中国比较医学杂志
Chinese Journal of Comparative Medicine
ISSN 1671-7856,CN 11-4822/R

《中国比较医学杂志》网络首发论文

题目：　健脾化浊方调控 PINK1/Parkin 通路激活代谢相关脂肪性肝病细胞线粒体自噬
作者：　杨炯，钟洁月，杨秋燕，梁容，童汪霞
网络首发日期：　2026-08-24
引用格式：　杨炯，钟洁月，杨秋燕，梁容，童汪霞．健脾化浊方调控 PINK1/Parkin 通路激活代谢相关脂肪性肝病细胞线粒体自噬[J/OL]．中国比较医学杂志．https://link.cnki.net/urlid/11.4822.R.20260824.1637.012

网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

健脾化浊方调控 PINK1/Parkin 通路激活代谢相关脂肪性肝病细胞线粒体自噬

杨 炯[1]，钟洁月[1]，杨秋燕[1]，梁 容[1]，童汪霞[2]✉

（1.广西中医药大学 研究生院，南宁 530001；2.广西中医药大学附属瑞康医院 肝病内科，南宁 530004）
*通信作者 童汪霞（1979—），女，博士，主任医师，教授，硕士生导师，研究方向：肝病的分子机制与临床治疗。E-mail:twx_01@126.com

摘要 目的 在细胞水平上探讨健脾化浊方是否通过调控线粒体自噬改善混合脂肪酸（棕榈酸钠+油酸钠）诱导的人肝癌细胞株(HepG2)细胞脂肪变性模型的脂质蓄积，并阐明其相关分子机制。方法 采用混合脂肪酸（800: 1 600 μmol/L）诱导 HepG2 细胞建立脂肪变性模型，设空白对照、模型、健脾化浊方低、中、高浓度含药血清及阿托伐他汀组干预。通过 CCK-8 法检测细胞活力；油红 O 与尼罗红染色及甘油三酯（TG）含量测定评估脂质蓄积；高通量测序与生物信息学分析差异基因及富集通路；蛋白免疫印迹法检测 PTEN 诱导假定激酶 1（PINK1）、E3 泛素连接酶 Parkin 蛋白（Parkin）、LC3-II/I及 p62 蛋白表达；JC-1 荧光探针检测线粒体膜电位；Ad-mCherry-GFP-LC3B 腺病毒示踪观察自噬体形成；透射电镜观察超微结构。结果 与细胞模型组相比，健脾化浊方中、高浓度组能显著提升细胞活力（$P<0.05$，$P<0.01$），降低细胞内 TG 含量（$P<0.01$，$P<0.001$）及脂滴蓄积。高通量测序筛选出 1 402 个差异表达基因，京都基因与基因组百科全书（KEGG）富集分析显示其显著富集于“线粒体自噬”通路，且关键基因 PINK1 表达显著上调。机制研究表明，在混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞中，健脾化浊方可浓度依赖性地上调 PINK1、Parkin 蛋白表达及 LC3-II/I比值（$P<0.05$，$P<0.01$，$P<0.001$），下调 p62 表达（$P<0.05$，$P<0.01$，$P<0.001$），降低异常升高的线粒体膜电位（$P<0.05$，$P<0.01$），并增加自噬体数量（$P<0.000\ 1$）。透射电镜下在健脾化浊方高浓度组观察到典型双层膜线粒体自噬小体。结论 在细胞水平上，健脾化浊方含药血清可浓度依赖性地改善混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞脂肪变性（表现为脂滴蓄积减少及 TG 含量下降），其作用机制与上调 PINK1、Parkin 蛋白表达、恢复线粒体膜电位、促进自噬体形成及诱导典型线粒体自噬小体形成密切相关。本研究为健脾化浊方治疗代谢相关脂肪性肝病（MASLD）提供了基于 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬机制的细胞学实验依据。

关键词 健脾化浊方；代谢相关脂肪性肝病；线粒体自噬；PINK1/Parkin 通路；脂质代谢
中图分类号 R575.5;R-332; R285.5 文献标志码 A

Jianpi Huazhuo formula regulates the PINK1/Parkin pathway to activate mitophagy in metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease cells

YANG Jiong[1] , ZHONG Jieyue[1] , YANG Qiuyan[1] , LIANG Rong[1] , TONG Wangxia[2] ✉

(1. Graduate School of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China；2. Department of Liver Diseases, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530004)

Abstract Objective To investigate, at the cellular level, whether the Jianpi Huazhuo formula ameliorates lipid accumulation in a steatosis model of human hepatoma G2 (HepG2) cells induced by mixed fatty acids (sodium palmitate and sodium oleate) through the regulation of mitophagy, and to elucidate the underlying molecular mechanisms. Methods A steatosis model was established by treating HepG2 cells with a mixture of sodium palmitate (800 μmol/L) and sodium oleate (1 600 μmol/L). Cells were subsequently allocated into six groups: blank control, model, Jianpi Huazhuo formula-containing serum (low, medium, and high concentrations), and atorvastatin groups. Cell viability was determined using the CCK-8 assay.

基金项目：国家自然科学基金(82060843，82260860)；广西青年科学基金(2018GXNSFBA281189)；2025 年校级硕士研究生科研创新项目(YCSY2025062)。
作者简介：杨炯（1997—），男，在读硕士研究生，研究方向：中西医结合治疗非酒精性脂肪肝。E-mail:19106049648@163.com
网络首发时间：2026-08-24 17:51:13 网络首发地址：https://link.cnki.net/urlid/11.4822.R.20260824.1637.012

Lipid accumulation was evaluated using Oil Red O and Nile Red staining, coupled with quantification of triglyceride (TG) content. High-throughput sequencing followed by bioinformatics analysis was performed to identify differentially expressed genes and enriched signaling pathways. Protein levels of PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1), E3 ubiquitin-protein ligase Parkin (Parkin), microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)-II/I, and p62 were assessed by Western blotting. Mitochondrial membrane potential was monitored using the JC-1 fluorescent probe. Furthermore, autophagosome formation was visualized by Ad-mCherry-GFP-LC3B adenoviral tracing, and ultrastructural alterations were examined by transmission electron microscopy. Results Compared with the cell model group, the medium- and high-concentration Jianpi Huazhuo formula groups significantly increased cell viability (P<0.05, P<0.01) and decreased intracellular TG levels (P<0.01, P<0.001) and lipid droplet accumulation. High-throughput sequencing identified 1 402 differentially expressed genes. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis revealed significant enrichment in the "mitophagy" pathway, with marked upregulation of the key gene PINK1. Mechanistic studies demonstrated that Jianpi Huazhuo formula concentration-dependently upregulated the protein expression of PINK1 and Parkin, as well as the LC3-II/I ratio, in HepG2 cells exposed to mixed fatty acids. (P<0.05, P<0.01, P<0.001), decreased p62 expression (P<0.05, P<0.01, P<0.001), reduced abnormally high mitochondrial membrane potential (P<0.05, P<0.01), and increased the number of autophagosomes (P<0.000 1). Typical double-membrane mitophagosomes were observed in the high-concentration Jianpi Huazhuo formula group under transmission electron microscopy. Conclusions At the cellular level, Jianpi Huazhuo formula-containing serum concentration-dependently ameliorated mixed fatty acid-induced steatosis in HepG2 cells, as manifested by reduced lipid droplet accumulation and decreased triglyceride (TG) content. These effects were closely associated with upregulated expression of PINK1 and Parkin, restored mitochondrial membrane potential, promoted autophagosome formation, and induced generation of typical mitophagosomes. The present study provides cellular experimental evidence supporting the therapeutic potential of Jianpi Huazhuo formula against metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) via the PINK1/Parkin-mediated mitophagy pathway.

Key words Jianpi Huazhuo formula; metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease; mitophagy; PINK1/Parkin pathway; lipid metabolism

代谢相关脂肪性肝病（metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, MASLD），是一种与代谢综合征密切相关的慢性肝脏疾病[1]。该疾病可从单纯的脂肪变性发展到代谢相关脂肪性肝炎（metabolic dysfunction-associated steatohepatitis, MASH）合并纤维化、肝硬化，部分患者最终可发展到肝细胞癌。研究表明，MASLD 与心脑血管疾病、II型糖尿病、睡眠呼吸暂停、慢性肾脏病（chronic kidney disease, CKD）等慢性疾病的高发密切相关[2-4]。由于 MASLD 的发病机制复杂和对其分子机制的了解甚少，目前 MASLD 的发病机制仍不完全清楚。现有的治疗策略主要集中在饮食干预和生活方式的改变[5-7]。但这些方法存在患者依从性较低，个体代谢差异显著，难以有效阻断疾病进展至 MASH 或肝纤维化阶段的不足[8, 9]。药物治疗主要针对代谢紊乱和氧化应激，包括过氧化物酶体增殖物激活受体激动剂、胰高血糖素样肽-1 受体激动剂以及法尼醇 X 受体激动剂。在临床应用中能够改善胰岛素抵抗和肝脏脂肪变性[10-12]，但存在停药后易反弹、价格昂贵等问题。因此，深入探讨 MASLD 的发病机制并发掘更有效的治疗药物，已成为该领域的研究重点。

MASLD 的核心发病机制源于长期能量摄入超过消耗，导致脂代谢异常。当前“多重打击”学说认为，能量过剩构成 MASLD 的“第一次打击”，而其诱发的线粒体功能障碍被视为推动疾病向 MASH 进展的“第二次打击”[13]，这被视为推动 MASLD 向 MASH 进展的核心枢纽[14]。功能障碍的线粒体产生过量活性氧（reactive oxygen species, ROS），引发氧化应激，促进炎症因子释放和肝星状细胞活化，驱动肝脏炎症与纤维化进程[15, 16]。在线粒体功能障碍的修复中线粒体自噬尤为关键，其功能紊乱被认为是 MASLD 的重要病理生理基础[1, 17]。线粒体自噬是清除缺陷或冗余线粒体并维持线粒体稳态的重要细胞途径，在调节线粒体形态、网络完整性及 ROS 水平等方面发挥关键作用[18-20]。近年来，研发针对线粒体自噬的药物已成为 MASLD 治疗领域的新策略，其手段主要集中于小分子化合物与肽类药物。如线粒体自噬激活剂尿石素 A 和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸前体（如烟酰胺单核苷酸）等可通过诱导线粒体自噬或改善能量代谢，在临床前模型中显示出治疗潜力[21, 22]。然而，这些药物在向临床应用转化时不仅存在转化进程缓慢，同时也存在“单一靶点”难以应对 MASLD 复杂的代谢-炎症网络的不足[23, 24]。相比之下，中药成分因其多靶点、低毒性的特点，在 MASLD 治疗中显示出独特潜力，如理脾降浊方[25]、理中汤[26]等。

