

基于转录组学的小青龙汤抑制中性粒细胞胞外诱捕网改善哮喘小鼠气道炎症研究

张杨筱妮^{1,2,3}, 张钊淳^{2,3}, 卢月^{2,3}, 古芯菱^{2,3}, 杨秋雨^{2,3}, 郑文江², 聂慧¹, 李常¹, 严倩^{1,2,4,5,6*}, 王雄文^{1,2,4*}

1. 广州中医药大学第一附属医院重庆医院, 重庆 400700

2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405

3. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东 广州 510405

4. 广东省中医临床研究院, 广东 广州 510405

5. 岭南医学研究中心, 广东 广州 510405

6. 中医证候全国重点实验室, 广东 广州 510120

摘要: **目的** 探讨小青龙汤通过抑制中性粒细胞胞外诱捕网 (NETs) 形成改善哮喘小鼠气道炎症的作用机制。**方法** BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组、小青龙汤 (7.02 g·kg⁻¹) 组, 除对照组外, 采用卵清蛋白 (OVA) 和完全弗氏佐剂 (CFA) 联合构建哮喘小鼠模型, 造模 14~20 d 每天使用 5% OVA 进行雾化, 每天进行 40 min, 小青龙汤组雾化前 1 h ig 小青龙汤 7.02 g·kg⁻¹, 对照组和模型组 ig 同等剂量的 0.9% 氯化钠溶液。通过苏木素-伊红 (HE)、Masson 染色观察小鼠肺组织气道炎症及胶原沉积; ELISA 法检测血清免疫球蛋白 E (IgE)、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、髓过氧化物酶 (MPO) 水平; 转录组学测序结合 K-means 聚类筛选核心通路及差异基因; 免疫荧光、免疫组化和 Western blotting 验证肺组织 NETs 形成。**结果** 与模型组比较, 小鼠肺组织病理状态明显改善, 肺泡扩张与结构破坏减轻, 气道及肺间质炎症浸润减少, HE 分数显著降低 ($P < 0.01$); 气道纤维化病理改变有所缓解, 表现为蓝染范围减小, 胶原纤维沉积水平显著降低 ($P < 0.01$); 血清中 MPO、IgE 和 TNF- α 含量明显降低 ($P < 0.001$); RNA-seq 结合 K-means 聚类分析提示, 小青龙汤干预效应与中性粒细胞活化及 NETs 相关通路密切相关, MPO、基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、环磷酸腺苷 (CAMP)、纤维蛋白原 A (FGA) 等可能参与其调控过程; 小青龙汤可显著降低肺组织气道周围 MPO、中性粒细胞弹性蛋白酶 (NE) 荧光信号 ($P < 0.01$ 、0.001); 显著降低肺组织气道周围 MPO、肽基精氨酸脱亚氨酶 4 (PADI4) 阳性面积 ($P < 0.01$ 、0.001); 显著降低肺组织中 NETs 通路相关的 NE、CAMP、MPO、PADI4、MMP9、FGA 蛋白相对表达量 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。**结论** 小青龙汤可通过抑制 NETs 相关炎症反应改善哮喘小鼠的气道炎症。

关键词: 小青龙汤; 中性粒细胞胞外诱捕网; 哮喘; 气道炎症; 髓过氧化物酶

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2026)09-3053-13

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.09.007

Study of Xiaqinglong Decoction in improving airway inflammation in asthmatic mice by inhibiting neutrophil extracellular traps formation based on transcriptomics

ZHANG Yangxiaoni^{1,2,3}, ZHANG Zhaochun^{2,3}, LU Yue^{2,3}, GU Xinling^{2,3}, YANG Qiuyu^{2,3}, ZHENG Wenjiang², NIE Hui¹, LI Chang¹, YAN Qian^{1,2,4,5,6}, WANG Xiongwen^{1,2,4}

1. The First Affiliated Hospital (Chongqing Branch) of Guangzhou University of Chinese Medicine, Chongqing 400700, China

2. First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

3. The First Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

收稿日期: 2026-03-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82608616); 重庆市中医药创新团队项目 (渝卫办白头 (2024) 570); 广东省基础与应用基础研究基金面上项目 (批准号 2026A1515011888); 广东省中医药局科研课题 (20254036); 国家资助博士后研究人员计划 (B 档, GZB20250913); 中国博士后科学基金面上项目 (2024M760670); 广州中医药大学 2025 年度校级创新创业训练项目 (202510572334)

作者简介: 张杨筱妮, 本科生, 研究方向为中西医结合防治呼吸系统疾病。E-mail: 19065339609@163.com

***通信作者:** 王雄文, 主任医师, 博士生导师, 主要从事呼吸系统疾病的中西医结合研究。E-mail: wangxiongwen@gzucm.edu.cn

严倩, 博士后, 主要从事呼吸系统疾病的中西医结合研究。E-mail: yanqian@gzucm.edu.cn

4. Guangdong Provincial Academy of Chinese Medical Clinical Research, Guangzhou 510405, China

5. Lingnan Medical Research Center, Guangzhou 510405, China

6. National Key Laboratory of Chinese Medicine Syndromes, Guangzhou 510120, China

Abstract: Objective To investigate the effect and molecular mechanism of Xiaoqinglong Decoction in improving airway inflammation in asthmatic mice by regulating the neutrophil extracellular traps (NETs) pathway. **Methods** BALB/c mice were randomly divided into control, model, and Xiaoqinglong Decoction groups ($7.02 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). Except for the control group, asthma models were induced using ovalbumin (OVA) and complete Freund's adjuvant (CFA). From day 14 to 20 after modeling, mice received daily nebulization with 5% OVA for 40 min. The Xiaoqinglong Decoction group was administered Xiaoqinglong Decoction orally at $7.02 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ one hour before nebulization, while the control and model groups received an equivalent volume of 0.9% saline solution. Lung tissue was stained with hematoxylin-eosin (HE) and Masson trichrome to evaluate airway inflammation and collagen deposition. Serum levels of immunoglobulin E (IgE), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and myeloperoxidase (MPO) were measured by ELISA. RNA sequencing combined with K-means clustering was used to identify key pathways and differentially expressed genes. Immunofluorescence, immunohistochemistry, and Western blotting were employed to validate NET formation in lung tissues. **Results** Compared with the model group, the pathological condition of lung tissue in the Xiaoqinglong Decoction group showed significant improvement, including reduced alveolar dilation and structural damage, decreased inflammatory infiltration in airways and interstitium, and significantly lower HE scores ($P < 0.01$). Pathological changes associated with airway fibrosis were alleviated, as indicated by reduced blue-stained areas and significantly decreased collagen fiber deposition ($P < 0.01$). Serum levels of MPO, IgE, and TNF- α were markedly reduced ($P < 0.001$). RNA-seq analysis combined with K-means clustering revealed that the therapeutic effect of Xiaoqinglong Decoction is closely related to pathways involving neutrophil activation and NET formation, with MPO, matrix metalloproteinase 9 (MMP9), cyclic AMP (cAMP), and fibrinogen alpha (FGA) potentially involved in its regulation. Xiaoqinglong Decoction significantly reduced fluorescent signals of MPO and neutrophil elastase (NE) around airways in lung tissue ($P < 0.01$, 0.001), significantly decreased positive staining areas of MPO and peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) ($P < 0.01$, 0.001), and significantly downregulated the relative protein expression levels of NE, cAMP, MPO, PADI4, MMP9, and FGA in lung tissue ($P < 0.05$, 0.01 , 0.001). **Conclusion** Xiaoqinglong Decoction can alleviate airway inflammation in asthmatic mice by inhibiting NETs-related inflammatory responses.

