

【实验研究】

金振口服液治疗支气管哮喘的药效作用和分子机制

董佳裕¹, 刘鑫², 苏真真², 邢薇薇², 徐欣玉², 徐利², 杨钰冰², 李美瑶¹, 张新庄², 曹亮², 王振中², 武子寅^{2*}, 肖伟^{1, 2*}

1. 南京中医药大学 中药制药过程控制与智能制造技术全国重点实验室, 江苏 南京 210023

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

摘要: 目的 建立小鼠支气管哮喘模型和人非小细胞肺癌细胞(A549)炎症模型, 研究金振口服液(Jinzen Oral Liquid, JZOL)对支气管哮喘的药效作用和分子机制。方法 将66只雌性BALB/c小鼠随机分为对照组和模型组, 模型组小鼠采用卵清蛋白(OVA)致敏法建立哮喘模型后, 将其分为模型组和JZOL高、中、低剂量(4.4、2.2、1.1 mg·kg⁻¹)组和地塞米松组(Dex, 2 mg·kg⁻¹)。全身体积描记系统测定小鼠气道反应Penh值。HE染色观察小鼠肺组织病理学情况。瑞氏-姬姆萨染色检测肺泡灌洗液(BALF)中炎性细胞数量。ELISA检测BALF中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和血清中免疫球蛋白E(IgE)和免疫球蛋白G1(IgG1)浓度。采用20 ng·mL⁻¹白细胞介素(IL)-1 β 诱导A549细胞24 h建立细胞炎症模型, 随机分为对照组、模型组以及4个质量浓度JZOL(5.39、2.69、1.35、0.67 mg·mL⁻¹)处理组。MTS法测定JZOL对A549细胞的药物毒性。采用RNA-seq技术对6个实验组进行转录组学分析, 筛选差异基因, 对其进行GSEA通路富集分析、京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析和基因本体(GO)注释通路富集分析, 通过实时荧光定量PCR(qRT-PCR)实验对筛选出的关键基因进行实验验证。结果 体内实验表明, JZOL能够改善小鼠肺组织炎性细胞浸润, 降低小鼠气道高反应性Penh值, 减少BALF中巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和中性粒细胞的数量, 降低BALF中TNF- α 和血清中IgE和IgG1的浓度。体外实验表明, JZOL对A549细胞的最大无毒浓度为5.39 mg·mL⁻¹。基因富集分析结果显示, 与对照组相比, 模型组共获得46条炎症模型相关通路, 而JZOL不同浓度处理组对这些通路的逆转比例分别为34.8%(5.39 mg·mL⁻¹)、50%(2.69 mg·mL⁻¹)、32.6%(1.35 mg·mL⁻¹)和26%(0.67 mg·mL⁻¹)。差异表达基因(DEG)的KEGG富集分析显示, 与对照组相比, 模型组共富集到58条通路; 与模型组相比, JZOL处理组共富集到32条通路, 逆转了IL-17、TNF、核苷酸寡聚化结构域(NOD)样受体信号通路等。对IL-17信号通路中趋化因子配体1(CXCL1)、趋化因子配体2(CXCL2)、脂质运载蛋白2(LCN2)进行qRT-PCR验证, 与转录组测序结果一致。结论 JZOL对由OVA诱导的小鼠支气管哮喘模型具有显著的治疗功效, 能有效缓解哮喘小鼠的气道高反应性并抑制肺部组织的炎症反应。其抗炎效果是通过调节CXCL1、CXCL2和LCN2这几个关键基因的表达, 进而影响IL-17信号通路来实现的。

关键词: 金振口服液; 支气管哮喘; 气道炎症; 气道高反应性; A549细胞; 转录组测序; qRT-PCR

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)07-1486-16

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.07.008

Pharmacodynamics and molecular mechanism of Jinzen Oral Liquid in treating bronchial asthma

DONG Jiayu¹, LIU Xin², SU Zhenzhen², XING Weiwei², XU Xinyu², XU Li², YANG Yubing², LI Meiyao¹, ZHANG Xinzhuang², CAO Liang², WANG Zhenzhong², WU Ziyin², XIAO Wei^{1, 2}

1. National Key Laboratory on Technologies for Chinese Medicine Pharmaceutical Process Control and Intelligent Manufacture, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To establish a mouse bronchial asthma model and a human non-small cell lung cancer cell (A549) inflammation model, and to study the pharmacological efficacy and molecular mechanism of Jinzen Oral Liquid (JZOL) on

收稿日期: 2024-02-07

基金项目: 国家中医药管理局-“岐黄学者”中医药领军人才项目; 江苏省工业和信息化产业转型升级专项-多组分中药关键技术研究

第一作者: 董佳裕, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂过程新技术。E-mail: dongjy618@163.com

*共同通信作者: 肖伟, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药新药的研究与开发。E-mail: kanionlunwen@163.com

