

本文引用: 方 远, 赵晶燕, 蒋庆要, 吴柏合, 刘千柳, 刘向国. 六味补气方通过促进细胞自噬抑制肺泡上皮细胞衰老治疗 COPD 的机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(10): 1852–1860.

## 六味补气方通过促进细胞自噬抑制肺泡上皮细胞衰老治疗 COPD 的机制研究

方 远, 赵晶燕, 蒋庆要, 吴柏合, 刘千柳, 刘向国 \*

安徽中医药大学, 安徽 合肥 230012

〔摘要〕目的 研究六味补气方对细胞自噬和肺泡上皮细胞衰老的影响及其治疗慢性阻塞性肺疾病(COPD)的机制。方法 按照随机数字表法将大鼠分为正常对照组(N 组)、模型组(M 组)、桂龙咳喘宁组(GL 组)和六味补气方低、中、高剂量组(LL 组、LM 组、LH 组), 每组 10 只。采用烟熏及气管滴入脂多糖(LPS)的方法建立 COPD 实验动物模型。药物干预后, 检测大鼠肺功能; HE 染色观察支气管肺组织形态学变化; 免疫组化检测肺组织中细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)4 和细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)表达水平; ELISA 检测血清和肺泡灌洗液(BALF)中 p21 和 p53 含量; Western blot 检测肺组织中 Beclin-1、自噬相关基因(ATG)14 和微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)-II/LC3-I 蛋白表达水平。结果 与 N 组比较, M 组大鼠肺活量(FVC)值、第三秒用力呼气容积(FEV<sub>3</sub>)值、FEV<sub>3</sub>/FVC 值和呼气峰流速(PEF)值均下降( $P<0.01$ ); 肺组织出现慢性支气管炎及肺气肿的病理学变化; 肺组织中 CDK4 和 CyclinD1 阳性面积比率以及组织化学评分(H-score)均降低( $P<0.01$ ); 血清及 BALF 中 p21 和 p53 含量均升高( $P<0.01$ ); 肺组织中 Beclin-1、ATG14 和 LC3-II/LC3-I 蛋白表达水平均降低( $P<0.01$ )。与 M 组比较, 各药物干预组大鼠 FVC 值、FEV<sub>3</sub> 值、FEV<sub>3</sub>/FVC 值和 PEF 值均上升( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); 肺组织病理学变化减轻; 肺组织中 CDK4 和 CyclinD1 阳性面积比率以及 H-score 均增加( $P<0.01$ ); 血清及 BALF 中 p21 和 p53 含量均下降( $P<0.01$ ); 肺组织中 Beclin-1、ATG14 和 LC3-II/LC3-I 蛋白表达水平均上升( $P<0.01$ )。与 GL 组比较, LL 组大鼠 FVC 值、FEV<sub>3</sub> 值、FEV<sub>3</sub>/FVC 值和 PEF 值均下降( $P<0.01$ ), 肺组织中 CDK4 和 CyclinD1 阳性面积比率以及 H-score 均降低( $P<0.01$ ), 血清及 BALF 中 p21 和 p53 含量均升高( $P<0.01$ ), 肺组织中 Beclin-1、ATG14 和 LC3-II/LC3-I 蛋白表达水平均降低( $P<0.01$ ); LH 组大鼠 FVC 值、FEV<sub>3</sub> 值、FEV<sub>3</sub>/FVC 值和 PEF 值均上升( $P<0.05$ ); LH、LM 组肺组织中 CDK4 和 CyclinD1 阳性面积比率以及 H-score 均上升( $P<0.01$ ), 血清及 BALF 中 p21 和 p53 含量均下降( $P<0.01$ ), 肺组织中 Beclin-1、ATG14 和 LC3-II/LC3-I 蛋白表达水平均上升( $P<0.01$ )。与 LH 组比较, LL、LM 组大鼠 FVC 值、FEV<sub>3</sub> 值、FEV<sub>3</sub>/FVC 值和 PEF 值均下降( $P<0.05$ ); 肺组织中 CDK4 和 CyclinD1 阳性面积比率以及 H-score 均降低( $P<0.01$ ); 血清及 BALF 中 p21 和 p53 含量均升高( $P<0.01$ ); 肺组织中 Beclin-1、ATG14 和 LC3-II/LC3-I 蛋白表达水平均降低( $P<0.01$ )。结论 六味补气方可加速细胞自噬, 延缓肺组织损伤和肺泡上皮细胞的衰老, 减轻气道炎症、增强肺功能; 其机制可能是六味补气方诱导 CDK4 和 CyclinD1 表达, 降低 p21、p53 含量, 提升 Beclin-1、ATG14 和 LC3-II/LC3-I 表达, 从而加速细胞自噬、抑制细胞衰老所致。

〔关键词〕六味补气方; 慢性阻塞性肺疾病; 肺功能; 细胞自噬; 细胞衰老; 细胞周期

〔中图分类号〕R259

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.10.007

## Mechanism of Liuwei Buqi Formula in alleviating COPD by enhancing autophagy and suppressing alveolar epithelial cell senescence