Key words: Xiaoqinglong Decoction; neutrophil extracellular traps; asthma; airway inflammation; myeloperoxidase

哮喘作为一种病因复杂的异质性呼吸道疾病，其病理生理核心涉及气道慢性炎症反应、气道高反应性状态及气道重塑等关键改变，过程涉及多种免疫细胞、炎症因子及信号通路协同调控^[1]。全球哮喘防治倡议（GINA）2025 报告^[2]显示，当前全球哮喘患病人数约 2.62 亿，患病率达 4.2%，且呈逐年上升趋势^[3]，造成沉重的疾病负担与社会经济压力。

中性粒细胞是机体固有免疫的主要效应细胞，是抵御病原体入侵的第一道防线^[4]，炎症状态下可被募集至气道，通过吞噬、脱颗粒、释放活性氧及形成中性粒细胞胞外诱捕网（NETs）等方式参与免疫应答^[5]。NETs 为 DNA-蛋白网状结构，可通过固定捕获病原体参与宿主防御^[6]，但其过度生成或未及时清除可直接损害周围组织，促进抗原呈递并激活免疫应答，引起体内炎症反应^[7]。NETs 还可以激活单核吞噬细胞系统，促进白细胞介素（IL）-1 β 分泌^[8]，进而募集更多中性粒细胞浸润肺组织，形成

炎症正反馈循环。研究证明，NETs 生成与降解失衡导致其在炎症部位异常蓄积^[9]，与哮喘、慢性阻塞性肺疾病、囊性纤维化等多种呼吸系统疾病密切相关^[10]，是调控哮喘气道炎症进展的关键靶点。

小青龙汤出自《伤寒论》，以止咳平喘、温肺化饮为主要功效，是中医临床治疗肺系疾病的经典方剂^[11]。现代药理研究发现，小青龙汤可通过抑制 LKB1/AMP 依赖的蛋白激酶（AMPK）通路改善过敏性哮喘小鼠气道炎症^[12]，且对中性粒细胞哮喘小鼠具有保护作用^[13]，提示其在不同哮喘模型中均具有稳定改善效果。临床研究表明，小青龙汤在改善哮喘患者肺通气功能、抑制气道黏液过度分泌方面具有显著疗效^[14]；体内动物实验证实，该方可降低哮喘大鼠血清肿瘤坏死因子（TNF）- α 、IL-13 等促炎因子水平，升高干扰素（IFN）- γ 水平^[15]，说明其可通过抗炎、抑制气道重塑、降低气道高反应性等途径减轻患者症状，然而小青龙汤是否能够通过

调控中性粒细胞 NETs 形成改善哮喘气道炎症, 目前尚缺乏直接实验依据。本研究旨在探讨小青龙汤通过调控 NETs 改善哮喘小鼠气道炎症的作用及靶点机制, 为临床应用提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

健康 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠, 6~8 周龄, 体重 20~22 g, 购自浙江维通利华公司, 实验动物生产许可证号为 SCXK(浙) 2024-0001, 饲养于广州中医药大学三元里校区动物实验中心, 室温控制在 20~26 °C, 湿度维持 40%~70%; 每天明暗各 12 h, 饮水为纯净水。实验期间, 允许动物自由摄食饮水。

本研究已通过广州中医药大学动物中心伦理审查委员会的审批, 伦理编号为 20250508009。

1.2 药物及主要试剂

甲醇(色谱纯, 德国 Merck 公司, 货号 106002, CAS 号 67-56-1); 乙腈(中国上海星可高纯溶剂有限公司, 货号 5011903, CAS 号 75-05-8); 甲酸(色谱纯, 中国上海 Aladdin 公司, 货号 F112032, CAS 号 64-18-6); 十六烷基-三甲基-溴化铵(CTAB)试剂[生工生物工程(上海)股份有限公司, 货号 A600108-0 500]; pBIOZOL 植物总 RNA 提取试剂(博日科技股份有限公司, 货号 BSC55M1); DNase I(无 RNase)(货号 M0303S)、DNase I Reaction Buffer(货号 B0303S), 美国 NEB 公司; VeZol Reagent(货号 R411-02)、Equalbit RNA BR Assay Kit(货号 EQ212-02)、VAHTS mRNA Capture Beads 2.0(货号 N403-C4)、VAHTS Universal V10 RNA-seq Library Prep Kit for Illumina (Premixed version)(货号 NR616-02)、VAHTS DNA Clean Beads(货号 N411-03)、Equalbit 1 x dsDNA HS Assay Kit(货号 EQ121-02), 中国诺唯赞公司; DEPC 处理水(货号 AM9920)、无核酸酶水(货号 AM9930), 美国 Thermo Fisher 公司; 苏木素-伊红(HE)染色液(货号 GP1074)、Masson 染色液(货号 GP1032), 中国塞维尔公司; 小鼠免疫球蛋白 E (IgE)、小鼠肿瘤坏死因子(TNF- α)酶联免疫吸附(ELISA)检测试剂盒(货号分别为 SYP-M0381、SYP-M0452), 环磷酸腺苷(cAMP)抗体、肽基精氨酸脱亚氨酶 4(PADI4)抗体、纤维蛋白原 A (FGA) 抗体(货号分别为 YP-mAb-18545、YP-mAb-18313、YP-Ab-06955), 武汉优品有限公司; 小鼠血清髓过氧化物酶

(MPO)抗体酶联免疫吸附(ELISA)检测试剂盒(中国联科生物, 货号 EK2133); MPO 抗体、GAPDH 抗体(美国 Proteintech 公司, 货号分别为 22225-1-AP、60004-1-Ig); 中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)抗体(美国 Affinity Biosciences 公司, 货号 AF0010); 基质金属蛋白酶 9 (MMP9) 抗体(中国 PTM BIO 公司, 货号 PTM-20061); β -actin 抗体(中国 Abmart 公司, 货号 M20011S)。

1.3 主要仪器

MS105DM 十万分之一电子天平(瑞士梅特勒托利多仪器有限公司); CentriVap 离心浓缩仪(美国 LABCONCO 公司); VORTEX-5 涡旋混合器(中国江苏 Kyllin-Bell 公司); KQ5200E 超声清洗仪(中国昆山超声仪器有限公司); RE-6000A 型、RE-52AA 型旋转蒸发器(中国上海亚荣生化仪器厂); 基因测序仪(美国因美纳公司); Qsep400 高通量核酸蛋白分析系统(中国台湾光鼎生物公司); SpectraMaxM2 多功能酶标仪(美国美谷分子公司); Qubit4.0 荧光定量仪(美国赛默飞世尔公司); 扩增仪(美国伯乐公司); 自动化建库工作站(中国华大智造公司); 冷冻离心机(德国艾本德公司); 球磨机(德国莱驰公司); 研磨仪(中国上海净信公司); 恒温振荡金属浴(中国天根生化科技公司); 病理扫描仪(中国江丰生物公司); Western blotting 凝胶电泳系统、多功能成像系统、T100™ Thermal Cycler 型逆转录合成仪(美国伯乐公司); Multiskan™ FC 型酶标仪、QuantStudio5 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Thermo Fisher 公司); Pannoramic MIDI 型数字病理切片扫描仪(匈牙利 3D Histech 公司); 手持式高速匀浆机(中国群安科技公司)。

2 方法

2.1 制备中药复方浓缩药液

小青龙汤参照全世健《方剂学》标准配伍: 麻黄 9 g、芍药 9 g、细辛 3 g、干姜 6 g、甘草 6 g、桂枝 9 g、五味子 3 g、半夏 9 g, 药品均购自广州中医药大学第一附属医院, 由医院药剂科出具合格报告, 全方总生药量为 54 g。70 kg 成人临床每日用量为 54 g, 按小鼠体表面积换算系数 9.1 计算, 小鼠临床等效剂量为 7.02 g·kg⁻¹。本课题组前期已进行剂量探索^[13], 该剂量下小鼠安全耐受且药效稳定。称取 4 剂处方量药材, 加水回流提取 2 次: 首次加 8 倍量水回流提取 1.5 h 并收集挥发油, 药渣再加 6

倍量水回流提取 1 h, 提取液经离心机和滤纸滤过后合并 2 次滤液, 于 55~60 °C 减压浓缩后, 加入挥发油混匀, 最终定容至 115 mL 后分装保存。将储存原液充分涡旋混匀, 精密移取少量原液, 冷冻干燥至恒重, 称量干浸膏质量, 计算得到小青龙汤水提提取率为 15.63 %。

2.2 小鼠哮喘模型的构建和药物干预

BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组、小青龙汤 (7.02 g·kg⁻¹) 组, 除对照组外, 根据前期团队已发表文献报道^[16], 制备 21 d 哮喘小鼠模型, 具体方法如下: 在第 0、7 天对小鼠进行致敏, 将卵清蛋白 (OVA) 20 μg 和完全弗氏佐剂 (CFA) 75 μL 混合后加盐水乳化, 每只小鼠 ip 300 μL 乳化液; 从第 14 天起至第 20 天每天使用 5% OVA 进行雾化, 每天进行 40 min, 小青龙汤组雾化前 1 h ig 小青龙汤 7.02 g·kg⁻¹, 对照组和模型组 ig 同等剂量的 0.9% 氯化钠溶液。雾化结束 24 h 后取材, 收集血液和肺组织用于后续分析。

2.3 小鼠样本处理

实验结束后, 小鼠禁食不禁水 12 h, 眼球取血; 血液于 4 °C、3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液分装后冻存于 -80 °C 冰箱。采血后收集小鼠肺组织, 取右肺最大叶完全浸泡于 4% 多聚甲醛溶液, 24 h 后制备石蜡切片。

