

杨玉洁,朱中博,张艳美,等. 急性肺损伤对大鼠脾 T 细胞凋亡的影响及益肺健脾方的干预作用研究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(9): 1160-1170.

YANG Y J, ZHU Z B, ZHANG Y M, et al. Effects of acute lung injury on apoptosis in rat splenic T cells and the interventional effect of Yifei Jianpi formula [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(9): 1160-1170.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.09.007

急性肺损伤对大鼠脾 T 细胞凋亡的影响 及益肺健脾方的干预作用研究

杨玉洁¹,朱中博¹,张艳美¹,刘喜平^{1*},张旭辉^{2*},张志明³

(1. 甘肃中医药大学,甘肃省中药新产品创制工程实验室,甘肃省中医方药挖掘与创新转化重点实验室,兰州 730000;2. 甘肃中医药大学附属医院,肺病科 兰州 730000;
3. 甘肃省中医院,兰州 730000)

【摘要】 目的 观察急性肺损伤(acute lung injury,ALI)大鼠脾 T 细胞凋亡及 X-连锁凋亡抑制蛋白相关因子(XIAP-associated factor 1, XAF1)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、死亡相关因子(factor associated suicide, FAS)蛋白表达情况,探讨益肺健脾方治疗 ALI 的机制是否与下调 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白表达,抑制 T 细胞凋亡有关。方法 60 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,随机分为空白组、模型组、阳性组、益肺健脾方高、中、低剂量组。阳性组给予地塞米松每天 0.5 g/kg 灌胃,益肺健脾方高、中、低剂量组分别给予每天 12、6、3 g/kg 的益肺健脾方灌胃,模型组与空白组均给予等量蒸馏水灌胃,每天给药 1 次,连续 14 d。动物肺功能检测系统检测各组大鼠肺功能情况;观察各组大鼠肺部影像学特征及脏器指数和肺组织湿重/干重(W/D)变化;苏木素-伊红(HE)染色观察各组大鼠肺部组织的病理学变化;流式细胞术检测各组大鼠脾 T 细胞亚群(CD4⁺/CD8⁺)及脾 T 细胞的凋亡情况,Western Blot 检测脾中 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白表达水平。结果 模型组大鼠肺功能降低,脾和胸腺脏器指数减少,肺组织湿重/干重(W/D)显著升高($P < 0.01$),肺部组织出现炎性渗出、肺泡破裂等现象,同时伴有肺纹理增粗以及大片磨玻璃影,T 细胞亚群(CD4⁺/CD8⁺)显著减少,XAF1、FAS、TNF- α 蛋白表达及 T 细胞凋亡率显著升高($P < 0.01$);经益肺健脾方干预后,大鼠肺组织湿重/干重(W/D)明显降低,胸腺的脏器指数显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),T 细胞亚群(CD4⁺/CD8⁺)明显增加,XAF1、FAS、TNF- α 蛋白表达及 T 细胞凋亡率明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 ALI 可诱发大鼠脾 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白表达上调及 T 细胞凋亡,益肺健脾方可能通过下调 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白表达,抑制 ALI 诱发的脾 T 细胞凋亡。

【关键词】 急性肺损伤;益肺健脾方;T 细胞凋亡;XAF1;FAS;TNF- α

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 09-1160-11

Effects of acute lung injury on apoptosis in rat splenic T cells and the interventional effect of Yifei Jianpi formula

YANG Yujie¹, ZHU Zhongbo¹, ZHANG Yanmei¹, LIU Xiping^{1*}, ZHANG Xuhui^{2*}, ZHANG Zhiming³

【基金项目】 甘肃省科技重大项目(22ZD1FA001),国家自然科学基金(82260889),第五批全国中医临床优秀人才研修项目(国中医药人教函[2022]239号),甘肃省自然科学基金项目(24JRRD002)。

Funded by Gansu Provincial Science and Technology Major Program (22ZD1FA001), National Natural Science Foundation of China (82260889), the Fifth Batch of National Traditional Chinese Medicine Clinical Outstanding Talents Training Program (Guozhong Medicine Ren Jiaohan [2022] No. 239), Natural Science Foundation of Gansu Province (24JRRD002).

【作者简介】 杨玉洁,在读硕士研究生,研究方向:方剂的临床应用及作用机理。Email:yyjwsry@163.com

【通信作者】 刘喜平,博士,教授,研究方向:方剂的临床应用及作用机理。Email:Lxpd-257@163.com;

张旭辉,硕士,主任医师,硕士生导师,研究方向:中西医结合呼吸病。Email:863303509@qq.com。

* 共同通信作者

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Laboratory for TCM New Products Development Engineering of Gansu Province, Key Laboratory of Traditional Chinese Herbs and Prescription Innovation and Transformation of Gansu Province, Lanzhou 730000, China; 2. Department of Pulmonary Disease, Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 3. Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

Corresponding author: LIU Xiping. E-mail: Lxpd-257@163.com; ZHANG Xuhui. E-mail: 863303509@qq.com

[Abstract] Objective To observe splenic T cell apoptosis and XIAP-associated factor 1 (XAF1), FAS, and tumor necrosis factor (TNF)- α protein expression levels in rats with acute lung injury (ALI), and to determine their roles in the protective effect of Yifei Jianpi formula. **Methods** Sixty male specific pathogen-free SD rats were divided randomly into blank, model, positive control, and high-, medium-, and low-dose Yifei Jianpi formula groups. Rats in the positive control group were given 0.5 g/kg dexamethasone by gavage, and rats in the high-, medium-, and low-dose Yifei Jianpi formula groups were given 12, 6, and 3 g/kg Yifei Jianpi formula by gavage, respectively. Rats in the model and blank groups were given equal amounts of saline by gavage. All medications were administered once a day for 14 days. Lung function testing was carried out in all rats. We observed the imaging characteristics of the lungs and changes in the organ index and lung tissue wet/dry weight (W/D) in each group, and detected the pathological changes in lung tissues by hematoxylin-eosin staining. Splenic T-cell subpopulations ($CD4^+/CD8^+$) and apoptosis of splenic T-cells were detected by flow cytometry and XAF1, FAS, and TNF- α protein expression levels in the spleen were detected by Western Blot. **Results** Rats in the model group showed reduced lung function, decreased spleen and thymus organ indexes, and significantly higher W/D of lung tissue ($P < 0.01$). In addition, they had inflammatory exudation and alveolar rupture in the lung tissue, accompanied by thickening of the lung texture and large areas of ground-glass shadows, with a significant decrease in T-cell subsets ($CD4^+/CD8^+$) and significant increases in XAF1, FAS, and TNF- α proteins, and in the rate of T-cell apoptosis ($P < 0.01$). Yifei Jianpi formula significantly reduced the W/D spleen of rat lung tissues, significantly increased the thymus organ index ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and the T-cell subpopulation ($CD4^+/CD8^+$), and significantly decreased the protein expression levels of XAF1, FAS, and TNF- α , and the T-cell apoptosis rate ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusions** ALI induced up-regulation of XAF1, FAS, and TNF- α protein expression and T-cell apoptosis in the spleen of rats, and Yifei Jianpi formula may protect against ALI by down-regulating these factors.