武子寅, 博士, 研究方向为中药新药研发。E-mail: cs416@qq.com

bronchial asthma. **Methods** Sixty-six female BALB/c mice were randomly divided into control group and model group. After the asthma model was established by the ovalbumin (OVA) sensitization method, mice in the model group were divided into model group, JZOL high, medium, and low dose group, and dexamethasone group (Dex). Whole-body volumetric tracing system was used to determine the penh value of airway response in mice. HE staining was used to observe the histopathology of lungs in mice. The number of inflammatory cells in alveolar lavage fluid (BALF) was detected by Riesling-Jimsa staining. ELISA was performed to detect tumor necrosis factor- α (TNF- α) in BALF and immunoglobulin E (IgE) and immunoglobulin G1 (IgG1) concentrations in serum. A cellular inflammation model was established by using 20 ng·mL⁻¹ interleukin (IL)-1 β induced A549 cells for 24 h. The cells were randomly divided into control group, model group, and four mass concentration JZOL-treated groups (5.39, 2.69, 1.35, and 0.67 mg·mL⁻¹). The MTS assay was used to determine the pharmacotoxicity of JZOL on A549 cells. RNA-seq technology was used to perform transcriptomics analysis of six experimental groups to screen differential genes, which were subjected to GSEA pathway enrichment analysis, KEGG pathway enrichment analysis and GO pathway enrichment analysis, and the key genes screened were experimentally verified by qRT-PCR experiments. **Results** *In vivo* experiments showed that JZOL was able to improve inflammatory cell infiltration in mouse lung tissues, reduce the Penh value of airway hyperresponsiveness in mice, decrease the number of macrophages, eosinophils and neutrophils in BALF, and decrease the concentrations of TNF- α in BALF and IgE and IgG1 in serum. *In vitro* experiments showed that the maximum nontoxic concentration of JZOL on A549 cells was 5.39 mg·mL⁻¹. Gene enrichment analysis showed that a total of 46 inflammation model-related pathways were obtained in the model group compared with the control group, and the percentage of the reversal of these pathways in the groups treated with different concentrations of JZOL was 34.8% (5.39 mg·mL⁻¹), 50% (2.69 mg·mL⁻¹), 32.6% (1.35 mg·mL⁻¹) and 26% (0.67 mg·mL⁻¹), respectively. KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes (DEGs) showed that a total of 58 pathways were enriched in model group compared with control group, and a total of 32 pathways were enriched in JZOL-treated group compared with the model group, reversing IL-17, TNF, and nucleotide oligomerization structural domain (NOD)-like receptor signaling pathways. The qRT-PCR validation of chemokine ligand 1 (CXCL1), chemokine ligand 2 (CXCL2), and lipid carrier protein 2 (LCN2) in the IL-17 signaling pathway was consistent with the transcriptome sequencing results. **Conclusion** JZOL has significant therapeutic efficacy in mouse model of bronchial asthma induced by OVA, effectively alleviating airway hyperresponsiveness and suppressing inflammatory responses in lung tissues in asthmatic mice. The anti-inflammatory effect was likely achieved by regulating the expression of several key genes, including CXCL1, CXCL2 and LCN2, which in turn affected the IL-17 signaling pathway.

Key words: Jinzhen Oral Liquid; bronchial asthma; airway inflammation; airway hyperresponsiveness; A549 cells; transcriptome sequencing; qRT-PCR

支气管哮喘简称哮喘,其主要特征是可逆性气流阻塞、肺部对平滑肌激动剂激发的高反应性(AHR)和慢性气道炎症,是当今危害人类健康最常见的慢性呼吸道疾病之一。哮喘影响了全球近4亿人的生活质量,造成46.1万人的死亡,是全球性的健康问题^[1]。在中国,哮喘共有4 570万患者,导致每年约有20万人死亡,它已成为中国面临的重大公共卫生挑战^[2]。另外,数据显示中国大陆成人哮喘患病率较高,且有逐年升高的趋势^[3],因此,深入探究哮喘的发病机制,寻找有效的治疗药物显得尤为重要。

随着传统中医药的不断发展,中药在世界范围内得到越来越多的认可^[4]。中药治疗哮喘至少有5 000年的历史^[5],传统的补肾益气汤就是治疗哮喘的有效方剂^[6]。在最近的新型冠状病毒肺炎疫情中,金振口服液(Jinzhen Oral Liquid, JZOL)在小儿肺炎治疗中发挥了不可替代的重要作用,被列为2023年《小儿病毒性肺炎中医临床诊疗指南》修订

版的推荐用药^[7]。JZOL具有清热解毒、祛痰止咳的功效,临床主要用于小儿急性支气管炎符合痰热咳嗽者。目前尚无文献研究JZOL对哮喘的治疗作用,因此,本研究通过体内和体外两个方面探究JZOL治疗哮喘的药效和分子机制,为JZOL治疗支气管哮喘新适应证提供研究基础,也为后续深入挖掘JZOL治疗呼吸系统疾病的药理作用提供研究方向参考。

1 材料

1.1 细胞

A549细胞,由北京大学人民医院惠赠,本实验室传代后保存在液氮中备用。

1.2 动物

SPF级BALB/c雌性小鼠66只,体质量为18~22 g,6~8周龄,购于江苏省南京青龙山动物场,动物生产许可证号SCXK(浙)2019-0002。小鼠在江苏康缘药业股份有限公司南京研究院动物房统一饲养。实验经江苏康缘药业股份有限公司机构动

物护理与使用委员会批准,批号 2023090103。

1.3 药物

受试药物 JZOL(批号 2185749)由江苏康缘药业股份有限公司提供,阳性药地塞米松(Dex,批号 2208030213)从辰欣药业股份有限公司购买。

1.4 主要试剂

卵清蛋白(OVA,货号 O1641, Sigma-Aldrich); 氯化乙酰甲胆碱(货号 IM3000, 北京索莱宝公司); 干燥氢氧化铝凝胶(货号 1017502, 北京索莱宝公司); 免疫球蛋白 E(IgE)ELISA 试剂盒(货号 E-EL-M3034, Elabscience); 免疫球蛋白 G1(IgG1)ELISA 试剂盒(货号 EK272, Multi Sciences); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA 试剂盒(货号 H052-1-2, 南京建成生物工程研究所); 瑞氏-姬姆萨复合染色试剂盒(货号 G1021, Solarbio); 胰蛋白酶-EDTA 消化液(货号 KGY0012, KeyGEN); CD4 抗体(货号 E-AB-F1097C, Elabscience); CD25 抗体(货号 E-AB-F1102E, Elabscience); Foxp3 抗体(货号 E-AB-F1238D, Elabscience); 白细胞介素(IL)-17 抗体(货号 E-AB-F1199E, Elabscience); IL-4 抗体(货号 E-AB-F1204E, Elabscience); γ 干扰素(IFN- γ)抗体(货号 E-AB-F1101E, Elabscience); DMEM 培养基(货号 11995065, Gibco); 青霉素-链霉素双抗溶液(货号 BC-CE-007, Gibco); PBS(货号 BC-BPBS-01, Bio-Channel); 胰酶(货号 SH30042.01, Hyclone); IL-1 β (货号 Z02922, 金斯瑞生物科技股份有限公司); MiniBEST Universal RNA Extraction Kit(货号 9767, Takara); PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)(货号 RR047A, Takara); TB Green® Premix Ex Taq™ II(货号 RR820L, Takara); Qubit™ RNA BR Assay Kit, 500 assays(货号 Q10211, Invitrogen); Illumina Poly (A) Capture(货号 20040894, Illumina); Illumina RNA Prep Ligation (96 samples)(货号 20040898, Illumina); IDT for Illumina RNA index Anchors(货