FANG Yuan, ZHAO Jingyan, JIANG Qingyao, WU Baihe, LIU Qianliu, LIU Xiangguo\*

Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230012, China

〔收稿日期〕2025-04-15

〔基金项目〕安徽省高校杰出青年科研项目(2022AH0200)。

〔通信作者〕\* 刘向国, 男, 博士, 副教授, 研究生导师, E-mail: 408738774@qq.com。

**[Abstract] Objective** To investigate the effects of Liuwei Buqi Formula (LWBQF) on cellular autophagy and alveolar epithelial cell senescence, and its mechanism in treating chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** Rats were randomized into the following groups using a random number table ( $n=10$  per group): normal control group (Group N), model group (Group M), Guilong Kechuaning group (Group GL), and low-, medium-, and high-dose LWBQF groups (Groups LL, LM, LH). A COPD experimental animal model was established using cigarette smoke exposure and intratracheal instillation of lipopolysaccharide (LPS). After drug intervention, rat lung function was measured. Morphological changes in bronchial and lung tissues were observed by HE staining. The expression levels of cyclin-dependent kinase (CDK) 4 and cyclin D1 (CyclinD1) in lung tissue was detected by immunohistochemistry. The levels of p21 and p53 in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measured by ELISA. The protein expression levels of Beclin-1, autophagy-related gene (ATG) 14, and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)-II/LC3-I ratio in lung tissue were detected by Western blot analysis. **Results** Compared with Group N, Group M exhibited significant decreases in forced vital capacity (FVC), forced expiratory volume at 3 seconds ( $FEV_3$ ),  $FEV_3$ /FVC ratio, and peak expiratory flow (PEF) ( $P<0.01$ ). It also showed pathological changes of chronic bronchitis and emphysema, reduced positive area ratios and histochemistry scores (H-scores) for CDK4 and CyclinD1 in lung tissue ( $P<0.01$ ), increased levels of p21 and p53 in serum and BALF ( $P<0.01$ ), and downregulated protein expression levels of Beclin-1, ATG14, and LC3-II/LC3-I ratio in lung tissue ( $P<0.01$ ). Compared with Group M, all drug intervention groups exhibited increased FVC,  $FEV_3$ ,  $FEV_3$ /FVC ratio, and PEF ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), alleviated pathological changes in lung tissue, increased positive area ratios and H-scores for CDK4 and CyclinD1 in lung tissue ( $P<0.01$ ), decreased levels of p21 and p53 in serum and BALF ( $P<0.01$ ), and upregulated protein expression levels of Beclin-1, ATG14, and LC3-II/LC3-I ratio in lung tissue ( $P<0.01$ ). Compared with Group GL, Group LL showed decreased FVC,  $FEV_3$ ,  $FEV_3$ /FVC ratio, and PEF ( $P<0.01$ ), reduced positive area ratios and H-scores for CDK4 and CyclinD1 in lung tissue ( $P<0.01$ ), increased levels of p21 and p53 in serum and BALF ( $P<0.01$ ), and downregulated protein expression levels of Beclin-1, ATG14, and LC3-II/LC3-I ratio in lung tissue ( $P<0.01$ ). Group LH showed increased FVC,  $FEV_3$ ,  $FEV_3$ /FVC ratio, and PEF ( $P<0.05$ ). Groups LH and LM showed increased positive area ratios and H-scores for CDK4 and CyclinD1 in lung tissue ( $P<0.01$ ), decreased levels of p21 and p53 in serum and BALF ( $P<0.01$ ), and upregulated protein expression levels of Beclin-1, ATG14, and LC3-II/LC3-I ratio in lung tissue ( $P<0.01$ ). Compared with Group LH, Groups LL and LM exhibited decreased FVC,  $FEV_3$ ,  $FEV_3$ /FVC ratio, and PEF ( $P<0.05$ ), reduced positive area ratios and H-scores for CDK4 and CyclinD1 in lung tissue ( $P<0.01$ ), increased levels of p21 and p53 in serum and BALF ( $P<0.01$ ), and downregulated protein expression levels of Beclin-1, ATG14, and LC3-II/LC3-I ratio in lung tissue ( $P<0.01$ ). **Conclusion** LWBQF can accelerate cellular autophagy, delay lung tissue damage and alveolar epithelial cell senescence, alleviate airway inflammation, and enhance lung function. The mechanism may be that LWBQF induces the expression of CDK4 and CyclinD1, reduces the levels of p21 and p53, and upregulates the expression of Beclin-1, ATG14, and LC3-II/LC3-I ratio, thereby promoting autophagy and inhibiting cell senescence.

**[Keywords]** Liuwei Buqi Formula; chronic obstructive pulmonary disease; pulmonary function; autophagy; cell senescence; cell cycle

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种以持续性气流受限为特征的慢性呼吸系统疾病,其发病机制与气道和肺组织对有害颗粒或气体的异常炎症反应有关,临床表现包括慢性咳嗽、咳痰、活动后呼吸困难等,严重者可合并肺心病和呼吸衰竭<sup>[1]</sup>。COPD 因其高患病率、高死亡率,已成为 2021 年全球年龄标化死亡率的第四大原因<sup>[2]</sup>。细胞衰老与 COPD 的发生、发展有密切的关

系,积累的衰老细胞主要通过增加衰老相关分泌表型(senescence-associated secretory phenotype, SASP),包括炎症因子、趋化因子等相关细胞因子表达,引起慢性炎症、破坏肺泡细胞及组织修复,在 COPD 发病机制中起着直接(受损上皮细胞纤维化)和间接(炎症介质释放增加)作用,进而促进气道重塑、肺泡壁破坏和肺功能进行性下降<sup>[3]</sup>。细胞自噬通过消除不必要的细胞物质,包括受损的细胞器和蛋白质聚集

体,在维持体内平衡和保护细胞方面发挥着关键作用;且通过清除损伤信号,抑制炎症小体的激活,减少 SASP 的释放,达到抑制炎症、维持代谢等多维度抑制细胞衰老的目的<sup>[4]</sup>。Beclin-1、自噬相关基因(autophagy-related gene, ATG)14 和微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)作为细胞自噬经典的检测指标,广泛用于反映自噬体的形成及成熟状态<sup>[5]</sup>。本实验通过检测不同组大鼠肺组织中这 3 项指标的变化,旨在探讨六味补气方对肺泡上皮细胞衰老与自噬变化的影响。由此,本研究从细胞衰老和自噬的角度进行针对性治疗,可能成为将来治疗 COPD 的重要策略之一。

六味补气方是安徽省中医院经验处方,由生晒参、炙黄芪、陈皮、玉竹、肉桂和益智仁 6 味中药组成,具有补气养阴、清热解毒的功效。全方通过阴阳平衡,补通相济及寒温互调,达到正邪兼顾的效果,在临床治疗 COPD 中取得了良好的疗效<sup>[6]</sup>。为确保实验结果的客观性和可行性,本实验选取桂龙咳喘宁作为阳性对照药。桂龙咳喘宁是一种中成药,具有降气平喘、止咳化痰的功效,已广泛用于 COPD 及支气管哮喘等疾病的临床治疗<sup>[7]</sup>。目前,六味补气方治疗 COPD 的具体分子生物学机制尚不清楚。因此,本文旨在探讨其治疗 COPD 的潜在机制及其对细胞自噬和肺泡上皮细胞衰老的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物及饲养环境

SPF 级雄性 SD 大鼠 65 只,鼠龄为 5~8 周龄,体质量 160~200 g,购于河南斯克贝斯生物科技股份有限公司,动物许可证号:SCXK(豫)2020-0005。动物实验已由安徽中医药大学伦理委员会审核通过,伦理批准号:AHUCM-rats-2024002。饲养环境如下:温度 18~26 ℃,相对湿度 40%~70%,通风换气 8~12 次/h。

