

本文引用: 黄玉, 张涛, 丁琳, 孙克伟. 基于 PINK1/Parkin 通路探讨温阳解毒化痰方含药血浆对肝细胞损伤的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(5): 845-855.

## 基于 PINK1/Parkin 通路探讨温阳解毒化痰方含药血浆对肝细胞损伤的影响

黄玉<sup>1</sup>, 张涛<sup>2</sup>, 丁琳<sup>2</sup>, 孙克伟<sup>2\*</sup>

1. 湖南中医药大学第一中医临床学院, 湖南长沙 410007; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007

**〔摘要〕** 目的 基于 PTEN 诱导激酶 1(PINK1)/E3 泛素连接酶(Parkin)通路探讨温阳解毒化痰方含药血浆对肝细胞损伤的影响。方法 采用 D-氨基半乳糖(D-GalN)+脂多糖(LPS)构建肝细胞损伤模型, 实验设置对照组、模型组、空白血浆组、中药血浆组、3-MA 组、中药+3-MA 组。CCK-8 法筛选含药血浆最佳干预浓度及时间; Annexin V-APC/PI 双染色法检测细胞凋亡情况; JC-1 染色检测线粒体膜电位; MitoSOX Red 染色检测活性氧(ROS)水平; 生物化学法检测超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平; 透射电镜观察肝细胞超微结构; RT-qPCR 法检测 PINK1、Parkin、微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)、整合体 1(SQSTM1/P62)mRNA 水平; Western blot 法检测 PINK1、Parkin、LC3、P62、B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、裂解的胱天蛋白酶-3(cleaved-Caspase-3)和胱天蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白表达水平。结果 CCK-8 结果显示, 15%含药血浆干预 12 h 为实验的最佳干预浓度及时间。与对照组相比, 模型组细胞各期凋亡率升高( $P<0.01$ ); 线粒体膜电位下降( $P<0.01$ ); 细胞内 ROS、MDA 水平上升( $P<0.01$ ); SOD 水平下降( $P<0.01$ ); 线粒体结构明显紊乱、自噬溶酶体数量较少; PINK1、Parkin、LC3 mRNA 表达下降( $P<0.01$ ), P62 mRNA 表达上升( $P<0.01$ ); PINK1、Parkin、Bcl-2 蛋白及 LC3 II/I 比值下降( $P<0.01$ ), P62、Bax 蛋白表达及 cleaved-Caspase-3/Caspase-3 比值上升( $P<0.01$ )。与模型组比较, 中药血浆组细胞各期凋亡程度减轻( $P<0.01$ ); 线粒体膜电位升高( $P<0.01$ ); 细胞内 ROS、MDA 水平下降( $P<0.01$ ); SOD 水平上升( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 中药血浆组线粒体结构紊乱程度减轻、自噬溶酶体增加; PINK1、Parkin、LC3 mRNA 表达升高( $P<0.01$ ), P62 mRNA 表达下降( $P<0.01$ ); PINK1、Parkin、Bcl-2 蛋白及 LC3 II/I 比值升高( $P<0.01, P<0.05$ ), P62、Bax 蛋白表达及 cleaved-Caspase-3/Caspase-3 比值下降( $P<0.01, P<0.05$ )。与中药血浆组比较, 中药+3-MA 组细胞凋亡率均明显上升( $P<0.01$ ); 线粒体膜电位下降( $P<0.01$ ); ROS、MDA 水平显著升高( $P<0.01$ ), SOD 水平显著下降( $P<0.01$ ); 电镜显示线粒体结构紊乱加重, 自噬溶酶体数量减少; PINK1、Parkin、LC3 mRNA 表达下降( $P<0.01$ ), P62 mRNA 表达升高( $P<0.01$ ); PINK1、Parkin、Bcl-2 蛋白及 LC3 II/I 比值下降( $P<0.01$ ), P62、Bax 蛋白表达及 cleaved-Caspase-3/Caspase-3 比值升高( $P<0.01, P<0.05$ )。结论 温阳解毒化痰方含药血浆可减轻 ROS 蓄积和氧化应激反应, 抑制线粒体内源性途径诱导的肝细胞凋亡在 D-GalN/LPS 诱导的肝细胞损伤中发挥保护作用, 其机制可能与其促进 PINK1/Parkin 通路介导的线粒体自噬、改善线粒体功能有关。

**〔关键词〕** 慢加急性肝衰竭; 肝损伤; 温阳解毒化痰方; PINK1/Parkin 通路; 线粒体自噬

**〔中图分类号〕** R285.5

**〔文献标志码〕** A

**〔文章编号〕** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.05.009

## Effects of plasma containing Wenyang Jiedu Huayu Formula on hepatocyte injury based on the PINK1/Parkin signaling pathway

HUANG Yu<sup>1</sup>, ZHANG Tao<sup>2</sup>, DING Lin<sup>2</sup>, SUN Kewei<sup>2\*</sup>

1. The First Clinical School of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

**〔收稿日期〕** 2025-01-07

**〔基金项目〕** 国家自然科学基金项目(81973833); 国家中医药管理局高水平中医药重点学科项目; 湖南中医药大学双一流学科建设项目(2018[03])。

**〔通信作者〕** \* 孙克伟, 男, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, E-mail: keweisun550@163.com。

**[Abstract] Objective** To investigate the effects of plasma containing Wenyang Jiedu Huayu Formula (WYJDHYF) on hepatocyte injury based on the PTEN-induced kinase 1 (PINK1)/E3 ubiquitin ligase (Parkin) pathway. **Methods** A hepatocellular injury model was established using D-galactosamine (D-GalN) combined with lipopolysaccharide (LPS). Experimental groups included control group, model group, blank plasma group, WYJDHYF plasma group, 3-MA group, and WYJDHYF+3-MA group. The optimal concentration and intervention duration of plasma was determined via CCK-8 assay. Cell apoptosis was assessed using Annexin V-APC/PI double staining. Mitochondrial membrane potential was measured by JC-1 staining, and reactive oxygen species (ROS) levels were checked using MitoSOX Red staining. Biochemical methods were employed to evaluate superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) levels. Hepatocyte ultrastructure was observed by transmission electron microscopy (TEM). RT-qPCR was used to quantify mRNA levels of PINK1, Parkin, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), and sequestosome 1 (SQSTM1/P62). The protein expression levels of PINK1, Parkin, LC3, p62/SQSTM1, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), cleaved-Caspase-3, and Caspase-3 were analyzed by Western blot. **Results** The CCK-8 assay indicated that intervention with 15% drug-containing plasma for 12 hours was the optimal concentration and duration for the experiment. Compared with the control group, the model group showed increased apoptosis rate of cells at all stages ( $P<0.01$ ); decreased mitochondrial membrane potential ( $P<0.01$ ); elevated levels of intracellular ROS and MDA ( $P<0.01$ ) and reduced SOD level ( $P<0.01$ ). TEM revealed severely disordered mitochondrial structures and fewer autolysosomes. The mRNA expression levels of PINK1, Parkin, and LC3 decreased ( $P<0.01$ ), while P62 mRNA expression increased ( $P<0.01$ ). The protein expressions of PINK1, Parkin, Bcl-2, and the ratio of LC3 II/I decreased ( $P<0.01$ ), whereas the P62 and Bax protein expressions and the cleaved-Caspase-3/Caspase-3 ratio were elevated ( $P<0.01$ ). Compared to the model group, the WYJDHYF plasma group exhibited reduced apoptosis rates at all stages ( $P<0.01$ ), increased mitochondrial membrane potential ( $P<0.01$ ), decreased intracellular ROS and MDA levels ( $P<0.01$ ), and increased SOD levels ( $P<0.01$ ). Alleviated mitochondrial structural disruption and increased autolysosomes were revealed. Upregulated PINK1, Parkin, and LC3 mRNA ( $P<0.01$ ) and downregulated P62 mRNA ( $P<0.01$ ) levels were shown. Protein expressions of PINK1, Parkin, and Bcl-2, as well as the LC3 II/I ratio, were demonstrated elevated ( $P<0.01$  or  $P<0.05$ ), whereas the expressions of P62 and Bax proteins and the cleaved-Caspase-3/Caspase-3 ratio decreased ( $P<0.01$  or  $P<0.05$ ). Compared to the WYJDHYF plasma group, the WYJDHYF+3-MA group exhibited markedly increased apoptosis rate ( $P<0.01$ ), decreased mitochondrial membrane potential ( $P<0.01$ ), elevated ROS and MDA levels ( $P<0.01$ ), reduced SOD levels ( $P<0.01$ ). Electron microscopy showed worsened mitochondrial disorganization and reduced autolysosome numbers. mRNA expressions of PINK1, Parkin, and LC3 decreased ( $P<0.01$ ), while P62 mRNA expression increased ( $P<0.01$ ). Protein expressions of PINK1, Parkin, Bcl-2 protein, and LC3-III ratio reduced ( $P<0.01$ ), whereas expressions of P62 and Bax proteins and Cleaved-Caspase-3/Caspase-3 ratio increased ( $P<0.01$  or  $P<0.05$ ). **Conclusion** The plasma containing WYJDHYF can alleviate ROS accumulation and oxidative stress, inhibit mitochondrial intrinsic apoptosis, and exert a protective effect against D-GalN/LPS-induced hepatocyte injury. Its protective mechanism may involve enhancing PINK1/Parkin pathway-mediated mitophagy and improving mitochondrial function.