[Keywords] acute lung injury; Yifei Jianpi formula; T-cell apoptosis; XAF1; FAS; TNF- α

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是由多种肺内(肺炎、感染等)或肺外致病因素导致的急性弥漫性炎症性肺损伤,进而引起急性呼吸衰竭的临床综合征^[1]。ALI以其显著的高发病率和死亡率对公共健康产生重大影响,研究统计 ALI 致死率已高达 30%~50%^[2]。机械通气、激素和抗炎药物是目前临床上常用的治疗方法,但均存在明显缺点,难以广泛推广,且激素和抗炎等药物副作用明显、预后差^[3]。故寻找安全有效的防治 ALI 的药物显得尤为紧迫。

益肺健脾方是治疗多种肺部炎症性损伤的常用有效方剂,在促进肺部炎症吸收、保护肺组织损伤、改善患者临床症状方面疗效显著^[4]。同时有研究发现 T 细胞凋亡是机体正常免疫调节的一部分,它有助于维持免疫平衡和清除异常或受损的细胞。但 T 细胞凋亡也可导致免疫系统的失调和组织损伤^[5-6]。X-连锁凋亡抑制蛋白相关因子(XIAP-

associated factor 1, XAF1)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor-alpha, TNF- α)、死亡相关因子(factor associated suicide, FAS)是参与细胞凋亡的重要因子。XAF1 通过抑制 XIAP 的抗凋亡功能,从而促进细胞凋亡^[7]; FAS 和凋亡相关因子配体(factor-related apoptosis ligand, FASL)的结合可以触发细胞凋亡信号通路^[8]; TNF- α 则通过激活凋亡信号通路,诱导细胞凋亡的发生^[9]。这些因子相互作用,共同参与调控细胞凋亡的发生发展。但益肺健脾方是否通过干预 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白表达抑制 T 细胞凋亡,进而保护肺部急性损伤,仍需进一步验证。

本研究拟建立脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的大鼠 ALI 模型,观察益肺健脾方对 ALI 大鼠脾 T 细胞凋亡及 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白表达的影响,阐明益肺健脾方对 ALI 的治疗作用及作用机制,

为探讨中医药防治 ALI 提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

60 只 SPF 级 SD 雄性大鼠(8 周龄,体重 200 ~ 220 g),购买于斯贝福(北京)生物技术有限公司【SCXK(京)2019-0010】。饲养于甘肃中医药大学科研中心 SPF 级实验室【SYXK(甘)2021-0004】,温度为(23 ± 2)℃、相对湿度 45% ~ 55%,12 h 明暗交替循环,饲养期间自由进食、进水,适应性饲养 5 d 后进行实验。所有程序均按照《甘肃省实验动物护理与使用指南》执行,且动物伦理获得甘肃中医药大学伦理委员会批准(2023-585)。

1.1.2 实验药物

益肺健脾方(黄芪 15 g,党参 6 g,陈皮 9 g,当归 9 g,柴胡 6 g,桔梗 3 g,麸炒白术 15 g,炒白芍 9 g,砂仁 13 g,生麦芽 15 g,炙甘草 6 g)药材饮片由甘肃中医药大学附属医院提供,经甘肃中医药大学药学院景明教授鉴定符合 2020 年版《中华人民共和国药典》规定。取上述益肺健脾方药材饮片,加入 10 倍量的蒸馏水浸泡药材,1 h 后煎煮 30 min,滤出药液后再次加入 8 倍量水煎煮 30 min,消毒纱布过滤,将 2 次滤液合并,浓缩至含生药质量浓度为 2.0 g/mL,4℃保存备用。

1.1.3 主要试剂与仪器

LPS 购自于 Solarbio 有限公司(批号:3230907001);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒购自于珠海贝索生物技术有限公司有限公司(批号:C220501);流式检测抗体均购自于购自于联科生物有限公司,Anti-Rat CD4 APC(批号:A311143)、Anti-Rat CD FITC(批号:A311142)、Anti-Rat CD25 FITC(A30534)、Anti-Rat CD4 PE(批号:A30534);凋亡试剂盒购自于 meilunbio 有限公司(批号:MA022-2);蛋白免疫印记(Western Blot)凝胶制备试剂盒购自 Solarbio 有限公司(批号:P1200-1/P1200-2);极敏型 ECL 化学发光试剂盒购自 NCM 有限公司(批号:P10060);单克隆抗体 β -Actin 购自于 Proteintech 有限公司(批号:20536-1-AP);单克隆兔源 TNF- α 抗体购自于 Immunoway 有限公司(批号:YT4689);单克隆兔源 FAS 抗体购自于 Affinity 有限公司(批号:AF5342);单克隆兔源 XAF1 抗体购自于 Abmart 有限公司(批号:TD13614);山羊抗兔 IgG 二抗购自

于 Proteintech 有限公司(批号:20000239);地塞米松购自于天津信谊津津药业有限公司(批号:1508156);BCA 蛋白定量试剂盒购自西安赫特生物技术有限公司(批号:WB003)。

动物 PET/SPECT/CT(Lnlivew-3000B,美国),肺功能检测系统(WBP PLT-UNR-RT,美国),流式细胞仪(BD sciences,FACSV erse,美国),电泳仪(北京六一生物科技有限公司,DYCZ-24DH,中国),凝胶成像系统(广州柏鹭腾生物科技有限公司,GeLview 6000 plu,中国),台式高速离心机(可成仪器有限公司,3-18R,中国),YB-6LF 生物组织石蜡包埋机(亚光科技股份有限公司,YB-6LF,中国),智能感知石蜡切片机(上海珂准仪器有限公司,KD-3390,中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及实验干预

60 只 SD 雄性大鼠,适应 1 周后,使用完全随机法选取 10 只大鼠作为空白组,剩余大鼠参考文献^[10]方法,采用气管内注射 LPS 建立 ALI 模型,造模结束后继续采用完全随机法将 ALI 模型大鼠随机分为模型组、阳性组、益肺健脾方高剂量组、益肺健脾方中剂量组、益肺健脾方低剂量组,每组 10 只。益肺健脾方高、中、低剂量组分别给予每天 12、6(相当于成人临床等效剂量)、3 g/kg 的益肺健脾方实验用药灌胃;阳性组给予每天 0.5 g/kg 的地塞米松溶液灌胃;正常组给予等体积的蒸馏水灌胃。各组大鼠连续灌胃 14 d,每天 1 次。

1.2.2 大鼠肺功能检测

参考文献^[11]方法,将各组 SD 大鼠用戊巴比妥钠(3 mg/kg)进行腹腔注射麻醉,待各组大鼠麻醉后无创进行肺功能测定。打开计算机 iox 2.6.0.3 采集系统软件,按照大鼠分组及编号设置数据储存路径,观察气道压力曲线、气道阻力曲线、肺容量曲线变化与动物呼吸机同步且平滑对称,待曲线稳定后收集呼吸数据。检测指标包括:最大吸气流速(peak inspiratory flow,PIF)、最大呼气流速(peak expiratory flow,PEF)、潮气量(tidal volume,TV)、呼气量(expiratory volume,EV)、50% 呼气流速(EF50)、被迫呼吸间隙(enhanced pause,Penh)。