### 1.2 药物

六味补气方组方如下:炙黄芪 15 g、生晒参 10 g、玉竹 10 g、益智仁 6 g、陈皮 6 g、肉桂 3 g,购于安徽省中医院中药房。桂龙咳喘宁片(大连天山药业有限公司,国药准字 Z20050149,规格:340 mg×60 片/盒)。

### 1.3 试剂及仪器

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(合肥白鲨生物科技有限公司,批号:BS904);雄狮牌香烟(浙江中烟工业有限责任公司,批号:ZJYC901028207881);p21、p53 检测试剂盒(上海爱萌优宁生物技术有限公司,批号:CCI2409202143、CCI2409202265);细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)4 抗体、细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)抗体、ATG14 抗体、LC3- I 抗体、LC3- II 抗体、山羊抗兔 IgG 抗体(美国 Abcam 公司,批号:ab108335、ab134175、ab133528、ab192890、ab137375、ab6939);Beclin-1 抗体、 $\beta$ -actin 抗体(沈阳万类生物科技有限公司,批号:WL05350、WL01362)。

烟熏箱(自制);动物肺功能检测仪(北京贝兰博公司,型号:Ani Rws 2005);石蜡切片机(德国 Leica 公司,型号:RM2016);电泳仪、转膜仪(上海天能科技有限公司,型号:EPS300、VE-186);光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司,型号:BX53)。

### 1.4 动物分组、造模

大鼠适应性喂养 1 周,按照随机数字表法分为正常对照组(N 组)、模型组(M 组)、桂龙咳喘宁组(GL 组)及六味补气方低、中、高剂量组(LL 组、LM 组、LH 组),每组 10 只。根据宋一平等<sup>[8]</sup>的方法采用气管内滴入 LPS 加烟熏双因素联合复制 COPD 实验动物模型。除 N 组外,其余各组大鼠分别于实验的第 1 天和第 14 天,以 3%戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔注射麻醉,手术暴露气管后,向气管内注入 1 mg/mL 的 LPS 200  $\mu$ L。除 LPS 滴入当日,其余每日将大鼠置于自制的烟熏箱中,点燃 20 支香烟并混合 100 g 锯木屑,每日烟熏 1 次,每次 30 min,持续 5 周,以肺功能下降以及支气管肺组织发生慢性支气管炎和肺气肿病理学改变判定为造模成功<sup>[9]</sup>。

### 1.5 药物干预

干预药物以 60 kg 体重成人每日 1 剂常规临床用量计算<sup>[9]</sup>,LL 组、LM 组、LH 组大鼠分别按照成人常规临床用量的 5、10、15 倍计算,配制成浓度为 0.26、0.53、1.06 g/kg 的低、中、高剂量的六味补气方混悬液。GL 组的剂量按照成人常规临床用量的 10 倍计算<sup>[9]</sup>,将桂龙咳喘宁片研磨成粉末,用生理盐水配制成 0.82 g/kg 的混悬液。造模成功后开始灌胃给药,N 组和 M 组大鼠按照成人等效剂量 10 倍计算,给

予 0.9%氯化钠溶液 10 mL/(kg·d)灌胃;GL 组、LL 组、LM 组、LH 组分别给予相应剂量药物灌胃,每日 1 次,持续给药 30 d。

1.6 取材与标本处理

以 3%戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠,检测肺功能后,腹主动脉取血离心 10 min,取上清;收集肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF),离心取上清;取出左肺,部分组织置于 4%的多聚甲醛中固定。将剩余右肺组织于液氮罐保存,用于 Western blot 检测。

1.7 检测指标

1.7.1 肺功能检测 采用小动物肺功能仪检测大鼠肺活量(forced vital capacity, FVC)值、第三秒用力呼气容积(forced expiratory volume at 3 seconds, FEV<sub>3</sub>)值、FEV<sub>3</sub>/FVC 值和呼气峰流速(peak expiratory flow, PEF)值。

1.7.2 HE 染色检测支气管肺组织形态学变化 将固定后的肺组织常规乙醇梯度脱水、二甲苯透明,石蜡包埋,连续 5 μm 厚切片,HE 染色、封固,光镜下观察支气管肺组织形态学变化。

1.7.3 免疫组化检测肺组织 CDK4、CyclinD1 蛋白表达水平 将石蜡切片常规脱蜡、抗原修复、3% $H_2O_2$  孵育、10%山羊血清封闭;滴加 CDK4 一抗和 CyclinD1 一抗 37 ℃孵育 1 h(稀释比均为 1:100),4 ℃冰箱过夜;生物素标记的二抗 37 ℃孵育 1 h;辣根酶标记链霉卵白素 37 ℃孵育 30 min;DAB 显色;苏木精复染、脱水、透明、封固。光镜下观察,每张切片随机选取 5 个高倍视野摄片,采用 GraphPad Prism 10.1 软件进行分析,计算阳性细胞比率(阳性细胞数/细胞总数)<sup>[10]</sup>。计算组织化学评分(histochemistry score, H-score),将每张切片内阳性细胞比率及其染色强度转化为相应的数值,达到对组织免疫染

色阳性深浅和阳性多少两方面进行综合半定量分析的目的<sup>[11]</sup>。

1.7.4 ELISA 检测大鼠血清及 BALF 中 p21 和 p53 含量 按照 ELISA 试剂盒检测方法检测血清及 BALF 中 p21 和 p53 含量,酶标仪 450 nm 测定 OD 值,以标准品浓度( $X$ )和 OD 值( $Y$ )拟合四参数方程,计算样本浓度时需将方程结果乘以稀释系数。

1.7.5 Western blot 检测肺组织中 Beclin-1、ATG14 和 LC3-II/LC3-I 蛋白表达水平 将收集的各组肺组织进行裂解,于 4 ℃下离心后取上清液,完成蛋白提取。用 BCA 对提取的蛋白进行定量。总蛋白溶液变性、电泳、转膜、封闭,孵育相应的一抗 Beclin-1(1:1 000)、ATG14(1:1 000)、LC3-I (1:1 000)、LC3-II (1:100),4 ℃摇床过夜。加入稀释后的二抗(1:10 000),室温孵育 2 h。增强型化学发光试剂显影。使用 ImageJ 软件分析条带灰度值,以目的蛋白灰度值/内参  $\beta$ -actin 灰度值比值做为最终结果。