**[Keywords]** acute-on-chronic liver failure; liver injury; Wenyang Jiedu Huayu Formula; PINK1/Parkin pathway; mitophagy

慢加急性肝衰竭 (acute-on-chronic liver failure, ACLF) 是在多种慢性肝病基础上出现的肝功能急性失代偿, 临床出现黄疸急性加深、凝血功能异常等表现的一种危及生命的综合征<sup>[1]</sup>。在我国, 病毒性肝炎尤其是乙型肝炎病毒引起的 ACLF 最为常见<sup>[2]</sup>。ACLF 短期病死率高<sup>[3]</sup>, 肝移植是目前 ACLF 治疗最有效的方法, 但由于供体短缺、移植手术费用高昂、移植后排异反应等问题, 部分患者无法获得有效治疗<sup>[4]</sup>。因此, 迫切需要更合理有效的治疗方法降低 ACLF 病死率, 解决目前治疗的困境。

线粒体是细胞维持稳态的重要调节器, 参与活

性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成与代谢、细胞死亡、氧化还原反应、离子稳态等多项生物代谢活动<sup>[5]</sup>。研究显示, ACLF 患者在全身体炎症状态下, 代谢产物和代谢途径的改变引起线粒体功能障碍, 导致器官衰竭的发生<sup>[6]</sup>。线粒体功能障碍可导致线粒体自噬失调、ROS 生成与代谢紊乱、线粒体内源性凋亡途径的激活, 从多方面影响 ACLF 疾病进展。

结合 ACLF 的临床表现, 中医学多将其归属于“急黄”“瘟黄”“肝瘟”等范畴, 传统治疗多从阴黄、阳黄辨治。近年来, 团队通过对肝衰竭患者长期观察发现, ACLF 患者临证之时, 部分患者临床证型介于阴

黄、阳黄之间,由此提出“阴阳黄”的病证名,创新性提出“阳黄-阴阳黄-阴黄”的辨证论治新模式,并以温阳健脾、解毒化瘀为治法创制温阳解毒化瘀方,临床疗效显著<sup>[7-9]</sup>。机制研究显示,温阳解毒化瘀方可降低肝衰竭炎症因子表达,抑制肝细胞凋亡,改善肝衰竭<sup>[10]</sup>。网络药理学研究显示,ROS代谢可能是温阳解毒化瘀方作用于 ACLF 的潜在靶点<sup>[11]</sup>,但具体调控机制尚未明确。ROS代谢与线粒体自噬及线粒体内源性凋亡途径密切相关,基于此,本研究以线粒体功能障碍为切入点,通过使用 D-氨基半乳糖(d-galactosamine, D-GalN)+脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)建立肝细胞损伤模型,深入探讨温阳解毒化瘀方改善肝衰竭细胞损伤的具体作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物与细胞系

健康 SPF 雄性大鼠 12 只,体质量(250±20) g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司购入,动物质量合格证:430727241102593956,饲养于湖南中医药大学第一附属医院动物实验中心。本实验通过湖南中医药大学第一附属医院伦理委员会审查,伦理审查编号:202404030。大鼠正常肝实质细胞 BRL-3A (Abiowell 公司,批号:AW-CNR428)。

### 1.2 药物与试剂

白术、丹参、黑顺片、赤芍、薏苡仁、茵陈(批号:240602、XZ24072904、2409230162、NG24092701、CK24090301、SX24101401),购自湖南中医药大学第一附属医院,经湖南中医药大学第一附属医院药学部邓桂明研究员鉴定均为正品。

CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所,批号:NU679);PTEN 诱导激酶 1(PTEN induced putative kinase 1, PINK1)、E3 泛素连接酶(Parkin RBR E3 ubiquitin-protein ligase, Parkin)、微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)、整合体 1(sequestosome 1, SQSTM1/P62)、胱天蛋白酶-3(cysteiny l aspartate specific proteinase-3, Caspase-3)、B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X, Bax)抗体(中国 Abiowell 公司,批号:AWA54820、AWA41194、AWA10125、AWA0000、AWA45562、AWA5806、AWA43352);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、丙氨酸

氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(aspartate transaminase, AST)试剂盒(中国南京建成生物工程研究所,批号:A001-3-2、A003-1-1、A020-2-2、C009-2-1、C010-2-1);LPS、D-GalN(美国 Sigma 公司,批号:L2630、G1639-100MG);MitoSOX Red 染色液、JC-1 试剂(中国碧云天生物技术有限公司,批号:S0061M、C2006);3-甲基腺嘌呤(3-Methyladenine, 3-MA)(美国 MedChem-Express 公司,批号:A8353);戊二醛、钨酸(中国 Abiowell 公司,批号:AWI007、AWI0136);Epon-812、DDSA、NMP、柠檬酸铅、无碳芳华膜铜网(中国中镜科仪技术有限公司,批号:GS02659、GS02827、GS02828、GA10701-1、BZ11262a)。

### 1.3 主要仪器

超净工作台(北京亚泰科隆仪器技术有限公司,型号:YT-CJ-2NB);流式仪(美国 Beckman 公司,型号:A00-1-1102);多功能酶标分析仪(深圳汇松科技发展有限公司,型号:MB-530);倒置生物显微镜(北京中显恒业仪器仪表有限公司,型号:DSZ2000X);低速离心机(上海知信实验仪器技术有限公司,型号:SL02);荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司,型号:QuantStudio);荧光 PCR 板(美国 Thermo 公司,型号:SPL0960);电泳仪、水平琼脂糖电泳槽(北京六一生物科技有限公司,型号:DYY-2C、DYCP-31DN);透射电子显微镜(日本电子株式会社,型号:JEM-1400FLASH);超薄切片机、组织脱水机(德国徕卡 LEICA 公司,型号:leica UC-7、EMTP);摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司,型号:TS-92)。

## 2 方法

### 2.1 含药血浆制备

称取白术 30 g、黑顺片 10 g、茵陈 30 g、丹参 30 g、赤芍 60 g、薏苡仁 30 g,先将黑顺片置于烧杯中,加入 10 倍纯净水浸泡 0.5 h 后,先煎 1 h,1 h 后加入 10 倍水浸泡 0.5 h 的其他药物再煎 1 h 后倒出药液,第二次加入 8 倍水煎煮 1 h,将两次药液混合,双层纱布过滤后使用旋转蒸发器将药液浓缩至 178 mL(药液生药质量浓度 3.2 g·mL<sup>-1</sup>),灭菌后放置于 4 ℃冰箱保存。将 12 只 SD 大鼠随机分为空白血浆组和中药血浆组,每组 6 只。中药血浆组大鼠灌胃温阳解毒化瘀方水煎剂 7 d,给药量计算方法参照《药理实验方法学》<sup>[12]</sup>,按人临床等效剂量的 3 倍换算出大鼠每天剂量为 51.3 g·kg<sup>-1</sup>,空白血浆组

