

沈婷婷,李素云,李亚,等. 基于 IRS-1/PI3K 信号轴探究补肺健脾方对 COPD 大鼠骨骼肌线粒体损伤的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 57-67.

Shen TT, Li SY, Li Y, et al. Role of IRS-1/PI3K signaling axis in the effects of Bufe Jianpi formula on mitochondrial damage in skeletal muscle of chronic obstructive pulmonary disease rats [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 57-67.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.03.008

基于 IRS-1/PI3K 信号轴探究补肺健脾方对 COPD 大鼠骨骼肌线粒体损伤的影响

沈婷婷^{1,2}, 李素云^{3,4*}, 李亚², 轩银霜^{1,2}, 李景梅^{1,2}, 李高峰^{1,2}, 韩冰洋^{1,2}

(1.河南中医药大学,郑州 450046;2.河南中医药大学第一附属医院中心实验室中药药理(呼吸)实验室,河南省呼吸病防治中医药重点实验室,郑州 450000;3.河南中医药大学第一附属医院呼吸科,郑州 450000;4.河南中医药大学呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心,郑州 450046)

【摘要】 目的 探究补肺健脾方(Bufe Jianpi formula,BJF)通过调控 IRS-1/PI3K 信号轴对 COPD 大鼠骨骼肌线粒体损伤的影响。**方法** 将 60 只 SPF 级 SD 大鼠随机分为空白(Control)组、COPD 稳定期模型(Model)组、氨茶碱(Am)组、补肺健脾方(BJF)组、吡格列酮(PIO)组以及补肺健脾方+吡格列酮(BJF+PIO)组,10 只/组。采用烟熏加鼻腔滴菌(肺炎克雷伯杆菌)的方法建立 COPD 稳定期大鼠模型,自第 9 周开始给药至 20 周结束后取材,每周给予大鼠体重测量。分别对肺组织和骨骼肌组织进行常规切片与 HE 染色,并于光镜下观察其相应的病理学改变。分别于第 0、8、20 周采用非束缚全身体积描记系统观察大鼠肺功能,包括 VT、PEF、EF50。采用 qPCR 技术检测大鼠骨骼肌组织中 IRS-1、PI3K、PGC-1 α 以及 Leptin mRNA 的表达。采用 Western blot 技术检测大鼠骨骼肌组织中 IRS-1、PI3K、AKT、p-AKT、PGC-1 α 、TFAM 和 Leptin 蛋白的表达。**结果** 光镜观察显示与 Control 组比,Model 组肺病理可见肺泡间质以及肺支气管存有大量的炎性细胞浸润,部分肺泡壁出现断裂并融合形成气腔、纤维网被破坏等;与 Model 组比,用药治疗后各组肺泡壁的断裂以及纤维网的破坏均得到改善,支气管中炎性细胞浸润减轻,其中以 BJF 组与 Am 组尤为明显。用药治疗后各组骨骼肌病理与 Model 组比,可不同程度改善肌纤维之间排列间隙、萎缩与断裂,肌细胞胞质染色不均一等,其中以 BJF 组疗效较为显著。与 Control 组比,Model 组 PEF、VT 和 EF50 第 8 周起显著降低($P<0.01$),BJF 组、BJF+PIO 组和 Am 组可以显著提高 PEF、EF50($P<0.01$)。与 Control 组比,Model 组中 IRS-1、PGC-1 α 和 PI3K mRNA 与蛋白表达水平显著降低($P<0.05$, $P<0.01$),Leptin mRNA 与蛋白表达水平显著增高($P<0.01$);与 Model 组比,BJF 组 IRS-1、PGC-1 α 、PI3K mRNA 与蛋白表达水平显著增高($P<0.05$, $P<0.01$);PIO 组 IRS-1 mRNA 表达水平显著增高($P<0.01$);BJF+PIO 组 PGC-1 α mRNA 水平显著增高($P<0.01$),IRS-1、PI3K mRNA 与蛋白水平显著升高($P<0.05$, $P<0.01$);Am 组中 PI3K mRNA 与蛋白表达水平显著增高($P<0.01$);4 个用药组中 Leptin mRNA 的表达水平均显著降低($P<0.01$),除 Am 组外,其余 3 个用药组 Leptin 蛋白表达显著降低($P<0.01$);与 Control 组比,Model 组股四头肌组织中 TFAM、p-AKT 蛋白表达有明显的下降趋势,各治疗组的 TFAM、p-AKT 蛋白表达均有升高趋势,但无显著性差异($P>0.05$)。**结论** 补肺健脾方可通过调控 IRS-1/PI3K 信号轴,改善骨骼肌线粒体的损伤,同时提高 PGC-1 α 与线粒体转录因子 TFAM 的表达,增强线粒体的生物合成,从而减轻肺与骨骼肌组织的病理性损伤。

【关键词】 COPD;骨骼肌功能障碍;IRS-1/PI3K 信号通路;补肺健脾方

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 03-0057-11

【基金项目】 国家重点研发计划项目(2018YFC1704800,2018YFC1704801);省级科技研发计划联合基金项目(222301420081);国家自然科学基金面上项目(82074413)。

【作者简介】 沈婷婷(1991—),女,博士研究生,研究方向:中医药防治呼吸系统疾病方向。E-mail:shenting208@163.com

【通信作者】 李素云(1965—),教授,主任医师,研究方向:中医药防治呼吸疾病临床与基础研究。E-mail:lisuyun2000@126.com

Role of IRS-1/PI3K signaling axis in the effects of Bufeijianpi formula on mitochondrial damage in skeletal muscle of chronic obstructive pulmonary disease rats

SHEN Tingting^{1,2}, LI Suyun^{3,4*}, LI Ya², XUAN Yinshuang^{1,2}, LI Jingmei^{1,2}, LI Gaofeng^{1,2}, HAN Bingyang^{1,2}
(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China. 2. Chinese Medicine Pharmacology (Respiratory) Laboratory, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Henan Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for the Prevention and Treatment of Respiratory Diseases, Zhengzhou 450000. 3. Respiratory Department of the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000. 4. Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan&Education Ministry of China, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