2.4 苏木素-伊红 (HE) 和 Masson 染色

取肺组织经包埋、切片制成石蜡切片, 冲洗石蜡后行 HE 染色 (含脱水、透明、封片步骤)。取石蜡切片进行脱蜡至水处理后, 置于重铬酸钾溶液中浸泡过夜。次日, 依次进行铁苏木素染色、丽春红酸性品红染色、磷钼酸分化及苯胺蓝复染。上述染色流程结束后, 对切片进行梯度脱水处理与封片, 镜检后在江丰 KFBIO 数字切片扫描仪进行扫描分析。由 2 名经过培训的实验人员采用盲法独立阅片, 每张切片随机选取 3 个不重叠的气道视野, 参照文献报道^[17] 的哮喘小鼠病理 0~4 分半定量标准进行评分。

2.5 ELISA 检测血清细胞因子水平

按照说明书, 使用 ELISA 试剂盒分别检测血清中 MPO、TNF-α 和 IgE 的表达水平, 在多功能微孔板检测系统上检测相应吸光度 (A) 值, 结合标准曲线换算得出样本对应蛋白浓度。

2.6 转录组测序

2.6.1 总 RNA 提取、文库构建与高通量测序 提取小鼠肺组织总 RNA 时, 采用 Trizol 法进行样本

裂解与分离, 所得 RNA 沉淀经 DEPC 处理水溶解后, 分别利用 Qubit 荧光定量仪与 Qsep400 高通量生物片段分析仪对其浓度与完整性进行质控检测; 以 Oligo (dT) 磁珠富集 mRNA, 经片段化、链特异性反转录、末端修复、dA-Tailing、接头连接与片段筛选, 构建插入片段 250~350 bp 的测序文库, 文库经定量与片段大小检测合格后, 按有效浓度与数据量需求混合文库, 采用 Illumina 平台完成 150 bp 配对末端测序。

2.6.2 生物信息学分析 原始数据经 fastp 质控滤过获得 clean reads, 通过 HISAT 比对至参考基因组, featureCounts 计算 FPKM 表达量, 利用 R 中 “DESeq2” 包进行差异表达分析。取组间差异基因交集, 使用 Venny 2.1 在线工具 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 绘制韦恩图, 并将交集基因导入 String 数据库创建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 通过 Cytoscape 3.10.0 中的 Centiscape 插件计算节点度值并可视化网络, 依据度值筛选核心靶点基因。通过 R 中 “clusterProfiler” 包进行京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 功能分析和基因本体 (GO) 富集分析。使用 R 软件 scale 函数对显著差异基因进行标准化处理, K-means 聚类 (K=9) 筛选小青龙汤干预相关核心基因群。

2.7 免疫荧光检测 NETs 标志物表达水平

石蜡切片先脱蜡至水, 细胞爬片与涂片经固定、洗涤及破膜处理后, 石蜡切片进行抗原修复。所有样本均经血清封闭, 加入 MPO (1:500) 和 NE (1:200) 一抗 4 °C 孵育过夜, 再滴加对应荧光二抗室温避光孵育, DAPI 复染细胞核后, 抗荧光淬灭封片剂封片后镜检, 随后在江丰 KFBIO 数字切片扫描仪进行扫描分析。每张切片随机选取 3 个互不重叠的视野, 使用 Image J 拆分荧光通道并设置阈值, 采用平均灰度值反映荧光信号强度, 所得结果用于统计分析。

2.8 免疫组化检测

样本前期处理同免疫荧光, 所有样本均经内源性过氧化物酶阻断、血清封闭, 加入 MPO 抗体 (1:200) 和 PADI4 抗体 (1:200) 一抗 4 °C 孵育过夜, 再用对应二抗室温孵育, 经 DAB 显色、苏木素复染核后, 按样本类型脱水封片后镜检, 随后在江丰 KFBIO 数字切片扫描仪进行扫描分析。

2.9 Western blotting 检测

使用 RIPA 蛋白裂解缓冲液、蛋白酶抑制剂、

磷酸酶抑制剂对小鼠肺组织样品进行匀浆裂解, 获得组织蛋白提取液用于后续 Western blotting 检测。采用 BCA 蛋白定量法检测样本浓度后按照标准方案进行后续分析, 一抗分别为: MPO (1:3 500)、CAMP (1:1 000)、NE (1:1 000)、PADI4 (1:3 000)、GAPDH (1:1 000)、MMP9 (1:1 000)、FGA (1:1 000)、 β -actin (1:3 000), 以 GAPDH (1:5 000)、 β -actin (1:5 000) 作为内参。孵育一抗并洗涤结束后, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的对应二抗 (1:5 000), 室温避光孵育 1 h, 充分洗涤后采用 ECL 化学发光试剂, 置于化学凝胶成像系统中显影成像。使用 Image J 软件计算蛋白相对表达量。

2.10 统计分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并使用 GraphPad Prism 进行分析。双尾 t 检验用于比较两组之间的数据, 单因素方差分析 (one-way ANOVA) 用于 3 组及以上组间比较, 检验前已确认数据符合正态分布与方差齐性。

3 结果

3.1 小青龙汤减轻哮喘肺组织气道炎症和气道重塑

HE 染色结果 (图 1-A) 显示, 对照组小鼠肺组织结构完整, 支气管与肺泡形态规则, 炎性浸润呈阴性状态; 模型组肺组织出现显著病理改变, 表现为气道结构排列紊乱, 肺泡间距明显增宽, 气道壁及血管旁见显著的炎症细胞灶性浸润, 同时伴随肺局部扩张充血与水肿改变, HE 分数显著升高 ($P < 0.001$); 经小青龙汤干预后, 小鼠肺组织病理状态明显改善, 肺泡扩张与结构破坏减轻, 气道及肺间质炎症浸润减少, HE 分数显著降低 ($P < 0.01$)。

Masson 染色结果 (图 1-B) 显示, 对照组小鼠气道壁形态规整, 管壁周围几乎未见胶原纤维沉积; 与对照组比较, 模型组小鼠气道结构出现显著异常, 管壁呈明显紊乱状态, 镜下可见大面积蓝染区域, 胶原沉积量显著增多 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 经小青龙汤干预后, 气道纤维化病理改变有所缓解, 表现为蓝染范围减小, 胶原纤维沉积水平显著降低 ($P < 0.01$)。

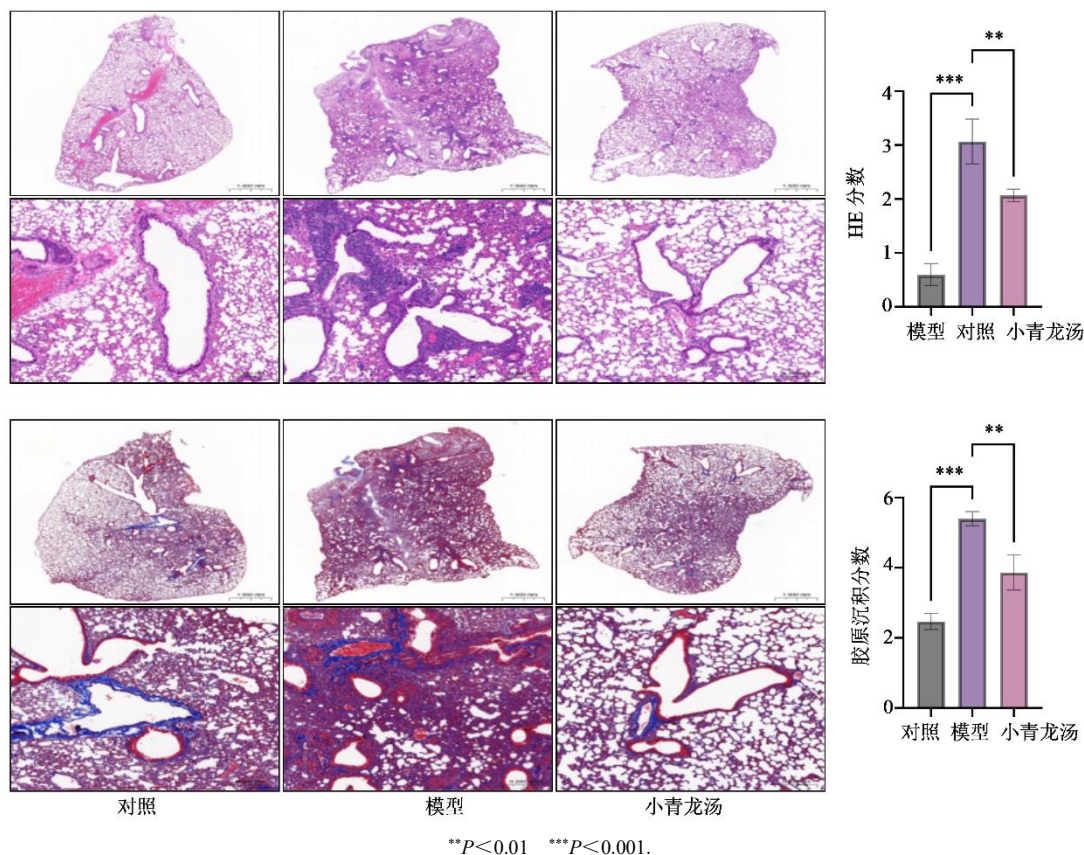


图 1 哮喘小鼠肺组织 HE (A)、Masson (B) 病理染色图 ($\times 40$ 、 $\times 100$) 及评分 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 1 HE (A) and Masson (B) staining images ($\times 40$, $\times 100$) and scores of lung tissues in asthmatic mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.2 小青龙汤减轻哮喘小鼠细胞炎症因子分泌