健脾化浊方是第三批全国名老中医周培郁教授治疗 MASLD 的经验方，该方具有疏肝解郁、健脾

益气、祛湿化浊的功效，在临床治疗 MASLD 中具有显著的疗效。我们前期研究发现该方可显著改善 MASLD 大鼠肝组织脂肪变性，且高通量测序分析结果提示其作用与“线粒体自噬”激活相关。基于此，本研究拟探讨健脾化浊方是否通过线粒体自噬调控线粒体功能，从而发挥其治疗 MASLD 的作用。旨在为阐明该方药效机制及开发新型 MASLD 治疗策略提供实验依据。

1.材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

本研究选用 30 只 SPF 级雄性 SD 大鼠，8 周龄，体质量（200±5）g，购自浙江大学动物实验中心[SCXK（湘）2024-0021]。在广西中医药大学动物实验中心饲养[SYXK 桂 2024-0004]，室温 22~23 ℃，相对湿度 50%～60%，12 h 光照/12 h 黑暗循环，自由摄食，自由饮用灭菌水。本研究中对实验动物的操作均经广西中医药大学伦理审查委员会批准（DW20230830-184）。在实验操作过程中，遵循 3R 原则，给与动物人道关怀，尽可能减轻动物的痛苦。

1.1.2 细胞

人肝癌细胞株(human hepatoma G2 cell line, HepG2)购自武汉普诺赛生命科技有限公司 (批号：CL-0103)。

1.2 主要试剂与仪器

健脾化浊方（柴胡 12 g（批号：20230124）、白芍 15 g（批号：20230617）、枳壳 15 g（批号：20231120）、黄芪 25 g（批号：20230530）、白术 20 g（批号：20230621）、茯苓 20 g（批号：20230521）、陈皮 10 g（批号：20230506）、荷叶 15 g（批号：20230913）、泽泻 15 g（批号：20230511）、姜厚朴 15 g（批号：20230220）、山楂 20 g（批号：230601）、党参 15 g（批号：20230326）、薏苡仁 30 g（批号：20230401）、法半夏 15 g（批号：230501）、甘草 6 g（批号：20230126）、桂枝 10 g（批号：20230515）、绞股蓝 20 g（批号：2305003）），由广西中医药大学附属瑞康医院中药房提供及制备，常规煎煮药物后制成水煎剂（生药含量 2.78 g/mL），4 ℃冷藏贮存。阿托伐他汀钙片（济南齐鲁制药有限公司，规格：每片 10 mg，批号：KC1H5114）。胎牛血清（fetal bovine serum, FBS，美国 Gibco 公司，批号：A5669701）；DMEM 培养基、1×PBS（武汉普诺赛生命科技有限公司，批号：WHB824F091，WHB824A031）；青链霉素混合液、胰蛋白酶 、CCK-8 试剂、尼罗红脂质荧光染色试剂盒、油红 O 染色试剂盒、RIPA 蛋白裂解液（北京索莱宝科技有限公司，批号：240009025，240011033，240005003，240010006，240011014，230003001）；棕榈酸钠-油酸钠（西安鲲创科技发展有限公司，批号：KC006）；甘油三酯（triglyceride, TG）含量测定试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司，批号：E1013）；二喹啉甲酸（bicinchoninic acid, BCA）蛋白定量试剂盒（上海碧云天生物技术股份有限公司，批号：022124240719）；Mito-Tracker Deep Red FM（线粒体深红荧光探针）、Ad-mCherry-GFP-LC3B（表达 mCherry-GFP-LC3B 融合蛋白的腺病毒）、JC-1 线粒体膜电位测定试剂盒（上海碧云天生物技术股份有限公司，批号：C1032-50μg，C3011-1mL，C2003S）；共聚焦培养皿（合肥白鲨生物科技有限公司，货号：BS-20-GJM）；PVDF 膜（上海碧云天生物技术股份有限公司，批号：112223240117）；PTEN 诱导假定激酶 1（PTEN-induced putative kinase 1, PINK1）抗体、E3 泛素连接酶 Parkin 蛋白（E3 ubiquitin-protein ligase parkin, Parkin）抗体、p62 抗体（武汉三鹰生物技术有限公司，批号：23289-1-AP，14035-1-AP，18227-1-AP）；微管相关蛋白 1 轻链 3（microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3）抗体、兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH）多克隆抗体（美国 ABclonal 公司，批号：4120000816，30202ES40）；HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗（武汉赛维尔生物科技有限公司，批号：G3378）。

恒温培养箱（太仓艺斯高医疗器械科技有限公司，型号：CLM-1708-8-NF）；显微镜（上海赛默飞世尔科技（中国）有限公司，型号：AMEX1000）；多功能微孔板检测仪（瑞士 Tecan 公司，型

号：Infinite 200 PRO）；共聚焦显微镜（日本奥林巴斯株式会社，型号：FV3000）；透射电子显微镜（日本电子株式会社，型号：JEM 1400）；高通量测序仪（武汉华大智造科技有限公司，型号：DNBSEQ-T7）；高速离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司，型号：TD5A-WS）；恒温水浴锅（常州国华科技发展有限公司，型号：HH-6）；MiniProGel™ 蛋白制胶、电泳与转膜系统（上海碧云天生物技术股份有限公司，型号：E6159）；化学发光成像系统（上海勤翔科学仪器有限公司，型号：ChemiScope 6100）。

1.3 实验方法

1.3.1 含药血清的制备

30 只 SD 大鼠随机分为空白血清组、健脾化浊方含药血清组与阿托伐他汀含药血清组，每组 10 只。给药剂量参照《药理实验方法学》[27]中人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值法进行换算。健脾化浊方临床成人日剂量为 3.97 g/kg，换算为大鼠等效剂量 25.02 g/kg；阿托伐他汀按临床成人（70 kg）日剂量 10 mg，按体表面积折算为大鼠剂量 0.9 mg/kg。空白血清组予等体积 0.9%氯化钠溶液。各组均每天早晚两次灌胃，连续 4 周。末次给药后，经腹主动脉采血 5~8 mL。血液室温静置 90 min 后，以 3 000 r/min 离心 15 min，分离血清（空白血清组血清即为空白血清，健脾化浊方组与阿托伐他汀组血清即为相应含药血清）。血清经 56 ℃、30 min 灭活并过滤除菌后，分装保存于-80 ℃备用。

1.3.2 细胞培养及分组

HepG2 细胞于含 10%FBS 及 1%青霉素-链霉素的 DMEM 培养基中，在 37 ℃、5% CO_2条件下培养。待细胞融合度达约 90%时，使用 0.25%胰蛋白酶消化并进行传代。实验设置以下 6 组：空白对照组（含 10%空白血清，来自动物实验空白血清组）、细胞模型组（混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞脂肪变性)、健脾化浊方低浓度（L-JPHZF，终浓度 50%）组、健脾化浊方中浓度（M-JPHZF，终浓度 100%）组、健脾化浊方高浓度（H-JPHZF，终浓度 200%）组以及阿托伐他汀阳性药物(ALE)组。除空白对照组外，其余各组细胞均采用 800 μmol/L 棕榈酸钠与 1 600 μmol/L 油酸钠的混合脂肪酸处理 24 h，以诱导肝细胞脂肪变性模型。建模结束后，细胞模型组与空白对照组用含 10%空白血清的培养基培养，各给药组用含相应浓度含药血清的培养基培养。

1.3.3 高通量测序与差异表达基因分析

采用含药血清对经混合脂肪酸处理的 HepG2 细胞进行干预，并通过高通量测序技术分析干预后基因转录组的变化。每组设置 3 个样本，利用华大 DNBSEQ-T7 平台对健脾化浊方高浓度干预组与细胞模型组共 6 个样本进行测序，获取基因及其表达量数据。基于 R 语言 Limma 包筛选差异表达基因，筛选阈值为$|\log_2 FC|>0.75$ 且 FDR<0.05。

1.3.4 差异基因功能富集分析

将前述通过高通量测序及差异分析所筛选出的健脾化浊方干预组与细胞模型组中的差异表达基因数据用于后续的疾病本体（disease ontology, DO）、生物过程（biological process, BP）及京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG）富集分析环节。获得基因被上传到开放的生物信息学平台 WebGestalt（www.WebGestalt.org）进行分析。

1.3.5 细胞活力检测

将对数生长期 HepG2 细胞以 1×10^4/孔的密度接种于 96 孔板。实验设置正常培养基对照组、溶剂对照组及 5 个浓度的混合脂肪酸（摩尔比 1:2）模型组，其浓度分别为 100: 200、200:400、400:800、800:1 600、1 600:3 200 μmol/L。正常培养基对照组仅加入等量完全培养基；溶剂对照组加入与混合脂肪酸模型组等体积溶剂的完全培养基，以排除溶剂本身对细胞活力的干扰；5 个浓度混合脂肪酸模型组分别加入含对应浓度混合脂肪酸的完全培养基。细胞于标准条件下培养 24 h 后，更换相应培养液，并继续分别处理 24 h 与 48 h。采用 CCK-8 法检测细胞活力：每孔加入 10 μL CCK-8 工作液，37 ℃孵育 40 min 后，使用酶标仪于 450 nm 波长下测定各孔吸光度（absorbance, A）。细胞存活率按以下公式计算：存活率=[(A 实验组-A 空白孔)/(A 对照组-A 空白孔)]×100%。

1.3.6 **油红 O 染色**

将对数生长期 HepG2 细胞接种于 24 孔板，分组及处理同“1.3.5”。处理结束后，弃去培养液，用 PBS 洗涤细胞 2 次。加入油红 O 固定液固定 30 min，蒸馏水漂洗 2 次。继而以 60%异丙醇浸洗 20 s，加入油红 O 染色液染色 30 min。染色后，用 60%异丙醇快速漂洗 10 s，待背景清晰后，以蒸馏水洗涤 3 次。随后，使用苏木素染色液对细胞核复染 1 min，水洗 2 次。加入油红 O 缓冲液反蓝 1 min，弃去缓冲液。最后，加入适量蒸馏水覆盖样本，于显微镜下观察并采集图像。