[Abstract] **Objective** To explore the action of Bufeijianpi formula (BJF) on mitochondrial damage to skeletal muscle in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) rats via its regulation of the IRS-1/PI3K signaling axis. **Methods** 60 SPF SD rats were randomly divided into Control group, Model group (COPD stable stage group), aminophylline (Am) group, BJF group, pioglitazone (PIO) group and BJF+PIO group, with 10 rats per group. A stable COPD rat model was established via forced smoking and *Klebsiella pneumoniae* nasal drip method. Samples were taken from the 9th week to the end of the 20th week, and the weight of the rats was measured every week. Routine sectioning and HE staining were performed on lung and skeletal muscle tissue, and corresponding pathological changes were observed under a light microscope. The lung function of the rats was observed by whole-body plethysmography in weeks 0, 8, and 20, including tidal VT, PEF, and EF50. The mRNA expression of IRS-1, leptin, PGC1- α , and PI3K in rat skeletal muscle was detected by qPCR. The expression of PGC1- α , TFAM, IRS-1, PI3K, AKT, p-AKT, and leptin in rat skeletal muscle tissue was detected by Western blot. **Results** The Model group, but not the Control group, showed a large number of inflammatory cells infiltrating the alveolar interstitium and bronchus, indicative of lung disease; some alveolar walls had broken and fused to form air cavities, and fiber networks were destroyed. After drug treatment, the rats showed improved alveolar wall and fiber network integrity and reduced inflammatory cell infiltration in the bronchus, especially those in the BJF and Am groups. In the drug treatment groups, the skeletal muscle pathology of each group showed improved spatial arrangement, the atrophy and fracturing of muscle fibers were ameliorated to different degrees, and cytoplasmic staining of muscle cells was uneven, and the BJF group showed the most significant effects. Compared with the Control group, the Model group's PEF, VT, and EF50 significantly decreased from week 8 ($P<0.01$), while the BJF, BJF+PIO and Am groups had significantly increased PEF and EF50 ($P<0.01$). Compared with Control group, the Model group's mRNA and protein expression levels of IRS-1, PGC1- α , and PI3K were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), the level of leptin was significantly increased ($P<0.01$). Compared with the Model group, the mRNA and protein expressions of IRS-1, PGC1- α and PI3K in the BJF group were significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$), and the mRNA expression of IRS-1 in the PIO group was significantly increased ($P<0.01$). The BJF+PIO group's mRNA levels of PGC1- α ($P<0.01$) and mRNA and protein levels of IRS-1 and PI3K were significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$). The mRNA and protein expression levels of PI3K in the Am group were significantly increased ($P<0.01$). The expression levels of leptin mRNA were significantly decreased in the four treatment groups ($P<0.01$), and the expression of leptin protein was significantly decreased in all treatment groups except the Am group ($P<0.01$). Compared with the Control group, the Model group's quadriceps femoris tissue showed a significant decrease in TFAM and p-AKT expression. TFAM and p-AKT expression in all the treatment groups showed an increasing trend, but the difference was not statistically significant ($P>0.05$). **Conclusions** By regulating the IRS-1/PI3K signaling axis, Bufeijianpi reduces mitochondrial damage to skeletal muscle, increases the expression of PGC1- α and mitochondrial transcription factor TFAM, enhances mitochondrial biosynthesis, and reduces pathological damage to lung and skeletal muscle tissue.

[Keywords] COPD; skeletal muscle dysfunction; IRS-1/PI3K signaling pathway; Bufeijianpi formula
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive lung disease, COPD) 是一种以不可逆气流受限和 (或) 慢性气道炎症为主要特征的呼吸系统疾病。预计到 2030 年,将上升至全球第 3 位死亡原因,俨然已成为一个国际性的公共健康问题^[1-2]。骨骼肌功能障碍 (skeletal muscle dysfunction, SMD) 是 COPD 常见的肺外表现^[3],其特征是功能性运动能力受损和体力活动减少^[4],多达 1/3 的 COPD 患者可表现出骨骼肌力量与耐力的障碍,以及易疲劳性增加等^[5-6];其发病机制复杂,涉及全身性炎症、氧化应激和线粒体功能损伤等^[7-8]。线粒体功能损伤可引发细胞能量代谢障碍、柠檬酸合成酶活性降低、氧化应激增强、呼吸链受抑制、线粒体 DNA 损伤等,可进一步加重 SMD^[9-11]。

胰岛素受体底物 1 (insulin receptor substrate 1, IRS-1)、磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K) 是 PI3K 信号轴的主要调节因子,IRS-1/PI3K 作为线粒体功能和胰岛素信号转导的主要信号轴,在调节能量代谢和细胞生长、分化中起重要作用。骨骼肌是胰岛素调控葡萄糖摄取、代谢和利用的主要目标组织之一,生理条件下,通过刺激标准的 IRS-PI3K 途径实现肌细胞对葡萄糖的摄取。当线粒体功能受到破坏时,会导致内源性氧化物产生增加,进而引发免疫失衡、炎症反应以及机体代谢异常等问题。这些因素促进了 COPD 骨骼肌功能障碍的发生和发展^[12-13];因此,调控 IRS-1/PI3K 信号通路可能是改善骨骼肌线粒体损伤的重要途径。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助活化因子 1 α (peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator 1 α , PGC-1 α) 是一个骨骼肌内胰岛素信号通路和线粒体内稳态关系的双向调节因子,肌小管中胰岛素和葡萄糖含量升高可干扰胰岛素信号通路、线粒体生物合成和线粒体生物能量代谢^[14],胰岛素增敏剂吡格列酮 (pioglitazone, PIO) 可修复上述变化并诱导 PGC-1 α 生成。此外,线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, TFAM) 作为线粒体基因组最重要的转录激活因子^[15],在调控线粒体 DNA (mtDNA) 表达及线粒体基因组复制中也起到了重要作用^[16-17]。

瘦素 (leptin, LEP) 是一种蛋白质类激素,由脂肪组织分泌,参与调节糖、脂肪与能量代谢,减低食欲,抑制脂肪细胞合成,降低体重。目前 SMD 常见的临床治疗有经皮神经肌肉电刺激和高流量鼻导

管氧疗法等^[18-19],但除康复训练有一定的疗效外,尚无有效药物^[20]。

中医药治疗 COPD 效果显著,课题组前期研究成果表明,补肺健脾方能够确切地改善患者的临床症状,减缓肺功能下降的速率,减少急性加重的次数,并提高患者的生存质量^[21-22]。基础研究显示,补肺健脾方能够显著改善 COPD 大鼠的氧化应激^[23-24],但其具体机制尚不清楚。本研究通过观察骨骼肌线粒体生物合成及 IRS-1/PI3K 相关指标变化,探讨补肺健脾方的作用机制,为寻求有效的治疗方法提供思路。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 60 只,6~8 周龄,体重 (200±20) g,雌雄各半,购于济南朋悦实验动物繁育中心 [SCXK (鲁) 2019-0003]。在河南中医药大学第一附属医院中心实验室开展饲养工作 [SYXK (豫) 2022-0004]。适应环境 7 d,无菌饲料喂养,自由饮用无菌水,饲养环境安静;实验过程中遵循实验动物“3R”原则,本实验经河南中医药大学实验动物伦理委员会审查批准 (YFYDW2016027)。

1.1.2 细菌

肺炎克雷伯杆菌 (46114),由中国医学细菌保藏管理中心提供。使用之前将其浓度调整为 6×10^8 CFU/mL。

1.2 主要试剂与仪器

红旗渠牌过滤嘴香烟,硬金红,烤烟型,焦油量 10 mg,烟碱量 1 mg,烟气 CO 含量 12 mg,河南中烟工业有限责任公司生产。补肺健脾方 (黄芪、党参、白术、茯苓等) 浸膏,由河南中医药大学药学院药物分析实验室提供,1 g 含生药量 2.1 g;吡格列酮胰岛素增敏剂,每盒 20 mg,称取 2 g 吡格列酮粉置入 1000 mL 配制好的甲基纤维素钠 (CMC) 溶液中,于磁力搅拌器上搅拌,直至混匀,配成 2 mg/mL 吡格列酮溶液;氨茶碱片,每片 0.1 g,国药准字 H41020704,由海南制药厂有限公司制药一厂提供,使用前加蒸馏水将其配成 1.0 mg/mL 浓度的混悬液;生理盐水 (0.9% NaCl),每瓶 500 mL,由河南竹林众生制药股份有限公司提供。TRIzol Reagent (Invitrogen, 货号: 15596018); 逆转录试剂盒 (Invitrogen, 货号: 4368814); SybrGreen Mix kit