号 20040899, Illumina); IDT for Illumina DNA/RNA UD indexes(货号 20026121, Illumina)。

1.5 主要仪器

Nextseq 2000 测序系统(美国 Illumina 公司); Tape Station 4150 自动化电泳系统(美国 Agilent 公司); LightCycler® 480 II 实时荧光定量 PCR 系统(瑞士 Roche 公司); FlexStation 3 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); NanoDrop One 微量紫外/可见光分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 低温高速离心机(德国 Sigma 公司); Beckman DxFlex 流式细胞仪(美国 Beckman 公司); Aperio VERSA 数字病理扫描仪(德国 Leica 公司); 轮转式 RM2235 切片机(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

JZOL 临床主治支气管哮喘符合痰热咳嗽者,因此本研究在 OVA 致小鼠哮喘经典模型^[8]的基础上,增加风热暴露模拟痰热证^[9-10],以探究 JZOL 对痰热证哮喘的药效。动物模型造模及给药流程图 1,具体实验操作如下:66 只 BALB/c 雌性小鼠随机分为 6 组,每组 11 只,分别为对照组、模型组和 JZOL 高、中、低(4.4、2.2、1.1 mg·kg⁻¹)剂量组及阳性药 Dex(2 mg·kg⁻¹)组。在实验开始的第 1 天和第 14 天给小鼠 ip 20 μ g OVA 致敏;第 21~25 天用 1% OVA 雾化激发小鼠体内的过敏原,每天 1 次,每次 30 min,连续 5 d。从第 19 天起, JZOL 组和阳性药组分别 ig 给予药物干预治疗。第 25 天雾化激发 24 h 后,采用无创全身体积描记系统(WBP)检测小鼠气道狭窄情况。

2.2 WBP 检测小鼠气道反应性

将小鼠放入 WBP,根据仪器使用说明书进行操作,气道高反应性以呼气间歇 Penh 值体现。各组基线值用 PBS 调整,记录基础值约 2 min;随后用质量浓度分别为 6.25、12.50、25.00、50.00 mg·mL⁻¹ 的氯化乙酰甲胆碱雾化刺激,每次雾化 30 s,记录 3

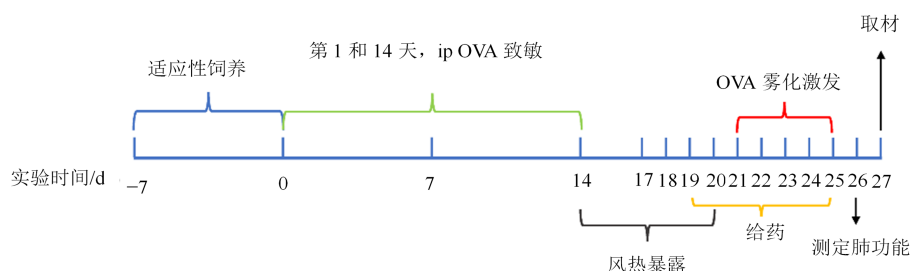


图 1 支气管哮喘造模和给药流程图

Fig. 1 Flow chart of bronchial asthma modeling and drug administration

min^[11-12]内 Penh 值,取 3 min 内 Penh 值的平均值, Penh 值越大说明气道阻力越大,气道狭窄越严重。

2.3 肺泡灌洗液(BALF)收集及炎症细胞计数

小鼠气道反应性检测结束后,对小鼠进行麻醉并开展样本采集。首先摘眼球采集血液样本,采集后将小鼠眼球表面残留血迹擦净;随后,每组随机选取 6 只小鼠采集 BALF 样本。具体操作方法如下:仰面固定,将小鼠颈部及胸廓部位皮肤处的毛发清除干净,避免 BALF 中沾有杂物。用酒精消毒,剪开颈部和胸部皮肤,分离颈部肌肉,暴露气管及胸腔,暴露肺组织。使用灌胃软管插入小鼠气管,连接存有生理盐水的注射器,轻揉灌洗肺组织 2~3 次,收集 BALF。将 BALF 在 4℃ 以 1 200 r·min⁻¹ (80×g) 离心 10 min,分离沉淀,用 PBS 悬浮后滴加在载玻片上制作灌洗液涂片。干燥后放入甲醇固定液中 5~10 min,根据瑞氏-姬姆萨染色的使用说明,滴加适量的染色液到载玻片上,室温孵育 5~10 min。蒸馏水洗涤风干后封片,显微镜下观察并分类计数巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和中性粒细胞,计算 200 个以上细胞。

2.4 BALF 中 TNF-α 及血清 IgG1、IgE 浓度检测

将上述获得的血液样本在 4℃、3 500 r·min⁻¹ 的条件下离心 10 min,取上清液备用,获得的 BALF 在 4℃、1 200 r·min⁻¹ 的条件下离心 10 min,取上清液备用。按照 ELISA 试剂盒说明书检测 BALF 中 TNF-α 及血清中 IgG1、IgE 的浓度。