大鼠每天灌胃等剂量生理盐水,每天灌胃 2 次。末次给药 2 h 后,腹腔注射 3%戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉取血,离心,水浴锅加热灭活(56 °C,30 min),0.22 μm 滤网过滤,分装后-80 °C 储存。

## 2.2 含药血浆最佳浓度筛选

取对数期生长的 BRL-3A 细胞,以每孔  $5 \times 10^3$  个细胞接种于细胞培养板中,每孔 100 μL,每组设置 6 个复孔。将细胞分组为空白组、对照组、模型组,5%、10%、15%、20%、25% 中药血浆组及对应浓度的空白血浆组,空白组不含细胞、只含 CCK-8 与培养基,对照组 BRL-3A 细胞正常培养,模型组细胞加入  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS 和  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  D-GalN 培养 24 h<sup>[3]</sup>,中药血浆组及空白血浆组在模型组干预基础上分别予以相应浓度的血浆干预。分别作用于 BRL-3A 细胞 12、24、48 h 后,每孔中加入 10 μL 的 CCK-8,完培配制 CCK-8 溶液,去除含药培养基每孔加入 100 μL 含 CCK-8 的培养基,培养箱孵育 4 h 后,使用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的吸光度(OD)值,计算各组细胞增殖抑制率。增殖抑制率(%)=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值)×100%。

## 2.3 细胞分组与给药

取对数生长的 BRL-3A 细胞进行分组,分为对照组、模型组、中药血浆组、空白血浆组、3-MA 组及中药+3-MA 组,对照组 BRL-3A 细胞正常培养,模型组细胞加入  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS 和  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  D-GalN 培养 24 h,中药血浆组及空白血浆组在模型组基础上根据筛选的最佳干预浓度及时间分别进行含药血浆及空白血浆干预处理,3-MA 组先予以  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  3-MA 预处理 2 h<sup>[3-4]</sup>后加入  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS 和  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  D-GalN 培养 24 h,中药+3-MA 组在 3-MA 组基础上加用中药血浆处理。

## 2.4 模型验证

取对照组和模型组细胞进行处理给药后,收集细胞培养上清液至离心管中, $3\ 000 \text{ r/min}$  离心 10 min(离心半径为 10 cm),去除细胞碎片,取上清液,按照试剂盒操作步骤检测细胞 ALT、AST 及 LDH 水平<sup>[5]</sup>。

## 2.5 Annexin V-APC/PI 双染色法检测细胞凋亡

取对数生长期的 BRL-3A 细胞按照“2.3”项分组处理给药后,用不含 EDTA 的胰酶消化各组细胞,PBS 洗涤 2 次, $1\ 000 \text{ r/min}$  离心 5 min(离心半径为 10 cm),收集约  $4.7 \times 10^5$  细胞,PBS 洗涤后依次加入

500 μL Binding buffer 悬浮细胞、5 μL Annexin V-APC 及 5 μL Propidium Iodide,流式细胞仪检测细胞凋亡率,实验重复 3 次。

## 2.6 JC-1 染色检测线粒体膜电位

取对数生长期的 BRL-3A 细胞按照“2.3”项分组处理给药后,重悬于 0.5 mL 细胞培养液中,加入 1 mL JC-1 染色工作液,颠倒数次充分混匀,细胞培养箱中 37 °C 孵育 20 min。按照每 1 mL JC-1 染色缓冲液加入 4 mL 蒸馏水的比例配制 JC-1 缓冲液,待孵育结束后,吸除上清,加入 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次,流式细胞仪检测。

## 2.7 MitoSOX Red 染色检测 ROS 水平

取对数生长期的 BRL-3A 细胞按照“2.3”项分组处理给药后, $2\ 500 \text{ r/min}$  离心 5 min(离心半径为 10 cm),弃去上清液,PBS 洗涤两次,加入 1 mL MitoSOX Red 染色工作液悬浮细胞,使细胞密度在  $3 \times 10^6/\text{mL}$ ,细胞培养箱中 37 °C 孵育 30 min,孵育结束后, $2\ 500 \text{ r/min}$  离心 5 min(离心半径为 10 cm),沉淀细胞,弃上清液,PBS 洗涤两次后弃上清液,再使用 PBS 重悬细胞,流式细胞仪检测 ROS 水平。

## 2.8 生物化学法检测 MDA、SOD 水平

取对数生长期的 BRL-3A 细胞按照“2.3”项分组处理给药后,收集各组培养上清液及细胞,按照试剂盒说明书检测培养上清中 MDA 水平及上清中 SOD 水平。

## 2.9 透射电镜观察细胞内超微结构

PBS 洗涤各组细胞并用胰蛋白酶消化、离心处理,加入戊二醛进行固定,1%四氧化锇再固定。不同浓度的丙酮溶液进行脱水,脱水剂浓度梯度为 30%→50%→70%→80%→90%→95%→100%。脱水剂和 Epon-812 包埋剂按照 3:1、1:1、1:3 比例依次渗透,Epon-812 纯包埋剂包埋。超薄切片机作 60~90 nm 超薄切片,加用醋酸钠染色液对各组细胞样品进行染色处理 10~15 min,清洗后加入柠檬酸铅的染色液染色 1~2 min。采用透射电子显微镜进行图像采集,先于低倍镜下观察整体,后调整至观察区域观察具体病变。

## 2.10 RT-qPCR 检测相关基因表达

Trizol 法提取细胞总 RNA,测 RNA 浓度及 OD260/OD280,符合要求后将获得的 RNA 置于-80 °C 储存。以总 mRNA 为模板,使用逆转录试剂盒合成

cDNA,置于-20℃储存。上机扩增,qPCR反应条件:变性(95℃,10 min),变性(95℃,15 s),退火(60℃,30 s)进行40次循环,溶解曲线60~95℃。以 $\beta$ -actin为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法比较分析各基因表达。使用Primer 5软件设计引物,所有引物均由北京擎科生物科技股份有限公司合成引物。详见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称	序列	长度/bp
PINK1	正向:GTGTCTGACCCACTGGACAC	193
	反向:CTGCTCCCTTTGAGACGACA	
Parkin	正向:TGGGCTGTGGGTTTCGTTT	103
	反向:CGGTATGCCTGAGAAGTCG	
P62	正向:AGCATACAGAGAGACCCAT	213
	反向:ACATACAGAAGCCAGAATGCAG	
LC3	正向:TATCCACACCCATCGCTGACA	104
	反向:CCTCTGACTCAGAAGCCGAA	
$\beta$ -actin	正向:ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC	223
	反向:TACTCTGCTTGCTGATCCAC	

### 2.11 Western blot 检测 PINK1、Parkin、LC3、P62、Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达水平

取对数生长的BRL-3A细胞按照“2.3”项分组处理给药后,PBS洗涤1次,加入200  $\mu$ L RIPA裂解液裂解细胞,提取总蛋白,BCA法检测蛋白浓度,电泳、转膜、5%脱脂蛋白封闭90 min,PBST稀释一抗PINK1、Parkin、LC3、P62、Caspase-3、Bax、Bcl-2(1:1 000)和 $\beta$ -actin(1:5 000),将PVDF膜与一抗4℃孵育过夜,PBST洗涤3次后加入二抗(1:5 000),在室温下孵育90 min,PBST洗3次,每次15 min,ECL化学发光液与PVDF膜反应1 min,凝胶成像系统成像,保存图片,使用ImageJ软件分析条带灰度值。

### 2.12 统计学分析

所有数据均采用SPSS 26.0统计软件进行数据处理,计量资料数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间比较符合正态性和方差齐性者,采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较选用LSD检验,符合正态分布但不符合方差齐性采用韦尔奇检验,不符合正态性分布者选用非参数检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 细胞模型验证