(Invitrogen, 货号: A25742); 无酶水 (Solarbio, 货号: R1600); PI3K p110 兔多克隆抗体 (Gene Tex, 货号: GTX111173); Leptin 兔单克隆抗体 (Gene Tex, 货号: GTX109204); TFAM 兔多克隆抗体 (Gene Tex, 货号: GTX112760); IRS1 兔多克隆抗体 (Gene Tex, 货号: GTX78916); PGC-1 α 兔多克隆抗体 (Gene Tex, 货号: GTX37356); AKT 兔多克隆抗体 (Gene Tex, 货号: GTX121937); AKT (phosphoSer473) 兔多克隆抗体 (Gene Tex, 货号: GTX128414); 高效 RIPA 裂解液 (Solarbio, 货号: R0010); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Solarbio, 货号: PC0020); SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (Solarbio, 货号: P120); 彩虹 245plus 广谱蛋白 Marker (Solarbio, 货号: PR1930); GAPDH 兔多克隆抗体 (货号: 10494-1-AP)、HRP 标记山羊抗兔二抗 (货号: SA00001-2) 均由武汉三鹰提供, 引物序列见表 1。IVC-II 动物饲养笼具 (冯氏实验动物设备有限公司, 江苏省苏州市); 全身体积描记系统 (Buxco, 美国); PM-10AD 光学显微镜及照相系统 (OLympus optical, 日本); 7500 型实时荧光定量 PCR 仪 (ABI, 美国); 核酸蛋白定量检测仪 (NanoVuePlus, 美国); ChemiDoc MP 全能成像系统 (BIO-RAD, 美国); 高速台式冷冻离心机 (Thermo, 美国); BS210 S 电子天平 (赛多利斯, 德国)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制备

大鼠购回后放于动物饲养笼具中适应环境 7 d。无菌饲料、无菌水喂养, 保持室内环境安静, 温度湿度适宜, 通风系统正常。参照课题组前期研究建立的 COPD 模型制备方法^[25], 采用香烟烟雾暴露联合细菌感染法制备 COPD 稳定期大鼠模型: 采用经鼻腔滴入的方法, 在大鼠吸气时, 将 0.1 mL 菌液经左右鼻孔交叉进行滴入, 菌液浓度 6 $\times 10^8$ CFU/mL, 每

5 d 滴 1 次, 持续 8 周。给予模型组和用药组大鼠烟熏, 点燃香烟并使烟熏箱烟雾浓度达到 (3000 $\pm$ 500) ppm, 每天 2 次, 每次 30 min, 两次烟熏间隔 $\geq$ 3 h, 持续 12 周。

1.3.2 分组

采用 Microsoft Excel 中“RAND()”函数, 将 SD 大鼠随机分为空白 (Control) 组、COPD 稳定期模型 (Model) 组、吡格列酮 (PIO) 组、补肺健脾方 (BJF) 组、补肺健脾方+吡格列酮 (BJF+PIO) 组以及氨茶碱 (aminophylline, Am) 组, 10 只/组。

1.3.3 给药

自第 9 周开始至第 20 周结束, BJF 组、BJF+PIO 组和 Am 组大鼠分别给予 BJF (12.42 g/(kg $\cdot$ d))、Am (0.027 g/(kg $\cdot$ d)) 灌胃, 每天灌胃 2 次, 间隔 $\geq$ 3 h。Control 组和 Model 组大鼠均给予生理盐水灌胃 (每只 2 mL)。至第 15 周, BJF+PIO 组和 PIO 组大鼠分别给予 PIO (0.01 g/(kg $\cdot$ d)) 腹腔注射, 每天 1 次, 共 6 周。补肺健脾方的临床人用计量为 1.97 g/kg, 大鼠药物剂量采用等效剂量换算公式计算。

1.3.4 指标检测

(1) 肺功能

分别于第 0、8、20 周结束时, 采用无束缚全身体积描记系统 (WBP) 测定大鼠肺功能, 包括潮气量 (VT)、呼气峰流速 (PEF) 和 50% 潮气量呼气流量 (EF50)。

(2) 肺病理

取出肺, 用 10 % 中性甲醛灌注左肺 20 min、固定 72 h, 梯度脱水后进行石蜡包埋, 调整厚度至 4 μ m 进行切片, 常规 HE 染色, 然后通过光学显微镜观察小气道和肺泡病理变化。

(3) 股四头肌病理

分离并取出股四头肌, 顺着肌肉纹理剥离位于左右两边大腿前侧的股四头肌组织, 分离干净后, 生理盐水冲洗; 将一块股四头肌固定在 10% 中性甲醛中, 后续进行石蜡包埋及病理检测; 另一块分装在冻存管中, 液氮条件下 -80 $^{\circ}$ C 冻存, 待后续蛋白与基因检测。

(4) RT-qPCR 检测股四头肌组织 IRS-1、Leptin、PGC-1 α 以及 PI3K mRNA 表达

用 TRIzol 法提取大鼠股四头肌组织中的总 RNA, 按照逆转录试剂盒的操作方法逆转录为 cDNA。配制 20 μ L qPCR 反应体系进行 PCR 反应,

表 1 引物序列		
Table 1 Primers sequence		
基因名称		序列 (5'-3')
Gene name		Sequence (5'-3')
PGC1- α	F	AACTCTCTGGAAGTGCAGGC
	R	GCTTTGGCGAAGCCTTGAAA
PI3K	F	ATCGACCTACACTTGGGGGA
	R	CAATATCTCTGCGCCGGGCT
Leptin	F	CAGCTTGCCCTCCCAAAACG
	R	TGTGGAGTAGAGCGAGGCTT
IRS1	F	TGACAGCTCCCAATGGTAC
	R	GGTAGCACCTGGGATGTAGC
GAPDH	F	CACCCGCGAGTACAACCTTC
	R	CACCCGCGAGTACAACCTTC

采用 GAPDH 作为内参,根据试剂盒说明书设定反应条件进行 PCR 扩增,数据导出进行定量分析,按照 mRNA 相对表达量 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算。

(5) Western blot 检测股四头肌组织 PGC-1 α 、TFAM、IRS-1、PI3K、AKT、p-AKT、Leptin 蛋白表达

取各组大鼠股四头肌组织,按照蛋白提取试剂盒提取股四头肌总蛋白,使用 BCA 法检测样本蛋白浓度。取 40 μ g 蛋白进行电泳、转膜,用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,加入 PGC-1 α 抗体 1:1000、TFAM 抗体 1:1000、IRS1 抗体 1:500、PI3K 抗体 1:500、AKT 抗体 1:2000、p-AKT 抗体 1:500 以及 Leptin 抗体 1:1000,4 $^{\circ}$ C 摇床上振摇过夜,1 $\times$ TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。再加入 1:1000 山羊抗兔 IgG-HRP,室温振摇反应 1 h,1 $\times$ TBST 漂洗 5 min,3 次。ECL 试剂显色、曝光,并用 Image J 软件分析。

1.4 统计学方法

采用 IBM SPSS 21.0 统计软件进行数据分析,对计量资料的组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。所有数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。方差齐者采用最小显著差法(LSD),方差不齐者采用 Dunnett's T3 法,显著性水准取 $\alpha = 0.05$ 。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

在动物饲养周期内,Control 组大鼠毛发光泽,饮食、饮水量正常,二便可,日常活动度无异常。Model 组大鼠自第 2 周开始,出现不同程度的躁动、

皮毛微黄、活动量减少等症状;造模第 4~8 周,Model 组大鼠毛发枯黄无光泽,精神欠佳,口鼻腔分泌物增加,部分大鼠出现大便溏薄,明显消瘦,肺部可闻及哮鸣音。在第 9 周给药治疗后,上述症状得以一定程度的缓解和改善。治疗组中以 BJF 组和 BJF+PIO 组改善显著。