1.2.3 大鼠肺部影像学特征观察

参考文献^[12]方法,SD 大鼠 3 mg/kg 的用戊巴比妥钠进行腹腔注射麻醉后,水平固定在 Micro CT 配套的动物支架上,保证肺部处在扫描范围内后进

行扫描。具体参数如下:扫描分辨率 78 μm ,曝光时间 2000 ms,电压 80 kV,电流 500 μA ,扫描角度 360°;图形分辨率 78 μm ,扫描时间 25 min,扫描后用 cobra 软件进行三维重构,将重构后的图像导入软件 amide 1.0.4 进行图像采集并观察肺组织炎性改变情况。

1.2.4 大鼠肺湿干质量比(W/D)和脏器指数的变化

各组 SD 大鼠用戊巴比妥钠(3 mg/kg)进行腹腔注射麻醉后处死,随后称取左肺为湿质量,将左肺放入恒温干燥箱(105 $^{\circ}\text{C}$)烘干 72 h,干燥至恒质量,并称取记录为干质量,按下列公式计算:肺干湿质量比 = 肺干质量/肺湿质量;脏器指数 = 脏器质量/大鼠体质量。

1.2.5 苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠肺组织病理形态变化

各组大鼠按上述方法处死后,取左肺于 4%多聚甲醛固定过夜,随后经常规脱水包埋于石蜡中。切片后,采用 HE 染色检测大鼠肺组织形态学改变。最后于普通光镜下拍照,根据大鼠肺组织出血情况,肺泡是否有充血,肺泡腔内炎症细胞包括中性粒细胞、巨噬细胞浸润情况,肺泡间隔的厚度对肺组织损伤量化评分^[13]。0 分:正常肺组织;1 分:轻度肺损伤, $\leq 25\%$ 肺部受累;2 分:中度肺损伤, $> 25\% \sim 50\%$ 肺部受累;3 分:严重肺损伤, $> 50\% \sim < 75\%$ 肺部受累;4 分:非常严重,几乎整肺受累。

1.2.6 流式细胞术检测 T 细胞亚群比例及凋亡

各组大鼠按上述方法处死后取脾进行研磨,滤网过滤,按细胞沉淀体积的 5 倍容积加入红细胞裂解液,轻轻吹打混匀,裂解 5 min。于 1200 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$,离心 5 min,弃去红色上清液。加入 15 mL PBS,吹打混匀后于 1200 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$,离心 5 min),弃上清,加入 PBS 混匀后进行细胞计数,调整细胞浓度到 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。T 细胞计数:各组细胞混悬液中分别加入抗体 CD8 1.25 μL 、CD3 4.5 μL 、CD4 4.5 μL ,通过流式细胞仪对各组细胞混悬液中的 T 淋巴细胞进行计数。T 细胞凋亡检测:加入 CD3 4.5 μL 对 T 细胞进行标记;染色:加入 Annexin V-FITC 和 PI 染色液,轻轻混匀;孵育:避光、室温孵育 15 min,随后置于冰上使用流式细胞仪检测。

1.2.7 Western Blot 检测脾 XAF1、FAS 和 TNF- α 蛋白表达

各组大鼠按上述方法处死后取脾组织,将脾组

织冷冻研磨,取部分研磨后的组织,加入蛋白酶抑制剂和裂解液,于组织研磨机中破碎研磨,离心,取上清。按照 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。根据目的蛋白分子量配置分离胶和浓缩胶。上样、电泳、并将其转移到 PVDF 膜上。用 5%脱脂牛奶完全浸没 PVDF 膜来封闭非特异性抗原(室温下静置 2 h),随后 $1 \times \text{TBST}$ 洗膜 3 次,每次 10 min。用相应的一抗(1:1000)完全浸没 PVDF 膜,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。次日洗膜后,将山羊抗兔 IgG 二抗(1:5000)在室温下孵育 1 h。洗膜 3 次后使用化学发光试剂显示,采用 Image J 1.8.0 软件分析计算凋亡标志蛋白 XAF1、FAS 和 TNF- α 的灰度值,并以 β -actin 作为参照蛋白。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件与 GraphPad Prism 9.5.1 进行统计学分析,符合正态分布的计量资料以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两间比较采用独立 t 检验, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肺功能的变化

与空白组相比,模型组 PEF、PIF、TV、EV、EF50 均显著降低,而 Penh 显著增高($P < 0.01$)。与模型组相比,益肺健脾方高、中剂量组中的 PEF、PIF、TV、EV、EF50 显著升高($P < 0.05$),而 Penh 显著降低($P < 0.01$),且趋势呈现剂量-效应关系(见表 1)。

2.2 各组大鼠肺部影像学的变化

与空白组相比,模型组肺纹理增粗,可见大片磨玻璃阴影。与模型组相比,益肺健脾方高、中、低剂量组的磨玻璃阴影均有所改善,其中益肺健脾方高剂量组改善情况明显优于中低剂量组(见图 1)。

2.3 各组大鼠肺干湿质量比和脏器指数的变化

与空白组比较,模型组大鼠肺干湿质量比显著升高($P < 0.01$),肺水肿严重,大鼠胸腺和脾指数均显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,益肺健脾方高剂量组大鼠胸腺指数明显升高($P < 0.05$)、益肺健脾方高、中剂量组脾指数显著升高($P < 0.01$)。益肺健脾方高、中剂量组大鼠肺干湿质量比显著降低($P < 0.01$)(见表 2)。

2.4 各组大鼠肺组织病理形态的变化

空白组大鼠肺组织未见明显异常,肺泡内无渗出物,肺泡大小均匀且排列整齐。与空白组相比,

表 1 各组大鼠肺功能的变化($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 1 Changes in lung function of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	剂量/ (g/kg) Dosages/ (g/kg)	PIF/(mL/s)	PEF/(mL/s)	TV/mL	EV/mL	EF50/mL	Penh
空白组 Blank group	-	50.13 ± 0.89	46.87 ± 1.92	3.00 ± 0.18	4.30 ± 0.32	47.34 ± 3.33	0.53 ± 0.17
模型组 Model group	-	17.21 ± 2.18**	16.86 ± 3.45**	0.75 ± 0.48**	1.02 ± 0.24**	14.71 ± 3.83**	3.18 ± 0.39**
阳性组 Positive group	0.5	46.87 ± 1.53###	38.09 ± 1.16###	2.70 ± 0.28###	3.98 ± 0.47###	37.79 ± 4.14###	0.85 ± 0.25###
益肺健脾方高剂量组 High dose group	12	35.62 ± 3.09###	36.23 ± 0.85###	2.34 ± 0.45###	3.35 ± 0.71###	34.57 ± 3.43###	0.98 ± 0.18###
益肺健脾方中剂量组 Medium dose group	6	30.41 ± 1.25###	31.01 ± 0.85###	1.43 ± 0.24#	2.99 ± 1.05#	28.57 ± 4.22###	1.21 ± 0.22###
益肺健脾方低剂量组 Low dose group	3	22.00 ± 2.08#	25.51 ± 3.75###	0.83 ± 0.13	1.55 ± 0.49	18.90 ± 1.63	1.81 ± 0.22###

