F,Tyurin V A,Blasi M,et al.Fatty acid transport protein 2 reprograms neutrophils in cancer[J]. Nature, 2019,569(7754):73-78.
[61] Linde I L,Prestwood T R,Qiu J,et al. Neutrophil-activating therapy for the treatment of cancer[J].Cancer Cell,2023,41(2):356-372.
[62] Treffers L W,Ten Broeke T,Rösner T,et al.IgA-mediated killing of tumor cells by neutrophils is enhanced by CD47-SIRPα checkpoint inhibition[J].Cancer Immunol Res, 2020,8(1):120-130.
[63] Behrens L M,Van Den Berg T K,Van Egmond M. Targeting the CD47-SIRPα innate immune checkpoint to potentiate antibody therapy in cancer by neutrophils[J]. Cancers(Basel),2022,14(14):3366.
[64] Blair H A. Efbemalenograstim alfa: first approval [J]. Drugs,2023,83(12):1125-1130.

(收稿日期:2026-03-20)

(上接第 966 页)

参考文献:

[1] Zhang J,Wang X,Shi X,et al.Combination of 15 lipid metabolites and motility into diagnosis of spleendeficiency FD[J].Chin Med,2019,14(1):16.
[2] Fernándezvizarra E,Tiranti V,Zeviani M.Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans:what we have learned by studying its defects[J]. Biochim Biophys Acta,2009,1793(1):200-211.
[3] Berger E,Rath E,Yuan D,et al.Mitochondrial function controls intestinal epithelial stemness and proliferation [J].Nat Commun,2016(7):13171.
[4] Baechler B L,Bloemberg D,Quadrilatero J. Mitophagy regulates mitochondrial network signaling, oxidative stress,and apoptosis during myoblast differentiation[J]. Autophagy,2019,15(9):1606-1619.
[5] Dong Y,Li Y,Sun Y,et al.Bufei Jianpi granules improve skeletal muscle and mitochondrial dysfunction in rats with chronic obstructive pulmonary disease [J]. BMC Complement Altern Med,2015(15):51.
[6] Liu W J,Xu X Z,Duan Z Y,et al.Efficacy of Sijunzi decoction on limb weakness in spleen Qi deficiency model rats through adenosine monophosphateactivated protein kinase/unc51 like autophagy activating kinase 1 signaling [J].J Tradit Chin Med,2021,41(4):617-623.
[7] 尹文浩,张家瑞,王垒钞,等.脾气虚大鼠海马神经元线粒体自噬的初步研究[J].辽宁中医杂志,2019,46(12):2650-2652.
[8] 陈慧,陈燕,王丹,等.两种脾虚证大鼠肝脏线粒体自噬及细胞凋亡的比较研究[J].中国中西医结合杂志,2019,39(11):1359-1365.
[9] 董佳梓,薛亚楠,魏云涛,等.电针“足三里”对脾虚大鼠心肌细胞 AMPK 线粒体通路的影响[J].北京中医药大学学报,2020,43(6):522-528.
[10] 徐慧颖,丁奕辉,董昊,等.苍术多糖与正丁醇部位对脾虚大鼠线粒体自噬的影响[J].天然产物研究与开发,2023,35(8):1372-1379.
[11] 国家药典委员会.中华人民共和国药典 2020 年版(一部)[S].北京:中国医药科技出版社,2020.
[12] 凌嘉阳,柏阳,曲扬,等.基于药效学和代谢组学考察北苍术不同炮制品对脾虚大鼠的影响[J].中国实验方剂学杂志,2024,30(7):179-188.
[13] 王文凯,张正,翁萍,等.建昌帮米泔水漂苍术工艺研究[J].时珍国医国药,2015,26(9):2157-2159.
[14] 张声生,胡玲,李茹柳.脾虚证中医诊疗专家共识意见(2017)[J].中医杂志,2017,58(17):1525-1530.
[15] 李亚欢,张冬梅,王淑艳,等.脾虚证动物模型研制概况[J].中医药导报,2019,25(1):100-102.
[16] 徐慧颖,董昊,丁奕辉,等.苍术麸炒前后多糖与正丁醇部位对脾虚大鼠的调节作用[J].中国处方药,2023,21(2):21-24.
[17] 段志园,许欣竹,谢鑫,等.四君子汤对脾气虚证模型大鼠股四头肌线粒体自噬和细胞凋亡水平的影响[J].世界科学技术-中医药现代化,2020,22(11):3900-3905.
[18] Iguchi M,Kujuro Y,Okatsu K,et al. Parkincatalyzed ubiquitinester transfer is triggered by PINK1dependent phosphorylation[J].J Biol Chem,2013,288(30):22019-22032.
[19] Geisler S,Holmström K M,Skujat D,et al. PINK1/Parkinmediated mitophagy is dependent on VDAC1 and P62/SQSTM1[J].Nat Cell Biol,2010,12(2):119-131.
[20] Rüb C,Wilkening A,Voos W. Mitochondrial quality control by the Pink1/Parkin system[J].Cell Tissue Res, 2017,367(1):111-123.

(收稿日期:2026-07-07)