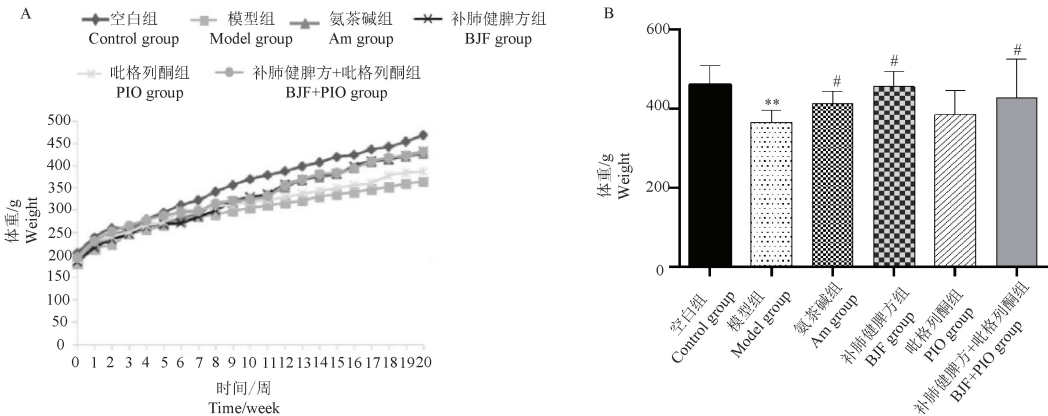
造模期间 Model 组大鼠共死亡 3 只,其中第 8 周死亡 2 只,于烟熏后出现窒息死亡,口鼻四肢呈发绀状;第 14 周死亡 1 只,四肢羸弱,呈恶病质状;解剖可见肺有瘀血斑,胸膜处出现严重粘连。第 9 周,Am 组大鼠死亡 1 只,因灌胃操作不当所致,解剖可见肺部斑块,散在小脓点。第 20 周取材时,PIO 组死亡 1 只,因腹腔注射麻醉剂过量所致。

2.2 体重变化

与 Control 组大鼠相比,Model 组大鼠体重虽总体呈现上升趋势,但增长较为缓慢;自第 7 周起,Model 组大鼠体重较 Control 组明显减轻($P<0.05$)。自第 12 周起,BJF、BJF+PIO 和 Am 组大鼠体重均较 Model 组显著增加($P<0.05$, $P<0.01$),其中以 BJF+PIO 组尤为显著($P<0.01$),自第 17 周起 PIO 组大鼠体重较 Model 组明显增加($P<0.05$)。见图 1。

2.3 肺功能变化

与 Control 组相比,第 8 周 Model 组的 VT 显著降低($P<0.01$),第 20 周,各用药组中以 BJF 组、BJF+PIO 组和 Am 组大鼠 VT 较 Model 组显著升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与 Control 组相比,第 8 周 Model 组的 PEF 显著降低($P<0.01$),第 20 周,各用药组中 BJF 组、BJF+PIO 组和 Am 组大鼠 PEF 较 Model 组



注:A:各组大鼠0~20周体重增长趋势;B:第20周各组大鼠体重水平。与空白组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。
图1 各组大鼠体重变化(g, $\bar{x}\pm s$)
Note. A, Body weight growth trend of rats in each group from 0~20 weeks. B, Body weight of rats in each group at week 20. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with Model group, # $P<0.05$.

Figure 1 Changes of body weight in each group

显著升高($P<0.01$),而 PIO 组与 Model 组无显著性差异($P>0.05$)。

与 Control 组比较,第 8 周 Model 组的 EF50 显著降低($P<0.01$),各个用药组与 Control 组之间无显著性差异($P>0.05$)。第 20 周,BJF 组、BJF+PIO 组和 Am 组大鼠 EF50 较 Model 组显著升高($P<0.05,P<0.01$),而 PIO 组与 Model 组无显著性差异($P>0.05$)。见表 2。

2.4 肺组织病理变化

于光镜下观察 Control 组大鼠肺泡结构完整,气道周围无炎性细胞浸润,无肺泡破裂融合,肺小气道结构正常。Model 组大鼠肺病理可见肺泡间质以及肺支气管存有大量的炎性细胞浸润,部分肺泡壁出现断裂并融合形成气腔、纤维网被破坏等。与 Model 组大鼠相比,各用药组药物治疗后均可不同

程度改善肺泡壁的断裂以及纤维网的破坏,减轻支气管中炎性细胞浸润,其中以 BJF 组与 Am 组改善尤为明显。见图 2。

2.5 股四头肌病理变化

光镜下观察 Control 组大鼠肌纤维之间排列整齐,纤维无萎缩与断裂,肌细胞胞质染色均一。Model 组大鼠股四头肌病理结果显示骨骼肌肌纤维之间的间隙明显增宽,纤维部分出现萎缩和断裂,肌细胞胞质染色不均等,用药治疗后各组均可不同程度改善上述病理变化,其中以 BJF 组较为显著。见图 3。

2.6 股四头肌组织中 IRS-1、Leptin、PGC-1α 和 PI3K mRNA 表达变化

结果见表 3 和图 4,与 Control 组比较,Model 组中 IRS-1、PGC-1α 和 PI3K mRNA 的表达水平显著

表 2 各组大鼠 VT、PEF 和 EF50 变化(mL, $\bar{x}\pm s,n=6$)
Table 2 VT, PEF and EF50 changes of rats in each group

指标		空白组	模型组	氨茶碱组	补肺健脾方组	吡格列酮组	补肺健脾方+ 吡格列酮组
Indicator		Control group	Model group	Am group	BJF group	PIO group	BJF+PIO group
VT	Week(0)	1.67±0.09	1.73±0.11	1.76±0.08	1.75±0.12	1.68±0.10	1.66±0.08
	Week(8)	1.77±0.10	1.68±0.09**	1.64±0.11	1.67±0.07	1.64±0.09	1.63±0.07
	Week(20)	1.82±0.06	1.54±0.10**	1.69±0.07 [#]	1.70±0.11 ^{##}	1.63±0.08 ^{ΔΔ}	1.66±0.06 ^{##}
PEF	Week(0)	16.22±0.77	15.98±0.69	16.18±1.02	16.11±0.92	16.36±1.22	15.88±0.60
	Week(8)	16.89±0.71	13.14±0.83**	13.43±0.92	13.26±0.97	13.63±1.07	13.12±0.88
	Week(20)	17.12±0.92	11.43±0.88**	14.23±0.56 ^{##}	13.34±0.76 ^{##}	14.30±0.91 ^Δ	14.22±0.93 ^{##}
EF50	Week(0)	1.46±0.16	1.38±0.07	1.39±0.08	1.34±0.82	1.37±0.11	1.33±0.11
	Week(8)	1.52±0.09	1.16±0.08**	1.21±0.10	1.18±0.08	1.14±0.07	1.11±0.05
	Week(20)	1.57±0.07	1.07±0.06**	1.35±0.06 ^{##}	1.31±0.10 ^{##}	1.16±0.05 ^Δ	1.32±0.10 ^{##}

注:与空白组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与补肺健脾方组相比,^Δ $P<0.05$,^{ΔΔ} $P<0.01$ 。
Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with Model group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$. Compared with BJF group, ^Δ $P<0.05$, ^{ΔΔ} $P<0.01$.