1.3.7 **尼罗红脂质荧光染色**

取对数生长期的 HepG2 细胞接种于共聚焦小皿中，按“1.3.2”分组及处理。处理结束后以 PBS 清洗 2 次，加入固定液固定 15 min；弃去固定液，以 PBS 清洗 1 次，加入尼罗红染色工作液，室温避光孵育 10 min；弃去染色液用 PBS 摇晃清洗细胞表面 30 s，重复 2 次，最后 1 次保留 PBS，避光条件下于 30 min 内使用共聚焦显微镜观察并采集图像。

1.3.8 TG **含量测定**

取对数生长期的 HepG2 细胞接种于 6 孔板中，分组及处理方法同“1.3.7”，每孔加 150 μL 裂解液，裂解 10 min 收集细胞裂解物后，分别依照 TG 试剂盒和 BCA 蛋白定量试剂盒说明书操作，测定各组 TG 及蛋白含量。

1.3.9 Ad-mCherry-GFP-LC3B **腺病毒感染法检测线粒体自噬**

将对数生长期 HepG2 细胞接种于共聚焦培养皿，培养 24 h 后，按感染复数（multiplicity of infection, MOI）=20 加入 Ad-mCherry-GFP-LC3B 腺病毒液，继续培养 24 h。弃去病毒液后，按“1.3.7”方法进行分组与处理。处理结束后，使用 Mito-Tracker Deep Red FM 对线粒体进行染色。

1.3.10 **线粒体膜电位测定**

将对数生长期 HepG2 细胞接种于共聚焦培养皿中培养 24 h，随后按“1.3.7”进行分组与处理。处理结束后，弃去培养液，使用 PBS 轻柔洗涤细胞 1 次。加入 JC-1 染色工作液，于细胞培养箱中避光孵育 20 min。弃去染色液后，加入 JC-1 缓冲液洗涤 2 次，最后加入新鲜完全培养基覆盖细胞。在共聚焦显微镜下观察并采集图像。

1.3.11 **透射电子显微镜**

将处于对数生长期的 HepG2 细胞消化传代后，接种至 100 mm 细胞培养皿中，在标准条件下培养 24 h。分组及处理方法同“1.3.7”，造模好的细胞不经漂洗直接倒出培养液后迅速加足量预冷的 2.5%戊二醛固定 1 h，刮下细胞离心后收集，吸去上清液，再加入新预冷 2.5%戊二醛，随后置于 4 ℃冰箱固定保存，后续经脱水、包埋、染色后，于透射电子显微镜下观察并采集图像。

1.3.12 **蛋白免疫印迹分析**

收集各组细胞，使用 RIPA 裂解液进行裂解，离心后取上清，采用 BCA 法测定蛋白浓度。等量蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳分离后，转移至 PVDF 膜。用 5%脱脂牛奶室温封闭 1 h，随后与特异性一抗于 4 ℃孵育过夜，包括：兔抗 PINK1 单克隆抗体（1:1 000）、兔抗 Parkin 单克隆抗体（1:2 000）、兔抗 p62 多克隆抗体（1:5 000）、兔抗 LC3 Ⅰ/Ⅱ多克隆抗体（1:500）及兔抗 GAPDH 多克隆抗体（1:5 000）。用 TBST 洗涤 3 次后，与 HRP 标记的山羊抗兔二抗（1:1 000）于 37 ℃孵育 40 min。洗涤后，使用 ECL 显影，通过凝胶成像系统采集图像。以 GAPDH 为内参，采用 Quantity One 3.0 软件分析目的蛋白的相对表达量。

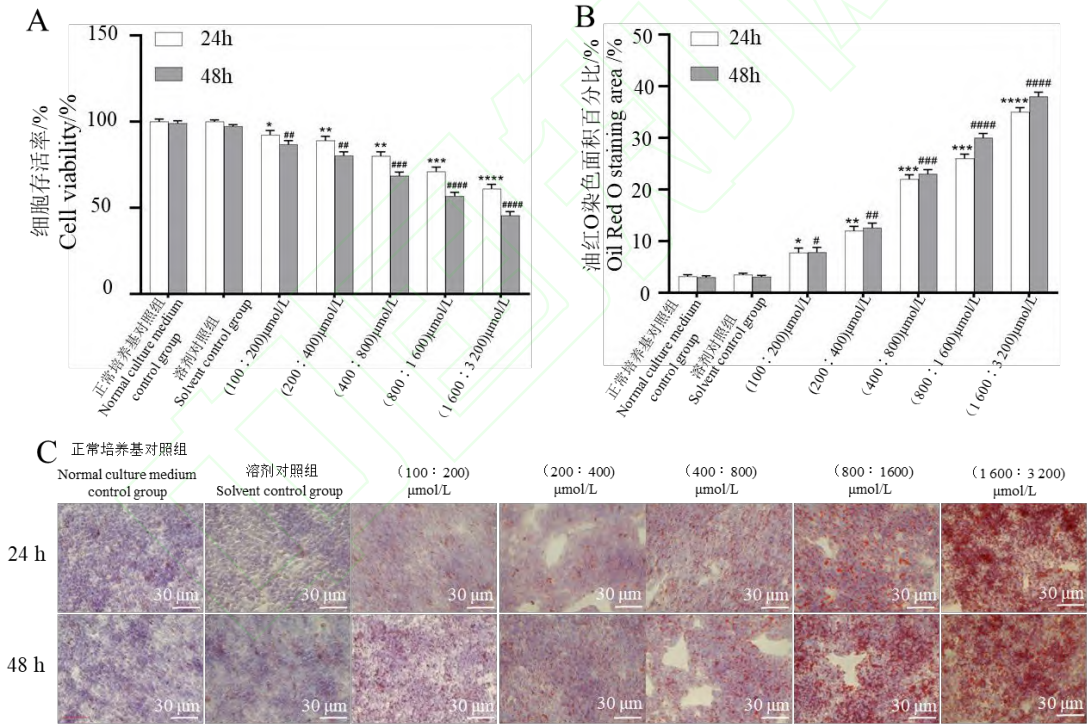
1.4 **统计学方法**

所有统计分析均通过 SPSS 26.0 软件完成。计量数据以平均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）的形式表示。组间比较采用单因素方差分析，并先行方差齐性检验。若方差齐，采用 LSD-*t* 法进行两两比较；若方差不齐，则选用 Tamhane’s *T*2 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HepG2 细胞脂肪变性模型的构建

本研究采用棕榈酸钠与油酸钠按物质的量之比 1:2 配制的混合脂肪酸处理 HepG2 细胞，以建立 HepG2 细胞脂肪变性模型。CCK-8 检测结果显示，溶剂对照组与正常培养基对照组的细胞存活率无显著差异（P>0.05），表明助溶剂本身对细胞无明显毒性作用。在此基础上，混合脂肪酸以时间和浓度依赖性的方式抑制细胞活力。与正常培养基对照组相比，各浓度混合脂肪酸处理 24 h 和 48 h 后，细胞存活率均显著降低（P<0.05，P<0.01，P<0.001，P<0.000 1）。其中，1 600 μmol/L∶3 200 μmol/L 浓度混合脂肪酸处理 48 h 后，细胞存活率降至(42.09±0.26)%（P<0.000 1），表明该处理条件已对细胞造成严重的毒性损伤（图 1A）。油红 O 染色结果显示，溶剂对照组细胞内未见明显橘红色脂滴聚集，与正常培养基对照组相比无明显差异，进一步证实溶剂本身不会诱导细胞内脂质蓄积。当混合脂肪酸浓度为 800 μmol/L∶1 600 μmol/L 及 1 600 μmol/L∶3 200 μmol/L 时，处理 24 h 与 48 h 后细胞内均可见大量橘红色脂滴聚集，成功模拟了肝细胞的脂质过度蓄积状态。然而，1 600 μmol/L∶3 200 μmol/L 剂量组出现明显细胞漂浮与形态损伤（图 1B、C），提示尽管脂肪变性更显著，但过强的细胞毒性可能干扰后续干预研究的准确性。综合考虑细胞活性与脂质蓄积水平，最终确定以 800 μmol/L∶1 600 μmol/L 浓度的混合脂肪酸干预 24 h 作为 HepG2 细胞脂肪变性模型的诱导条件。



注：A：CCK-8 法检测细胞活力柱状图；B：油红 O 染色脂质沉积定量柱状图；C：油红 O 染色细胞形态学图片(400×)。作用 24 h 时与正常培养基对照组相比，$^{*}P$<0.05，$^{**}P$<0.01，$^{***}P$<0.001，$^{****}P$<0.000 1；作用 48 h 时与正常培养基对照组相比，$^{\#}P$<0.05，$^{\#\#}P$<0.01，$^{\#\#\#}P$<0.001，$^{\#\#\#\#}P$<0.000 1。

图 1 不同浓度混合脂肪酸对 HepG2 细胞活力及脂质沉积的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

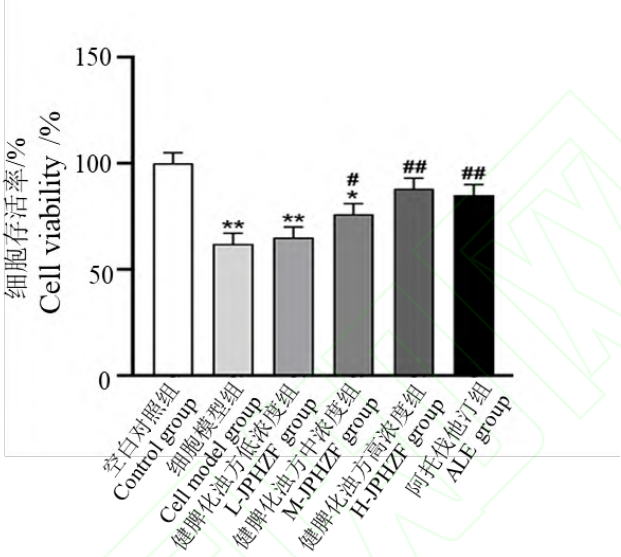
Note. A, Column chart of cell viability detected by CCK-8 assay. B, Quantitative column chart of lipid deposition stained by Oil Red O. C, Morphological images of cells stained by Oil Red O (400×). Compared with the normal culture medium control group after 24 h of treatment, $^{*}P$<0.05, $^{**}P$<0.01, $^{***}P$<0.001, $^{****}P$<0.000 1. Compared with the normal culture medium control group after 48 h of treatment, $^{\#}P$<0.05, $^{\#\#}P$<0.01, $^{\#\#\#}P$<0.001, $^{\#\#\#\#}P$<0.000 1.