注:与空白组相比,** $P < 0.01$;与模型组相比,# $P < 0.05$,### $P < 0.01$ 。(下图/表同)

Note. Compared with the blank group, ** $P < 0.01$. Compared with the model group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

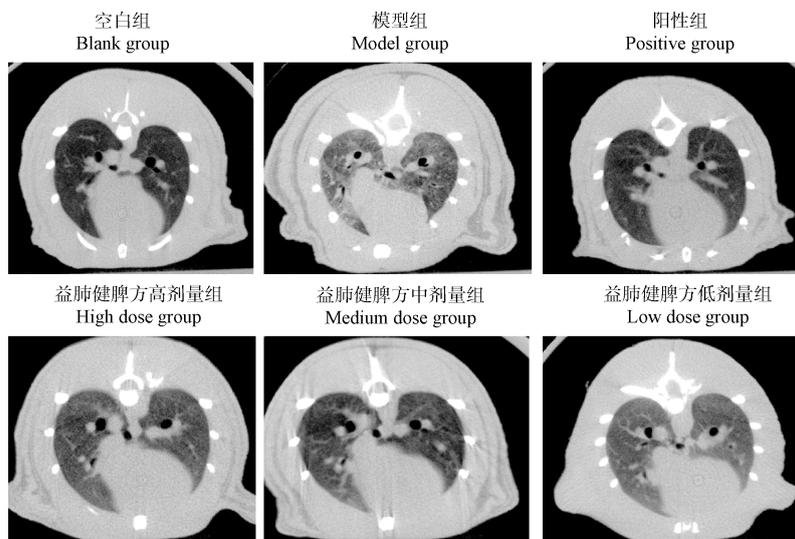


图 1 各组大鼠肺部影像学的变化

Figure 1 Changes in lung imaging of rats in each group

模型组中大鼠肺组织严重受损,肺间质水肿、充血、肺泡壁增厚、肺泡间隙增宽、并见大量炎症细胞浸润,肺组织损伤评分显著升高($P < 0.01$)。益肺健脾方高、中、低剂量组的肺组织损伤情况均有不同程度地减轻,并伴有炎性细胞浸润减少,其中益肺健脾方高、中剂量组肺组织损伤评分显著降低($P < 0.01$)(见图 2)

2.5 各组大鼠脾组织中 T 细胞凋亡情况

与空白组比较,模型组大鼠脾组织中 $CD4^+/CD8^+$ 显著降低($P < 0.01$),T 细胞总凋亡率显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,益肺健脾方高、中剂量组大鼠脾组织中 $CD4^+/CD8^+$ 明显升高($P <$

0.05)、T 细胞凋亡率则显著降低($P < 0.01$),以益肺健脾方高剂量组最为显著($P < 0.01$)。(见图 3,图 4)

2.6 各组大鼠脾组织中 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白表达

与空白组比较,模型组大鼠脾组织中 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白的表达水平均呈现上调趋势($P < 0.05$)。与模型组比较,益肺健脾方高、中剂量组大鼠脾组织中 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白的表达水平均显著下调($P < 0.05$),而益肺健脾方低剂量组上述蛋白表达水平有降低,但无统计学意义($P > 0.05$)。(见图 5)。

表 2 各组大鼠脏器指数及肺湿干质量比($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Organ index and lung wet to dry mass ratio of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	剂量/(g/kg) Dosages/(g/kg)	胸腺指数 Thymus index	脾指数 Spleen index	肺干湿质量比/% Lung wet/dry mass ratio/%
空白组 Blank group	-	2.54 ± 0.40	2.96 ± 0.33	3.97 ± 0.25
模型组 Model group	-	1.35 ± 0.28**	1.70 ± 0.28**	5.50 ± 0.23**
阳性组 Positive group	0.5	2.12 ± 0.18 [#]	2.84 ± 0.56 ^{##}	4.37 ± 0.36 ^{##}
益肺健脾方高剂量组 High dose group	12	2.10 ± 0.30 [#]	2.77 ± 0.81 ^{##}	4.52 ± 0.31 ^{##}
益肺健脾方中剂量组 Medium dose group	6	1.88 ± 0.32	2.58 ± 0.29 ^{##}	4.64 ± 0.19 ^{##}
益肺健脾方低剂量组 Low dose group	3	1.45 ± 0.41	2.12 ± 0.78 [#]	5.10 ± 0.31 [#]