2.5 肺组织苏木精-伊红染色法(HE)染色

在小鼠完成血液和 BALF 样本采集后,每组随机选取 5 只小鼠用于采集肺组织。将采集的肺组织置于 4% 多聚甲醛中浸泡固定,制作肺组织石蜡切片,使用 HE 染色进行肺组织炎症病理评分。具体操作方法如下:将干燥的石蜡切片进行常规二甲苯脱蜡,下行梯度乙醇水化,蒸馏水洗;苏木素染核 2 min,盐酸酒精分化数秒,水洗返蓝;伊红染液染片 1 min,水洗冲掉残留染液;切片经梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封片;使用 Aperio VERSA 数字病理扫描仪明场扫描全景,200 倍视野观察。小鼠肺组织炎症病理评分标准为:无炎症细胞浸润为 0 分;支气管及血管壁周围仅有少量炎症细胞浸润为 1 分(轻度炎症反应);支气管及血管壁周围有中量炎症细胞浸润,且浸润面积小于整张肺切片的 1/3 为 2 分(中度炎症反应);支气管及血管壁周围有大量炎症细胞浸润,且浸润面积大于整张肺切片的 1/3 且小于整张肺切片的 2/3 为 3 分(重度炎症

反应)。

2.6 MTS 法检测细胞存活率

以每孔 1×10^4 个细胞的密度将 A549 细胞接种至 96 孔板中,于 37℃ 恒温培养箱中培养 24 h。将细胞分为对照组(加入含对应溶剂的培养基)和给药组(加入含 JZOL 43.09、21.55、10.77、5.39、2.69、1.35、0.67、0.34 mg·mL⁻¹ 的培养基),设立 6 孔平行,放入培养箱中继续培养 24 h。取出 96 孔板,每孔加入 100 μL 含 MTS (0.5 mg·mL⁻¹) 的新鲜无血清 DMEM 培养溶液,将 96 孔板放入培养箱中避光孵育 2 h 后,移至酶标仪中检测各个反应孔在 490 nm 处的吸光度值。取 6 孔吸光度平均值进行计算,观察 JZOL 对 A549 细胞的毒性,实验重复 3 次。

2.7 细胞培养、造模与给药

A549 细胞复苏后,在 5%CO₂、37℃ 恒温培养箱中,完全饱和湿度条件下,用含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 完全培养基进行培养。取在对数生长期的 A549 细胞制备细胞悬液,以每孔 1×10^5 个细胞接种于 12 孔板中培养 24 h。细胞随机分为对照组、模型组、4 个剂量 JZOL 给药组(5.39、2.69、1.35、0.67 mg·mL⁻¹),各组设 2 个重复。对各组别进行如下处理:(1)对照组:不使用任何诱导剂或药物处理 24 h;(2)模型组:加入 20 ng·mL⁻¹ 的 IL-1β 刺激处理 24 h;(3)给药组:在 20 ng·mL⁻¹ 的 IL-1β 的刺激下^[13],采用 5.39、2.69、1.35、0.67 mg·mL⁻¹ 的 JZOL 干预 24 h。

2.8 JZOL 干预 A549 细胞炎症模型的转录组测序实验

2.8.1 细胞 RNA 提取、浓度测定和质量控制 使用 Takara RNA 提取试剂盒,对“2.7”项细胞进行总 RNA 提取,初步测定样品 RNA 浓度。在制备文库前,使用 Qubit 荧光光度计对 RNA 浓度再次进行定量,并使用 Agilent Tape Station 测定 RNA 的 RIN 值,确保样品浓度和质量均符合文库制备要求。

2.8.2 文库制备及上机测序 提取细胞内总 RNA 按照起始量 1 000 ng 进行文库制备,按照要求稀释 RNA,首先使用脱氧核糖核酸酶消化 DNA 后,用带有 Oligo(dT)的磁珠富集含有 poly A 尾的 mRNA,并对其进行纯化;接着加入打断试剂将 mRNA 打断成短片段,以打断后的 mRNA 为模板,用逆转录酶和随机引物合成一链 cDNA;然后用脱氧尿嘧啶三磷酸(dUTP)取代脱氧胸腺嘧啶三磷酸(dTTP)以实现链特异性,合成第二链 cDNA;然后纯化的双链 cDNA 进行末端修复、加 A 尾并连接双端测序接头

后进行片段大小选择,最后进行PCR扩增形成扩增文库。将构建好的文库利用Agilent Tape Station质检,合格后用Illumina二代测序仪进行测序。

2.9 转录组数据分析

2.9.1 测序及原始数据处理 测序结束后,对下机数据进行整理,获得原始读段(raw reads),利用Trimmomatic^[14]软件对raw reads进行过滤,去除reads中的接头序列,去除含N碱基的reads,舍弃低质量的reads。对滤过的数据与参考基因组进行比对分析,使用HISAT2^[15]软件对clean reads进行序列比对和拼接,获取reads在参考基因组上的定位信息,统计每个样本比对到各个基因上的reads数,并采用subread软件中的feature counts^[16]工具进行分析。

2.9.2 GSEA 通路富集分析 基因富集分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA,版本号:4.2.3)^[17]中通路富集分析不局限于某些目标基因集,而是从所有基因的表达丰度出发,分析在不同的通路中的基因的整体表达影响,理论上更容易囊括细微但协调性的变化对生物通路的影响。方法是DESeq2(版本号1.36.0)计算得到的log₂FC,输入到preranked GSEA工具中,背景Database来自于KEGG官网,最终得到NES值(normalized enrichment score)。NES为正值,表示该通路是上调趋势,反之NSE为负值,表示该通路是下调趋势。NOM *P*-val表征富集结果的可信度,FDR *q*-val代表多重假设检验校正后的*P*值。本项目的筛选标准为FDR<0.25为显著富集通路结果。