病理损伤改善直观反映药物疗效,为进一步评价小青龙汤对哮喘肺部炎症微环境的调控作用,对炎症相关指标进行检测(图2)。与对

照组比较,模型组小鼠血清中 MPO、IgE 和 TNF- α 含量明显升高($P<0.001$);与模型组比较,小青龙汤干预后可显著降低上述指标水平($P<0.001$)。

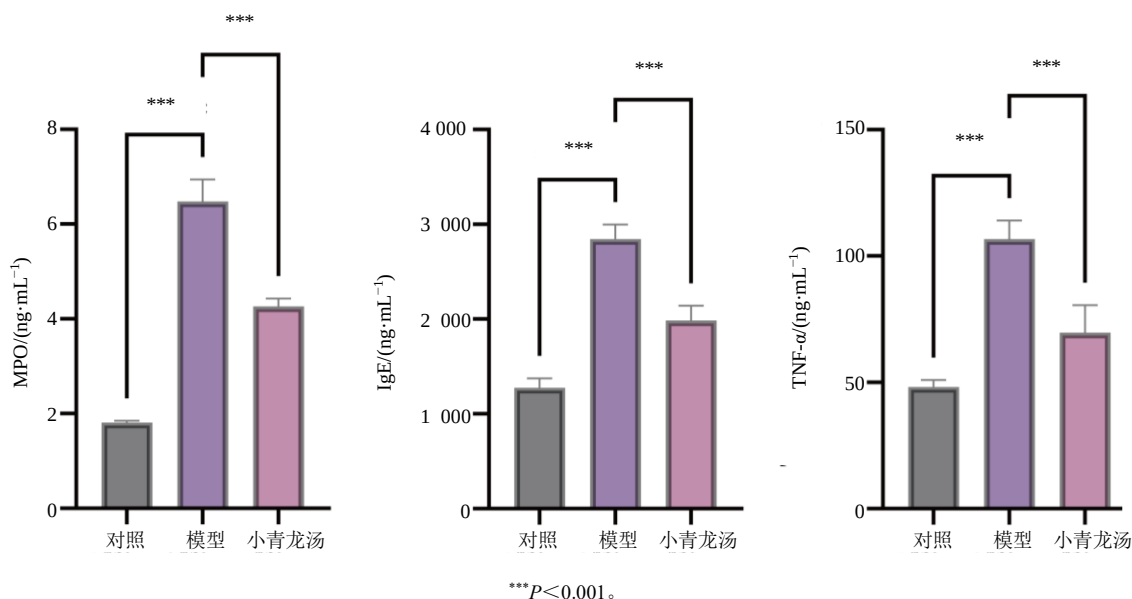


图2 哮喘小鼠血清炎症因子分析 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 2 Analysis of serum inflammatory factors in asthmatic mice ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

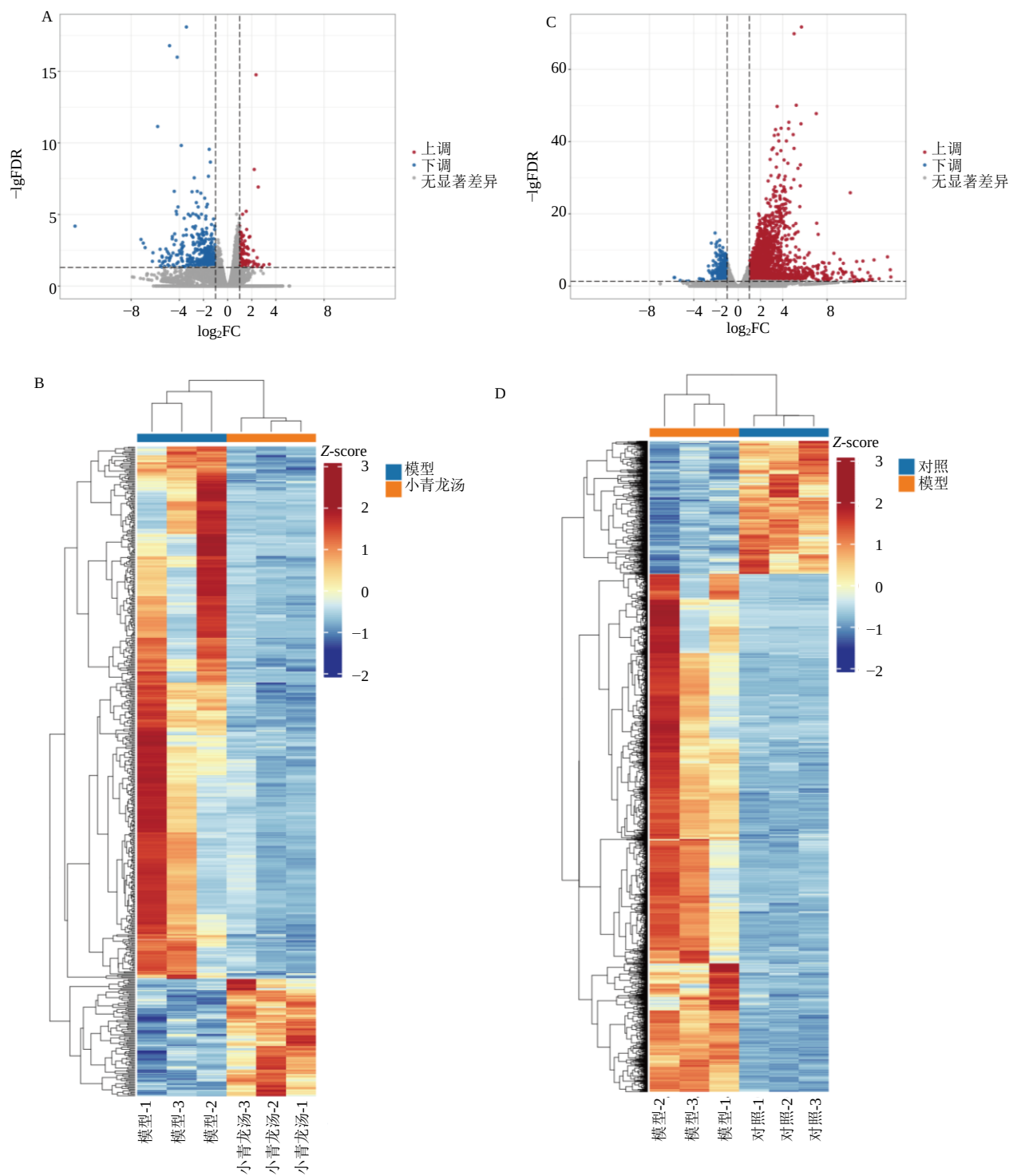
3.3 转录组测序揭示小青龙汤缓解气道炎症作用机制与 NETs 有关

3.3.1 差异基因筛选与富集分析揭示小青龙汤调控 NETs 通路改善气道炎症 为探究小青龙汤改善哮喘气道炎症的生物学机制,对肺组织进行 RNA-seq。对基因表达量标准化处理后计算 FPKM 值,分析基因表达分布及差异基因聚类,热图显示各组样本中差异表达基因(DEGs)的表达情况;与对照组相比,模型组有 2421 个 DEGs,与模型组比,小青龙汤组共筛选得到 581 个 DEGs,其中上调基因 105 个、下调基因 476 个,其余 23761 个基因表达无显著差异(图3)。