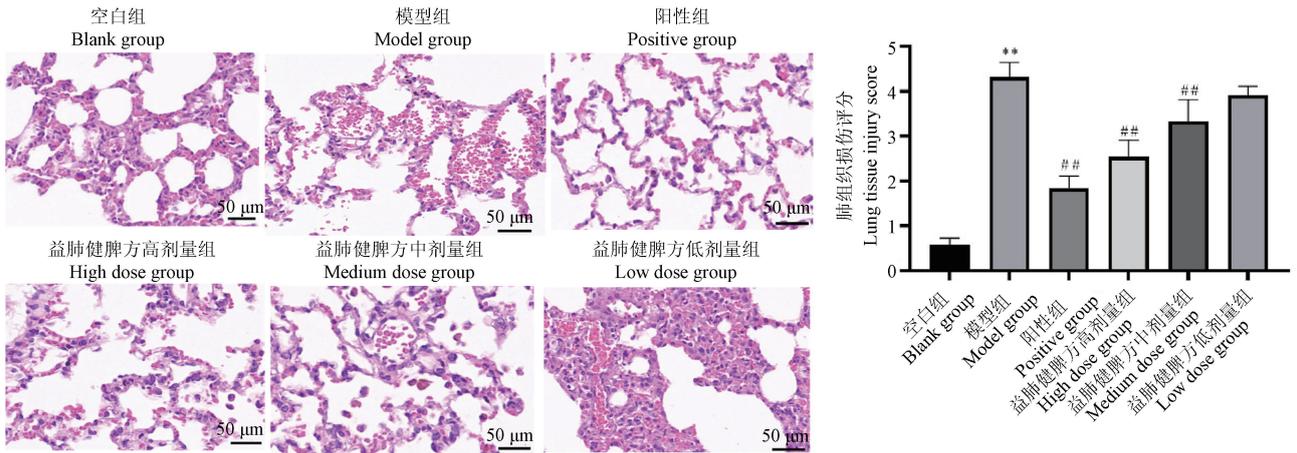


图 2 各组大鼠肺组织 HE 染色

Figure 2 HE staining of rat lung tissue in each group

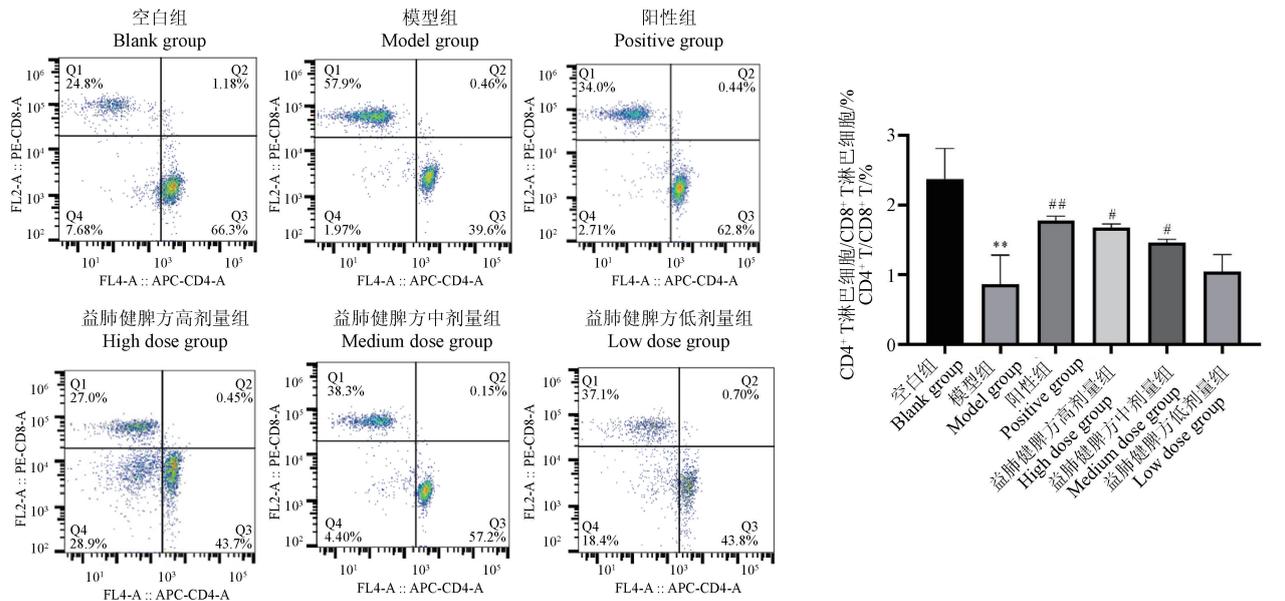


图 3 各组大鼠脾组织中 T 细胞亚群($CD4^+/CD8^+$)的变化

Figure 3 Changes of T-cell subsets ($CD4^+/CD8^+$) in the spleen tissues of rats from various groups

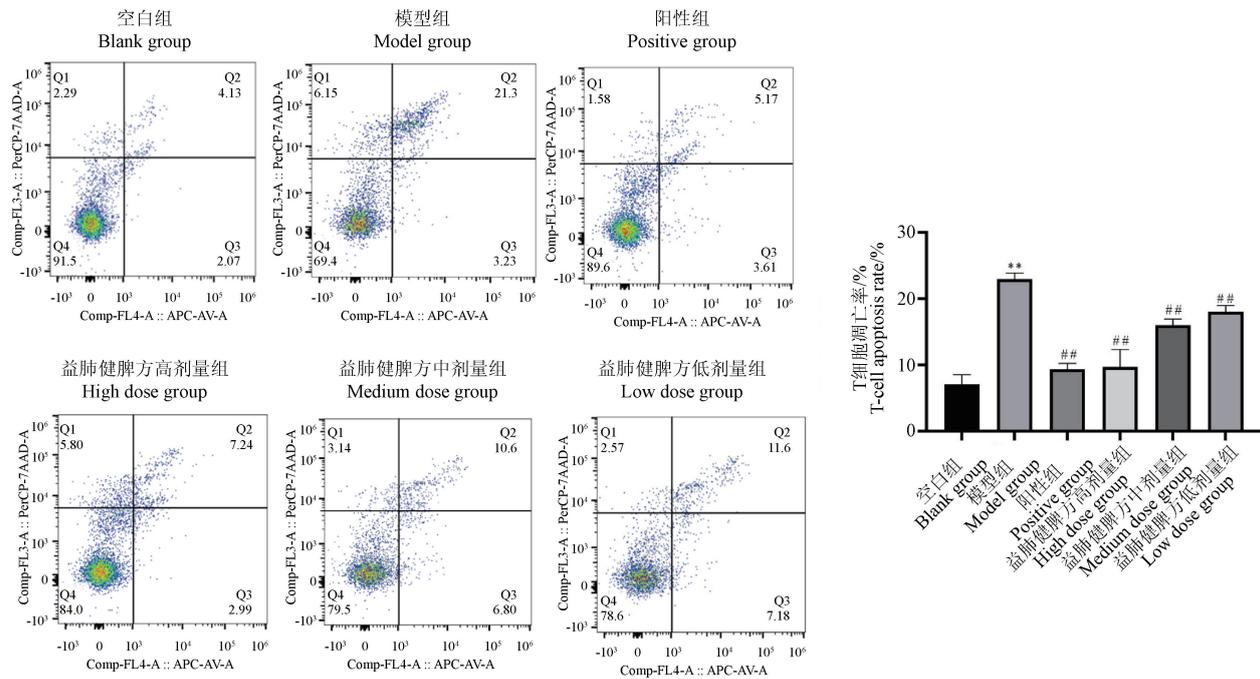
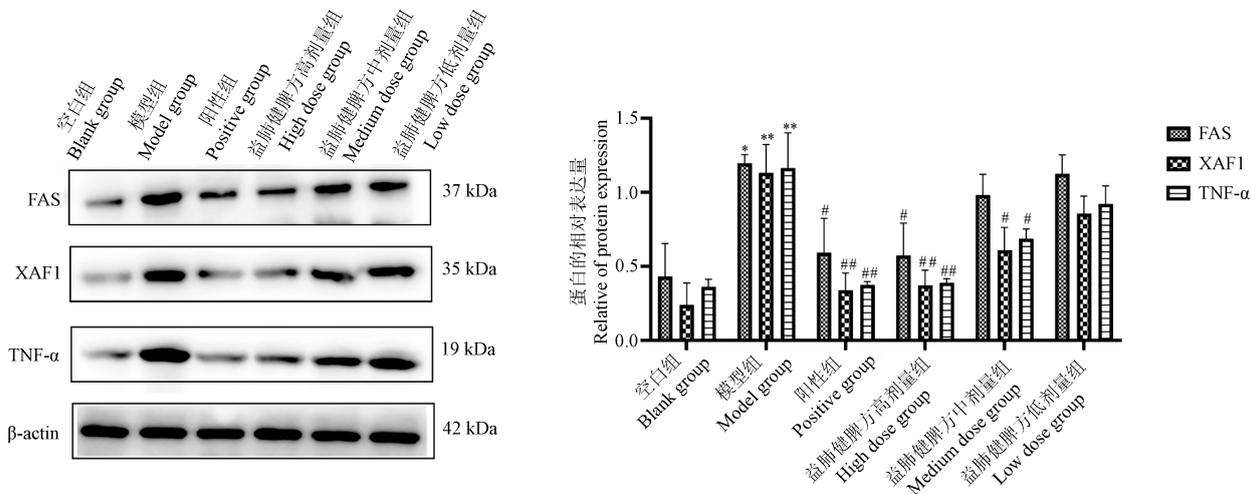


图 4 各组大鼠脾组织中 T 细胞凋亡的情况

Figure 4 T-cell apoptosis in the spleen tissue of rats in each group



注:与空白组相比, * $P < 0.05$ 。

图 5 各组大鼠脾组织中 XAF1、FAS 和 TNF-α 蛋白表达变化

Note. Compared with the blank group, * $P < 0.05$.