1.8 统计学分析

用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。符合正态分布且方差齐,多组间比较采用 One-way ANOVA 检验,两两比较采用 LSD 法检验;不符合正态分布,采用非参数检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 检测各组大鼠肺功能变化

与 N 组比较,M 组大鼠肺功能参数 FVC 值、FEV<sub>3</sub> 值、FEV<sub>3</sub>/FVC 值和 PEF 值均下降( $P<0.01$ );与 M 组比较,LL、LM、LH、GL 组大鼠肺功能参数 FVC 值、FEV<sub>3</sub> 值、FEV<sub>3</sub>/FVC 值和 PEF 值均上升( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );与 GL 组比较,LH 组大鼠肺功能参数 FVC 值、FEV<sub>3</sub> 值、FEV<sub>3</sub>/FVC 值和 PEF 值均增高( $P<0.05$ ),LL

表 1 各组大鼠肺功能参数比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 Comparison of rat pulmonary function parameters among different groups ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别   | $n$ | FVC/mL          | FEV <sub>3</sub> /mL | FEV <sub>3</sub> /FVC/% | PEF/(mL/s)       |
|------|-----|-----------------|----------------------|-------------------------|------------------|
| N 组  | 10  | 13.28±2.14      | 12.15±1.81           | 91.74±4.26              | 48.93±5.96       |
| M 组  | 10  | 4.41±0.91**     | 2.08±0.51**          | 47.02±5.11**            | 16.89±1.81**     |
| LL 组 | 10  | 7.02±0.34**△▲△○ | 4.12±0.16**△▲△○      | 58.89±5.04**△▲△○        | 26.73±2.87**△▲△○ |
| LM 组 | 10  | 9.12±0.76**△△○  | 6.79±1.00**△△○       | 74.15±4.77**△△○         | 31.98±1.83**△△○  |
| LH 组 | 10  | 9.70±1.02*△△▲   | 8.16±0.96*△△▲        | 84.08±3.05*△△▲          | 39.36±3.75*△△▲   |
| GL 组 | 10  | 7.80±0.33**△△   | 5.44±0.31**△△        | 69.90±4.47**△△          | 30.43±2.64**△△   |

注:与 N 组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与 M 组比较,△ $P<0.05$ ,△△ $P<0.01$ ;与 GL 组比较,▲ $P<0.05$ ,▲▲ $P<0.01$ ;与 LH 组比较,○ $P<0.05$ 。

组大鼠肺功能参数FVC 值、FEV<sub>3</sub> 值、FEV<sub>3</sub>/FVC 值和 PEF 值均下降( $P<0.01$ );与 LH 组比较,LL 组和 LM 组大鼠肺功能参数 FVC 值、FEV<sub>3</sub> 值、FEV<sub>3</sub>/FVC 值和 PEF 值均下降( $P<0.05$ )。详见表 1。

## 2.2 HE 染色检测各组大鼠支气管肺组织形态学变化

N 组大鼠支气管壁结构完整,管腔内未见渗出物,周围肺组织完整,未见炎症细胞浸润,肺泡间隔未见异常。与 N 组比较,M 组大鼠支气管腔变狭窄,肺泡壁粒细胞散在浸润,肺泡壁增厚,肺泡间隔增宽,少量肺泡代偿性扩张;少量细支气管黏膜上皮细胞水肿,细胞质疏松、淡染,较多管腔内可见炎症细胞,少见炎症细胞小灶性或灶性浸润,肺泡破裂融合成肺大疱,上述改变符合慢性支气管炎及肺气肿的病理学特征。与 M 组比较,LL、LM、LH 组和 GL 组大鼠支气管和肺组织周围炎症浸润减轻,肺泡壁增厚,

肺泡间隔增宽的程度与范围变小;细支气管黏膜上皮细胞水肿程度减轻,炎症细胞减少,肺泡代偿性扩张程度降低,肺组织病理学得到了不同程度的改善,其中以 LH 组改善最为明显。详见图 1。

## 2.3 免疫组化检测各组大鼠肺组织中 CDK4、CyclinD1 蛋白表达水平

与 N 组比较,M 组大鼠肺组织中 CDK4、CyclinD1 的阳性面积比率和 H-score 均下降( $P<0.01$ );与 M 组比较,各药物干预组大鼠肺组织中 CDK4、CyclinD1 的阳性面积比率和 H-score 均上升( $P<0.01$ );与 GL 组比较,LL 组大鼠肺组织中 CDK4、CyclinD1 的阳性面积比率和 H-score 均下降( $P<0.01$ ),LH、LM 组 CDK4、CyclinD1 的阳性面积比率和 H-score 均上升( $P<0.01$ );与 LH 组比较,LL 组、LM 组大鼠肺组织中 CDK4、CyclinD1 的阳性面积比率和 H-

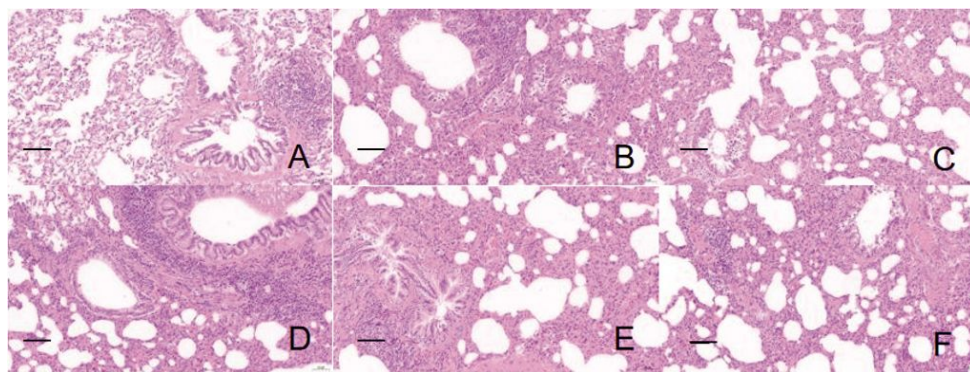


图 1 各组大鼠支气管肺组织形态学变化(HE,×200,标尺=50 μm)