对 3 组之间的 DEGs 进行两两取交集分析,通过韦恩图筛选获得 3 组间共有 65 个 DEGs。对上述核心靶点构建 PPI 网络(图 4-A、B、C),根据节点连接度排序并筛选出 MPO、MMP9、MMP12、CD8A、CD19、基序趋化因子受体 2(CXCR2)、肽聚糖识别蛋白 1(PGLYRP1)、恶性脑肿瘤缺失蛋白 1(DMBT1)等分子为关键靶点。GO 富集显示,小青龙汤可调控“lymphocyte differentiation”“cytokine-mediated signaling pathway”“antibacterial humoral

response”等生物学过程(图 4-D);KEGG 富集提示其主要通过 NETs 通路、细胞因子-受体相互作用等通路改善哮喘气道炎症(图 4-F),其中 MPO、CAMP、纤维蛋白原 A(FGA)为 NETs 通路中的关键靶点。结果提示,小青龙汤对哮喘肺组织炎症微环境的调控可能与中性粒细胞活化及 NETs 形成密切相关,后续进一步围绕 NETs 相关标志物进行实验验证。

3.3.2 K-means 聚类核心基因亚群并验证 NETs 相关功能通路 为进一步解析小青龙汤对差异基因的调控模式,采用 K-means 聚类将其分为 9 个亚类,其中 Subclass 2、4、7 表达趋势与药物干预作用高度契合:模型组显著下调,给药后明显回升,提示该亚类基因为介导小青龙汤改善哮喘气道炎症的核心亚群(图 5-A)。GO 富集分析结果显示,Subclass 2 主要富集于抗氧化活性、过氧化物酶活性等 NETs 相关生物学过程(图 5-B);KEGG 通路富集分析结果表明,Subclass 4 显著富集于 NETs 通路、细胞因子-受体相互作用及 NF- κ B 信号通路等哮喘炎症关键通路(图 5-C)。综合转录组分析结果提示,小青龙汤缓解气道炎症作用机制可能与 NETs 有关。



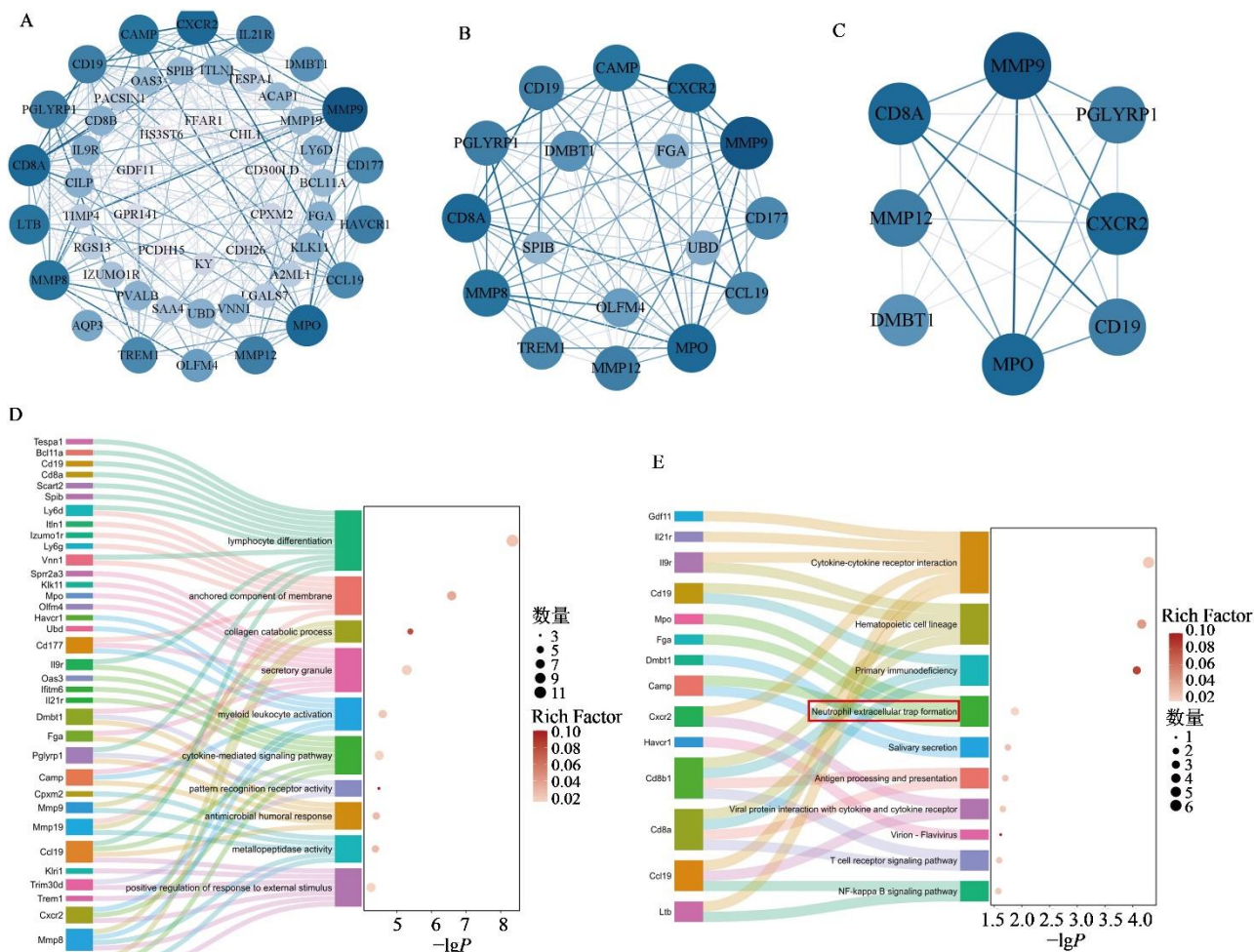
A、B-小青龙汤组和模型组差异基因火山图与聚类图；C、D-对照组和模型组差异基因火山图与聚类图。
A, B-volcano and cluster plots between Xiaoqinglong group and model group; C, D-volcano and cluster plots between control group and model group.

图 3 转录组差异基因分析结果
Fig. 3 Results of transcriptomic differential gene analysis

3.4 免疫荧光、免疫组化提示小青龙汤抑制哮喘小鼠肺组织 NETs 标志物表达水平

为进一步验证小青龙汤对哮喘 NETs 的调控作

用，对肺组织进行免疫荧光和免疫组化分析。研究结果显示，与对照组相比，模型组小鼠肺组织气道周围 MPO (图 6-A, $P < 0.001$)、NE (图 6-B, $P <$



A、B、C-PPI 筛选关键基因；D-GO 富集分析；E-KEGG 富集分析。
A, B, and C-Key genes screened by PPI; D-GO enrichment; E-KEGG enrichment.

图 4 3 组差异基因交集及富集分析结果

Fig. 4 Intersection and enrichment analysis of differentially expressed genes among three groups

0.001) 荧光信号显著增强, MPO 和 NE 均定位在胞浆; 与模型组相比, 小青龙汤可显著降低上述分子荧光强度 ($P < 0.01$ 、 0.001)。免疫组化结果表明, 与对照组相比, 模型组小鼠肺组织气道周围 MPO (图 6-C, $P < 0.01$)、PADI4 (图 6-D, $P < 0.001$) 阳性面积显著增加, 小青龙汤干预后上述分子表达水平显著下调 ($P < 0.01$ 、 0.001), 进一步验证了小青龙汤通过抑制 NETs 相关炎症细胞的浸润, 从而减轻哮喘小鼠气道炎症反应的分子机制。