与对照组相比,模型组ALT、AST及LDH水平

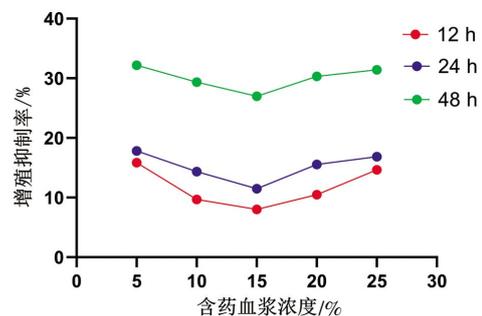
均明显升高( $P<0.01$ ),提示肝细胞存在明显损伤。详见表2。

表2 对照组与模型组细胞ALT、AST及LDH水平比较( $\bar{x}\pm s, n=3$ )Table 2 Comparison of ALT, AST, and LDH levels between control group and model group ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	ALT/(U·L <sup>-1</sup> )	AST/(U·L <sup>-1</sup> )	LDH/(U·L <sup>-1</sup> )
对照组	1.83±0.14	6.08±0.23	55.87±7.77
模型组	5.06±0.09**	12.02±0.28**	112.08±3.86**

注:与对照组相比,\*\* $P<0.01$ 。

### 3.2 温阳解毒化癥方含药血浆最佳浓度及干预时间与24、48 h干预时间下中药血浆组的细胞增殖抑制率比较,12 h干预时间下细胞增殖抑制率最低( $P<0.05$ ),提示12 h为最佳干预时间。进一步分析12 h干预时间下不同浓度含药血浆的作用效果,结果显示细胞增殖抑制率呈现浓度依赖性变化( $P<0.05$ ),其中15%含药血浆组的抑制率最低。综上,15%含药血浆干预12 h可作为后续实验的最佳干预浓度及干预时间。详见图1。

图1 不同浓度及时间下温阳解毒化癥方含药血浆对细胞增殖抑制率的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )Fig.1 Effects of plasma containing WYJDHYF on inhibition rate of cell proliferation under different concentrations and time points ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

### 3.3 温阳解毒化癥方抑制线粒体内源性凋亡途径激活减轻肝细胞凋亡

3.3.1 温阳解毒化癥方含药血浆对肝细胞凋亡的影响 与对照组相比,模型组的早期、晚期及总凋亡率均明显上升( $P<0.01$ );与模型组相比,中药血浆组早期、晚期及总凋亡率明显下降( $P<0.01$ ),3-MA组早期、晚期及总凋亡率明显升高( $P<0.01$ );与中药血浆组相比,中药+3-MA组早期、晚期及总凋亡率均明显上升( $P<0.01$ )。详见表3、图2。

3.3.2 温阳解毒化癥方含药血浆对细胞线粒体膜电

表 3 温阳解毒化痰方含药血浆对细胞凋亡率的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 3 Effects of plasma containing WYJDHYF on cell apoptosis rate ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	早期凋亡率/%	晚期凋亡率/%	总凋亡率/%
对照组	1.94±0.09	1.13±0.12	3.07±0.13
模型组	5.36±0.49**	5.85±0.14**	11.21±0.49**
空白血浆组	4.59±0.35	6.20±0.47	10.79±0.65
中药血浆组	3.98±0.32 <sup>###</sup>	3.36±0.15 <sup>###</sup>	7.35±0.26 <sup>###</sup>
3-MA 组	10.11±0.41 <sup>###</sup>	11.26±0.39 <sup>###</sup>	21.37±0.66 <sup>###</sup>
中药+3-MA 组	7.00±0.23 <sup>ΔΔ</sup>	8.90±0.07 <sup>ΔΔ</sup>	15.89±0.26 <sup>ΔΔ</sup>

注:与对照组相比,\*\* $P<0.01$ ;与模型组相比,<sup>###</sup> $P<0.01$ ;与中药血浆组相比,<sup>ΔΔ</sup> $P<0.01$ 。

位水平的影响 与对照组比较,模型组 JC-1 单体率明显上升( $P<0.01$ ),提示线粒体膜电位下降;与模型组比较,中药血浆组 JC-1 单体率明显下降( $P<0.01$ ),提示线粒体膜电位较前恢复,3-MA 组 JC-1 单体率明显上升( $P<0.01$ ),提示线粒体膜电位下降;与中药血浆组相比,中药+3-MA 组 JC-1 单体率明显升高( $P<0.01$ )。详见图 3。

3.3.3 温阳解毒化痰方含药血浆对细胞凋亡相关蛋白表达水平的影响 与对照组相比,模型组 Bcl-2 蛋白表达明显下降( $P<0.01$ ),Bax 蛋白表达及cleaved-Caspase-3/Caspase-3 比值明显升高( $P<0.01$ );与模型组相比,中药血浆组 Bcl-2 蛋白表达明显升高

( $P<0.01$ ),Bax 蛋白表达及 cleaved-Caspase-3/Caspase-3 比值下降( $P<0.05, P<0.01$ ),3-MA 组细胞 Bcl-2 蛋白表达明显下降( $P<0.01$ ),Bax 蛋白表达及 cleaved-Caspase-3/Caspase-3 比值升高( $P<0.05, P<0.01$ );与中药血浆组相比,中药+3-MA 组细胞 Bcl-2 蛋白表达明显下降( $P<0.01$ ),Bax 蛋白表达及cleaved-Caspase-3/Caspase-3 比值升高( $P<0.05, P<0.01$ )。详见表 4、图 4。

### 3.4 温阳解毒化痰方含药血浆减轻 ROS 过度积累及氧化应激

3.4.1 温阳解毒化痰方含药血浆对细胞 ROS 水平的影响 与对照组相比,模型组细胞内 ROS 水平显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,中药血浆组细胞内 ROS 水平显著下降( $P<0.01$ ),3-MA 组细胞内 ROS 水平明显升高( $P<0.01$ );与中药血浆组相比,中药+3-MA 组细胞内 ROS 水平明显上升( $P<0.01$ )。详见图 5。

3.4.2 温阳解毒化痰方含药血浆对细胞 MDA、SOD 水平的影响 与对照组相比,模型组细胞内 MDA 水平显著升高( $P<0.01$ ),SOD 水平显著下降( $P<0.01$ );与模型组比较,中药血浆组细胞内 MDA 水平显著下降( $P<0.01$ ),SOD 水平显著升高( $P<0.01$ ),3-MA 组细胞内 MDA 水平明显升高( $P<0.01$ ),SOD 水平明显下降( $P<0.01$ );与中药血浆组相比,中药+3-MA 组