Figure 5 Changes in protein expression of XAF1、FAS and TNF-α in spleen tissues of rats in various groups

3 讨论

ALI 是一种先天性与适应性免疫反应相关的急性炎症性疾病^[14]。研究表明,T 细胞凋亡在急性肺损伤的发展中起着一定的作用,减少 T 细胞凋亡可能有助于减轻肺部组织损伤和炎症反应,从而改善急性肺损伤的预后^[15]。然而,目前对于如何调控 T 细胞凋亡以及其在急性肺损伤中的具体作用机制

还需要进一步研究,因此深入了解 T 细胞凋亡的调控机制与急性肺损伤发展的关系,有助于寻找潜在的治疗策略和改善患者的预后。

现代研究发现肺部损伤与炎症反应会累及全身多个组织和器官,尤其是对胃肠道和免疫系统^[16]。改善胃肠道症状,保护脾胃功能,能够促进肺部炎症的吸收,减少粘连,改善肺损伤,提高其免疫功能,及早截断病势,防止疾病的进一步发展^[17]。

中医学认为肺属金,脾胃属土,二者母子相生,在生理和病理上具有相关性。生理上肺气充足依赖脾气生化,脾运输水谷精微则依赖肺气的宣发肃降,两脏共同输布津液并维持人体全身气机的调畅^[18-19];病理上则易出现母病及子,子病及母,肺脾同病的特点^[20]。在治疗上《医宗必读·虚劳》指出:“脾有生肺之能…土旺而生金,勿拘于保肺”。因此,培土生金、益肺健脾在肺系疾病治疗中具有重要意义^[21]。课题组前期研究表明具有益气健脾、培土生金作用的参苓白术散能显著改善 LPS 诱导的肺部炎症反应,提高肺部免疫功能^[22]。许爱英^[23]和韩冰阁等^[24]也证实了“培土生金”有利于肺炎后炎症的吸收和呼吸功能的修复,从而增强机体免疫功能。另外作为培土生金代表方的补中益气汤也被证实具有消除炎症、调节免疫、缓解咳嗽、肺损伤等症状,保护肺组织的作用^[25]。基于以上理论背景,本研究所采用方剂益肺健脾方是由经典方补中益气汤化裁而来,由炙黄芪、党参、陈皮、当归、柴胡、桔梗、麸炒白术、炒白芍、砂仁、生麦芽、炙甘草组成。全方以“益肺健脾”立法,兼顾止咳、化痰、平喘,在促进肺部炎症吸收、缩短病程、改善患者症状方面具有良好的临床疗效。基于该方的临床反馈及文献回顾,本研究通过 LPS 来构建大鼠急性肺损伤模型。LPS 作为革兰氏阴性菌细胞壁的一种成分,可通过破坏肺泡上皮屏障并诱导细胞凋亡以及肺组织中氧化水平的不平衡直接引起 ALI^[26-27]。研究结果表明,益肺健脾方能够有效改善大鼠肺功能、肺组织损伤及肺部炎症。肺水肿是 ALI 最主要的病理特征之一^[28];胸腺和脾指数通常是评估宿主免疫能力的重要指标^[29],本研究结果发现益肺健脾方不但能够降低 W/D 比率,显著抑制肺水肿,同时还能提高脾与胸腺的脏器指数,增加大鼠免疫力^[30]。可见,益肺健脾方对于大鼠 ALI 模型的肺部组织损伤具有较好的改善作用。

T 细胞是对肺部炎症保护性免疫的核心成分^[31]。根据细胞表面标志物和特化功能,经典二分法将 T 细胞分为 CD4⁺ 和 CD8⁺。CD4⁺ T 细胞也称为 T 辅助细胞,根据他们的表型、特征细胞因子和指定转录因子的能力,CD4⁺ T 细胞分为 5 个经典亚群:TH1 细胞(TH1 cell, TH1)、辅助性 T 细胞 2(T helper 2 cell, Th2)、辅助性 T 细胞 17(T helper cell 17, TH17)、滤泡辅助性 T 细胞(follicular helper T cell, Tfh)和调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)

细胞^[32]。以上亚群的功能可协调宿主对病原体的防御。细胞毒性 CD8⁺ T(CTL)细胞是早期抗肿瘤、抗感染的细胞,可介导直接杀伤受感染的靶细胞,赋予肺部感染保护性免疫^[33];CD4⁺ T/CD8⁺ T 表示诱导性 T 淋巴细胞与抑制性 T 淋巴细胞之间的平衡状态,是机体免疫内环境稳定的最重要指标^[34];总之,T 细胞对肺部炎症反应保护起着重要作用,且不同的 T 细胞亚群可协调先天性和适应性免疫反应,促进病原体清除、组织修复以及对呼吸道细菌感染的持久记忆的建立^[35]。有研究表明,肺部炎症期间,T 细胞凋亡可能会影响 T 细胞亚群的比例^[36]。同时 T 细胞作为机体免疫防御中的关键角色,是免疫系统中重要的组成部分,其凋亡增加,可加剧急性肺损伤的发生^[37]。细胞凋亡在许多生理与病理过程中发挥重要作用,特别是在发育和免疫系统中^[38]。研究表明,FAS、TNF- α 、XAF1 是通过外在(死亡受体途径)和内在(线粒体途径)启动细胞凋亡的重要分子^[39],同时 FAS、TNF- α 和 XAF1 在维持免疫系统平衡中也扮演着重要角色。其中,FAS 通过参与调节 T 细胞、B 细胞和自然杀伤细胞等免疫细胞的活化、增殖和凋亡过程,从而维持免疫平衡^[40];TNF- α 则是一种多功能的细胞因子,诱导细胞凋亡的同时广泛参与炎症反应和免疫调节,在免疫系统中发挥重要作用^[41];XAF1 在免疫细胞中表达较高,可参与调节免疫细胞的凋亡过程,从而影响免疫功能的发挥^[42]。另有研究报道显示,TNF 和 XAF1 是参与 T 细胞凋亡的重要通路^[43];同时有临床性研究证实,在肺部炎症明显的患者外周血中发现 XAF1、TNF- α 、FAS 等凋亡通路相关基因特异性上调,且 T 细胞的数量也随之明显减少^[44]。与上述研究结果相似,本研究利用流式细胞术检测大鼠脾组织中 T 细胞亚群(CD4⁺/CD8⁺)与 T 细胞的凋亡情况,其结果显示,益肺健脾方高、中剂量组显著增加大鼠脾中 CD4⁺/CD8⁺ 比例的同时明显降低了大鼠脾中 T 细胞的凋亡率。随后利用蛋白免疫印迹法对大鼠脾组织中 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白表达水平变化进行检测,结果显示与空白组相比,模型组大鼠脾组织中 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白的相对表达水平均显著性升高,而与模型组相比,益肺健脾方高、中剂量组明显降低了脾组织中 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白的相对表达水平。总之这些结果表明益肺健脾方可能也是通过降低大鼠脾组织中 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白的表达量来减少急性肺损伤