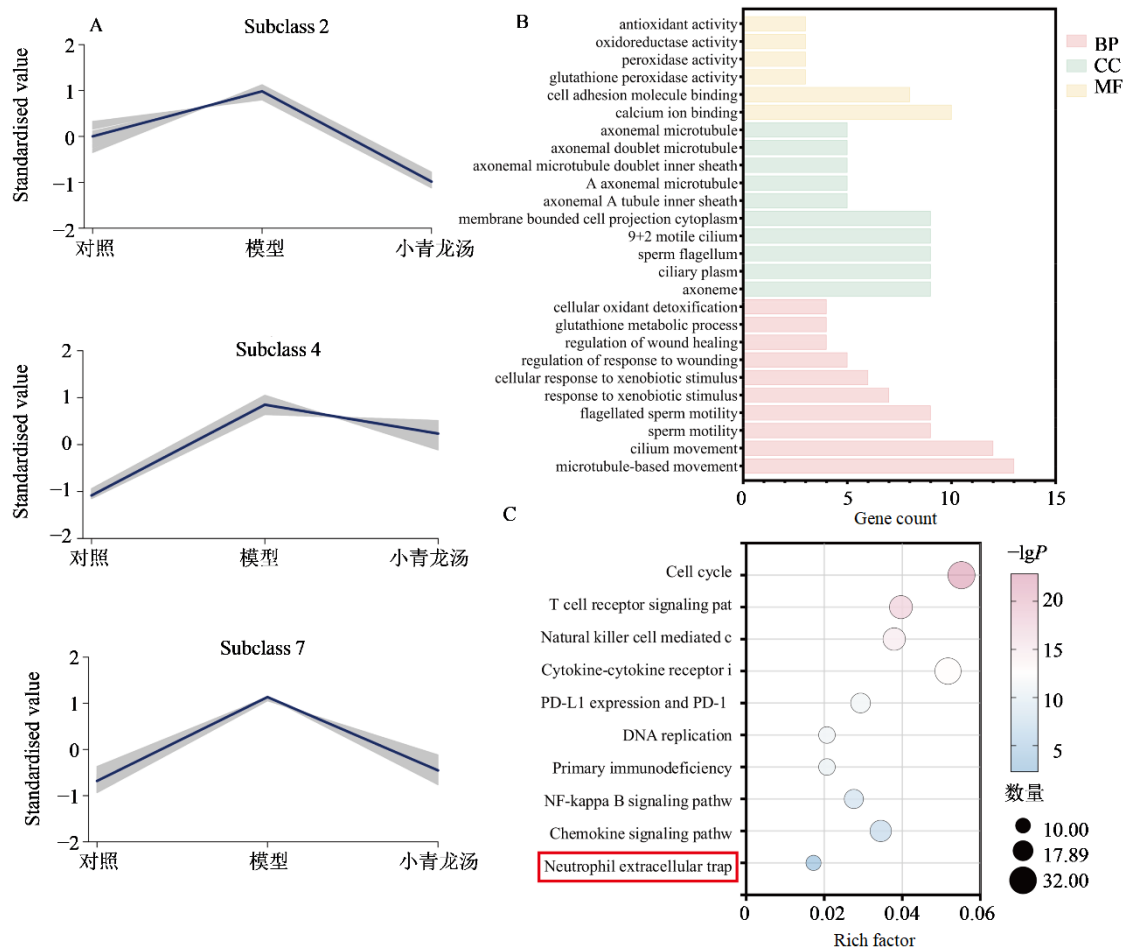
3.5 Western blotting 揭示小青龙汤对哮喘小鼠肺组织 NETs 相关标志物表达的抑制作用

采用 Western blotting 法检测各组小鼠肺组织中 NETs 相关蛋白的表达水平。结果显示 (图 7), 相较于对照组, 哮喘模型组小鼠肺组织中 NETs 通路相关的 NE、CAMP、MPO、PADI4、MMP9、FGA

蛋白相对表达量均显著上调 ($P < 0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, 给予小青龙汤治疗后, 上述指标的异常高表达得到了有效抑制 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 提示小青龙汤能够显著降低哮喘小鼠肺组织 NETs 通路相关蛋白表达, 其可能通过抑制 NETs 通路活性改善气道炎症。

4 讨论

哮喘是一类高度异质性的复杂气道疾病, 其高发病率、高病死率已成为全球性重大公共卫生问题^[18]。多数患者经吸入性糖皮质激素联合 β_2 受体激动剂治疗可获得较好疗效^[19], 但长期使用存在激素抵抗^[20]、骨质疏松^[21]等问题, 且中重度患者临床控制率偏低^[22], 停药后症状易复发, 亟须寻找安全有效的新型治疗策略。已有证据表明, 小青龙汤干预支气管哮喘急性发作期优势明确, 疗效显著且



A-Kmeans 聚类趋势; B-Subclass 2 的 GO 功能富集; C-Subclass 4 的 KEGG 通路富集。
A-Kmeans clustering trend; B-GO functional enrichment of Subclass 2; C-KEGG pathway enrichment of Subclass 4.

图 5 核心亚群基因富集分析结果

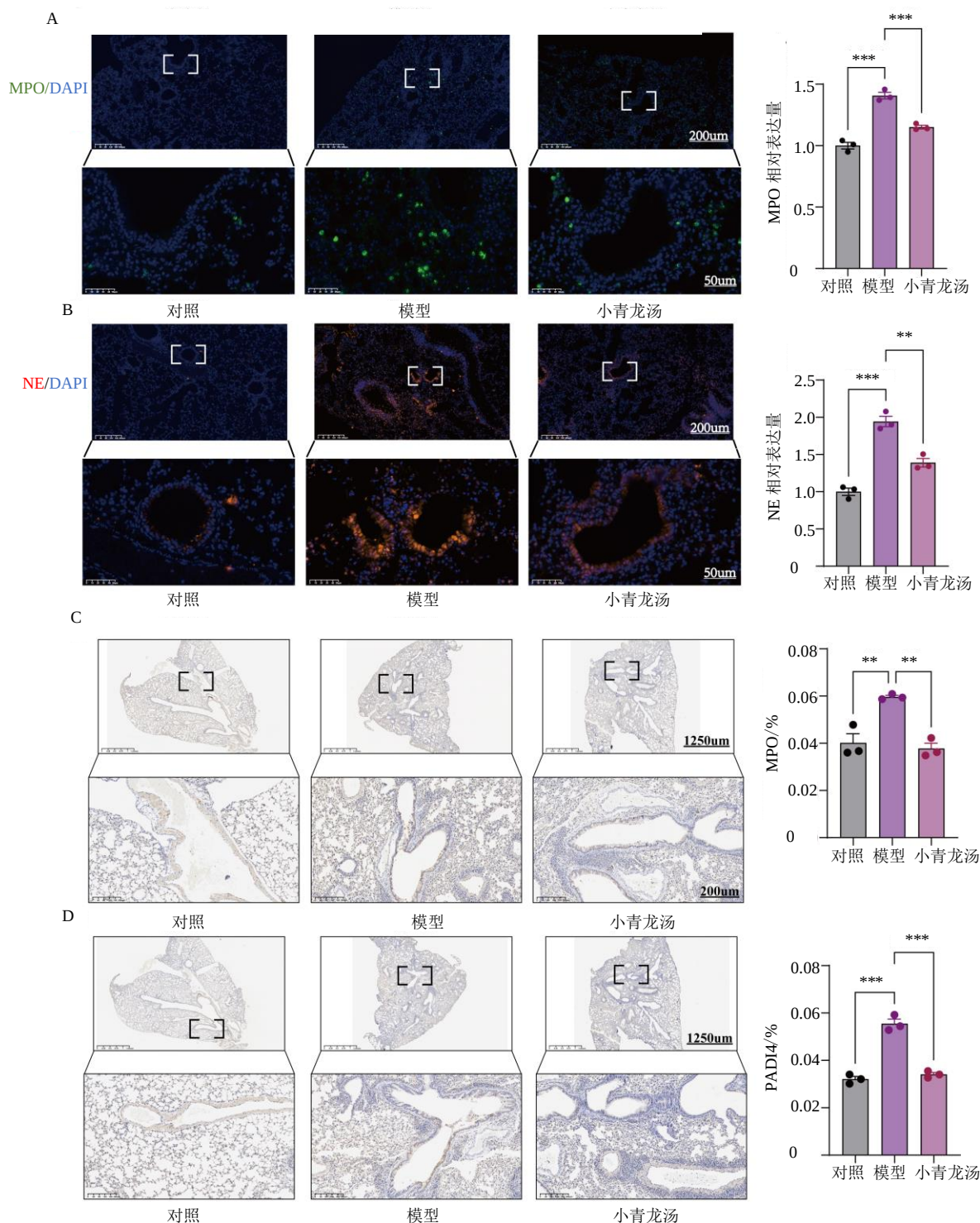
Fig. 5 Enrichment analysis of core subgroup genes

安全性良好^[23]。本研究造模通过 OVA/CFA 致敏联合 OVA 雾化激发构建哮喘小鼠模型, 结合病理染色、血清 ELISA、RNA-seq、Western blotting 以及免疫荧光、免疫组化等多种手段进行研究。

中医药治疗哮喘历史悠久, 中医学将哮喘归于“哮病”“喘证”“咳嗽”范畴, 临床常以小青龙汤加减治疗寒哮喘^[24]。现代药理研究表明, 小青龙汤可通过多通路发挥抗炎效应: 转录组学与分子对接整合分析证实, 其能协同抑制巨噬细胞介导的炎症及辣椒素受体 (TRPV1) 依赖的神经源性通路, 从而缓解过敏性鼻炎症状^[25]; 网络药理学与蛋白质组学整合研究亦发现, 该方可通过抑制铁死亡途径改善中性粒细胞型哮喘^[13]。本研究 HE 染色结果显示, 小青龙汤干预后小鼠肺组织炎症细胞浸润明显减少, Masson 染色证实气道胶原沉积降低, ELISA 结果显示血清 IgE、TNF- α 等促炎因子水平显著下调,