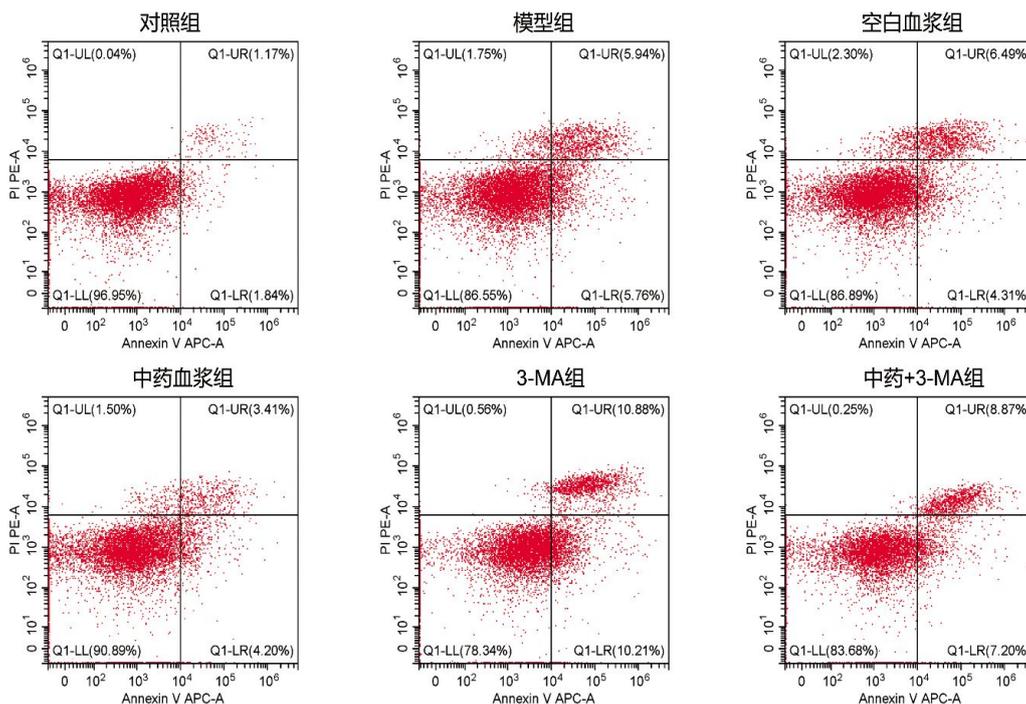


图 2 各组细胞凋亡情况流式图

Fig.2 Flow diagram of cell apoptosis in each group

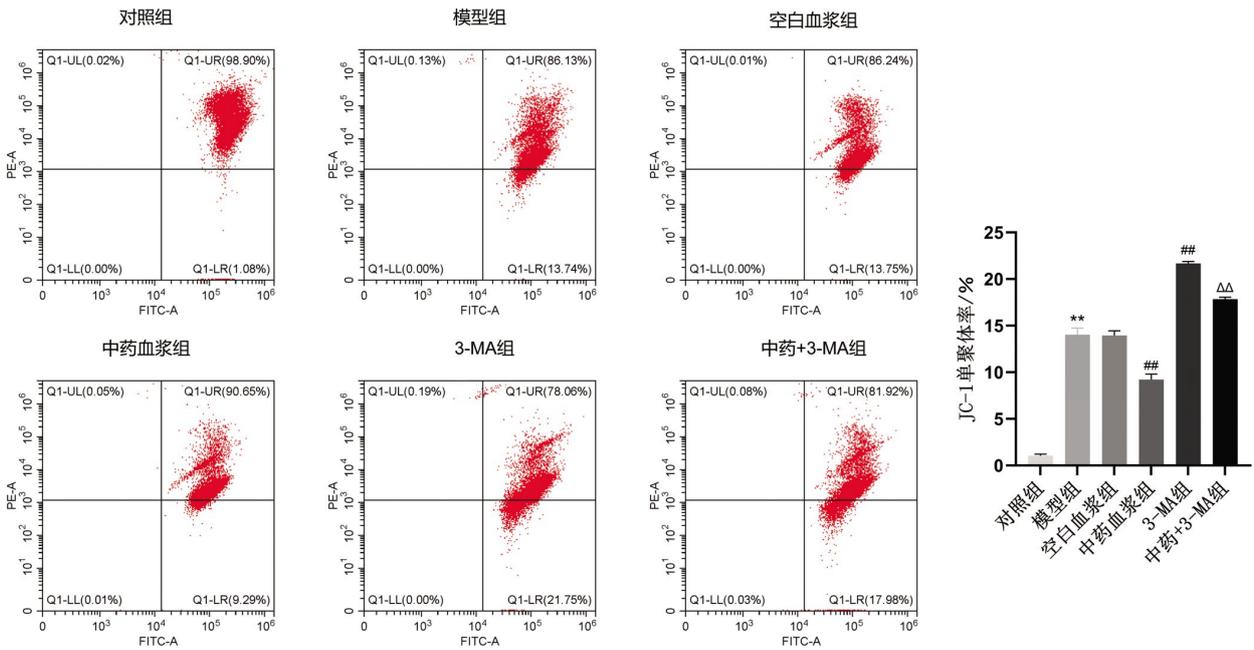


图 3 温阳解毒化痰方含药血浆对细胞线粒体膜电位水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Fig.3 Effects of plasma containing WYJDHYF on mitochondrial membrane potential of cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

注:与对照组相比,\*\* $P<0.01$ ;与模型组相比,## $P<0.01$ ;与中药血浆组相比,ΔΔ $P<0.01$ 。

表 4 温阳解毒化痰方含药血浆对细胞凋亡相关蛋白表达水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 4 Effects of plasma containing WYJDHYF on expression levels of apoptosis-related proteins in cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	Bax/ $\beta$ -actin	Bcl-2/ $\beta$ -actin	cleaved-Caspase-3/Caspase-3
对照组	0.07±0.02	0.60±0.03	0.22±0.07
模型组	0.24±0.03**	0.33±0.03**	1.27±0.08**
空白血浆组	0.24±0.04	0.32±0.02	1.28±0.08
中药血浆组	0.15±0.01##	0.40±0.01##	0.74±0.08#
3-MA 组	0.52±0.02###	0.08±0.02###	5.02±0.41#
中药+3-MA 组	0.34±0.02ΔΔ	0.15±0.02ΔΔ	2.64±0.19Δ

注:与对照组相比,\*\* $P<0.01$ ;与模型组相比,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$ ;与中药血浆组相比,Δ $P<0.05$ ,ΔΔ $P<0.01$ 。

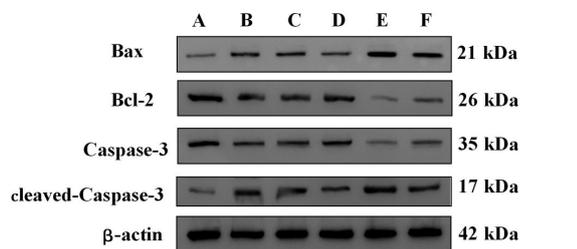


图 4 温阳解毒化痰方含药血浆对细胞凋亡相关蛋白表达水平的影响

Fig.4 Effects of plasma containing WYJDHYF on expression levels of apoptosis-related proteins in cells

注:A.对照组;B.模型组;C.空白血浆组;D.中药血浆组;E.3-MA 组;F.中药+3-MA 组。

### 3.5 温阳解毒化痰方含药血浆对 PINK1/Parkin 通路介导的线粒体自噬的调控作用

#### 3.5.1 温阳解毒化痰方含药血浆干预后细胞内超微结构变化

对照组肝细胞线粒体呈圆形或椭圆形,线粒体嵴清晰可见,基质均匀,可见部分自噬溶酶体;模型组线粒体大多呈椭圆形,中度肿胀,嵴减少或缺失,基质变淡,粗面内质网数量多,中度扩张,细胞核内异染色质凝集,可见少量自噬溶酶体;空白血浆组线粒体呈椭圆形或长杆状,中度肿胀,嵴断裂减少,密度加深,基质变淡,粗面内质网中度扩张,可见少量自噬溶酶体;中药血浆组线粒体呈圆形或椭圆形,轻度肿胀,嵴少量减少或缺失,基质变淡,粗面内质网中度扩张,细胞质中可见较多自噬溶酶体;3-MA 组线粒体呈圆形或椭圆形,中度肿胀,嵴大部分减少