**Fig.1** Morphological changes of rat bronchial and lung tissues in each group (HE,×200, scale bar=50 μm)

注:A.N 组;B.M 组;C.GL 组;D.LL 组;E.LM 组;F.LH 组。

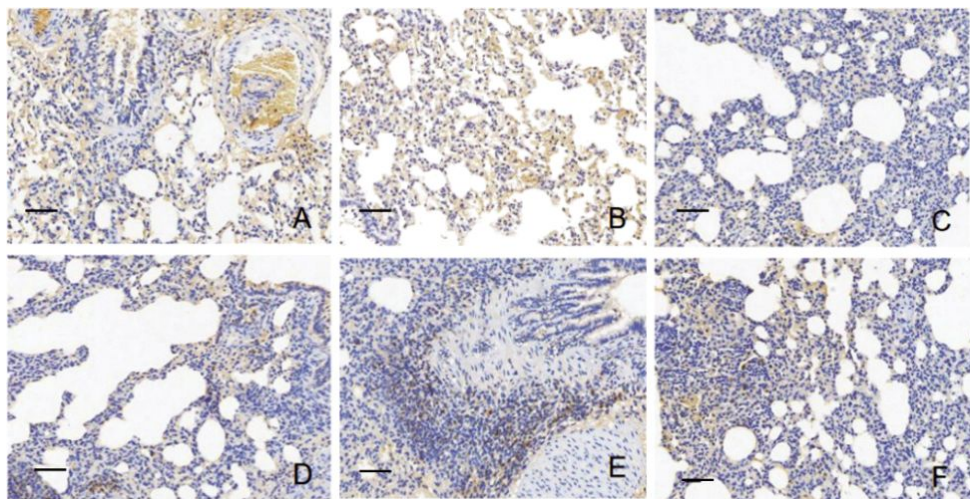


图 2 各组大鼠肺泡上皮细胞 CDK4 表达(免疫组化,×200,标尺=50 μm)

**Fig.2** Expression of CDK4 in rat alveolar epithelial cells in each group (Immunohistochemistry, ×200, scale bar=50 μm)

注:A.N 组;B.M 组;C.GL 组;D.LL 组;E.LM 组;F.LH 组。

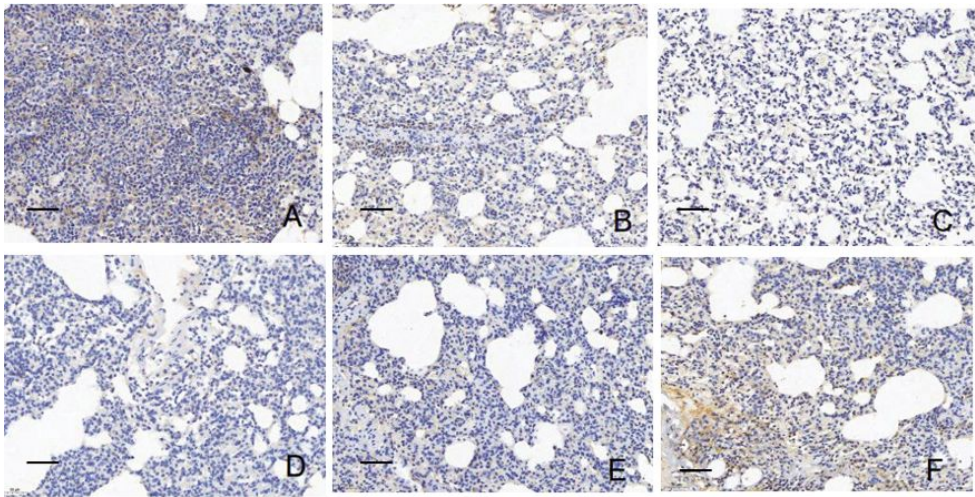


图 3 各组大鼠肺泡上皮细胞 CyclinD1 表达(免疫组化,×200,标尺=50 μm)

**Fig.3** Expression of CyclinD1 in rat alveolar epithelial cells in each group (Immunohistochemistry, ×200, scale bar=50 μm)  
注:A.N 组;B.M 组;C.GL 组;D.LL 组;E.LM 组;F.LH 组。

表 2 各组大鼠肺组织中 CDK4、CyclinD1 的阳性面积比率和 H-score( $\bar{x}\pm s$ )

**Table 2** The positive area ratios and H-scores of CDK4 and CyclinD1 in rat lung tissue of each group ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别   | n  | CDK4 阳性面积比率/%     | CDK4 H-score/分    | CyclinD1 阳性面积比率/% | CyclinD1 H-score/分 |
|------|----|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| N 组  | 10 | 13.43±0.36        | 22.93±1.51        | 7.26±0.69         | 23.27±1.99         |
| M 组  | 10 | 3.66±0.15**       | 4.87±0.15**       | 0.88±0.01**       | 4.87±0.15**        |
| LL 组 | 10 | 7.26±0.29**△▲▲○○  | 15.61±1.16**△▲▲○○ | 2.50±0.06**△▲▲○○  | 14.40±1.07**△▲▲○○  |
| LM 组 | 10 | 10.78±0.11**△▲▲○○ | 18.55±0.58**△▲▲○○ | 3.84±0.20**△▲▲○○  | 18.55±0.59**△▲▲○○  |
| LH 组 | 10 | 11.66±0.17**△▲▲   | 20.02±0.70**△▲▲   | 5.16±0.52**△▲▲    | 20.02±0.70**△▲▲    |
| GL 组 | 10 | 9.12±0.23**△△     | 17.19±0.32**△△    | 3.32±0.28**△△     | 17.17±0.34**△△     |

注:与 N 组比较,\*\* $P<0.01$ ;与 M 组比较,△ $P<0.01$ ;与 GL 组比较,▲ $P<0.01$ ;与 LH 组比较,○○ $P<0.01$ 。

score 均下降( $P<0.01$ )。详见图 2—3,表 2。

#### 2.4 ELISA 检测各组大鼠血清及 BALF 中 p21、p53 的含量

2.4.1 各组大鼠血清中 p21、p53 的含量 与 N 组比较,M 组大鼠血清中 p21、p53 的水平含量均上升( $P<0.01$ );与 M 组比较,各药物干预组大鼠血清中 p21、p53 的含量均下降( $P<0.01$ );与 GL 组比较,LL 组大鼠血清中 p21、p53 的含量均上升( $P<0.01$ ),LH 组和 LM 组大鼠血清中 p21、p53 的含量均下降( $P<0.01$ );与 LH 组比较,LL 组、LM 组大鼠血清中 p21、p53 的含量均上升( $P<0.01$ )。详见表 3。

2.4.2 各组大鼠 BALF 中 p21、p53 的含量 与 N 组比较,M 组大鼠 BALF 中 p21、p53 的水平含量均上升( $P<0.01$ );与 M 组比较,各药物干预组大鼠 BALF 中 p21、p53 的含量均下降( $P<0.01$ );与 GL 组比较,LL 组大鼠 BALF 中 p21、p53 的含量均上升( $P<0.01$ ),LH 组