提示小青龙汤可减轻哮喘气道结构损伤与重塑进程。在此基础上, 通过转录组学筛选差异基因并进行 K-means 聚类分析, 锁定 NETs 为核心调控通路, 并进一步开展动物实验验证, 与已有研究形成互补, 丰富了小青龙汤干预哮喘多途径、多靶点的作用机制。

近年研究表明, NETs 的过度生成是哮喘病理进展的关键驱动因素, 且循环 NETs 水平与哮喘严重程度强相关^[26]。本研究采用免疫荧光、免疫组化及 Western blotting 多种技术检测哮喘模型小鼠肺组织, 模型组小鼠肺组织中 NETs 标志物 MPO、NE、PADI4、MMP9、FGA、CAMP 的表达水平显著升高; 小青龙汤干预后上述指标均明显下调, 提示小青龙汤可有效抑制肺组织 NETs 的形成进而改善气道炎症。NETs 的形成受多分子精密调控, 依赖组蛋白、MPO 的酶促作用^[27], NE 可在 NETs 形成早期



A、B-MPO、NE 免疫荧光染色及相对荧光强度统计($\times 50$ 、 $\times 400$); C、D-MPO、PADI4 免疫组化染色及阳性面积统计($\times 40$ 、 $\times 200$); ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。
A, B-Immunofluorescence staining and relative fluorescence intensity of MPO and NE ($\times 50$, $\times 400$); C, D- Immunohistochemical staining and positive area of MPO and PADI4 ($\times 40$, $\times 200$); ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$.

图 6 小青龙汤抑制哮喘小鼠 NETs 标志物表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Effects of Xiaoqinglong Decoction on NETs markers in asthmatic mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

特异性切割组蛋白，打破染色质致密结构；MPO 则结合组蛋白并协同 NE 进一步促进染色质解聚^[28]。

既往研究显示，MPO 和 NE 缺乏均会导致染色质解聚障碍、NETs 释放受阻^[29]，提示二者为 NETs 形成

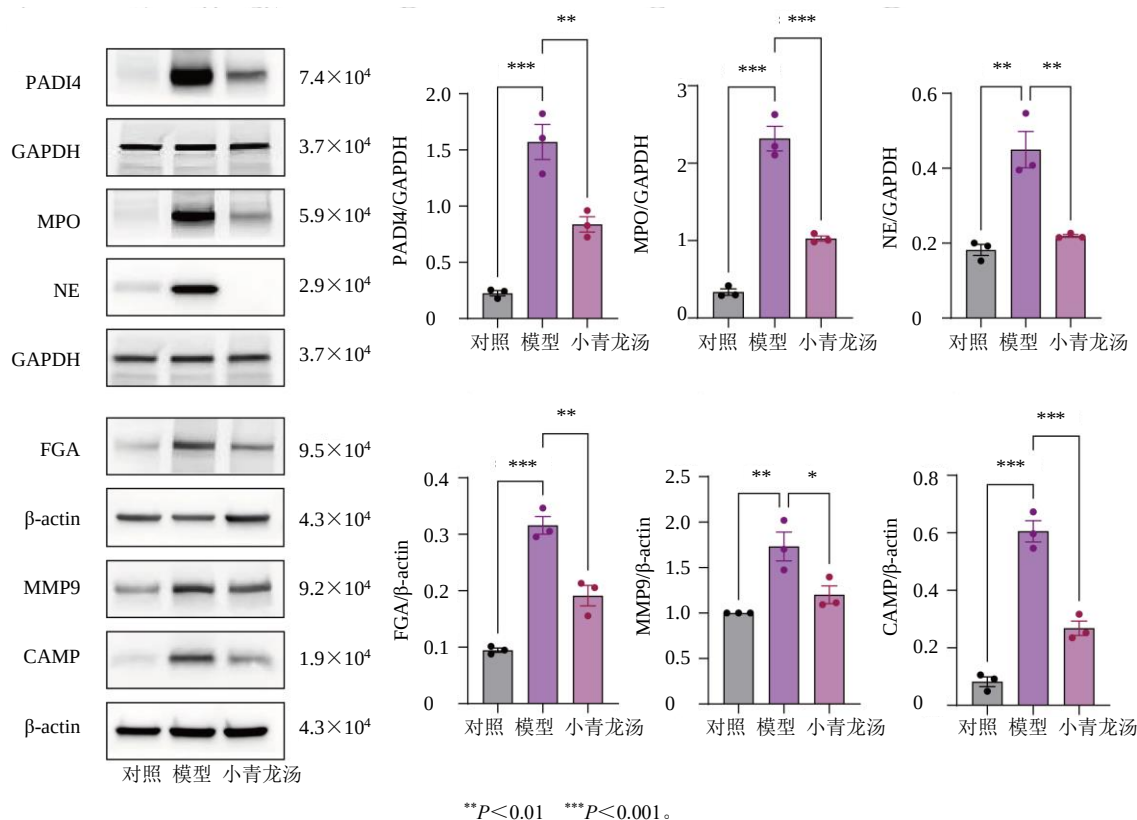


图 7 各组小鼠肺组织 NETs 通路相关蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 7 Comparison of NETs pathway-related proteins in mouse lung tissues ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

的重要调控分子。组蛋白瓜氨酸化水平增高同样参与 NETs 形成过程中的染色质解缩，组蛋白精氨酸或单甲基化精氨酸转化为瓜氨酸残基的过程由 PADI4 催化，PADI4 敲除可使中性粒细胞无法发生组蛋白 H3 瓜氨酸化，阻碍染色质解缩进而显著抑制 NETs 释放^[30]。已有研究还发现，人类和小鼠中性粒细胞的 NETs 释放均受 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体调控^[31-32]，NLRP3 在中性粒细胞中的激活与嗜天青颗粒及明胶酶颗粒的释放密切相关，后者含有 MMP-9^[33]，后续动物实验进一步证实 MMP-9 释放与 NLRP3 活化存在关联^[34]，敲低或抑制 MMP-9 可显著减少 NETs 形成^[35]。CAMP 是一类重要的抗菌肽，其在人体内的成熟活性肽为 LL-37^[36]。研究表明，哮喘患者体内该分子表达显著异常^[37]，在 NETs 微环境中可介导炎症小体 NLRP3 活化，进一步促进炎症和 NETs 释放^[38]。FGA 编码纤维蛋白原 A α 链，是纤维蛋白原的重要组成部分，在离子霉素刺激下可在中性粒细胞表面聚集，进而显著抑制 NETs 相关炎症反应^[39]。上述分子共同参与调控 NETs 形成与中性粒细胞活化，在哮喘气道炎症的发生发展中

发挥关键作用。

本研究将小青龙汤改善哮喘气道炎症的机制聚焦于 NETs 形成，证实其可靶向调控 MPO、MMP-9、CAMP、FGA、PADI4 及 NE 等关键分子表达，为小青龙汤的临床应用及相关机制研究提供了实验依据与理论支撑。同时，本研究也存在一定局限性：仅采用临床等效剂量进行干预，未设置低、中、高剂量梯度以探讨量效关系；受实验条件限制，未开展小鼠肺功能检测，缺少功能学层面的疗效评价。后续可通过增设不同剂量梯度及完善肺功能检测等方式，系统开展量效关系研究并完善机制验证，进一步明确小青龙汤调控 NETs 通路的物质基础与作用规律，完善本研究的不足之处。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Olsthoorn S E M, van Krimpen A, Hendriks R W, et al. Chronic inflammation in asthma: Looking beyond the Th2 cell [J]. Immunol Rev, 2025, 330(1): e70010.
- [2] Asthma G I F. 2025 GINA Strategy Report-Global Initiative for Asthma-GINA [EB/OL]. (2025-05-06) [2025-12-13]. <https://ginasthma.org/2025-gina-strategy->