将模型组和对照组GSEA分析获得的通路集定义为炎症特征通路集;将药物处理后的细胞转录组数据分别以模型组为对照进行GSEA分析,获得的通路集定义为药物干预通路集。将药物干预通路集与炎症特征通路集比较,其中变化趋势相反的通

路所占炎症特征通路集的比值,定义为药物的抗炎指数:若抗炎指数≥50%,表明该受试药物具有强抗炎能力;若抗炎指数为30%~50%,表明该受试药物具有中等抗炎能力;若抗炎指数<30%,表明该受试药物不具备抗炎能力^[18]。

2.9.3 差异基因筛选 利用DESeq2^[19](版本号1.36.0)软件包进行分析,以不做任何处理的对照组为对照筛选模型组差异基因,以模型组为对照筛选给药组差异基因,筛选标准为|log₂(Fold change)|≥1.5且*P*≤0.05。

2.9.4 京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 KEGG(<https://www.genome.jp/kegg/>)显著性富集能预测差异表达基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。利用超几何检验进行假设检验得到*P*值,并用BH方法对*P*值进行校正得到Corrected *P*值,根据*P*值找出显著富集的通路,筛选标准为*P*<0.05。

2.9.5 基因本体(GO)通路富集分析 GO(<http://geneontology.org/>)功能显著性富集分析是根据差异与背景相比,分析差异表达基因与哪些生物学功能显著相关,筛选标准为*P*<0.05,包括生物过程(BP)、细胞成分(CC)、分子功能(MF)。

2.10 qRT-PCR检测和分析

借助NCBI Primer Blast工具设计引物,使用Takara反转录试剂盒将500 ng总RNA逆转录合成cDNA,采用SYBR Green I与双链DNA结合后发出荧光,在罗氏LightCycler 480II上进行定量荧光PCR反应,反应条件是95℃预变性30 s,95℃变性3 s,60℃延伸30 s,总共进行40个循环。PCR结束后得到各基因的循环阈值(Ct),以内参基因GAPDH的Ct值进行标准化,最终目的基因的相对表达水平以2^{-ΔΔCt}方法来计算“3.7”项各组细胞相关RNA相对表达水平。引物名称及其序列见表1。

表1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequence

基因	基因号(ID)	序列(5'-3')	产物长度/bp
GAPDH	ENSG00000111640	F: GTGGACCTGACCTGCCGTCTAG R: GAGTGGGTGTCGCTGTTGAAGTC	149
CXCL1	ENSG00000163739	F: AAGAACATCCAAAGTGTGAACG R: CACTGTTTCAGCATCTTTTCGAT	148
CXCL2	ENSG00000081041	F: GCTGCTGCTCCTGCTCCTG R: GGACTTCACCTTCACACTTTGGATG	136
LCN2	ENSG00000148346	F: GAGTTACCCTGGATTAAACGAGT R: AAGCGGATGAAGTTCTCCTTTA	171

2.11 统计分析

使用 Graphpad prism 5.0 统计软件进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较使用单因素方差(One-way ANOVA)分析方法。

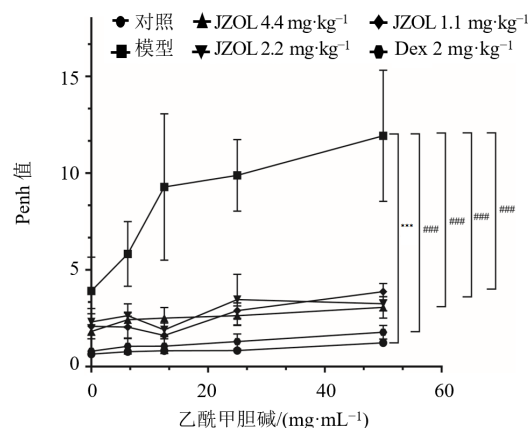
3 结果

3.1 JZOL对哮喘小鼠气道狭窄Penh值的影响

随着乙酰甲胆碱剂量的增加,雾化后Penh值增强,Penh值越大说明气道阻力越大,气道狭窄越严重。如图2所示,与对照组相比,模型组小鼠肺功能Penh值显著升高($P < 0.001$);与模型组相比,不同浓度JZOL组和Dex组小鼠肺功能Penh值都显著降低($P < 0.001$),说明JZOL能够有效降低小鼠气道阻力,减轻气道狭窄现象,结果显示JZOL降低小鼠气道Penh值的药效没有剂量相关性。

3.2 JZOL对哮喘小鼠BALF中炎症细胞的影响

如图3所示,与对照组相比,模型组小鼠BALF中巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和中性粒细胞数量显著上升($P < 0.001$);与模型组相比,不同剂量JZOL组小鼠BALF中巨噬细胞和中性粒细胞数量显著下降($P < 0.001$),JZOL高、中剂量组和Dex组小鼠BALF中嗜酸性粒细胞数量显著下降($P < 0.001$)。