Figure 1 Effects of mixed fatty acids at various concentrations on HepG2 cell viability and lipid accumulation（$\bar{x}\pm s$, n=3）

2.2 健脾化浊方对混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞活性的影响

本研究使用健脾化浊方含药血清对混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞进行干预，观察其对细胞活性

的影响。CCK-8 实验结果显示，与空白对照组相比，细胞模型组和健脾化浊方低、中浓度组细胞活力显著降低（$P<0.05$，$P<0.01$），高浓度健脾化浊方干预组和阿托伐他汀组的细胞活性较模型组无显著变化（$P>0.05$）。与细胞模型组细胞相比，除低浓度健脾化浊方干预组的细胞活性较细胞模型组无显著变化外，中、高浓度健脾化浊方干预组及阿托伐他汀干预组细胞存活率较细胞模型组均明显增强（$P<0.05$，$P<0.01$，图 2），这表明健脾化浊方在中等及以上浓度能够有效对抗由脂毒性引起的细胞活力下降，发挥细胞保护作用。综合上述结果说明，健脾化浊方改善混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞活性存在浓度依赖性。低浓度效果有限；而中、高浓度则能显著逆转模型导致的细胞活力损伤，其改善细胞活力的效果与阿托伐他汀相当。



注：与空白对照组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与细胞模型组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

图 2 健脾化浊方含药血清对混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞活力的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Note. Compared with the control group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$. Compared with the cell model group, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$。

Figure 2 Effect of Jianpi Huazhuo formula-containing serum on the viability of mixed fatty acid-induced HepG2 cells（$\bar{x}\pm s$, $n=3$）

2.3 健脾化浊方对混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞脂肪变性模型中脂质蓄积的影响

本研究对健脾化浊方干预混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞内蓄积脂质的作用进一步进行了观察。

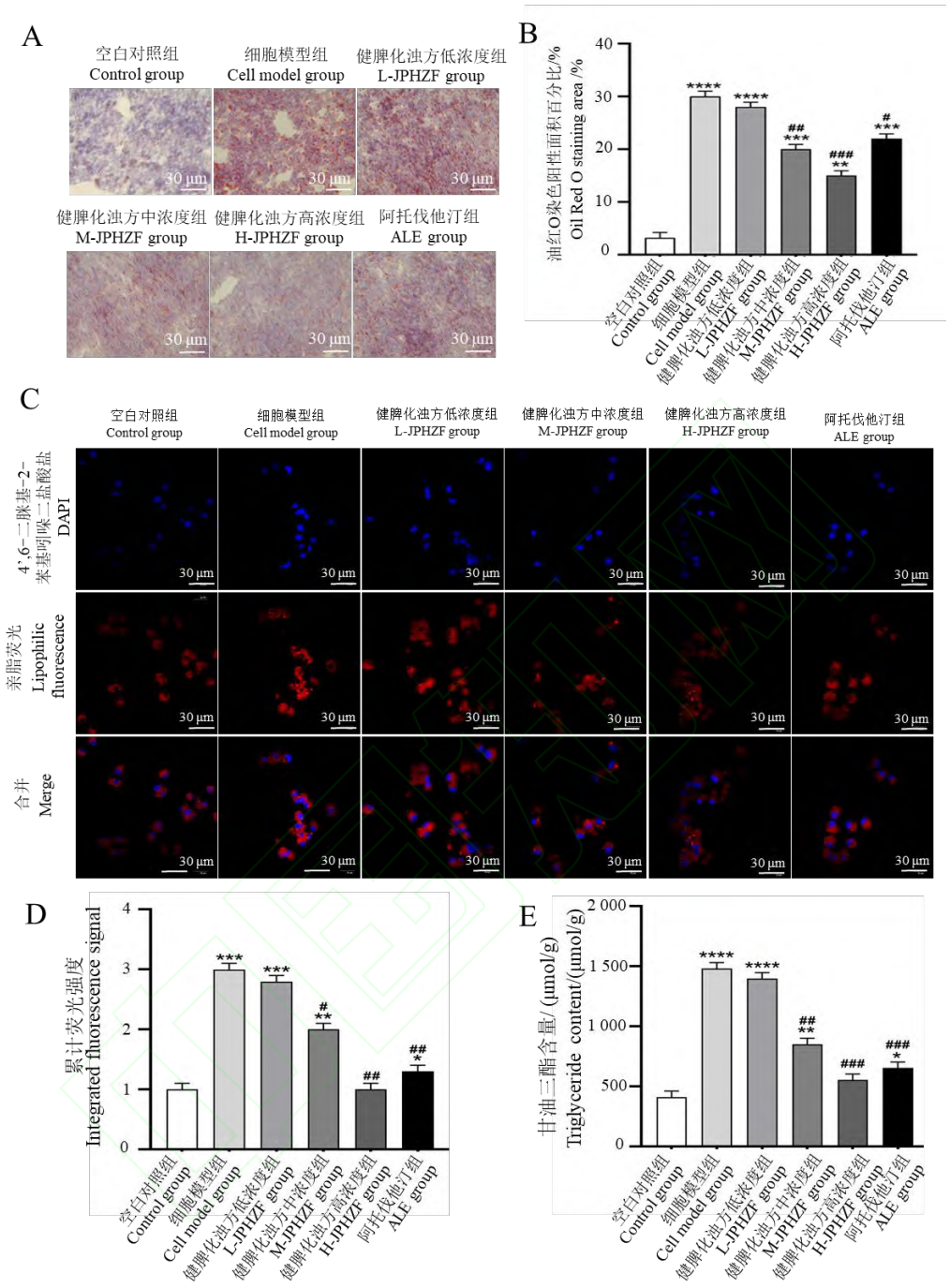
油红 O 染色结果显示，与空白对照组相比，细胞模型组，健脾化浊方干预组及阿托伐他汀钙干预组 HepG2 细胞胞质内均可见显著红色环状脂滴蓄积（$P<0.01$，$P<0.01$，$P<0.000\ 1$）。与细胞模型组相比，除健脾化浊方低浓度组的细胞内脂滴大小和数量无显著变化外（$P>0.05$），健脾化浊方中、高浓度组与阿托伐他汀组细胞质中脂滴的大小和数量都明显减少（$P<0.05$，$P<0.01$，$P<0.001$，图 3A、3B），这从形态学上直观表明，健脾化浊方在中等及以上浓度具有明确的减少混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞中脂质蓄积的作用，且效力与阳性药相当。

尼罗红染色结果显示，与空白对照组相比，细胞模型组，健脾化浊方低、中浓度组及阿托伐他汀组细胞内脂质荧光强度均显著增强（$P<0.05$，$P<0.01$，$P<0.001$），健脾化浊方高浓度组无显著变化（$P>0.05$）。与细胞模型组相比，健脾化浊方低浓度组无显著变化（$P>0.05$），而健脾化浊方中、高浓度组及阿托伐他汀组细胞内脂质荧光强度出现明显减弱（$P<0.05$，$P<0.01$），这从定量层面证实了中高浓度健脾化浊方对混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞中脂质蓄积的改善作用，其结果与油红 O 染色观察相互印证（图 3C、3D）。

各组 TG 含量检测结果显示，与空白对照组相比，细胞模型组，健脾化浊方低、中浓度组及阿托伐他汀组细胞内 TG 水平均显著升高（$P<0.05$，$P<0.01$，$P<0.000\ 1$），而健脾化浊方高浓度组无显著差异（$P>0.05$）。与细胞模型组相比，除健脾化浊方低浓度组 TG 水平与模型组相比无明显差异外

（P>0.05），健脾化浊方中、高浓度组及阿托伐他汀组细胞 TG 含量均较模型组显著降低（P<0.01，P<0.001）。从最核心的脂质生化指标上定量证实了健脾化浊方对混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞脂质蓄积的改善作用（图 3E）。

上述 3 项检测从形态（油红 O）、定量荧光（尼罗红）和生化定量（TG）3 个维度，得出结论：健脾化浊方减少混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞内脂质蓄积的作用存在明确的浓度依赖性。低浓度效果不显；而中、高浓度则能显著逆转混合脂肪酸诱导的细胞模型诱导的脂质过度蓄积，其改善细胞脂质蓄积的效果（尤其在改善 TG 核心指标方面）与阿托伐他汀相当。



注：A：各组 HepG2 细胞油红 O 染色图像(400×)；B：基于油红 O 染色的细胞内脂滴相对含量统计分析；C：各组 HepG2 细胞尼罗红染色荧光图像（400×）；D：尼罗红染色的细胞内脂质荧光强度统计分析；E：各组 HepG2 细胞内甘油三酯含量测定。与空白对照组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$，$^{****}P<0.000\ 1$；与细胞模型组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$，$^{\#\#\#}P<0.001$，$^{\#\#\#\#}P<0.000\ 1$。

图 3 健脾化浊方对混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞内脂质的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

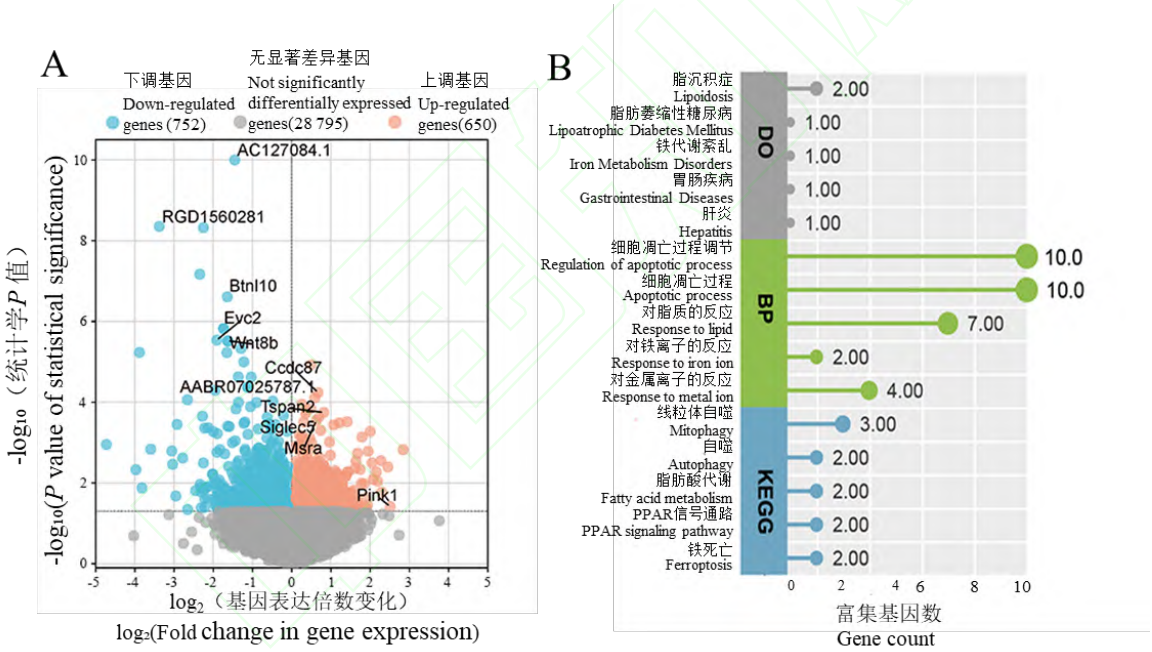
Note. A, Oil Red O staining images of HepG2 cells in each group (400×). B, Statistical analysis of intracellular lipid droplet relative content based on Oil Red O staining. C, Fluorescence images of Nile Red staining in HepG2 cells of each group (400×). D, Statistical analysis of intracellular lipid fluorescence intensity based on Nile Red staining. E, Determination of triglyceride content in HepG2 cells of each group. Compared with the control group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, $^{****}P<0.000\ 1$. Compared with the cell model group, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$, $^{\#\#\#}P<0.001$, $^{\#\#\#\#}P<0.000\ 1$.