- report/.
- [3] Huang K W, Yang T, Xu J Y, et al. Prevalence, risk factors, and management of asthma in China: A national cross-sectional study [J]. *Lancet*, 2019, 394(10196): 407-418.
- [4] Hidalgo A, Chilvers E R, Summers C, et al. The neutrophil life cycle [J]. *Trends Immunol*, 2019, 40(7): 584-597.
- [5] Wang H, Kim S J, Lei Y, et al. Neutrophil extracellular traps in homeostasis and disease [J]. *Sig Transduct Target Ther*, 2024, 9: 235.
- [6] Driouich A, Smith C, Ropitiaux M, et al. Root extracellular traps versus neutrophil extracellular traps in host defence, a case of functional convergence [J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2019, 94(5): 1685-1700.
- [7] Radic M, Marion T N. Neutrophil extracellular chromatin traps connect innate immune response to autoimmunity [J]. *Semin Immunopathol*, 2013, 35(4): 465-480.
- [8] Lachowicz-Scroggins M E, Dunican E M, Charbit A R, et al. Extracellular DNA, neutrophil extracellular traps, and inflammasome activation in severe asthma [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 199(9): 1076-1085.
- [9] Xiang J Y, Cui M Y, Zhang Y L. Neutrophil extracellular traps and neutrophilic asthma [J]. *Respir Med*, 2025, 245: 108150.
- [10] Morán G, Uberti B, Quiroga J. Role of cellular metabolism in the formation of neutrophil extracellular traps in airway diseases [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 850416.
- [11] 贾波, 许二平. 方剂学 [M]. 第 3 版. 北京: 中国中医药出版社, 2021: 33.
Jia B, Xu E P. *Science of Prescription Formulas* [M]. 3rd Edition. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2021: 33.
- [12] 徐心悦, 李梦俊, 步苏芹. 基于 LKB1/AMPK 通路探讨小青龙汤对过敏性哮喘小鼠气道炎症的影响 [J]. *临床合理用药*, 2025, 18(32): 28-31, 39, 181.
Xu X Y, Li M J, Bu S Q. Exploring the effect of Xiaoqinglong Tang on airway inflammation in allergic asthma mice based on LKB1/AMPK pathway [J]. *Chin J Clin Ration Drug Use*, 2025, 18(32): 28-31, 39, 181.
- [13] Liao G, Yan Q, Zhang M F, et al. Integrative analysis of network pharmacology and proteomics reveal the protective effect of Xiaoqinglong Decotion on neutrophilic asthma [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 330: 118102.
- [14] 王瑞艳. 小青龙汤对支气管哮喘患者神经肽物质及气道黏液高分泌的影响研究 [J]. *中国医学创新*, 2025, 22(10): 83-86.
Wang R Y. Study on the effects of xiaoqinglong decoction on neuropeptide substance and airway mucus hypersecretion in patients with bronchial asthma [J]. *Med Innov China*, 2025, 22(10): 83-86.
- [15] 王彬, 赵明哲, 孙羽扬, 等. 小青龙汤干预哮喘寒饮蕴肺证气道炎症的机制研究 [J]. *中国药房*, 2025, 36(13): 1574-1580.
Wang B, Zhao M Z, Sun Y Y, et al. Study on the mechanism of Xiaoqinglong decoction in intervening in airway inflammation of asthma with syndrome of cold retention accumulation in lung [J]. *China Pharm*, 2025, 36(13): 1574-1580.
- [16] Yan Q, Zhang X X, Xie Y, et al. Bronchial epithelial transcriptomics and experimental validation reveal asthma severity-related neutrophilic signatures and potential treatments [J]. *Commun Biol*, 2024, 7(1): 181.
- [17] Xing Q Q, Liu L W, Zhao X, et al. Serum proteomics analysis based on label-free revealed the protective effect of Chinese herbal formula Gu-Ben-Fang-Xiao [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 119: 109390.
- [18] WHO. Asthma [EB/OL]. (2026-04-28) [2026-05-17]. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/asthma>.
- [19] Hong G H, Kwon H S, Lee K Y, et al. hMSCs suppress neutrophil-dominant airway inflammation in a murine model of asthma [J]. *Exp Mol Med*, 2017, 49(1): e288.
- [20] Peters M C, Kerr S, Dunican E M, et al. Refractory airway type 2 inflammation in a large subgroup of asthmatic patients treated with inhaled corticosteroids [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2019, 143(1): 104-113.e14.
- [21] Chalitsios C V, McKeever T M, Shaw D E. Incidence of osteoporosis and fragility fractures in asthma: A UK population-based matched cohort study [J]. *Eur Respir J*, 2021, 57(1). DOI:10.1183/13993003.01251-2020.
- [22] Oba Y, Anwer S, Patel T, et al. Addition of long-acting beta2 agonists or long-acting muscarinic antagonists versus doubling the dose of inhaled corticosteroids (ICS) in adolescents and adults with uncontrolled asthma with medium dose ICS: A systematic review and network meta-analysis [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2023, 8(8): CD013797.
- [23] 周英杰, 秦帅, 田春燕, 等. 小青龙汤干预支气管哮喘急性发作期系统评价/Meta 分析的再评价 [J]. *中国中医急症*, 2023, 32(10): 1707-1712, 1732.
Zhou Y J, Qin S, Tian C Y, et al. Xiaoqinglong decoction intervention in acute attack stage of bronchial asthma: A systematic review/Meta-analysis re-evaluation [J]. *J Emerg Tradit Chin Med*, 2023, 32(10): 1707-1712, 1732.
- [24] 张景祖. 小青龙汤治疗支气管哮喘研究进展 [J]. *光明中医*, 2021, 36(21): 3738-3738, F0003, F0004.
Zhang J Z. Research progress of Xiaoqinglong decoction

- in treating bronchial asthma [J]. *Guangming J Chin Med*, 2021, 36(21): 3738-3738, F0003, F0004.
- [25] Zhou L, Huang L Y, He G F, et al. Xiao-Qing-Long-Tang alleviates allergic rhinitis by inhibiting M1 macrophage polarization and modulating the TRPV1 channel [J]. *Phytomedicine*, 2026, 150: 157732.
- [26] Granger V, Taillé C, Roach D, et al. Circulating neutrophil and eosinophil extracellular traps are markers of severe asthma [J]. *Allergy*, 2020, 75(3): 699-702.
- [27] Sørensen O E, Borregaard N. Neutrophil extracellular traps: The dark side of neutrophils [J]. *J Clin Investig*, 2016, 126(5): 1612-1620.
- [28] Papayannopoulos V, Metzler K D, Hakkim A, et al. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps [J]. *J Cell Biol*, 2010, 191(3): 677-691.
- [29] Laine C M, Bailey E F. Common synaptic input to the human hypoglossal motor nucleus [J]. *J Neurophysiol*, 2011, 105(1): 380-387.
- [30] Li P X, Li M, Lindberg M R, et al. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps [J]. *J Exp Med*, 2010, 207(9): 1853-1862.
- [31] Münzer P, Negro R, Fukui S, et al. NLRP3 inflammasome assembly in neutrophils is supported by PAD4 and promotes NETosis under sterile conditions [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 683803.
- [32] Shimizu H, Sakimoto T, Yamagami S. Pro-inflammatory role of NLRP3 inflammasome in experimental sterile corneal inflammation [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 9596.
- [33] Johnson J L, Ramadass M, Haimovich A, et al. Increased neutrophil secretion induced by NLRP3 mutation links the inflammasome to azurophilic granule exocytosis [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 507
- [34] Ren P P, Wu D, Appel R, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome with inhibitor MCC950 prevents aortic aneurysms and dissections in mice [J]. *J Am Heart Assoc*, 2020, 9(7): e014044.
- [35] Leal V N C, Bork F, Mateo Tortola M, et al. Bruton's tyrosine kinase (BTK) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) regulate NLRP3 inflammasome-dependent cytokine and neutrophil extracellular trap responses in primary neutrophils [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2025, 155(2): 569-582.
- [36] Li Y, Chu X J, Liu C B, et al. Exogenous murine antimicrobial peptide CRAMP significantly exacerbates Ovalbumin-induced airway inflammation but ameliorates oxazolone-induced intestinal colitis in BALB/c mice [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2018, 14(1): 146-158.
- [37] Xiao W, Hsu Y P, Ishizaka A, et al. Sputum cathelicidin, urokinase plasminogen activation system components, and cytokines discriminate cystic fibrosis, COPD, and asthma inflammation [J]. *Chest*, 2005, 128(4): 2316-2326.
- [38] Kahlenberg J M, Carmona-Rivera C, Smith C K, et al. Neutrophil extracellular trap-associated protein activation of the NLRP3 inflammasome is enhanced in lupus macrophages [J]. *J Immunol*, 2013, 190(3): 1217-1226.
- [39] Locke M, Francis R J, Tsaousi E, et al. Fibrinogen protects neutrophils from the cytotoxic effects of histones and delays neutrophil extracellular trap formation induced by ionomycin [J]. *Sci Rep*, 2020, 10: 11694.

[责任编辑 兰新新]