中的 T 细胞凋亡数量。综上,益肺健脾方对大鼠 ALI 模型的肺功能、肺纹理以及肺部损伤均有一定的改善作用,提高脾中的 $CD4^+/CD8^+$ 的同时还能减少了 T 细胞的凋亡数量,其机制可能与下调大鼠脾组织中 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白的表达水平有关。本研究不仅为后续进一步探讨益肺健脾方改善 ALI 的相关分子机制提供了实验基础,也为益肺健脾方临床防治 ALI 提供了科学依据。

参 考 文 献(References)

- [1] HUANG W, FU G, WANG Y, et al. Immunometabolic reprogramming of macrophages with inhalable CRISPR/Cas9 nanotherapeutics for acute lung injury intervention [J]. Acta Biomater, 2024, 181: 308-316.
- [2] ZHANG J, GUO Y, MAK M, et al. Translational medicine for acute lung injury [J]. J Transl Med, 2024, 22(1): 25.
- [3] SHAH D, DAS P, ACHARYA S, et al. Small immunomodulatory molecules as potential therapeutics in experimental murine models of acute lung injury (ALI)/acute respiratory distress syndrome (ARDS) [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5): 2573.
- [4] 王鑫, 张志明, 王功臣, 等. “甘肃方剂”在新型冠状病毒肺炎防治中的应用策略分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(16): 21-25.
- WANG X, ZHANG Z M, WANG G C, et al. Analysis of “Gansu prescriptions” in prevention and treatment of coronavirus disease-2019 [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2020, 26(16): 21-25.
- [5] BETSUYAKU T, ITO Y, PEAKE N, et al. Enhanced autophagy and phagocytosis of apoptotic lymphocytes in splenic macrophages of acute ethanol-treated rats; Light and electron microscopic studies [J]. Histol Histopathol, 2024, 39(7): 853-866.
- [6] YAO Y, DENG H, LI P, et al. α -lactose improves the survival of septic mice by blockade of TIM-3 signaling to prevent NKT cell apoptosis and attenuate cytokine storm [J]. Shock, 2017, 47(3): 337-345.
- [7] LIU J, LIU X, WEI B, et al. Effect of stable overexpression of XAF1 gene on biological characteristics of ovarian cancer A2780 cells [J]. J South Med Univ, 2021, 41(5): 760-766.
- [8] RANJAN K, PATHAK C. Cellular dynamics of fas-associated death domain in the regulation of cancer and inflammation [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(6): 3228.
- [9] ZHANG P, LI W, ZHENG X, et al. Endoplasmic reticulum stress and death receptor-mediated apoptosis in the neuronal differentiation of adult adipose-derived stromal cells [J]. Heliyon, 2024, 10(7): e28608.
- [10] 张亚平, 张广平, 苏萍, 等. 不同途径吸入脂多糖致大鼠急性肺炎模型的优选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(7): 82-88.
- ZHANG Y P, ZHANG G P, SU P, et al. Selection of acute pneumonia rat models induced by lipopolysaccharide with different inhalation pathways [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2018, 24(7): 82-88.
- [11] 王俊丽, 刘喜平, 崔树婷, 等. 湿生扁蕾不同提取部位对肺纤维化模型大鼠肺功能的影响 [J]. 中国民族民间医药, 2022, 31(23): 21-26.
- WANG J L, LIU X P, CUI S T, et al. Effects of different polar parts of *Gentianopsis paludosa* (Munro.) ma on pulmonary function in rats with pulmonary fibrosis [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharmacology, 2022, 31(23): 21-26.
- [12] 廖一羲, 王搏, 邱志广, 等. 博来霉素诱导的肺纤维化大鼠肺组织病理和超微结构变化 [J]. 中国病理生理杂志, 2023, 39(12): 2296-2304.
- LIAO Y X, WANG B, QIU Z G, et al. Lung histopathological and ultrastructural changes in rats with bleomy-cin-induced pulmonary fibrosis [J]. Chin J Pathophysiol, 2023, 39(12): 2296-2304.
- [13] 张英华, 吕翰林, 周建文, 等. 黄连解毒汤调节 HIF-1 α /VEGF 信号通路改善 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆能力的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(7): 59-65.
- ZHANG Y H, LU H L, ZHOU J W, et al. Huanglian jiedutang regulates HIF-1 α /VEGF signaling pathway to improve learning and memory abilities of APP/PS1 transgenic mice [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2024, 30(7): 59-65.
- [14] YANG J, DONG L, WANG Y, et al. Targeted degradation of hexokinase 2 for anti-inflammatory treatment in acute lung injury [J]. Mol Med Rep, 2024, 29(5): 83.
- [15] DOUGHTY L. Adaptive immune function in critical illness [J]. Curr Opin Pediatr, 2016, 28(3): 274-280.
- [16] XU Y, ZHU J, FENG B, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells on lung and gut $CD8^+$ T cells in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice [J]. Cell Prolif, 2021, 54(5): e13028.
- [17] 路迎冬, 尚唱, 辛来运, 等. 基于肠道微生态角度探讨从脾胃论治在新型冠状病毒肺炎中的应用 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(7): 1-6.
- LU Y D, SHANG C, XIN L Y, et al. Application of treatment from spleen and stomach in tackling COVID-19 with intestinal microecology approach [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2020, 38(7): 1-6.
- [18] 蔡梦圆, 吴澎泞, 杨仁旭, 等. “肺脾同治”法在新型冠状病毒肺炎中的应用 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(2): 63-66.
- CAI M Y, WU P N, YANG R X, et al. The application of TCM theory “pifeitongzhi” in COVID-19 [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2020, 36(2): 63-66.
- [19] 张召杨, 孙增涛, 刘南飞, 等. 脾肺相关理论及临床应用研究 [J]. 陕西中医, 2020, 41(11): 1623-1626, 1631.
- ZHANG Z Y, SUN Z T, LIU N F, et al. Theory and clinical application of lung and spleen [J]. Shaanxi J Tradit Chin Med, 2020, 41(11): 1623-1626, 1631.
- [20] 严诏琦, 徐义峰, 李可可, 等. 国医大师洪广祥从“补虚泻