Figure 3 Effect of Jianpi Huazhuo formula on intracellular lipid content in mixed fatty acid-induced HepG2 cells（$\bar{x}\pm s$, n=3）

2.4 健脾化浊方干预混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞转录组学分析

为了探讨健脾化浊方干预混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞脂肪变性模型的可能机制，我们对健脾化浊方干预组和未干预组的混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞进行了高通量测序。高通量测序探针共检测到 30 197 个基因。差异分析显示，健脾化浊方干预组和未干预组间共得到 1 402 个差异表达基因。差异基因中共有 650 个基因表达上调，752 个基因表达下调，我们用图展示了高低表达排列前 5 的基因（图 4A）。

考虑到线粒体功能障碍在混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞脂肪变性中的作用，我们重点关注了差异表达的线粒体基因。在 1 402 个差异表达的基因中差异表达的线粒体基因共 56 个。其中差异表达的线粒体基因中包含 PINK1。进一步的富集分析结果显示，差异线粒体因 DO 富集在脂代谢障碍、脂肪缺乏性糖尿病、铁代谢障碍、消化系统疾病及肝炎等疾病上；BP 显著富集在凋亡过程的调控、细胞凋亡过程、对脂质的响应、对铁离子的响应及对金属离子的响应等相关条目；KEGG 通路富集于线粒体自噬、自噬、脂肪酸代谢、过氧化物酶体增殖物激活受体（peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR）信号通路、铁死亡等通路上（图 4B）。上述结果说明差异表达的线粒体基因可调控线粒体自噬、自噬、铁死亡等信号，通过脂代谢障碍、脂肪缺乏性糖尿病、铁代谢障碍等疾病与混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞脂肪变性相关联。已知线粒体自噬在脂肪肝进程中扮演了重要角色，我们对健脾化浊方干预后是否能诱导混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞发生线粒体自噬进行了观察。



注：A：差异基因火山图；B：差异基因 GO-BP/DO/KEGG 功能富集分析。

图 4 健脾化浊方干预混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞的转录组学分析（$\bar{x}\pm s$，n=3）

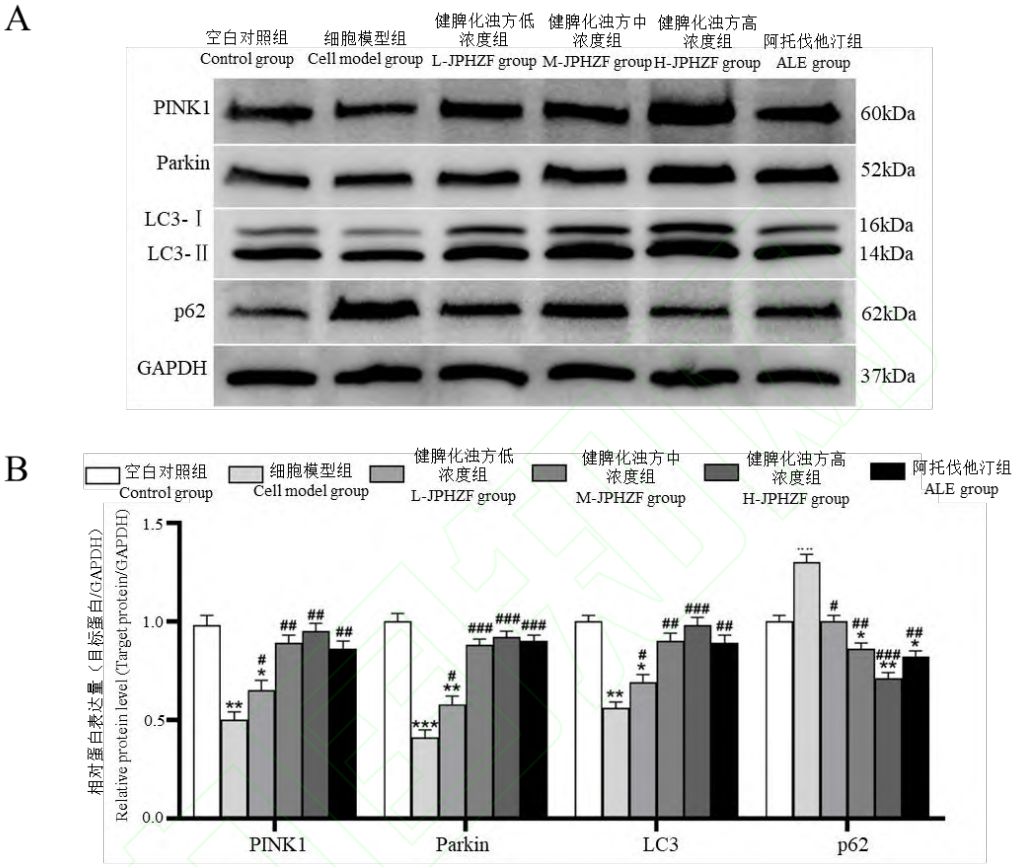
Note. A, Volcano plot of differentially expressed genes. B, Functional enrichment analysis of differentially expressed genes (GO-BP/DO/KEGG).

Figure 4 Transcriptomic analysis of Jianpi Huazhuo formula intervention in mixed fatty acid-induced HepG2 cells（$\bar{x}\pm s$, n=3）

2.5 健脾化浊方对线粒体自噬通路 PINK1/Parkin 相关蛋白表达的影响

为了观察健脾化浊方对混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞线粒体自噬的影响，本研究从多个侧面进行了实验观察。作为线粒体自噬经典通路中的关键因子，PINK1 在高通量测序中被发现在健脾化浊方干预后表达升高。因此，我们对线粒体自噬通路 PINK1/Parkin 中的自噬相关蛋白进行了观察。Western blot 检测结果显示，与空白对照组相比，细胞模型组中 PINK1、Parkin 的蛋白表达水平及 LC3II/I比值显著降低（P<0.01，P<0.001），p62 蛋白表达上细胞模型组显著增高（P<0.01），表明成

功模拟了混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞脂肪变性状态下线粒体自噬流的抑制。药物干预后与细胞模型组相比，健脾化浊方各浓度组及阿托伐他汀组 PINK1、Parkin 蛋白表达和 LC3II/I比值均明显上调（$P<0.05$，$P<0.01$，$P<0.001$），p62 蛋白表达均显著下降（$P<0.05$，$P<0.01$，$P<0.001$），这从分子机制上确证，健脾化浊方干预能浓度依赖性地激活 PINK1/Parkin 通路，促进自噬流，从而逆转细胞模型导致的线粒体自噬抑制。（图 5A、5B）



注：A：各组细胞 PINK1、Parkin、LC3II/I及 p62 蛋白表达的 Western blot 代表性条带；B：PINK1、Parkin、LC3II/I比值及 p62 蛋白相对表达量的统计分析。与空白对照组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$；与细胞模型组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$，$^{\#\#\#}P<0.001$，$^{\#\#\#\#}P<0.000\ 1$。

图 5 健脾化浊方对混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞 PINK1/Parkin 通路相关蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

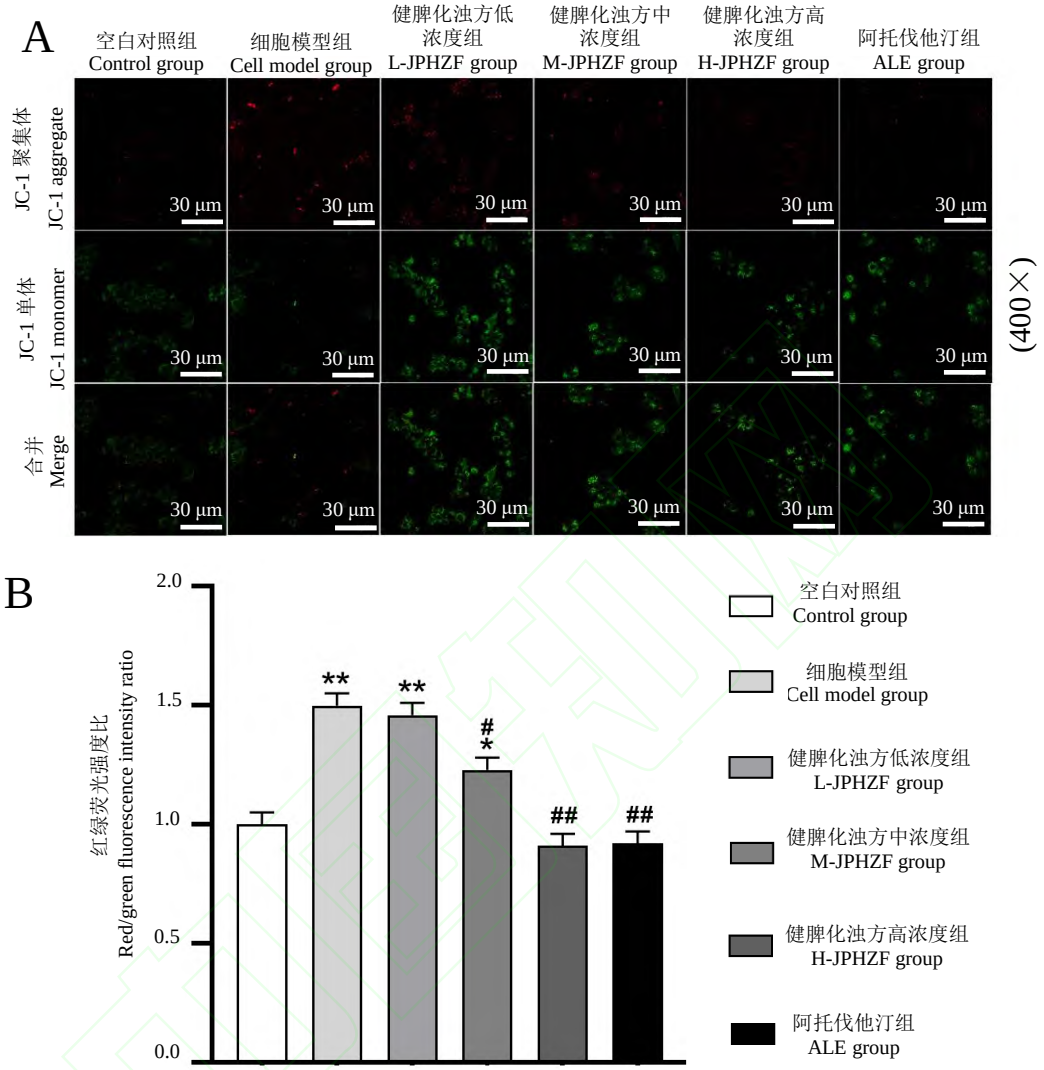
Note. A, Representative Western blot images showing the expression of PINK1, Parkin, LC3-Ⅱ/Ⅰ, and p62 proteins in each group. B, Quantitative analysis of PINK1, Parkin, LC3-Ⅱ/Ⅰ ratio, and relative p62 protein expression levels. Compared with the blank control group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$. Compared with the cell model group, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$, $^{\#\#\#}P<0.001$, $^{\#\#\#\#}P<0.000\ 1$.