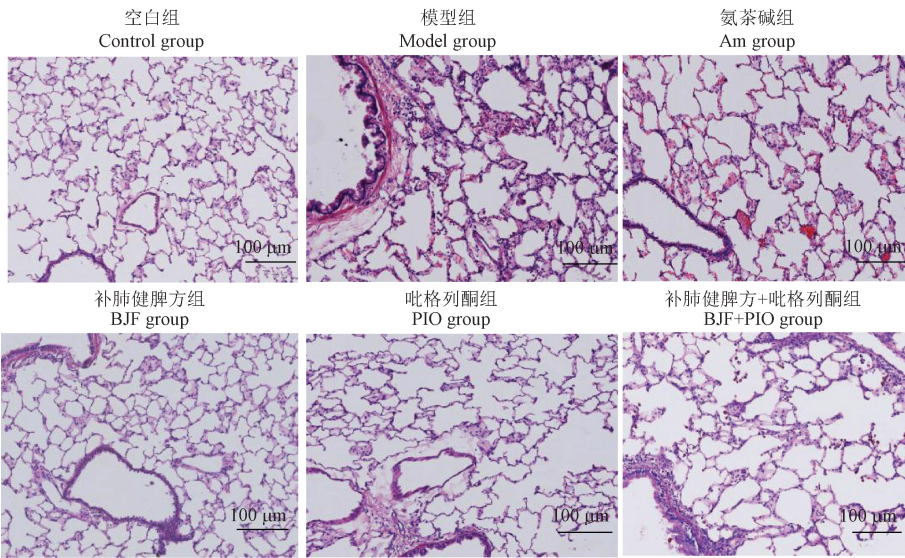


图 2 肺组织病理(HE)
Figure 2 Lung pathology (HE)

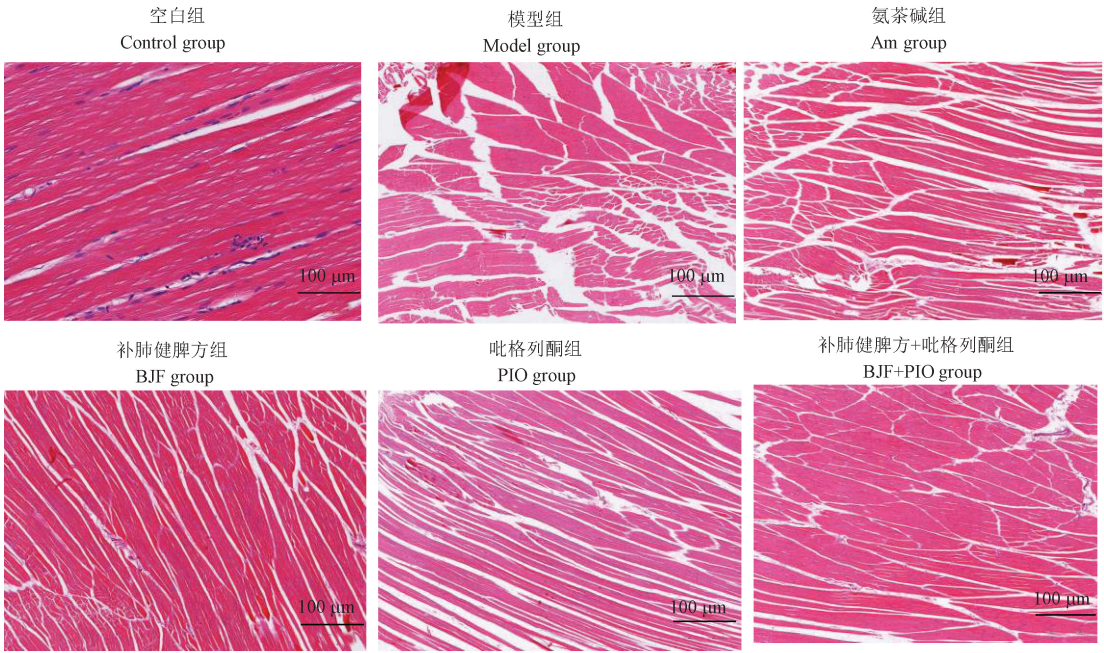


图 3 股四头肌组织病理(HE)
Figure 3 Quadriceps muscle pathology(HE)

表 3 IRS-1/PI3K 信号轴相关基因 mRNA 的表达变化($\bar{x}\pm s$) Table 3 Changes of mRNA expression of genes related to IRS-1/PI3K signaling axis				
组别 Groups	IRS1	Leptin	PGC-1 α	PI3K
空白组 Control group	1.00 $\pm$ 0.15	1.00 $\pm$ 0.14	1.00 $\pm$ 0.16	1.00 $\pm$ 0.16
模型组 Model group	0.29 $\pm$ 0.03 [*]	5.53 $\pm$ 0.40 ^{**}	0.38 $\pm$ 0.03 [*]	0.16 $\pm$ 0.04 ^{**}
氨茶碱组 Am group	0.36 $\pm$ 0.05	3.85 $\pm$ 0.50 ^{##}	0.46 $\pm$ 0.05	0.38 $\pm$ 0.05 ^{##}
补肺健脾方组 BJJF group	0.71 $\pm$ 0.04 ^{##□□}	1.64 $\pm$ 0.06 ^{##□□}	0.96 $\pm$ 0.08 ^{##□□}	0.90 $\pm$ 0.13 ^{##□□}
吡咯列酮组 PIO group	0.53 $\pm$ 0.05 ^{##□Δ}	3.09 $\pm$ 0.26 ^{##□□ΔΔ}	0.36 $\pm$ 0.03 ^{ΔΔ}	0.26 $\pm$ 0.04 ^{ΔΔ}
补肺健脾方+吡咯列酮组 BJJF+PIO group	0.91 $\pm$ 0.03 ^{##□□ΔΔ▲▲}	1.94 $\pm$ 0.14 ^{##□□▲▲}	0.73 $\pm$ 0.05 ^{##□□ΔΔ▲▲}	0.68 $\pm$ 0.07 ^{##□□ΔΔ▲▲}

注:与空白组相比, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$;与模型组相比, ^{##} $P<0.01$;与补肺健脾方组相比, ^Δ $P<0.05$, ^{ΔΔ} $P<0.01$;与吡咯列酮组相比, ^{▲▲} $P<0.01$;与氨茶碱组相比, [□] $P<0.05$, ^{□□} $P<0.01$ 。
Note. Compared with Control group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$. Compared with Model group, ^{##} $P<0.01$. Compared with BJJF group, ^Δ $P<0.05$, ^{ΔΔ} $P<0.01$. Compared with PIO group, ^{▲▲} $P<0.01$. Compared with Am group, [□] $P<0.05$, ^{□□} $P<0.01$.

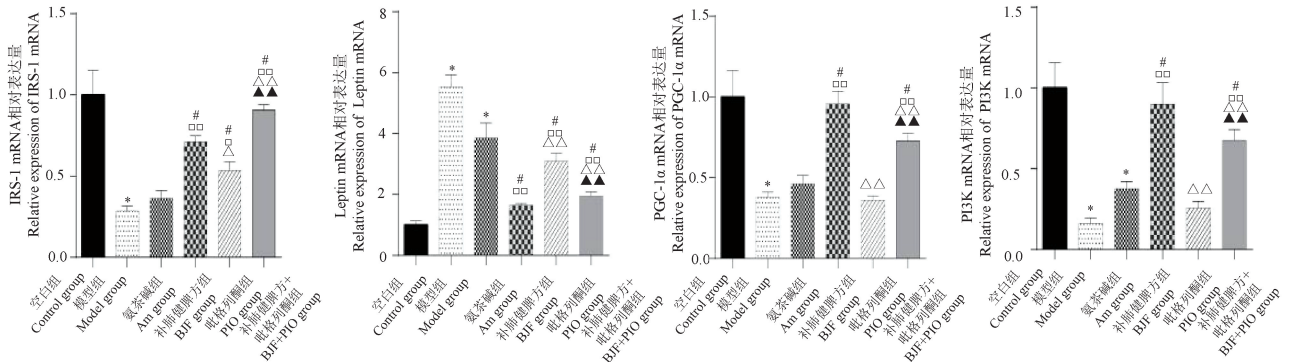


图 4 各组 COPD 大鼠股四头肌组织 IRS-1、Leptin、PGC-1 α 和 PI3K mRNA 的表达比较($\bar{x}\pm s$)
Note. Compared with Control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with Model group, [#] $P<0.05$. Compared with BJJF group, ^Δ $P<0.05$, ^{ΔΔ} $P<0.01$. Compared with PIO group, ^{▲▲} $P<0.01$. Compared with Am group, [□] $P<0.05$, ^{□□} $P<0.01$.
Figure 4 Comparison of IRS-1, Leptin, PGC-1 α and PI3K mRNA expression in quadriceps muscle of COPD rats in each group