MDA 水平明显升高 ( $P<0.01$ ),SOD 水平显著下降( $P<0.01$ )。详见图 6。

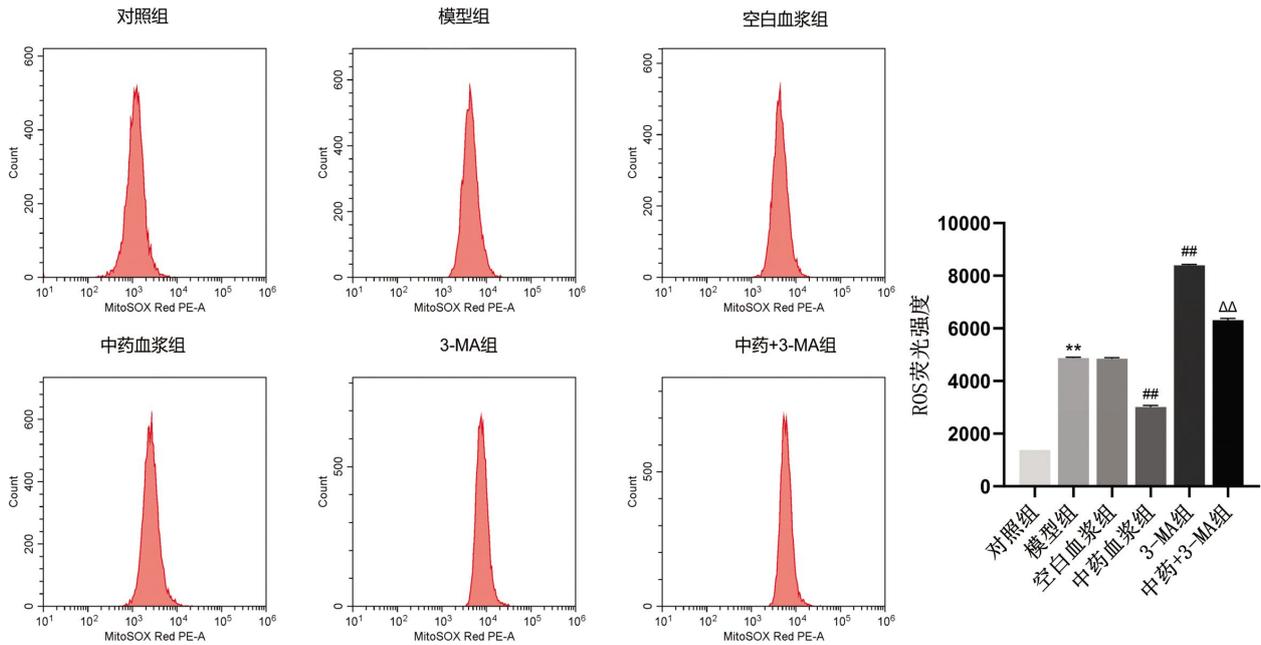


图 5 温阳解毒化痰方含药血浆对细胞内 ROS 水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Fig.5 Effects of plasma containing WYJDHYF on intracellular ROS levels ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

注:与对照组相比, \*\* $P<0.01$ ;与模型组相比, # $P<0.01$ ;与中药血浆组相比,  $\Delta P<0.01$ 。

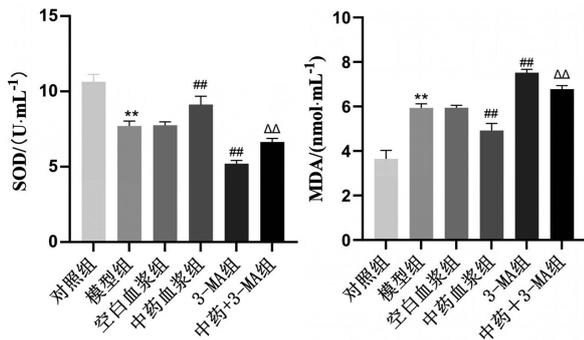


图 6 温阳解毒化痰方含药血浆对细胞 MDA、SOD 水平的影响

Fig.6 Effects of plasma containing WYJDHYF on MDA and SOD levels in cells

注:与对照组相比, \*\* $P<0.01$ ;与模型组相比, # $P<0.01$ ;与中药血浆组相比,  $\Delta P<0.01$ 。

缺失,基质变淡,粗面内质网中度扩张;中药+3-MA组线粒体呈长杆状,轻度肿胀,嵴减少缺失,基质变淡,粗面内质网中度扩张,可见少量自噬溶酶体。详见图 7。

3.5.2 温阳解毒化痰方含药血浆对线粒体自噬相关基因表达水平的影响 与对照组相比,模型组PINK1、Parkin、LC3 mRNA 明显下降 ( $P<0.01$ ),P62 mRNA明显升高( $P<0.01$ );与模型组相比,中药血浆组PINK1、Parkin、LC3 mRNA 明显升高( $P<0.01$ ),P62 mRNA明显下降( $P<0.01$ );与模型组相比,3-MA 组PINK1、

Parkin、LC3 mRNA 明显下降( $P<0.01$ ),P62 mRNA明显上升( $P<0.01$ );与中药血浆组相比,中药+3-MA组 PINK1、Parkin、LC3 mRNA 下降( $P<0.01$ ),P62 mRNA 明显升高( $P<0.01$ )。详见图 8。

3.5.3 温阳解毒化痰方含药血浆对细胞线粒体自噬相关蛋白表达水平的影响 与对照组相比,模型组 PINK1、Parkin 蛋白表达水平及 LC3 II/I 比值明显下降( $P<0.01$ ),P62 明显升高( $P<0.01$ );与模型组相比,中药血浆组 PINK1、Parkin 蛋白表达水平及 LC3 II/I 比值升高( $P<0.05, P<0.01$ ),P62 蛋白表达下降( $P<0.05$ ),3-MA 组细胞 PINK1、Parkin 蛋白表达水平及 LC3 II/I 比值下降( $P<0.05, P<0.01$ ),P62 蛋白表达水平升高( $P<0.01$ );与中药血浆组相比,中药+3-MA 组细胞 PINK1、Parkin 蛋白表达水平及 LC3 II/I 比值下降( $P<0.01$ ),P62 蛋白表达水平升高( $P<0.01$ )。详见表 5、图 9。

#### 4 讨论

ACLF 是一种严重的临床综合征,具有高短期病死率的特点<sup>[16]</sup>。中医学多将其归属于“急黄”“瘟黄”“肝瘟”范畴,古代医家大多从湿热、热毒、瘀血方面辨证论治。本团队在前期观察研究中发现,ACLF 常发生于肝硬化等慢性肝病基础上,多有长期使用苦寒药物史,苦寒药物损伤脾胃或病久迁延不愈耗

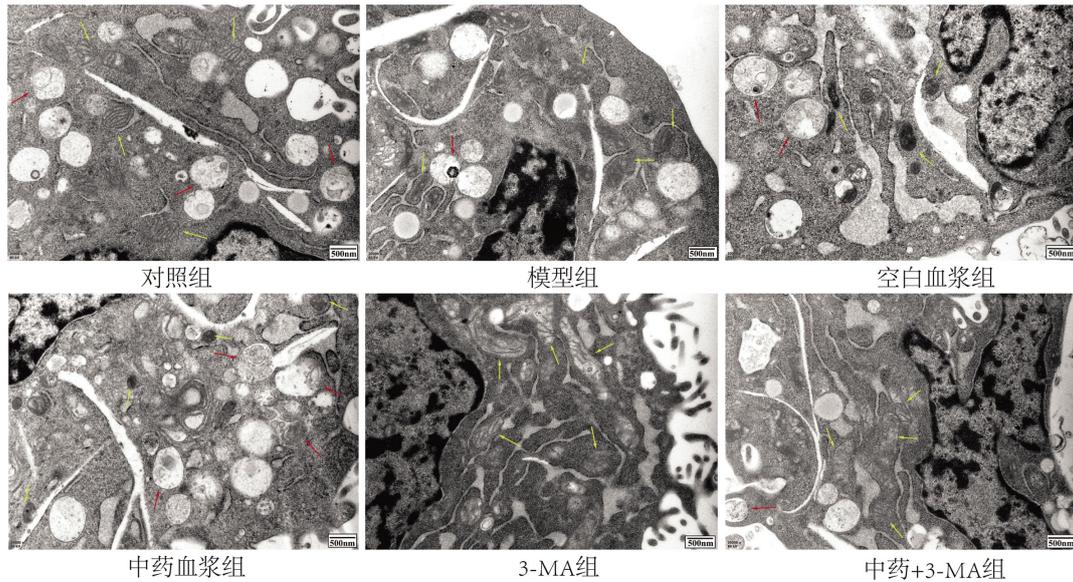


图 7 透射电镜下观察各组细胞内超微结构( $\times 20\ 000$ )

Fig.7 Ultrastructural observation of intracellular organelles in each group by TEM ( $\times 20\ 000$ )