表 3 各组大鼠血清中 p21 和 p53 的含量比较(pg/mL, $\bar{x}\pm s$ )

**Table 3** Comparison of the levels of p21 and p53 in the rat serum in each group (pg/mL,  $\bar{x}\pm s$ )

| 组别   | n  | p21                 | p53                   |
|------|----|---------------------|-----------------------|
| N 组  | 10 | 457.00±29.12        | 1 565.00±55.67        |
| M 组  | 10 | 785.70±31.88**      | 2 198.00±100.10**     |
| LL 组 | 10 | 720.10±11.71**△▲▲○○ | 2 063.00±37.81**△▲▲○○ |
| LM 组 | 10 | 537.20±12.07**△▲▲○○ | 1 924.00±30.93**△▲▲○○ |
| LH 组 | 10 | 508.40±5.66**△▲▲    | 1 771.00±101.50**△▲▲  |
| GL 组 | 10 | 663.50±14.61**△△    | 1 947.00±23.79**△△    |

注:与 N 组比较,\*\* $P<0.01$ ;与 M 组比较,△ $P<0.01$ ;与 GL 组比较,▲ $P<0.01$ ;与 LH 组比较,○○ $P<0.01$ 。

和 LM 组大鼠 BALF 中 p21、p53 的含量均下降( $P<0.01$ );与 LH 组比较,LL 组、LM 组大鼠 BALF 中 p21、p53 的含量均上升( $P<0.01$ )。详见表 4。

#### 2.5 Western blot 检测各组肺组织中 Beclin-1、ATG14 和 LC3-II/LC3-I 蛋白表达水平

与 N 组比较,M 组大鼠肺组织中 Beclin-1、

ATG14 和 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 表达水平均下降( $P<0.01$ );与 M 组比较,各药物干预组大鼠肺组织中 Beclin-1、ATG14 和 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 表达水平均上升( $P<0.01$ );与 GL 组比较,LH 组和 LM 组大鼠肺组织中 Beclin-1、ATG14 和 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 表达水平均上升( $P<0.01$ ),LL 组肺组织中 Beclin-1、ATG14 和 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 表达水平均下降( $P<0.01$ )。与 LH 组比较,LL 组、LM 组大鼠肺组织中 Beclin-1、ATG14 和 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 表达水平均下降( $P<0.01$ )。详见图 4—5。

表 4 各组大鼠 BALF 中 p21 和 p53 的含量比较  
(pg/mL, $\bar{x}\pm s$ )

Table 4 Comparison of the levels of p21 and p53 in rat BALF in each group (pg/mL,  $\bar{x}\pm s$ )

| 组别   | n  | p21                | p53                  |
|------|----|--------------------|----------------------|
| N 组  | 10 | 269.10±33.70       | 500.30±47.43         |
| M 组  | 10 | 703.60±16.15**     | 1 437.00±85.91**     |
| LL 组 | 10 | 652.40±14.67**△▲△○ | 1 145.00±65.60**△▲△○ |
| LM 组 | 10 | 466.30±37.15**△▲△○ | 806.40±74.60**△▲△○   |
| LH 组 | 10 | 327.90±32.34**△▲△  | 674.90±78.08**△▲△    |
| GL 组 | 10 | 563.00±28.15**△△   | 952.00±50.93**△△     |

注:与 N 组比较,\*\* $P<0.01$ ;与 M 组比较,△ $P<0.01$ ;与 GL 组比较,▲ $P<0.01$ ;与 LH 组比较,○ $P<0.01$ 。

3 讨论

细胞衰老是 COPD 和特发性肺纤维化等慢性肺部疾病的重要驱动机制,其发生机制涉及自噬受损、端粒缩短等<sup>[12]</sup>。当细胞自噬被激活时,其水平与 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 比值成正比,且 Beclin-1 的表达亦同步增加<sup>[13]</sup>。研究发现,包括 COPD 肺泡上皮细胞在内的多种细胞均显示出细胞自噬效率下降,细胞衰老增加,提示细胞自噬及衰老在 COPD 的发病机制中起到至关重要的作用<sup>[14]</sup>。COPD 发病机制主要与氧化

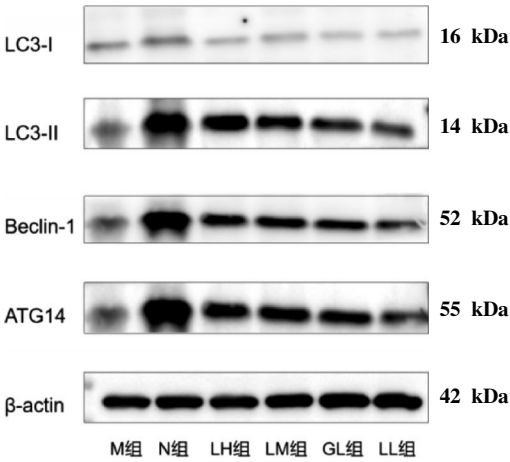


图 4 各组大鼠肺组织中 Beclin-1、ATG14、LC3-Ⅰ 和 LC3-Ⅱ 蛋白条带图

Fig.4 Protein band images of Beclin-1, ATG14, LC3-Ⅰ, and LC3-Ⅱ in rat lung tissue in each group

应激,细胞自噬和细胞衰老等有关,这些过程会放大慢性炎症,导致 DNA 损伤,加速肺衰老,刺激肺纤维化和肺气肿<sup>[15-16]</sup>。烟草暴露是 COPD 发生的最重要原因。据统计,在 COPD 患者中,有过吸烟史的患者比例大于 70%,香烟烟雾中含有大量有害物质,会诱发细胞衰老<sup>[17]</sup>。

COPD 归属于中医学“喘息病”“肺胀”范畴,其发病机制为痰阻、痰浊等<sup>[18]</sup>。中医学认为肺脾肾虚证交错发生是 COPD 的根本,临床通过“补宗气,调脾气”可减轻 COPD 气道炎症、阻抑气道重塑,改善肺功能<sup>[19]</sup>。“六味补气方”由炙黄芪、生晒参、益智仁、玉竹、陈皮、肉桂组成,全方共奏补气固本、理气化痰之效,适用于肺脾皆虚所致久咳气短之证<sup>[20]</sup>。有研究证实,每天服用 200 mg 人参提取物 G115,持续 3 个月,可改善 COPD 患者的肺功能<sup>[21]</sup>。黄芪甲苷作为黄芪的主要成分,具有抗氧化、抗炎、抗衰老等多种