降低($P<0.05$),Leptin mRNA 的表达水平显著增高($P<0.01$);与 Model 组比较,4 个用药组中 Leptin mRNA 的表达水平均显著降低($P<0.01$),BJF、PIO 和 BJF+PIO 组 IRS1 mRNA 的表达水平均显著增高($P<0.05$, $P<0.01$);BJF 和 BJF+PIO 组 PGC-1 α mRNA 的表达水平较 Model 组显著升高($P<0.01$);BJF、BJF+PIO 和 Am 组 PI3K mRNA 的表达水平较 Model 组显著增高($P<0.01$)。

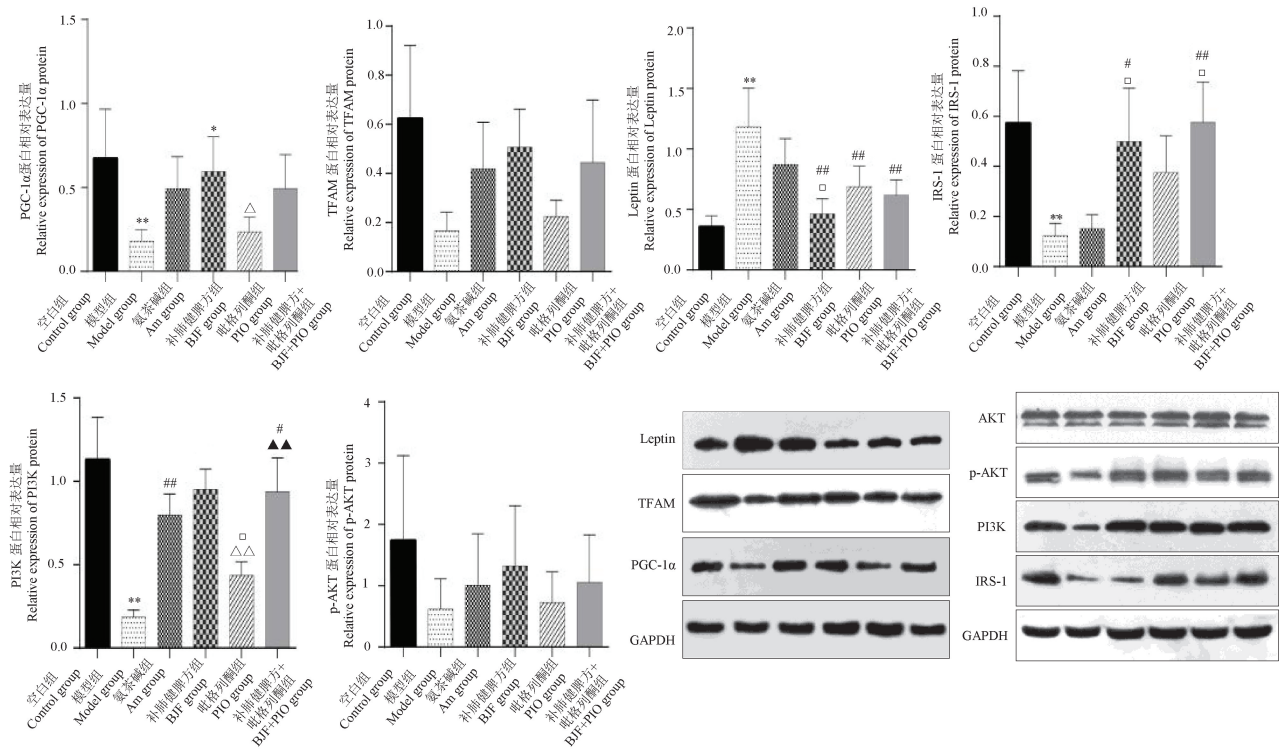
2.7 股四头肌组织中 PGC-1 α 、TFAM、IRS-1、PI3K、p-AKT 以及 Leptin 相关蛋白的表达变化

结果见表 4 和图 5,与 Control 组比较,Model 组股四头肌组织中 PGC-1 α 、IRS-1、PI3K 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$),Leptin 蛋白的表达水平显著增高($P<0.01$)。与 Model 组比较,BJF 组 PGC-1 α 蛋白的表达水平显著增高($P<0.05$),其他各治疗组 PGC-1 α 蛋白表达均有不同程度升高,但无显著性

表 4 大鼠股四头肌组织 PGC-1 α 、TFAM、Leptin、IRS-1、PI3K 和 p-AKT 的蛋白表达变化($\bar{x}\pm s$)
Table 4 Protein expression changes of PGC-1 α , TFAM,Leptin,IRS-1,PI3K and p-AKT in quadriceps muscle of rats

组别 Groups	PGC-1 α	TFAM	Leptin	IRS-1	PI3K	p-AKT
空白组 Control group	0.67 $\pm$ 0.29	0.62 $\pm$ 0.30	0.36 $\pm$ 0.09	0.57 $\pm$ 0.21	1.13 $\pm$ 0.25	1.75 $\pm$ 1.38
模型组 Model group	0.18 $\pm$ 0.07**	0.17 $\pm$ 0.08	1.18 $\pm$ 0.32**	0.12 $\pm$ 0.05**	0.19 $\pm$ 0.04**	0.62 $\pm$ 0.50
氨茶碱组 Am group	0.49 $\pm$ 0.19	0.42 $\pm$ 0.19	0.87 $\pm$ 0.21	0.15 $\pm$ 0.06	0.80 $\pm$ 0.13##	1.01 $\pm$ 0.84
补肺健脾方组 BJF group	0.60 $\pm$ 0.21 [#]	0.51 $\pm$ 0.15	0.46 $\pm$ 0.12##□	0.50 $\pm$ 0.21□	0.95 $\pm$ 0.12##	1.32 $\pm$ 0.98
吡格列酮组 PIO group	0.24 $\pm$ 0.09 Δ	0.22 $\pm$ 0.07	0.69 $\pm$ 0.17##	0.38 $\pm$ 0.15	0.44 $\pm$ 0.08□ $\Delta\Delta$	0.73 $\pm$ 0.50
补肺健脾方+吡格列酮组 BJF+PIO group	0.49 $\pm$ 0.20	0.44 $\pm$ 0.25	0.62 $\pm$ 0.13##	0.58 $\pm$ 0.16##□□	0.94 $\pm$ 0.20## $\blacktriangle\blacktriangle$	1.05 $\pm$ 0.78

注:与空白组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,[#] $P<0.05$,## $P<0.01$;与补肺健脾方组相比, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$;与吡格列酮组相比, $\blacktriangle\blacktriangle$ $P<0.01$;与氨茶碱组相比,□ $P<0.05$,□□ $P<0.01$ 。
Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with Model group, [#] $P<0.05$, ## $P<0.01$. Compared with BJF group, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$. Compared with PIO group, $\blacktriangle\blacktriangle$ $P<0.01$. Compared with Am group, □ $P<0.05$, □□ $P<0.01$.