注:黄色箭头指示线粒体,红色箭头指示自噬溶酶体。

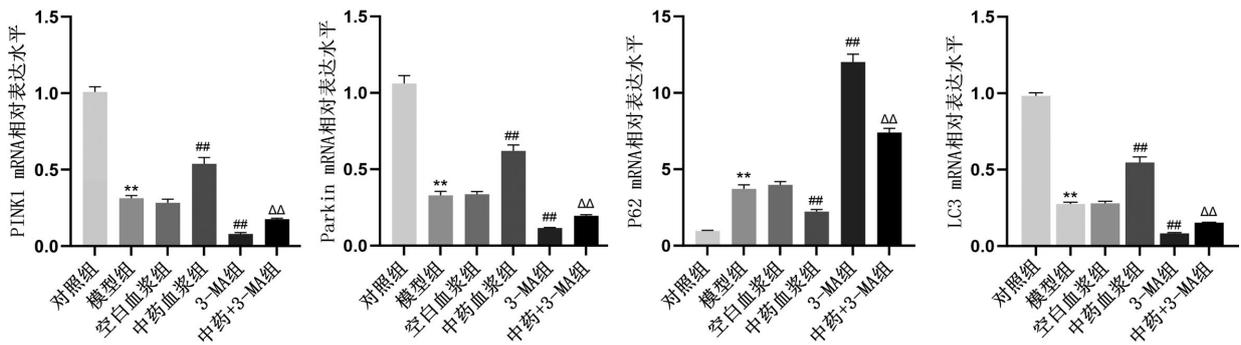


图 8 温阳解毒化痰方含药血浆对细胞线粒体自噬相关基因表达水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Fig.8 Effects of plasma containing WYJDHYF on expression levels of mitophagy-related genes in cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

注:与对照组相比,\*\* $P<0.01$ ;与模型组相比,# $P<0.01$ ;与中药血浆组相比, $\Delta P<0.01$ 。

表 5 温阳解毒化痰方含药血浆对细胞线粒体自噬相关蛋白表达水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 5 Effects of plasma containing WYJDHYF on the expression levels of mitophagy-related proteins in cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	PINK1/ $\beta$ -actin	Parkin/ $\beta$ -actin	LC3 II / I	P62/ $\beta$ -actin
对照组	0.58 $\pm$ 0.05	0.53 $\pm$ 0.04	4.97 $\pm$ 1.06	0.10 $\pm$ 0.04
模型组	0.27 $\pm$ 0.01**	0.30 $\pm$ 0.04**	0.96 $\pm$ 0.18**	0.31 $\pm$ 0.04**
空白血浆组	0.26 $\pm$ 0.02	0.29 $\pm$ 0.03	0.97 $\pm$ 0.22	0.31 $\pm$ 0.05
中药血浆组	0.42 $\pm$ 0.03 <sup>#</sup>	0.39 $\pm$ 0.01 <sup>#</sup>	2.07 $\pm$ 0.19 <sup>#</sup>	0.20 $\pm$ 0.04 <sup>#</sup>
3-MA 组	0.09 $\pm$ 0.03 <sup>#</sup>	0.08 $\pm$ 0.02 <sup>#</sup>	0.13 $\pm$ 0.02 <sup>#</sup>	0.58 $\pm$ 0.09 <sup>#</sup>
中药+3-MA 组	0.16 $\pm$ 0.02 <sup>ΔΔ</sup>	0.15 $\pm$ 0.02 <sup>ΔΔ</sup>	0.32 $\pm$ 0.02 <sup>ΔΔ</sup>	0.41 $\pm$ 0.06 <sup>ΔΔ</sup>

注:与对照组相比,\*\* $P<0.01$ ;与模型组相比,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>#</sup> $P<0.01$ ;与中药血浆组相比,<sup>ΔΔ</sup> $P<0.01$ 。

伤脾胃,故其病机除了实证外,脾虚证候不容忽视。随着病程的延长,脾虚逐渐明显,成为影响预后的关键因素<sup>[17-18]</sup>,由此提出以温阳健脾、解毒化痰为治法的温阳解毒化痰方。前期研究发现,温阳解毒化痰方可降低 ACLF 患者病死率、提高黄疸消退率<sup>[8,19]</sup>,

深入探讨其改善 ACLF 的机制尤为重要。

线粒体参与人体内能量与代谢过程,正常情况下,细胞从线粒体氧化磷酸化中获得绝大部分能量,ACLF 患者处于炎症与损伤状态时,线粒体功能障碍,线粒体  $\beta$  氧化水平下降、糖酵解增加、ROS 产生

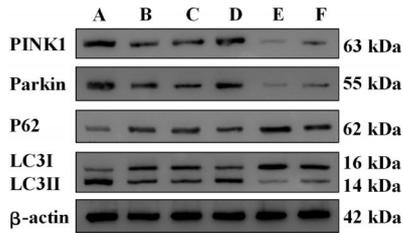


图9 温阳解毒化癥方含药血浆对细胞线粒体自噬相关蛋白表达水平的影响

Fig.9 Effects of plasma containing WYJDHYF on the expression levels of mitophagy-related proteins in cells

注:A.对照组;B.模型组;C.空白血浆组;D.中药血浆组;E.3-MA组;F.中药+3-MA组。

增加,过量 ROS 进一步加重细胞凋亡、组织损伤和器官功能障碍<sup>[20]</sup>。研究显示,ACLF 患者白细胞和肝衰竭患者肝组织中线粒体的数量和大小有所变化,并且表现出线粒体结构紊乱和功能异常<sup>[21-22]</sup>,提示改善线粒体结构与功能是潜在治疗靶点。

自噬作为清除受损细胞器的重要机制,在 ACLF 中显著受抑制,表现为自噬相关分子表达降低及自噬底物 P62 异常堆积<sup>[23]</sup>。线粒体自噬是一种选择性自噬,通过清除受损的线粒体从而维持肝细胞稳态。PINK1/Parkin 途径是最经典的线粒体自噬途径:当线粒体受损时,稳定位于线粒体外膜的 PINK1 磷酸化,结合到 Parkin 的结构域上,促进了 Parkin 被 PINK1 磷酸化,进一步引起结构的重排和 Parkin 的激活,激活的 Parkin 将泛素蛋白连接到线粒体外膜蛋白上,为 PINK1 磷酸化提供更多的底物,放大 Parkin 的募集和激活,从而启动线粒体自噬<sup>[24-25]</sup>。当细胞内 ATP 能量耗竭或电子呼吸链活性受损时,线粒体自噬调控障碍,异常线粒体及 ROS 蓄积,加重细胞内氧化应激损伤、能量不足或细胞凋亡<sup>[26-27]</sup>。细胞受损后,线粒体通过释放细胞色素 C 和凋亡诱导因子,激活 Caspase 家族,尤其是 Caspase-3,从而诱导细胞凋亡<sup>[28]</sup>。Caspase-3 切割活化后转化为 cleaved-Caspase-3,因此两者比值是衡量凋亡的重要指标,此外促凋亡蛋白 Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 共同调控凋亡进程<sup>[29]</sup>。研究显示,ACLF 患者肝组织内 PINK1 蛋白表达减少,ROS 及细胞凋亡明显增加,过表达 PINK1 或激活 PINK1/Parkin 通路介导的线粒体自噬,可有效缓解肝衰竭导致的肝细胞凋亡和 ROS 过度蓄积<sup>[30-31]</sup>。因此,靶向 PINK1/Parkin 通路介导的线粒体自噬与凋亡可作为治疗 ACLF 的一种新策略。