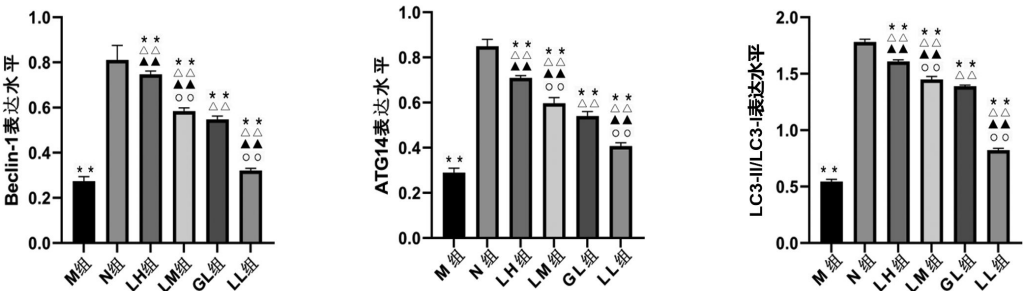


图 5 各组大鼠肺组织中 Beclin-1、ATG14 和 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 蛋白表达水平比较

Fig.5 Comparison of the protein expression levels of Beclin-1, ATG14, and LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ ratio in rat lung tissue among different groups

注:与 N 组比较,\*\* $P<0.01$ ;与 M 组比较,△ $P<0.01$ ;与 GL 组比较,▲ $P<0.01$ ;与 LH 组比较,○ $P<0.01$ 。

功效<sup>[22]</sup>。有研究表明,陈皮黄酮、肉桂酸及玉竹提取物皆有抗氧化、抗炎和保护心血管等生理作用<sup>[23-25]</sup>。

p53 和 p21 是细胞衰老过程中的重要调控因子,p53 通过激活 p21 来诱导细胞周期停滞,从而防止受损细胞的增殖,p53-p21-视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, Rb)信号通路是重要的细胞衰老信号传导通路<sup>[26]</sup>。p53 是一种细胞周期调节剂,细胞衰老状态下,它可以激活下游的 p21 分子,而p21 又能抑制 CDK2 细胞/周期蛋白 E 复合体,使得磷酸化 Rb 蛋白转变为去磷酸化 Rb 蛋白<sup>[27]</sup>,去磷酸化的 Rb 蛋白结合转录因子 E2F,抑制了 E2F 下游的基因转录,从而使阻滞细胞进入 S 期并退出细胞周期,启动了细胞衰老过程<sup>[28]</sup>。本研究显示,与 N 组相比较,M 组大鼠肺组织中 p21、p53 含量增加,而六味补气方可降低 COPD 大鼠肺组织中 p21、p53 的含量,从而延缓细胞衰老。

细胞周期蛋白是细胞周期调控中的重要因子,其作用是促进细胞的分裂增殖。衰老细胞通常表现为 CyclinD1 降解和 CDK4 活性降低,导致 Rb 持续去磷酸化,细胞周期阻滞在 G<sub>1</sub> 期,G<sub>1</sub> 期是唯一能从外界接受增殖或抑制信号的时期,G<sub>1</sub> 期的推进主要靠 CyclinD1-CDK6/CDK4、CyclinD1-CDK2 复合体调控,CDK4、CyclinD1 的表达量升高可使 G<sub>1</sub> 期变短,在细胞周期 G<sub>1</sub> 期发挥作用的主要是 CyclinD1 及其结合分子 CDK4 和 CDK6<sup>[29]</sup>。G<sub>1</sub> 期中,CyclinD1 在此阶段激活 CDK4 或 CDK6,并与之结合,启动细胞周期,使 G<sub>1</sub> 周期抑制蛋白(Rb)被磷酸化,推动细胞从 G<sub>1</sub> 期进入 S 期<sup>[30]</sup>,从而促进肺部组织细胞增殖。本次研究发现,M 组大鼠肺组织中 CDK4、CyclinD1 的表达低于 N 组,而六味补气方干预后,各用药组大鼠肺组织中 CDK4、CyclinD1 的表达较 M 组升高,提示六味补气方对细胞衰老有一定程度的缓解作用。

Beclin-1 是自噬启动的重要开关,可招集 LC3,促使 LC3- I 加工形成 LC3- II,形成自噬体,进而调控自噬体的形成及成熟<sup>[31]</sup>。LC3 为酵母 ATG8 的同源体,一般以可溶性 LC3- I 的形式存在;当自噬发生时,LC3 和自噬泡膜表面的磷脂酰乙醇胺结合,转变为脂溶性的 LC3- II;且 LC3- II 的表达与自噬活性成正比<sup>[32]</sup>。本研究结果显示,M 组大鼠肺组织中 Beclin-1、LC3- II/LC3- I、ATG14 蛋白表达低于 N 组,而六味补气方干预后,大鼠肺组织中 Beclin-1、LC3- II/LC3-

I、ATG14 蛋白表达升高,提示细胞自噬活动增强。此结果表明六味补气方能够提高肺泡上皮细胞自噬活性,促进细胞自噬。

本研究结果显示,六味补气方可提升 COPD 大鼠 CDK4 和 CyclinD1 表达,降低 p21、p53 水平含量,提高 Beclin-1、LC3- II/LC3- I、ATG14 表达,从而促进细胞自噬,延缓肺组织细胞衰老,改善肺组织病理学变化,增强肺功能。