Figure 5 Effects of Jianpi Huazhuo formula on the expression of PINK1/Parkin pathway-related proteins in mixed fatty acid-induced HepG2 cells（$\bar{x}\pm s$, $n=3$）

2.6 健脾化浊方对混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响

JC-1 染料在线粒体膜电位较高时形成聚合物，发出红色荧光；当膜电位降低时，JC-1 以单体形式存在，发出绿色荧光。通过红绿荧光强度的比值，可定量评估线粒体膜电位的变化。线粒体膜电位的检测结果显示，与空白对照组相比，细胞模型组，健脾化浊方低、中浓度组细胞线粒体膜电位显著升高（$P<0.05$，$P<0.01$），提示混合脂肪酸诱导的细胞脂肪变性模型存在线粒体功能障碍（膜电位异常升高），而低、中浓度药物单独处理未能纠正此异常；健脾化浊方高浓度组及阿托伐他汀组细胞线粒体膜电位无显著差异（$P>0.05$），这表明健脾化浊方高浓度组能够将细胞模型中异常升高的线粒体膜电位恢复至正常生理水平。与细胞模型组相比，健脾化浊方中、高浓度组和阿托伐他汀组干预后线粒体膜电位明显降低（$P<0.05$，$P<0.01$），而健脾化浊方低浓度组线粒体膜电位与细胞模型组相比无

统计学差异（P>0.05，图 6A、6B)。这一功能指标的改善，与上述自噬蛋白激活的结果相互印证，表明激活的线粒体自噬可能通过清除受损线粒体，从而恢复正常线粒体功能。



注：A：各组细胞线粒体膜电位检测代表性图（400×）；B：线粒体膜电位相对强度的统计分析。与空白对照组相比，$^{*}P$<0.05，$^{**}P$<0.01；与细胞模型组相比，$^{\#}P$<0.05，$^{\#\#}P$<0.01。

图 6 健脾化浊方对混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞线粒体膜电位损伤的改善作用（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Note. A, Representative images showing mitochondrial membrane potential in each group (400×). B, Quantitative analysis of relative mitochondrial membrane potential. Compared with the blank control group, $^{*}P$<0.05, $^{**}P$<0.01, Compared with the cell model group, $^{\#}P$<0.05, $^{\#\#}P$<0.01.

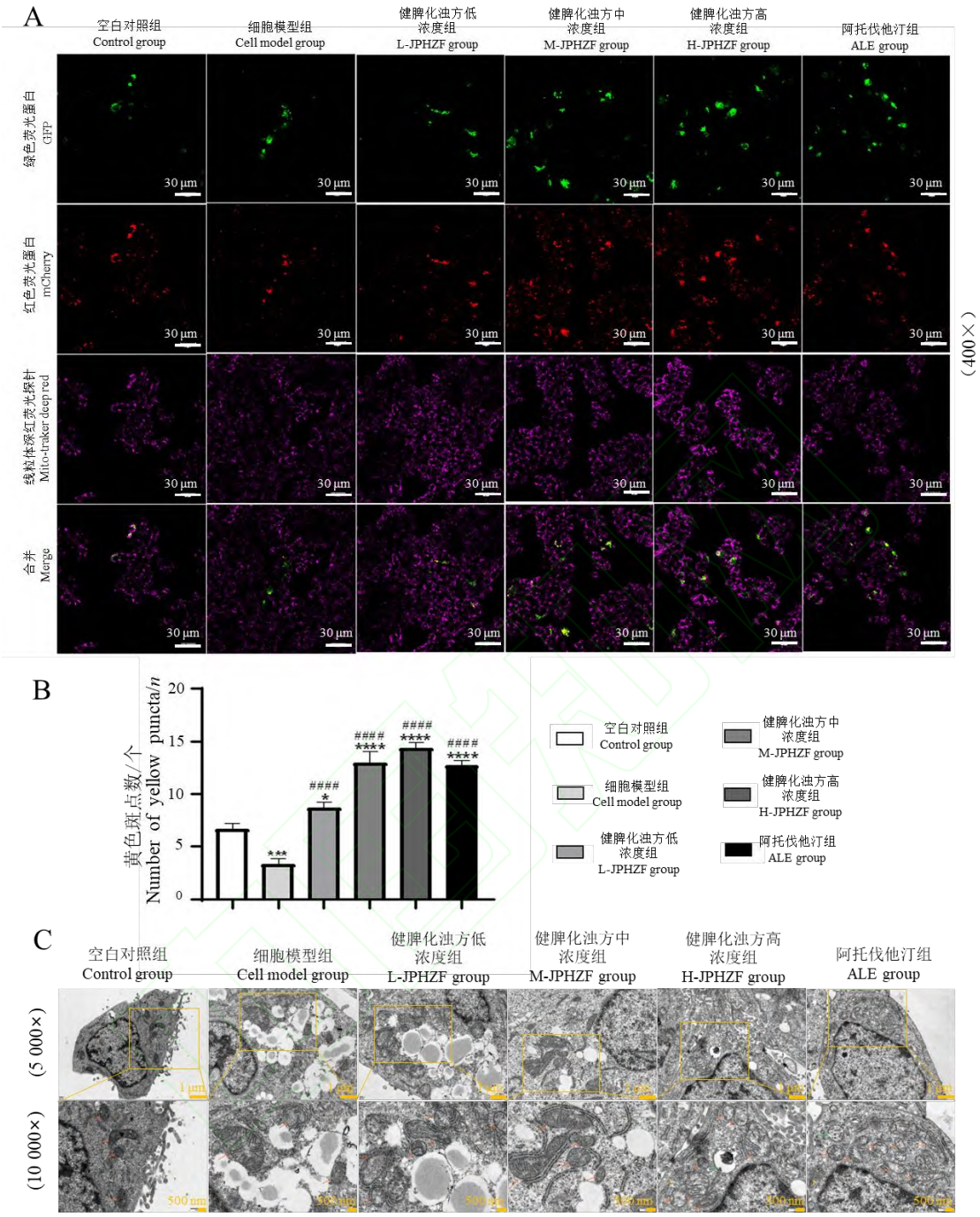
Figure 6 Ameliorative effect of Jianpi Huazhuo formula on mitochondrial membrane potential impairment in mixed fatty acid-induced HepG2 cells（$\bar{x}\pm s$, n=3）

2.7 健脾化浊方对混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞自噬流及线粒体自噬体形成的影响

在共聚焦显微镜下，线粒体显示为洋红色伪彩。通过 mRFP-GFP-LC3 双荧光报告系统，当自噬激活形成自噬体时，LC3 蛋白聚集呈现黄色荧光斑点；当自噬体与溶酶体融合后，因 GFP 荧光淬灭而显示为红色斑点。通过统计与线粒体共定位的黄色斑点数量，可以评估细胞的线粒体自噬水平。结果显示，与空白对照组相比，细胞模型组细胞中黄色斑点和线粒体的共定位点数降低（P<0.001），各浓度健脾化浊方组及阿托伐他汀组则明显增多（P<0.05，P<0.000 1），直接可视化了药物对自噬过程的促进作用。与细胞模型组相比，各浓度健脾化浊方组及阿托伐他汀组细胞中黄色斑点数量则明显

增多（$P<0.000\ 1$），定量证实了健脾化浊方能浓度依赖性地增加线粒体自噬体的形成。（图 7A、7B）

在细胞线粒体自噬小体超微结构的观察中我们发现，空白对照组 HepG2 细胞线粒体结构完整、形态饱满，呈长条状或椭圆形状。线粒体内部清晰可见平行板状嵴。而混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞脂肪变性模型组细胞胞质内可见空泡形成，且自噬小体与自噬溶酶体数量均明显减少。未见明显双层膜构成的线粒体自噬小体形成。与细胞模型组相比，健脾化浊方组可见分布较多数量的溶酶体，圆形或球形且体积缩小的线粒体，视野里还可见分布直径约为 0.5~1.0 μm 的圆形线粒体小粒体，在某些线粒体内部可见由其膜系统分解形成而来的小囊泡。尤其在健脾化浊方高浓度组，清晰可见将线粒体包裹在内部的双层膜结构（图 7C），此为典型的线粒体自噬小体。



注：A：各组细胞 mCherry-GFP-LC3 荧光示踪的代表性图像（400×），黄色斑点代表自噬溶酶体；B：各组细胞中黄色斑点数量的定量分析；C：透射电镜观察各组细胞线粒体超微结构及自噬体形成的代表性图像（5 000×，10 000×），红色箭头表示线粒体，黄色箭头表示自噬溶酶体，绿色箭头表示线粒体自噬体。与空白对照组相比，$^{*}P<0.05$，$^{***}P<0.001$，$^{****}P<0.000\ 1$；与细胞模型组相比，$^{\#\#\#\#}P<0.000\ 1$。

图 7 荧光示踪及透射电镜观察各组细胞自噬流与线粒体自噬体形成（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Note. A, Representative images of mCherry-GFP-LC3 fluorescence tracing in each group (400×), yellow puncta indicate autophagolysosomes. B, Quantitative analysis of yellow puncta numbers in each group. C, Representative transmission electron microscopy images of mitochondrial ultrastructure and autophagosome formation in each group (5 000×, 10 000×), red arrows indicate mitochondria, yellow arrows indicate autophagolysosomes, and green arrows indicate mitophagosomes. Compared with the control group, $^{*}P<0.05$, $^{***}P<0.001$, $^{****}P<0.000\ 1$. Compared with the cell model group, $^{\#\#\#\#}P<0.000\ 1$.