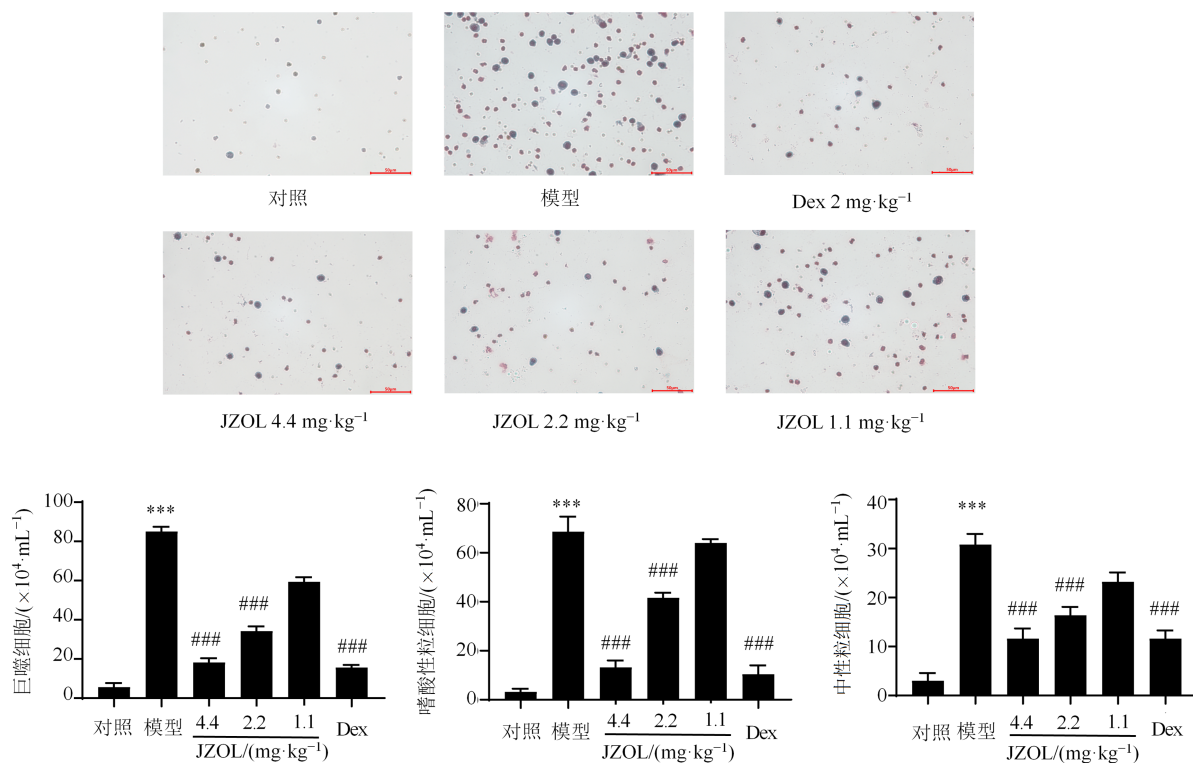
与对照组比较:*** $P < 0.001$;与模型组比较:### $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group.

图2 JZOL对小鼠肺功能Penh值的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of JZOL on Penh value of lung function in mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

上述结果说明JZOL通过减少BALF中巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和中性粒细胞的数量,来减轻小鼠肺部的炎症反应,并且JZOL对哮喘模型小鼠BALF中炎症细胞数量的减少呈现剂量相关性。



与对照组比较:*** $P < 0.001$;与模型组比较:### $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group.

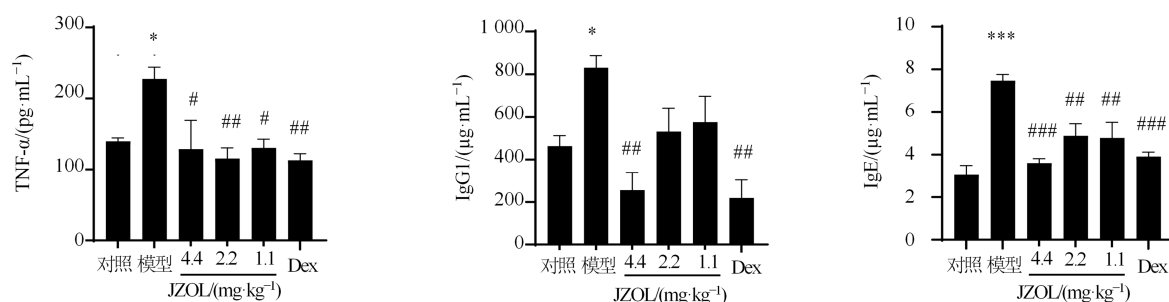
图3 BALF中各炎症细胞数量($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 3 Number of inflammatory cells in alveolar lavage fluid ($\bar{x} \pm s, n=5$)

3.3 JZOL 对哮喘小鼠 BALF 中 TNF- α 及血清 IgG1、IgE 水平的影响

由图4可知,与对照组相比,模型组小鼠 BALF 中炎症因子 TNF- α 浓度显著增加($P<0.05$);与模型组相比,不同剂量 JZOL 组和 Dex 组小鼠 BALF 中 TNF- α 浓度均显著降低($P<0.05$),其中 JZOL 中剂量组和 Dex 组小鼠 BALF 中 TNF- α 浓度降低更加显著($P<0.01$)。与对照组相比,模型组小鼠血清中炎症因子 IgG1 浓度显著增加($P<0.05$);与模型组相

比,JZOL 高剂量组和 Dex 组 IgG1 浓度显著降低($P<0.01$)。与对照组相比,模型组小鼠血清中 IgE 浓度显著增加($P<0.001$);与模型组相比,不同剂量 JZOL 组和 Dex 组小鼠血清中 IgE 浓度显著降低($P<0.01$),其中 JZOL 高剂量组和 Dex 组小鼠血清中 IgE 浓度降低更加显著($P<0.001$)。上述结果说明 JZOL 可能通过降低哮喘小鼠 BALF 中炎症因子 TNF- α 和血清中 IgG1、IgE 的浓度来抑制体内炎症反应。



与对照组比较: * $P<0.05$ *** $P<0.001$;与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ 。
* $P<0.05$ *** $P<0.001$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs model group.