## 参考文献

- [1] 陈典,隆寰宇,张丛溪,等. 2025 年 GOLD 慢性阻塞性肺疾病诊断、治疗、管理及预防全球策略更新要点解读[J]. 中国全科医学, 2025, 28(16): 1937-1949.
- [2] GBD 2021 Causes of Death Collaborators. Global burden of 288 causes of death and life expectancy decomposition in 204 countries and territories and 811 subnational locations, 1990-2021: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021[J]. Lancet, 2024, 403(10440): 2100-2132.
- [3] 黄婧怡,危蕾,刘芳英,等. 线粒体自噬在调控 COPD 细胞衰老中作用及中医药研究进展[J]. 上海中医药大学学报, 2024, 38(5): 94-100.
- [4] ROUZÉ A, BODDAERT P, MARTIN-LOECHES I, et al. Impact of chronic obstructive pulmonary disease on incidence, microbiology and outcome of ventilator-associated lower respiratory tract infections[J]. Microorganisms, 2020, 8(2): 165.
- [5] 姚文静,王翠峰,高金亮,等. 自噬相关蛋白 Beclin-1 及 LC3- II 在肺癌转移性胸腔积液中的表达研究[J/OL]. 中国全科医学, 2025: 1-8. [2025-09-23]. <https://doi.org/10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0812>.
- [6] 吴柏合,于芳春,谢桂元,等. 六味补气方对慢性阻塞性肺疾病细胞焦亡的干预作用及机制研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2024, 44(5): 583-591.
- [7] 李娜. 自拟咳嗽宁方对支气管哮喘急性期患者的治疗有效性分析[J]. 饮食保健, 2021(20): 93.
- [8] 宋一平,崔德健,茅培英,等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立及药物干预的影响[J]. 中华内科杂志, 2000, 39(8): 556-557.
- [9] 贺宏波. 中药用量研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(10): 210-213.
- [10] BENONISSON H, ALTINTAS I, SLUIJTER M, et al. CD3-bispecific antibody therapy turns solid tumors into inflammatory sites but does not install protective memory[J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2019, 18(2): 312-322.
- [11] YIN J Z, SHI X Q, WANG M D, et al. Arsenic trioxide elicits anti-tumor activity by inhibiting polarization of M2-like tumor-associated macrophages via Notch signaling pathway in lung adenocarcinoma[J]. International Immunopharmacology, 2023, 117: 109899.

- [12] 杨学情, 徐荣漪, 李小丝, 等. 代谢相关脂肪性肝病中肝细胞衰老的调控机制研究进展[J]. 中国医药, 2025, 20(6): 950-954.
- [13] 潘丹虹, 李 路, 王文义, 等. 荣筋拈痛方对白细胞介素-1 $\beta$ 诱导的体外大鼠软骨细胞自噬相关基因表达的影响[J]. 风湿病与关节炎, 2022, 11(2): 1-5, 15.
- [14] BAKER J R, VUPPUSETTY C, COLLEY T, et al. Oxidative stress dependent microRNA -34a activation via PI3K $\alpha$  reduces the expression of sirtuin-1 and sirtuin-6 in epithelial cells[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 35871.
- [15] 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, 2022, 11(11): 2237.
- [16] GHOSH M, MILLER Y E, NAKACHI I, et al. Exhaustion of airway basal progenitor cells in early and established chronic obstructive pulmonary disease[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2018, 197(7): 885-896.
- [17] DING Y, CHEN J, OKON I S, et al. Absence of AMPK $\alpha$ 2 accelerates cellular senescence via p16 induction in mouse embryonic fibroblasts[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2016, 71: 72-80.
- [18] 彭 艳, 邓利萍, 范小春, 等. 小陷胸汤合金苇茎汤加减治疗慢性阻塞性肺疾病伴肺炎临床研究[J]. 陕西中医, 2024, 45(12): 1649-1653.
- [19] 王红艳, 上官萍, 柯 婷. 培土生金方治疗气虚证兼血瘀证 COPD 稳定期患者的效果及对中医证候积分、气道重塑的影响[J]. 临床医学研究与实践, 2023, 8(3): 122-124.
- [20] 于芳春, 刘向国, 方 芳, 等. 六味补气方对 COPD 模型大鼠 Th1/Th2 类细胞平衡调节作用的实验研究[J]. 陕西中医, 2022, 43(2): 161-165.
- [21] HUANG X Y, DUAN X J, WANG K H, et al. Shengmai injection as an adjunctive therapy for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease: A systematic review and meta-analysis[J]. Complementary Therapies in Medicine, 2019, 43: 140-147.
- [22] ZHANG J Q, WU C X, GAO L, et al. Astragaloside IV derived from Astragalus membranaceus: A research review on the pharmacological effects[J]. Advances in Pharmacology, 2020, 87: 89-112.
- [23] 刘丽娜, 徐玉娟, 肖更生, 等. 不同年份陈皮黄酮成分分析及抗氧化活性评价[J]. 南方农业学报, 2020, 51(3): 623-629.
- [24] 杨 阳. 肉桂酸和香豆素类衍生物的合成及其抗氧化性能的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [25] 何瑞阳, 王 锋, 苏小军, 等. 玉竹多糖低共熔溶剂提取工艺优化及其抗氧化和抗糖基化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(8): 190-198.
- [26] BHAMARASUTA C, PREMRATANACHAI K, MONGKOLPINYOPAT N, et al. Iron status and erythropoiesis response to darbepoetin alfa in dogs with chronic kidney disease[J]. The Journal of Veterinary Medical Science, 2021, 83(4): 601-608.
- [27] 高露洋, 罗 丹, 王文军, 等. 槲皮素通过 p53-p21-Rb 通路缓解慢性阻塞性肺疾病的肺衰老[J]. 西部医学, 2024, 36(2): 217-221, 227.
- [28] BUČAR PAJEK M, SVILAN K, VIVODA T, et al. Isolated effects of renal failure, anthropometric indices, and serum total iron-binding capacity as determinants of muscle performance in hemodialysis patients[J]. Journal of Renal Nutrition, 2016, 26(4): 245-252.
- [29] 满 鑫. CyclinD1、E 在 COPD 大鼠气道重塑中的作用机制及复方血栓通胶囊干预的研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2017.
- [30] 方 姣, 王子博, 王子鉴, 等. 基于 CyclinD1-CDK4/6-P16 通路探究欣胃颗粒对胃癌前病变大鼠细胞增殖的影响[J]. 现代消化及介入诊疗, 2024, 29(5): 543-546, 551.
- [31] 贾茗桉, 梁瀛今, 井芃祯, 等. 清肺解毒化痰方调控 mTOR/Bcl-1/LC3 信号轴改善小鼠肺泡巨噬细胞重型炎症模型自噬[J]. 中药药理与临床, 2025: 1-22. [2025-09-24]. <https://doi.org/10.13412/j.cnki.zyyl.20250702.003>.
- [32] 刘大江, 曹亚芳, 李瑞云, 等. 胰岛素经 TSC2/mTOR/LC3 II 通路抑制子宫内膜癌醋酸甲羟孕酮耐药细胞自噬和凋亡[J]. 现代肿瘤医学, 2025, 33(9): 1454-1462.

(本文编辑 陈 晨)