Figure 7 Fluorescence tracing and transmission electron microscopy observation of autophagic flux and mitophagosome formation in each group（$\bar{x}\pm s$, n=3）

3 讨论

上述结果从分别从分子层面（自噬相关蛋白表达上调）、细胞器功能层面（降低异常升高的线粒体膜电位）、动态过程层面（自噬体形成增多）及超微结构层面（典型线粒体自噬小体出现）4 个相互佐证的维度，构成了完整的证据链，充分说明健脾化浊方能够有效诱导混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞发生线粒体自噬，且该作用存在浓度依赖性。

本研究首次在细胞水平上探讨了健脾化浊方通过调控线粒体自噬改善混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞脂肪变性的作用机制。我们发现健脾化浊方能浓度依赖性地改善混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞脂质代谢紊乱，其核心机制与激活 PINK1/Parkin 通路、激活线粒体自噬相关。

线粒体作为细胞能量工厂，其功能稳态是维持肝细胞脂质代谢平衡的核心[17]。线粒体自噬作为一种关键的质量控制机制，负责选择性清除受损线粒体[28]。在 MASLD 进程中，脂质超载引发线粒体氧化应激与膜电位去极化，导致线粒体损伤。若此时线粒体自噬功能受损，将导致功能障碍线粒体堆积，进而产生过量 ROS、促炎因子，并触发肝细胞凋亡，形成“脂质蓄积-线粒体损伤-自噬抑制”的恶性循环，驱动疾病向 MASH 及肝纤维化进展[29]。PINK1/Parkin 通路是调控线粒体自噬的核心机制。当线粒体受损膜电位崩溃时，PINK1 稳定于线粒体外膜并激活，进而招募并激活胞质中的 Parkin。活化后的 Parkin 对线粒体外膜蛋白进行泛素化修饰，这些泛素链作为“吃我”信号被 p62/SQSTM1 等接头蛋白识别，最终引导自噬体包裹受损线粒体，与溶酶体融合完成降解[30]。因此，恢复 PINK1/Parkin 通路功能、重塑线粒体自噬，已成为 MASLD 治疗的新策略。

以往研究已证实 PINK1/Parkin 通路功能紊乱是加剧 MASLD 肝细胞脂质蓄积与线粒体损伤的关键环节。其在 MASLD 进程中常表现为表达下调与功能抑制。如在游离脂肪酸处理的犊牛肝细胞及 MASLD 小鼠肝组织中，均观察到 PINK1、Parkin 蛋白表达显著降低，并伴随 p62 堆积、LC3-Ⅱ/Ⅰ比值下降等自噬流受阻特征[31,32]。而利用中药活性成分或复方调控 PINK1/Parkin 通路，是改善 MASLD 的有效策略。在多项细胞与动物实验中，橙皮素被证实可在棕榈酸诱导的 HepG2 细胞及高脂饮食大鼠模型中，通过腺苷酸活化蛋白激酶 α（adenosine monophosphate-activated protein kinase α,AMPKα）-动力相关蛋白 1（dynamin-related protein 1, Drp1）/PINK1-Parkin 通路提升线粒体自噬水平，从而减少脂滴堆积、恢复脂肪酸氧化能力与三磷酸腺苷合成[33, 34]；虎杖苷则在 MASLD 小鼠模型中能协同调控沉默信息调节因子 3（silent information regulator 3, SIRT3）-叉头框蛋白 O3（forkhead box O3, FOXO3）-B 细胞淋巴瘤-2（B-cell lymphoma 2, Bcl-2）/腺病毒 E1B 19 kDa 相互作用蛋白 3（Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3, BNIP3）轴与 PINK1-Parkin 通路，增强线粒体自噬，并改善肝脏脂肪变性及炎症反应[35] 。此外，中药复方如扶脾柔肝方能通过下调肝纤维化大鼠肝组织中 PINK1、Parkin、Beclin-1 和 LC3-Ⅱ的 mRNA 及蛋白表达，调控线粒体自噬活性，进而延缓肝纤维化进程[36]；健肝消脂方可通过调节 PINK1/Parkin 通路介导的线粒体自噬，对 MASLD 模型小鼠发挥明确的治疗作用[37]。

本研究中使用的健脾化浊方系在经典名方逍遥散基础上，结合华南地区湿热偏盛、易伤脾胃的地域特点及饮食致病因素，加减而成的复方[38]。全方由柴胡 12 g、白芍 15 g、枳壳 15 g、黄芪 25 g、白术 20 g、茯苓 20 g、陈皮 10 g、荷叶 15 g、泽泻 15 g、姜厚朴 15 g、山楂 20 g、党参 15 g、薏苡仁 30 g、法半夏 15 g、甘草 6 g、桂枝 10 g、绞股蓝 20 g 共 17 味中药组成。方中柴胡、白芍、枳壳为君，疏肝行气、调畅气机；黄芪、党参、白术、茯苓、陈皮为臣，益气健脾、燥湿利水；佐以荷叶、泽泻、姜厚朴、法半夏、薏苡仁化浊祛瘀，桂枝温阳化气以助湿浊消散；山楂、绞股蓝活血化瘀、消积降脂，并以甘草调和诸药，兼护中气。全方整体上在疏肝理气、健脾利水、祛痰化浊、活血化瘀之功效方面更为突出。

为了阐明健脾化浊方改善混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞脂肪变性的机制，我们整合了形态学、基因组学及分子生物学的结果构建了完整的证据链。首先，在脂质代谢表型上，健脾化浊方含药血清呈浓度依赖性逆转混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞脂肪变性、提升细胞活力。同时在油红 O 及尼罗红染色上可观察到健脾化浊方干预后脂肪变性细胞的脱脂效应。值得关注的是，高浓度组在脂质沉积改

善上优于阳性药阿托伐他汀，不仅验证了复方的浓度依赖性效果，更凸显其相较于单一化学药的改善作用优势。为阐明健脾化浊方作用的分子基础，我们通过高通量测序筛选了 1 402 个差异表达基因。通过功能富集我们观察到差异基因显著地富集于“线粒体自噬”“自噬”及“脂肪酸代谢”等核心通路。我们进一步聚焦于 56 个线粒体相关差异基因，并发现线粒体自噬的关键起始基因 PINK1 表达显著上调。PINK1 作为线粒体自噬通路的关键起始激酶，在线粒体受损时稳定积累于外膜并招募 Parkin，是启动自噬的核心事件。尽管 BNIP3、FUN14 结构域蛋白 1（FUN14 domain-containing protein 1, FUNDC1）等受体也参与线粒体自噬调控，但其主要在缺氧或特定应激条件下发挥作用，且在本研究转录组数据中未观察到显著差异表达。因此，结合 KEGG 富集分析结果及 PINK1 在通路中的核心地位，我们选择 PINK1/Parkin 轴作为主要研究靶点。上述一系统生物学分析不仅从全局视角揭示了健脾化浊方干预与脂代谢、自噬通路的强关联，更为后续聚焦于 PINK1/Parkin 通路介导的线粒体自噬这一具体机制，提供了直接的分子线索与坚实的研究起点。通过 Western blot 实验我们证实健脾化浊方能浓度依赖性地上调 PINK1 与 Parkin 的蛋白表达，并同步诱导 LC3-II/I比值升高及自噬底物 p62 降解。通过 JC-1 染色及 Ad-mCherry-GFP-LC3B 示踪实验我们证实健脾化浊方能显著降低混合脂肪酸模型细胞中异常升高的线粒体膜电位及增加细胞内自噬溶酶体（黄色斑点）的数量。同时，我们使用透射电镜在高浓度组细胞中直接捕获到典型的双层膜线粒体自噬小体，为此通路激活提供了直观的“金标准”超微结构证据。至此，从分子信号到细胞器结构与功能的多维证据闭环得以形成，共同确证健脾化浊方在细胞水平上可通过浓度依赖性激活 PINK1/Parkin 通路，驱动功能性线粒体自噬。

本研究尚存一定的局限性：首先，本实验采用 HepG2 肝癌细胞系作为 MASLD 细胞模型，该细胞系虽广泛用于脂代谢研究，但其肿瘤来源特性及代谢特征与正常原代肝细胞存在差异，可能不完全模拟生理性 MASLD 的病理过程。因此，本研究的结论应限定为“细胞水平证据”，后续需在小鼠正常肝细胞、人正常肝细胞系 HL-7702 或原代肝细胞及 MASLD 动物模型中进一步验证。其次，本研究目前仅提供了健脾化浊方上调 PINK1/Parkin 表达、激活线粒体自噬与改善脂质沉积的相关性证据，尚未通过基因沉默或特异性抑制剂阻断实验证实该通路的必需性。由于实验条件限制，暂未在本次研究中开展相关验证，未来将采用 *PINK*1 siRNA 或线粒体自噬抑制剂 Mdivi-1 等工具，在阻断条件下进一步确证该通路是否为健脾化浊方药效的必需机制；此外，复方药效成分及其与 PINK1/Parkin、PPAR 等通路的因果关联，尚待网络药理学与基因敲除进一步阐明。

结论：在细胞水平上，健脾化浊方含药血清可浓度依赖性地改善混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞脂肪变性，其作用机制与激活 PINK1/Parkin 通路、恢复线粒体膜电位、促进自噬体形成及诱导典型线粒体自噬小体形成密切相关。上述结果从分子信号、细胞器功能、动态过程及超微结构四个维度构建了完整证据链，共同确证健脾化浊方通过驱动功能性线粒体自噬发挥改善脂肪变性的作用。本研究为健脾化浊方治疗 MASLD 提供了基于 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬机制的细胞学实验依据。

杨炯, 钟洁月, 杨秋燕, 等. 健脾化浊方调控 PINK1/Parkin 通路激活代谢相关脂肪性肝病细胞线粒体自噬[[J]. 中国比较医学杂志, 2026, 36(17): 00 – 00.