前期研究发现,温阳解毒化癥方可抑制肝衰竭

大鼠的肝细胞凋亡<sup>[30]</sup>,但其调控凋亡的具体途径尚未完全明确,深入解析该方调控凋亡的具体分子机制,对揭示其改善 ACLF 的分子靶点具有重要价值。本研究通过构建 D-GalN/LPS 联合诱导的肝细胞损伤模型,予以温阳解毒化癥方含药血浆干预,研究结果显示,温阳解毒化癥方含药血浆干预后可促进线粒体膜电位恢复,抑制 Bax 蛋白表达,提高 Bcl-2 表达,降低 cleaved-Caspase-3/Caspase-3 比值,抑制线粒体内源性凋亡途径激活减轻 D-GalN/LPS 诱导的肝细胞凋亡;同时还可降低细胞内 ROS 及 MDA 水平,提高 SOD 水平,缓解 D-GalN/LPS 诱导的氧化应激损伤。为进一步探究温阳解毒化癥方减轻肝细胞凋亡及氧化应激损伤具体机制,本研究使用 Western blot 法和 RT-qPCR 法检测 PINK1/Parkin 信号通路关键蛋白及 mRNA 的表达水平,并与自噬抑制剂 3-MA 对比,研究发现温阳解毒化癥方含药血浆可提高 PINK1、Parkin 蛋白表达及 LC3-II/LC3-I 比值,降低 P62 表达,透射电镜示线粒体损伤减轻,自噬溶酶体数量增加。自噬抑制剂 3-MA 可逆转温阳解毒化癥方的保护作用,提示其减轻肝细胞损伤,可能与调控 PINK1/Parkin 通路促进线粒体自噬有关。

综上,本研究表明,温阳解毒化癥方可减轻氧化应激反应,抑制内源性凋亡途径激活减轻 D-GalN/LPS 诱导的肝细胞凋亡,其机制可能与促进 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬有关。本研究未特异性靶向 PINK1/Parkin 信号轴进行干预,未来可结合基因敲除或慢病毒转染等手段进一步阐明温阳解毒化癥方改善 ACLF 的具体分子机制。

## 参考文献

- [1] 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组,中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊治指南(2018年版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(1): 38-44.
- [2] TREFTS E, GANNON M, WASSERMAN D H. The liver[J]. Current Biology, 2017, 27(21): R1147-R1151.
- [3] WANG T Y, TAN W T, WANG X B, et al. Role of precipitants in transition of acute decompensation to acute-on-chronic liver failure in patients with HBV-related cirrhosis[J]. JHEP Reports, 2022, 4(10): 100529.
- [4] 李朋, 李君. 慢加急性肝衰竭肝移植的获益评估及供肝分配新策略[J]. 中华肝脏病杂志, 2023, 31(6): 569-573.
- [5] DAVE D T, PATEL B M. Mitochondrial metabolism in cancer Cachexia: Novel drug target[J]. Current Drug Metabolism, 2019, 20(14): 1141-1153.

- [6] MOREAU R, CLÀRIA J, AGUILAR F, et al. Blood metabolomics uncovers inflammation-associated mitochondrial dysfunction as a potential mechanism underlying ACLF[J]. *Journal of Hepatology*, 2020, 72(4): 688–701.
- [7] 朱文芳, 孙克伟, 陈 斌, 等. 温阳解毒化痰方对 HBV 相关肝衰竭患者肠道菌群的影响[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2014, 24(4): 214–216.
- [8] 陈 斌. “温阳健脾、解毒化痰法”治疗慢性乙型重型肝炎的疗效及机制研究[Z]. 长沙: 湖南中医药大学, 2016–04–21.
- [9] 熊 焰. 温阳解毒化痰法对肝衰竭 IETM 非阳黄证的干预机制及临床疗效研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2014.
- [10] 杜 珊, 王 杰, 陈 斌, 等. 温阳解毒化痰颗粒对肝衰竭 I-ETM 大鼠 TLR4 mRNA, TNF- $\alpha$  及肝细胞凋亡的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(2): 26–32.
- [11] TANG D, WANG R Y, SUN K W, et al. Network pharmacology-based prediction of active compounds in the Wenyang Jiedu Huayu formula acting on acute-on-chronic liver failure with experimental support in vitro and in vivo[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 1003479.
- [12] 魏 伟. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [13] LI J, HUANG Q, MA W F, et al. Hepatoprotective efficacy and interventional mechanism of JianPi LiShi YangGan formula in acute-on-chronic liver failure[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2024, 318: 116880.
- [14] YANG H, PING X Y, CUI Y L, et al. Role of Rapamycin and 3-MA in oxidative damage of HLECs caused by two doses of UVB radiation[J]. *Advances in Ophthalmology Practice and Research*, 2023, 3(1): 15–22.
- [15] 郑晓美. 圣草酚对 LPS/D-GalN 诱导的急性肝损伤的保护作用及机制研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2024.
- [16] SARIN S K, CHOUDHURY A, SHARMA M K, et al. Acute-on-chronic liver failure: Consensus recommendations of the Asian Pacific association for the study of the liver (APASL): An update[J]. *Hepatology International*, 2019, 13(4): 353–390.
- [17] 彭 杰, 陈 斌, 孙克伟, 等. 慢性乙型重型肝炎“湿热-血瘀-脾虚”证候分布与演变特点的回溯性分析[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2011, 21(3): 135–138.
- [18] 陈 斌, 黄裕红, 龚 磊, 等. 健脾温阳与清热化湿法治疗血浆置换术后慢性重型肝炎的临床比较[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2008, 18(6): 368–370.
- [19] 伍玉南, 孙克伟, 彭建平, 等. 解毒化痰温阳健脾与解毒化痰益气健脾法治疗慢性重型肝炎的临床观察[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2011, 21(1): 4–7.
- [20] ENGELMANN C, CLÀRIA J, SZABO G, et al. Pathophysiology of decompensated cirrhosis: Portal hypertension, circulatory dysfunction, inflammation, metabolism and mitochondrial dysfunction[J]. *Journal of Hepatology*, 2021, 75: S49–S66.
- [21] ZHANG I W, CURTO A, LÓPEZ-VICARIO C, et al. Mitochondrial dysfunction governs immunometabolism in leukocytes of patients with acute-on-chronic liver failure[J]. *Journal of Hepatology*, 2022, 76(1): 93–106.
- [22] LANE M, BOCZONADI V, BACHTARI S, et al. Mitochondrial dysfunction in liver failure requiring transplantation[J]. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2016, 39(3): 427–436.
- [23] REN F, ZHANG L, ZHANG X, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  promotes autophagy to protect mice from acute liver failure mediated by peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ [J]. *Cell Death & Disease*, 2016, 7(3): e2151.
- [24] GEISLER S, HOLMSTRÖM K M, SKUJAT D, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1[J]. *Nature Cell Biology*, 2010, 12(2): 119–131.
- [25] BIRSA N, NORKETT R, WAUER T, et al. Lysine 27 ubiquitination of the mitochondrial transport protein Miro is dependent on serine 65 of the parkin ubiquitin ligase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(21): 14569–14582.
- [26] 刘天宇, 王志维. 线粒体自噬与心血管疾病的研究进展[J]. *医学综述*, 2021, 27(21): 4165–4170.
- [27] 姜雪霞. ROS 和 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬在硫酸镍致 H9c2 细胞氧化应激、凋亡中的作用[D]. 兰州: 兰州大学, 2024.
- [28] 朱大诚, 魏佳旭, 刘 燕, 等. 白屈菜生物碱通过细胞凋亡线粒体途径对白血病 CEM 细胞增殖的抑制作用[J/OL]. *江西中医药大学学报*, 1–13[2025-04-12]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/36.1331.R.20241125.0853.002.html>.
- [29] 毛 箴, 肖桂扬, 梁淑芬, 等.  $\alpha$ -MSH 调控 Bcl-2 线粒体途径在桃红四物汤防治激素性股骨头坏死中的作用机制[J]. *智慧健康*, 2023, 9(34): 40–45, 49.
- [30] YIN X H, XUE R, WU J, et al. PINK1 ameliorates acute-on-chronic liver failure by inhibiting apoptosis through mTORC2/AKT signaling[J]. *Cell Death Discovery*, 2022, 8(1): 222.
- [31] WU H, WU L, LUO L, et al. Quercetin inhibits mitophagy-mediated apoptosis and inflammatory response by targeting the PPAR $\gamma$ /PGC-1 $\alpha$ /NF- $\kappa$ B axis to improve acute liver failure[J]. *International Immunopharmacology*, 2024, 143: 113444.