图4 JZOL 对小鼠血清中 IgG1、IgE 和 BALF 中 TNF- α 浓度的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of JZOL on serum IgG1, IgE and TNF- α levels in BALF of mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

3.4 JZOL 对哮喘小鼠肺组织病理形态学的影响

对照组小鼠肺组织无炎症浸润现象,形状完好,肺泡间隔由单层细胞组成;模型组小鼠肺组织细胞肿大,气管壁增厚,肺泡间隔变宽,细支气管和血管周围有大量炎症细胞浸润;JZOL 给药后,不同剂量 JZOL 组和 Dex 组小鼠肺组织细胞肿大有所缓解,肺泡间隔变小,肺泡壁变薄,炎症细胞浸润现象减少(图5)。从病理评分来看(表2),与对照组相

比,模型组小鼠肺组织炎症评分显著增加($P<0.001$);与模型组相比,JZOL 低、中、高剂量组和 Dex 组小鼠肺组织炎症评分均有所降低,且 JZOL 组小鼠肺组织炎症评分降低程度呈现剂量相关性,其中 JZOL 高剂量组和 Dex 组小鼠肺组织炎症评分显著降低($P<0.001$)。上述结果表明,JZOL 能够缓解哮喘所致小鼠肺组织损伤,减轻肺组织炎症反应。

3.5 JZOL 对 A549 细胞的药物毒性结果

将 JZOL 稀释 6.25、12.5、25、50、100、200、400、800 倍,用 MTS 试剂检测细胞存活率,细胞存活率均

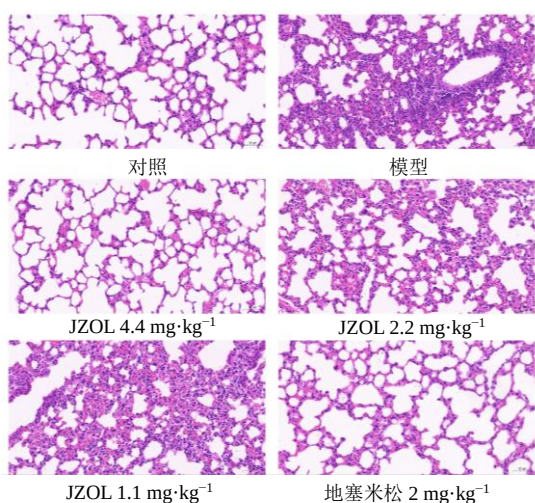


图5 JZOL 对小鼠肺组织病理学形态的影响

Fig. 5 Effect of JZOL on pathological morphology of lung tissue in mice

表2 各组小鼠肺组织炎症病理评分($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Pathological scores of lung inflammation in mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	炎症评分/分
对照	—	0.2±0.44
模型	—	2.6±0.55***
JZOL	4.4	0.6±0.55###
	2.2	2.0±0.71
	1.1	3.0±0.41
地塞米松	2.0	0.8±0.84###

与对照组比较: *** $P<0.001$;与模型组比较: ### $P<0.001$ 。

*** $P<0.001$ vs control group; ### $P<0.001$ vs model group.

值大于95%的最高受试浓度即为JZOL对A549的最大无毒浓度。结果见图6,结果显示JZOL在生药浓度不大于 $5.39\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (成品药稀释50倍)时,对A549细胞无毒。

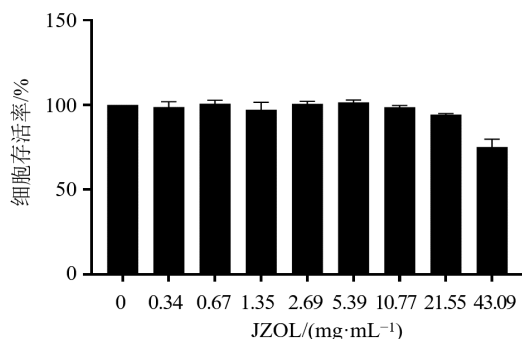


图6 MTS法检测JZOL对A549细胞的毒性($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 6 MTS method was used to detect the toxicity of Jin-zhen oral liquid to A549 cells($\bar{x}\pm s, n=3$)

3.6 JZOL抑制A549细胞炎症的转录组数据分析

3.6.1 转录组测序数据质量分析 本研究共完成12个样本的转录组学测序研究,处理可得27.2 GB clean data。总体碱基质量超过Q30的比例在92%以上,所有样本测序数据量满足定量要求,数据质量高。

采用主成分分析法(PCA)和tSNE降维分析(tSNE)展现基因表达差异,计算样本之间的距离,考察组内和组间差异,对各个样本的测序结果进行分析和可视化(图7)。结果显示,对照组和模型组的表达谱能明显分开,表明样本组间独立性和组内重复性均较好,为后续分析打好基础。

3.6.2 GSEA结果分析 如方法所述,首先根据模

型组与对照组对比的GSEA分析获得炎症特征通路集(图8),本研究共获得46条炎症特征通路;通过4个不同浓度药物处理组与模型组比较分析,获得其抗炎指数(表3)。本研究结果发现不同浓度的JZOL均表现出良好的抗炎能力,其中高剂量组(抗炎指数34.8%)、中高剂量组(抗炎指数50.0%)表现出中等以上抗炎能力,中低剂量组(抗炎指数32.6%)、低剂量组(抗炎指数26.0%)也有一定抗炎能力。具体来讲,结果发现4个药物处理组都显著逆转了鞘糖脂代谢通路(glycosphingolipid biosynthesis ganglion series)、RIG样受体信号通路(RIG like receptor signaling pathway)、类固醇激素合成通路(steroid hormone biosynthesis)变化趋势;高剂量和中剂量JZOL组显著逆转了B细胞受体信号通路(B cell receptor signaling pathway)、细胞周期通路(cell cycle)、鞘糖脂生成通路(glycosphingolipid biosynthesis globo series)变化趋势。在4个药物处理组中,细胞因子受体相互作用通路(cytokine-cytokine receptor interaction)、NOD样受体信号通路(NOD-like receptor signaling pathway)、Toll样受体信号通路(Toll-like receptor signaling pathway)、酪氨酸代谢通路(tyrosine metabolism)等炎症相关通路的表达趋势均被2个药物处理组逆转。