Yang J, Zhong JY, Yang QY, et al. Jianpi Huazhuo formula regulates the PINK1/Parkin pathway to activate mitophagy in metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease cells [J]. Chin J Comp Med, 2026, 36(17): 00 – 00.

[参考文献]

[1] Zhu L, Wu X, Liao R. Mechanism and regulation of mitophagy in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): a mini-review [J]. Life Sci, 2023, 312: 121162.

[2] Duell P B, Welty F K, Miller M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: a scientific statement from the American heart association [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2022, 42(6): e168-e185.

[3] Rinella M E, Neuschwander-Tetri B A, Siddiqui M S, et al. AASLD Practice Guidance on the clinical assessment and management of nonalcoholic fatty liver disease [J]. Hepatology, 2023, 77(5): 1797-1835.

[4] Sun D Q, Targher G, Byrne C D, et al. An international Delphi consensus statement on metabolic dysfunction-associated fatty liver disease and risk of chronic kidney disease [J]. Hepatobiliary Surg Nutr, 2023, 12(3): 386-403.

[5] Younossi Z M, Zelber-Sagi S, Henry L, et al. Lifestyle interventions in nonalcoholic fatty liver disease [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2023, 20(11): 708-722.

[6] Nam H, Yoo J J, Cho Y, et al. Effect of exercise-based interventions in nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review with meta-analysis [J]. Dig Liver Dis, 2023, 55(9): 1178-1186.

[7] Hadefi A, Arvanitakis M, Trépo E, et al. Dietary strategies in non-alcoholic fatty liver disease patients: From evidence to daily clinical practice, a systematic review [J]. United Eur Gastroenterol J, 2023, 11(7): 663-689.
[8] 徐佳浩， 梁计陵， 李佳航， 等． 运动改善小鼠非酒精性脂肪肝纤维化的生物信息学分析 [J]． 中国康复医学杂志， 2025， 40（7）： 986-994．
Xu J H, Liang J L, Li J H, et al. Bioinformatics analysis of exercise rehabilitation in improving the non-alcoholic fatty liver fibrosis [J]. Chin J Rehabil Med, 2025, 40(7): 986-994.
[9] 张文富， 陈毅然， 王振常， 等． 脂必泰胶囊治疗非酒精性脂肪肝合并慢性乙型病毒性肝炎的临床研究 [J]． 中华中医药学刊， 2025， 43（11）： 39-42．
Zhang W F， Chen Y R， Wang Z C， et al． Clinical study on treatment of non-alcoholic fatty liver combined with chronic hepatitis B with zhibitai capsules（脂必泰胶囊） [J]． Chin Arch Tradit Chin Med， 2025， 43（11）： 39-42．
[10] Lefere S, Puengel T, Hundertmark J, et al. Differential effects of selective- and pan-PPAR agonists on experimental steatohepatitis and hepatic macrophages [J]. J Hepatol, 2020, 73(4): 757-770.
[11] Nevola R, Epifani R, Imbriani S, et al. GLP-1 receptor agonists in non-alcoholic fatty liver disease: current evidence and future perspectives [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(2): 1703.
[12] Neuschwander-Tetri B A, Loomba R, Sanyal A J, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial [J]. Lancet, 2015, 385(9972): 956-965.
[13] Ramanathan R, Ali A H, Ibdah J A. Mitochondrial dysfunction plays central role in nonalcoholic fatty liver disease [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(13): 7280.
[14] Amorim R, Magalhães C C, Borges F, et al. From non-alcoholic fatty liver to hepatocellular carcinoma: a story of (mal)adapted mitochondria [J]. Biology, 2023, 12(4): 595.
[15] Wang L, Yang Y, Sun H, et al. Magnoflorine alleviates nonalcoholic fatty liver disease by modulating lipid metabolism, mitophagy and inflammation [J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2025, 178: 106997.
[16] Lee H L, Kim J M, Go M J, et al. Fermented Protaetia brevitarsis larvae alleviates high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in C57BL/6 mice via regulation of lipid accumulation and inflammation [J]. J Microbiol Biotechnol, 2025, 35: e2409025.
[17] Jin K, Shi Y, Zhang H, et al. A TNFα/Miz1-positive feedback loop inhibits mitophagy in hepatocytes and propagates non-alcoholic steatohepatitis [J]. J Hepatol, 2023, 79(2): 403-416.
[18] Lu Y, Li Z, Zhang S, et al. Cellular mitophagy: Mechanism, roles in diseases and small molecule pharmacological regulation [J]. Theranostics, 2023, 13(2): 736-766.
[19] Wang S, Long H, Hou L, et al. The mitophagy pathway and its implications in human diseases [J]. Sig Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 304.
[20] Picca A, Faitg J, Auwerx J, et al. Mitophagy in human health, ageing and disease [J]. Nat Metab, 2023, 5(12): 2047-2061.
[21] Li F, Luo J, Xie Q, et al. Differential effects of ellagic acid on non-alcoholic fatty liver disease in mice: grouped by urolithin A-producing capacity [J]. Food Funct, 2025, 16(8): 3166-3179.
[22] Aggarwal S, Yadav V, Maiwall R, et al. Metabolomic analysis shows dysregulation in amino acid and NAD+ metabolism in palmitate treated hepatocytes and plasma of non-alcoholic fatty liver disease spectrum [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2023, 643: 129-138.
[23] Andreux P A, Blanco-Bose W, Ryu D, et al. The mitophagy activator urolithin A is safe and induces a molecular signature of improved mitochondrial and cellular health in humans [J]. Nat Metab, 2019, 1(6): 595-603.
[24] Dall M, Hassing A S, Treebak J T. NAD+ and NAFLD-caution, causality and careful optimism [J]. J Physiol, 2022, 600(5): 1135-1154.
[25] 潘琳琳， 相宏杰， 刘桂荣． 理脾降浊方通过调控 HIF-1α/PPARγ/BNIP3 线粒体自噬途径改善小鼠非酒精性脂肪肝的机制研究 [J]． 时珍国医国药， 2024， 35（8）： 1862-1867．
Pan L L, Xiang H J, Liu G R. Mechanism study of Li Pi Jiang Zhuo Formula improving non-alcoholic fatty liver in mice by regulating the HIF-1α/PPARγ/BNIP3 mitophagy pathway [J]. Lishizhen Med Materia Med Res, 2024, 35(8): 1862-1867.
[26] Yang J, Tao D, Wei M A, et al. Protective effects and mechanisms of Lizhong decoction against non-alcoholic fatty liver disease in a rat model [J]. J Tradit Chin Med, 2022, 42(5): 773-780.
[27] 徐叔云， 卞如濂， 陈修． 药理实验方法学 [M]． 北京： 人民卫生出版社， 2003： 203-206．
Xu S Y, Bian R L, Chen X. Pharmacological Experimental Methodology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003: 203-206.
[28] Choubey V, Zeb A, Kaasik A. Molecular mechanisms and regulation of mammalian mitophagy [J]. Cells, 2021, 11(1): 38.
[29] Paoli A, Cerullo G. Investigating the link between ketogenic diet, NAFLD, mitochondria, and oxidative stress: a narrative review [J]. Antioxidants (Basel), 2023, 12(5): 1065.
[30] Narendra D P, Jin S M, Tanaka A, et al. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin [J]. PLoS Biol, 2010, 8(1): e1000298.
[31] Fang Z, Liu G, Zhu M, et al. Low abundance of mitophagy markers is associated with reactive oxygen species overproduction in cows with fatty liver and causes reactive oxygen species overproduction and lipid accumulation in calf hepatocytes [J]. J Dairy Sci, 2022, 105(9): 7829-7841.
[32] Zhang H, You Y, Xu J, et al. New sesquiterpenes and viridin derivatives from Penicillium sp. Ameliorates NAFLD by regulating the PINK1/Parkin mitophagy pathway [J]. Bioorg Chem, 2024, 151: 107656.
[33] Li W, Cai Z, Schindler F, et al. Elevated PINK1/Parkin-dependent mitophagy and boosted mitochondrial function mediate protection of HepG2 cells from excess palmitic acid by hesperetin [J]. J Agric Food Chem, 2024, 72(23): 13039-13053.
[34] Chen S, Lu H, Yin G, et al. Hesperitin prevents non-alcoholic steatohepatitis by modulating mitochondrial dynamics and mitophagy via the AMPKα-Drp1/PINK1-Parkin signaling pathway [J]. Biochim Biophys Acta BBA Mol Cell Biol Lipds, 2025, 1870(1): 159570.
[35] He J, Qian Y C, Yin Y C, et al. Polydatin: a potential NAFLD therapeutic drug that regulates mitochondrial autophagy through SIRT3-FOXO3-BNIP3 and PINK1-PRKN mechanisms-a network pharmacology and experimental investigation [J]. Chem Biol Interact, 2024, 398: 111110.
[36] 安祯祥， 何远利， 王芳， 等． 扶脾柔肝方及拆方对肝纤维化大鼠肝组织线粒体自噬相关蛋白表达的影响 [J]． 中华中医药学刊， 2022， 40（2）： 11-15， 15-18．
An Z X， He Y L， Wang F， et al． Effects of Fupi Rougan formula（扶脾柔肝方）and its splited prescriptions on expressions of mitochondrial autophagy-related proteins in liver tissues of hepatic fibrosis rats [J]． Chin Arch Tradit Chin Med， 2022， 40（2）： 11-15， 15-18．

[37] 廖加抱， 宋云， 王斯， 等． 健肝消脂方调控 PINK1/Parkin 通路介导的线粒体自噬治疗非酒精性脂肪肝 [J]． 浙江中医药大学学报， 2024， 48（8）： 905-914．
Liao J B, Song Y, Wang S, et al. Jian'gan Xiaozhi decoction regulates PINK1/Parkin pathway mediated mitochondrial autophagy to treat non-alcoholic fatty liver disease [J]. J Zhejiang Chin Med Univ, 2024, 48(8): 905-914.
[38] 刘谢． 健脾化浊膏治疗脾虚湿盛型失代偿期肝硬化腹水的临床观察 [D]． 南宁： 广西中医药大学， 2021： 11．
Liu X. Clinical observation of Jianpi Huazhuo Paste in treating spleen deficiency with dampness exuberance type decompensated liver cirrhosis with ascites [D]. Nanning: Guangxi University of Chinese Medicine, 2021: 11