- 实,肺脾同治”论治支气管扩张症缓解期经验 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34(8): 1997-1999.
- YAN Z Q, XU Y F, LI K K, et al. Brief summary of academic thoughts of national master of TCM HONG Guang-xiang on diagnosis and treatment for pulmonary diseases [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2023, 34(8): 1997-1999.
- [21] 赵蓉, 邢峰丽, 张艳霞, 等. 基于“肺脾同治”中医治疗老年肺部感染研究进展 [J]. 河北中医, 2023, 45(12): 2102-2106.
- ZHAO R, XING F L, ZHANG Y X, et al. Research progress of treating senile pulmonary infection with traditional Chinese medicine based on “treating both lung and spleen” [J]. Hebei J Tradit Chin Med, 2023, 45(12): 2102-2106.
- [22] 武妍琳, 刘喜平, 贾育新, 等. 参苓白术散对肠道菌群失调幼鼠肺部免疫炎症反应的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(11): 79-85.
- WU Y L, LIU X P, JIA Y X, et al. Effect of Shenling Baizhu Powder on pulmonary immune inflammatory response in juvenile mice with intestinal dysbiosis [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2022, 29(11): 79-85.
- [23] 许爱英. 间接补益的作用与临证应用意义 [J]. 中医学药刊, 2003, 21(6): 965.
- XU A Y. The role of indirect tonic and its clinical significance [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2003, 21(6): 965.
- [24] 韩冰阁, 张志明, 雍文兴, 等. 从肠道微生态探讨“培土生金法”在治疗新型冠状病毒肺炎中的运用 [J]. 实用中医内科杂志, 2021, 35(7): 105-108.
- HAN B G, ZHANG Z M, YONG W X, et al. Study on the application of Peitu Shengjin method in the treatment of new coronavirus pneumonia [J]. J Pract Tradit Chin Intern Med, 2021, 35(7): 105-108.
- [25] 尹燕燕, 岳昭娣, 丁懿, 等. 基于网络药理学探讨补中益气汤对新型冠状病毒肺炎恢复期的作用机制 [J]. 山东中医药大学学报, 2021, 45(5): 685-694.
- YIN Y Y, YUE Z D, DING Y, et al. Study on the mechanism of Buzhong Yiqi Decoction on the recovery period of COVID-19 based on network pharmacology [J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med, 2021, 45(5): 685-694.
- [26] LIU Z, GAO J, BAN Y, et al. Synergistic effect of paeoniflorin combined with luteolin in alleviating Lipopolysaccharides-induced acute lung injury [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 327: 118022.
- [27] QING C, WU Y, LIU B, et al. Ameliorative effect of *Morinda officinalis* oligosaccharides on LPS-induced acute lung injury [J]. Chem Biodivers, 2024, 21(5): e202400506.
- [28] 戴全武, 刘毅, 曾格格, 等. 苓甘五味姜辛汤治疗急性肺损伤的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(24): 95-103.
- DAI Q W, LIU Y, ZENG G G, et al. Study on mechanism of Linggan Wuwei Jiangxintang in treating acute lung injury [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(24): 95-103.
- [29] 孔思琪, 李金田, 李娟, 等. 归芪益元膏联合顺铂通过内质网应激途径和线粒体凋亡途径对 Lewis 肺癌小鼠的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(20): 54-61.
- KONG S Q, LI J T, LI J, et al. Effect of Guiqi Yiyuan ointment combined with cisplatin on mice with Lewis lung cancer through endoplasmic reticulum stress pathway and mitochondrial apoptosis pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2024, 30(20): 54-61.
- [30] 陆松侠, 黄茸茸, 胡健力, 等. 基于 IL-33/ST2 信号通路研究补肺汤对慢性支气管炎大鼠肺组织炎症因子表达的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(23): 5826-5830.
- LU S X, HUANG R R, HU J L, et al. Based on IL-33/ST2 signaling pathway, the effect of Bufei Decoction on the expression of inflammatory factors in lung tissue of rats with chronic bronchitis was studied [J]. Chin J Gerontol, 2023, 43(23): 5826-5830.
- [31] CHEN K, KOLLS J K. T cell-mediated host immune defenses in the lung [J]. Annu Rev Immunol, 2013, 31: 605-633.
- [32] ANNUNZIATO F, ROMAGNANI S. Heterogeneity of human effector CD4⁺ T cells [J]. Arthritis Res Ther, 2009, 11(6): 257.
- [33] KOH C H, LEE S, KWAK M, et al. CD8 T-cell subsets: heterogeneity, functions, and therapeutic potential [J]. Exp Mol Med, 2023, 55(11): 2287-2299.
- [34] BYRNES D, MASTERSON C H, BRADY J, et al. Differential effects of cytokine versus hypoxic preconditioning of human mesenchymal stromal cells in pulmonary sepsis induced by antimicrobial-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. Pharmaceuticals, 2023, 16(2): 149.
- [35] WU J, HAYES B W, PHOENIX C, et al. A highly polarized Th₂ bladder response to infection promotes epithelial repair at the expense of preventing new infections [J]. Nat Immunol, 2020, 21(6): 671-683.
- [36] ZHANG S, ZHANG N, HAN J, et al. Dynamic immune status analysis of peripheral blood mononuclear cells in patients with *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection sepsis using single-cell RNA sequencing [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1380211.
- [37] LIU J, SONG K, LIN B, et al. HMGB1 promotes neutrophil PD-L1 expression through TLR2 and mediates T cell apoptosis leading to immunosuppression in sepsis [J]. Int Immunopharmacol, 2024, 133: 112130.
- [38] BAUMANN S, KRUEGER A, KIRCHHOFF S, et al. Regulation of T cell apoptosis during the immune response [J]. Curr Mol Med, 2002, 2(3): 257-272.
- [39] IGNEY F H, KRAMMER P H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(4): 277-288.
- [40] YANG Z, KAO X, HUANG N, et al. Identification and analysis of PANoptosis-related genes in sepsis-induced lung injury by bioinformatics and experimental verification [J]. J Inflamm Res, 2024, 17: 1941-1956.
- [41] SUKOCHEVA O A, NEGANOVA M E, ALEKSANDROVA Y, et al. Signaling controversy and future therapeutic perspectives of targeting sphingolipid network in cancer immune editing and

resistance to tumor necrosis factor- α immunotherapy [J]. Cell Commun Signal, 2024, 22(1): 251.

[42] HAN Y, BAI X, LIU S, et al. XAF1 protects host against emerging RNA viruses by stabilizing IRF1-dependent antiviral immunity [J]. J Virol, 2022, 96(17): e0077422.

[43] YANG X, YAN J, XUE Y, et al. Single-cell profiling reveals distinct immune response landscapes in tuberculous pleural effusion and non-TPE [J]. Front Immunol, 2023,

14: 1191357.

[44] ZHU L, YANG P, ZHAO Y, et al. Single-cell sequencing of peripheral mononuclear cells reveals distinct immune response landscapes of COVID-19 and influenza patients [J]. Immunity, 2020, 53(3): 685-696.

[收稿日期] 2024-05-28

《中国比较医学杂志》稿约

国内刊号 CN 11-4822/R 国际刊号 ISSN 1671-7856 邮局代号 82-917

一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊)。征稿的范围是与人类生命与健康密切相关的实验动物与动物实验等生命科学各分支学科,重点刊载比较医学成果和进展。栏目设置包括研究报告、综述与专论、研究快报、研究简讯、技术与方法、经验交流、学术动态、国外研究进展、学术信息、简讯等栏目。要求来稿数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、被《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》、中文生物医学期刊文献数据库(CMCC)、中国生物医学期刊数据库等数据库收录。

二、投稿要求及注意事项

文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。文章正文字数在 5000 字左右。

投稿网址: <http://zgswdw.cnjournals.com/zgbjyxzz/ch/index.aspx>

期待您的来稿!