注:与空白组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与空白组相比,[#] $P<0.05$,## $P<0.01$;与补肺健脾方组相比, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$;与吡格列酮组相比, $\blacktriangle\blacktriangle$ $P<0.01$;与氨茶碱组相比,□ $P<0.05$ 。

图 5 COPD 大鼠股四头肌组织 Leptin、TFAM、PGC-1 α 、p-AKT、PI3K 和 IRS-1 蛋白的表达比较($\bar{x}\pm s$)

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with Model group, [#] $P<0.05$, ## $P<0.01$. Compared with BJF group, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$. Compared with PIO group, $\blacktriangle\blacktriangle$ $P<0.01$. Compared with Am group, □ $P<0.05$.

Figure 5 Expression of Leptin, TFAM, PGC-1 α , p-AKT, PI3K and IRS-1 in the quadriceps muscle of COPD rats

差异($P>0.05$)。BJF+PIO 与 BJJ 组 IRS-1 蛋白表达水平较 Model 组显著增高($P<0.05$, $P<0.01$),其他各治疗组 IRS-1 蛋白表达水平有升高趋势,但无显著性差异($P>0.05$)。Am、BJJ 和 BJJ+PIO 组 PI3K 蛋白的表达水平较 Model 组显著增高($P<0.01$),且以 BJJ+PIO 组增高最为显著,PIO 组 PI3K 蛋白的表达水平有所升高,但无显著性差异($P>0.05$)。与 Control 组比较,Model 组股四头肌组织中 TFAM、p-AKT 蛋白表达有明显的下降趋势,各治疗组 TFAM、p-AKT 蛋白表达均有不同程度的升高趋势,但均无显著性差异($P>0.05$)。

3 讨论

全身性炎症、氧化应激和能量代谢紊乱被认为是导致 COPD 骨骼肌功能障碍的因素^[26],但确切的分子机制尚不清楚。线粒体损伤是 COPD 患者骨骼肌功能障碍的最重要机制之一,线粒体对机体氧化应激和能量代谢的调节发挥了关键作用,保护线粒体免受损伤对于改善 COPD 骨骼肌功能障碍至关重要。线粒体的生物发生属于动态调节,需要不断产生新的线粒体,以维持适当数量形态正常的活动细胞器,因此,刺激线粒体的生物发生可能会改善线粒体功能损伤^[27]。PGC-1 α 是一小类转录调节因子的成员,主要存在于骨骼肌,是线粒体生物合成的关键因子,控制参与着线粒体的生物发生、氧化应激、代谢调节以及基因的表达;研究表明它是通过与转录因子如核呼吸因子(NRF)相互作用来控制线粒体基因的表达水平并诱导线粒体生物发生^[28]。TFAM 是一种 DNA 结合刺激蛋白,调节线粒体 DNA 的转录和复制以维持 mtDNA 含量^[29]。当 PGC-1 α 与 NRF1 相互作用时,可激活下游 TFAM 的表达,当 TFAM 蛋白和 mRNA 平行增加 2 倍时,线粒体含量也会相应增加 2~3 倍^[30],从而刺激线粒体的生物发生^[31]。COPD 大鼠骨骼肌中 PGC-1 α 与 TFAM 基因表达明显降低,线粒体功能的改善可能与 PGC-1 α 和 TFAM 的大量表达且参与调节线粒体的转录机制相关^[32]。本研究结果表明,Model 组大鼠骨骼肌中 PGC-1 α 与 TFAM 基因和蛋白表达均较 Control 组显著降低,各治疗组均可以不同程度的增加 PGC-1 α 与 TFAM 基因和蛋白表达,提示补肺健脾方能够通过提高 PGC-1 α 与 TFAM 的表达,增强线粒体的生物合成,改善 COPD 骨骼肌线粒体损伤。

从 IRS-1/PI3K 通路干预骨骼肌的角度去探析

COPD 的发病机制,对临床探寻其防治靶点具有重要意义。当线粒体功能发生损伤时,脂肪酸会在细胞内大量堆积^[8],使得胰岛素受体底物(IRS)-1 丝/苏氨酸发生磷酸化,从而抑制 IRS-1 酪氨酸的磷酸化,不能激活 PI3K,下调 Glut4 的活性,导致机体代谢异常、体能活动不足,加重骨骼肌功能障碍^[12]。同时,Leptin 作为调节能量代谢的主要激素,在能量代谢方面发挥着重要的作用。研究发现 COPD 合并骨骼肌萎缩大鼠血清中 Leptin 水平较正常大鼠偏高且体重明显减轻^[33]。本研究结果显示 Model 组大鼠 IRS-1、PI3K、p-AKT 基因和蛋白表达水平较 Control 组大鼠显著降低,Leptin 基因和蛋白的表达水平较 Control 组大鼠显著增高;BJJ 组、BJJ+PIO 组和 PIO 组均可以不同程度的增加 IRS-1、PI3K、p-AKT 基因和蛋白的表达,4 个用药组均可降低 Leptin 基因和蛋白的表达;提示补肺健脾方可通过调控 IRS-1/PI3K 信号轴,改善骨骼肌线粒体的损伤,对 COPD 骨骼肌功能障碍发挥治疗作用。

COPD 合并骨骼肌功能障碍在中医属于“痿症”范畴,《素问·平人氣象论》中记载:“脏真濡于脾,脾藏肌肉之气也”“肺主气司呼吸”“脾主肌肉四肢”,若肺脾气虚则宗气不足、脾失健运,血液生化乏源,四肢肌肉失于濡养,肌肉萎缩甚至功能障碍。肺五行属金,脾属土,两者为母子关系,肺胀病久,子盗母气致肺脾两虚,肌肉失养,而致痿症^[34]。因此,培土生金、健脾益肺可作为 COPD 骨骼肌功能障碍的有效治疗方法。

导师李素云教授根据多年临床经验,以“补肺健脾,培土生金”为法,拟定了补肺健脾方(黄芪、党参、白术、茯苓、浙贝母等)治疗骨骼肌功能障碍患者。经多中心、随机对照临床试验表明,对于 COPD 稳定期患者,补肺健脾颗粒能够减轻患者气流受限、改善肺通气、增强肺功能,减少 AECOPD 的发生次数,提高患者生活质量等^[21]。开展相关动物实验结果也表明,补肺健脾方通过减轻骨骼肌的炎症反应,调节肌细胞能量代谢,提高骨骼肌线粒体密度等^[35-36]。

综上所述,补肺健脾方可通过调控 IRS-1/PI3K 信号轴,改善骨骼肌线粒体的损伤,同时提高线粒体辅激活因子 PGC-1 α 与线粒体转录因子 TFAM 的表达,增强线粒体的生物合成,从而减轻肺与骨骼肌组织的病理性损伤,但其确切机制仍需进一步展开探究。

参考文献:

- [1] Asia Pacific COPD Roundtable Group. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease; an Asia-Pacific perspective [J]. *Respirology*, 2005, 10 (1): 9–17.
- [2] ZHANG Q, LI W, AYIDAERHAN N, et al. IP₃ R attenuates oxidative stress and inflammation damage in smoking-induced COPD by promoting autophagy [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25 (13): 6174–6187.
- [3] CRUTHIRDS C L, VAN DER MEIJ B S, WIERZCHOWSKA-MCNEW A, et al. Presence or absence of skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease is associated with distinct phenotypes [J]. *Arch Bronconeumol*, 2021, 57 (4): 264–272.
- [4] KOHLBRENNER D, SIEVI N A, ROEDER M, et al. Handgrip strength seems not to be affected by COPD disease progression: a longitudinal cohort study [J]. *COPD*, 2020, 17(2): 150–155.
- [5] JAITOVICH A, BARREIRO E. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: what we know and can do for our patients [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018, 198 (6): 824–825.
- [6] MARKLUND S, BUI K L, NYBERG A. Measuring and monitoring skeletal muscle function in COPD: current perspectives [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2019, 14: 1825–1838.
- [7] PIEGUEZUELOS E, ESQUINAS C, MORENO E, et al. Muscular dysfunction in COPD: systemic effect or deconditioning? [J]. *Lung*, 2016, 194(2): 249–257.
- [8] BARREIRO E, GEA J. Molecular and biological pathways of skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Chron Respir Dis*, 2016, 13(3): 297–311.
- [9] DE BRANDT J, SPRUIT M A, DERAWE W, et al. Changes in structural and metabolic muscle characteristics following exercise-based interventions in patients with COPD: a systematic review [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2016, 10(5): 521–545.
- [10] BUTTERFIELD D A, HALLIWELL B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2019, 20(3): 148–160.
- [11] AREA-GOMEZ E, DE GROOF A, BONILLA E, et al. A key role for MAM in mediating mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 335.
- [12] AFFOURTIT C. Mitochondrial involvement in skeletal muscle insulin resistance: a case of imbalanced bioenergetics [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1857(10): 1678–1693.
- [13] YANG S, LIAN G. ROS and diseases: role in metabolism and energy supply [J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 467: 1–12.
- [14] PAGEL-LANGENICKEL I, BAO J, JOSEPH J J, et al. PGC-1 α integrates insulin signaling, mitochondrial regulation, and bioenergetic function in skeletal muscle [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(33): 22464–22472.
- [15] NASSIR F, IBDAH J A. Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(5): 8713–8742.
- [16] CAMPBELL C T, KOLESAR J E, KAUFMAN B A. Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1819(9/10): 921–929.
- [17] GOLDENTHAL M J. Mitochondrial involvement in myocyte death and heart failure [J]. *Heart Fail Rev*, 2016, 21(2): 137–155.
- [18] JAITOVICH A, BARREIRO E. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. what we know and can do for our patients [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018, 198 (2): 175–186.
- [19] 王亚南, 郑莉, 耿婉如, 等. 经鼻高流量氧疗与常规氧气疗法对急性左心衰竭患者心脏功能作用研究 [J]. *内蒙古民族大学学报(自然科学版)*, 2019, 34(6): 532–534.
WANG Y N, ZHENG L, GENG W R, et al. Study on the effects of high flow nasal *Cannula* oxygen therapy and conventional oxygen therapy on heart function in patients with acute left heart failure [J]. *J Inn Mong Univ Natl Nat Sci*, 2019, 34(6): 532–534.
- [20] LATIMER L E, CONSTANTIN D, GREENING N J, et al. Impact of transcutaneous neuromuscular electrical stimulation or resistance exercise on skeletal muscle mRNA expression in COPD [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2019, 14: 1355–1364.
- [21] LI S Y, LI J S, WANG M H, et al. Effects of comprehensive therapy based on traditional Chinese medicine patterns in stable chronic obstructive pulmonary disease: a four-center, open-label, randomized, controlled study [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2012, 12: 197.
- [22] YU X Q, WANG M H, LI J S, et al. Effect of comprehensive therapy based on Chinese medicine patterns on self-efficacy and effectiveness satisfaction in chronic obstructive pulmonary disease patients [J]. *Chin J Integr Med*, 2019, 25(10): 736–742.
- [23] 张蓝熙, 田燕歌, 朱丽华, 等. 补肺益肾方通过调控 Nrf2 通路抗氧化应激治疗慢性阻塞性肺疾病机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(5): 2374–2379.
ZHANG L X, TIAN Y G, ZHU L H, et al. Mechanism of Bufeiyishen Formula antioxidant stress in rats with chronic obstructive pulmonary disease via Nrf2 signaling pathway [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2020, 35(5): 2374–2379.
- [24] 田燕歌, 李亚, 李建生, 等. 调补肺肾三法对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺组织氧化应激的影响和远后效应 [J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(2): 621–624.
TIAN Y G, LI Y, LI J S, et al. Influence and long-term effect of tiaobu Feishen therapies on oxidative stress in lungs of rats with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2014, 29(2): 621–624.
- [25] LI Y, LI S Y, LI J S, et al. A rat model for stable chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke

- inhalation and repetitive bacterial infection [J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(10): 1752-1760.
- [26] GOUZI F, ABDELLAOUI A, MOLINARI N, et al. Fiber atrophy, oxidative stress, and oxidative fiber reduction are the attributes of different phenotypes in chronic obstructive pulmonary disease patients [J]. J Appl Physiol, 2013, 115(12): 1796-1805.
- [27] WHITAKER R M, CORUM D, BEESON C C, et al. Mitochondrial biogenesis as a pharmacological target: a new approach to acute and chronic diseases [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2016, 56: 229-249.
- [28] VILLENA J A. New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond [J]. FEBS J, 2015, 282(4): 647-672.
- [29] YUN C W, HAN Y S, LEE S H. PGC-1 α controls mitochondrial biogenesis in drug-resistant colorectal cancer cells by regulating endoplasmic reticulum stress [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20: 1707-1720.
- [30] COLLU-MARCHESE M, SHUEN M, PAULY M, et al. The regulation of mitochondrial transcription factor A (Tfam) expression during skeletal muscle cell differentiation [J]. Biosci Rep, 2015, 35(3): e00221.
- [31] HALLING J F, JESSEN H, NØHR-MELDGAARD J, et al. PGC-1 α regulates mitochondrial properties beyond biogenesis with aging and exercise training [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2019, 317(3): E513-E525.
- [32] LU J J, WANG Q, XIE L H, et al. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis regulates quadriceps muscle atrophy and fiber-type alteration in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Tob Induc Dis, 2017, 15: 43.
- [33] 李亚, 李素云, 毛静, 等. 补肺健脾方调控 NF- κ B 信号通路对 COPD 大鼠骨骼肌瘦素的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(8): 3663-3666.
LI Y, LI S Y, MAO J, et al. Effects of Bufeijianpi Formula on skeletal muscular leptin via NF- κ B signaling in rats with COPD [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 32(8): 3663-3666.
- [34] 林文波. 补脾肺汤方在慢性阻塞性肺疾病稳定期的应用效果观察 [J]. 中国中医药科技, 2020, 27(2): 250-252.
LIN W B. Observation on the application effect of Bupifei Decoction in the stable stage of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Chin J Tradit Med Sci Technol, 2020, 27(2): 250-252.
- [35] DONG Y, LI Y, SUN Y, et al. Bufeijianpi Granules improve skeletal muscle and mitochondrial dysfunction in rats with chronic obstructive pulmonary disease [J]. BMC Complement Altern Med, 2015, 15: 51.
- [36] LI Y, MAO J, TIAN Y, et al. Bufeijianpi granules down-regulated pNF- κ B, p53, JHIF-1 α and Bax in muscle tissues: muscular protection in chronic obstructive pulmonary disease rats [C]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine; 2015.

[收稿日期]2023-05-05