3.6.3 差异基因筛选 通过RNA-seq分析不同实验组之间的显著差异基因(筛选标准: $FC\geq 2, P_{\text{adj}} < 0.05$)。结果显示,与对照组比较,模型组共筛选得到56个差异基因(图9和表4),其中30个基因上调,26个基因下调。上调基因有长链酰基辅酶A合酶4(Acyl-CoA synthetase long chain family member 4,

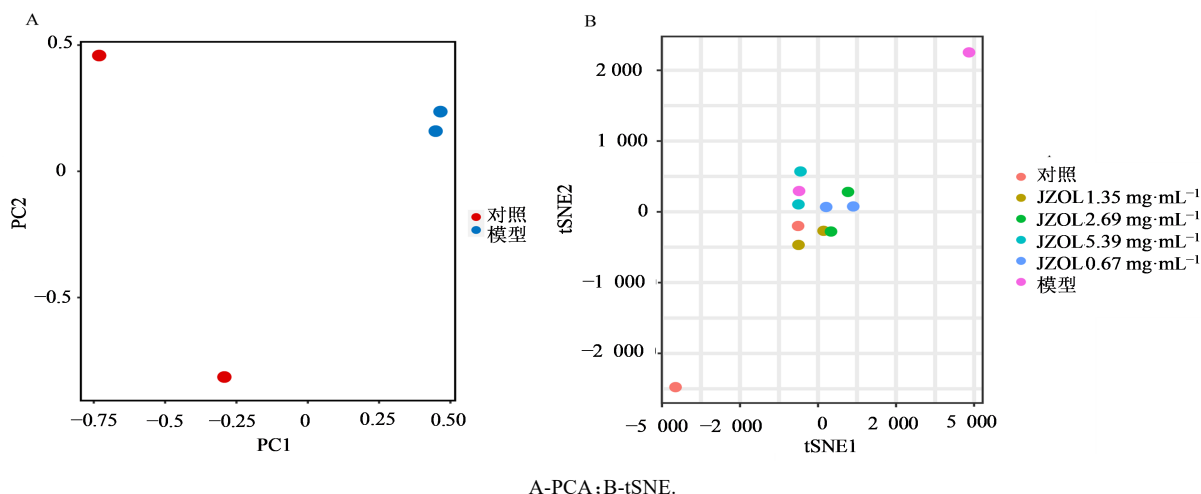


图7 转录组测序数据质量分析

Fig. 7 Quality analysis of transcriptome sequencing data

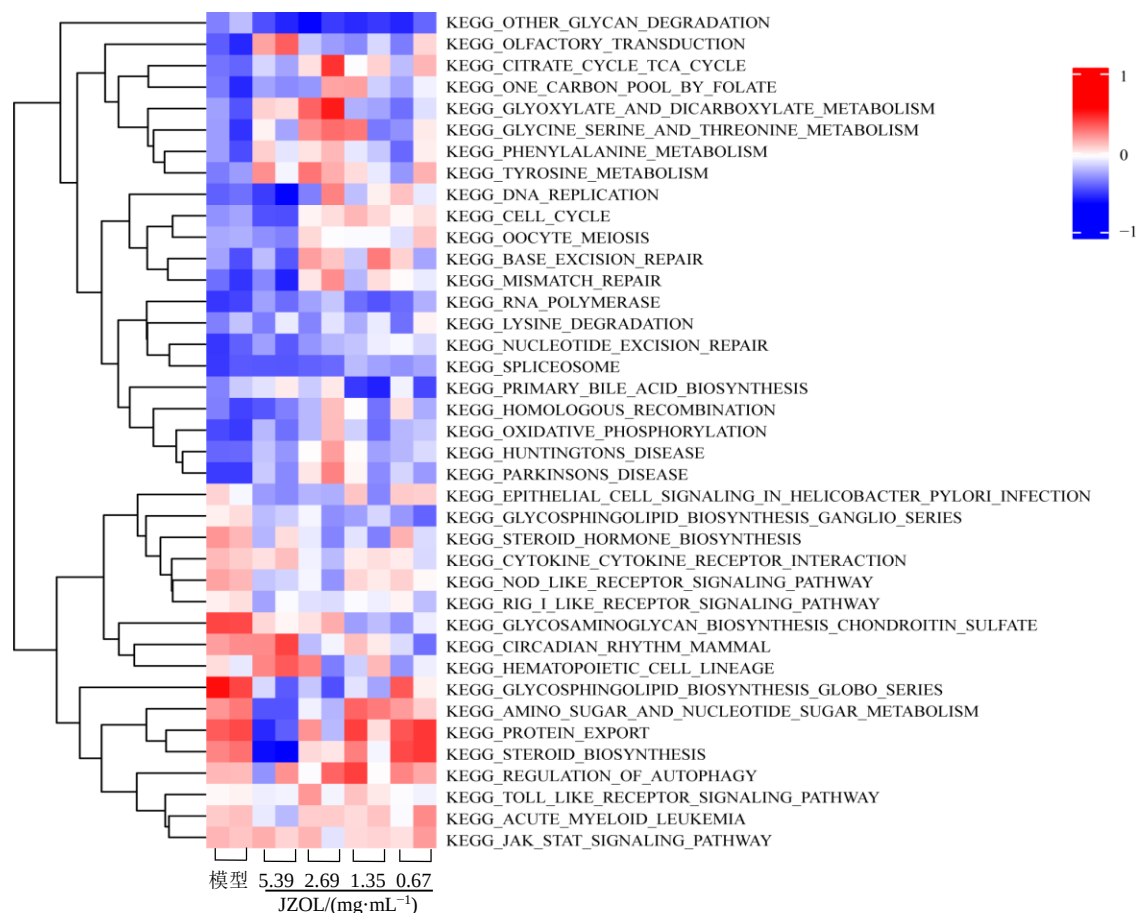


图 8 模型组与 JZOL 处理组 GSEA 通路富集分析

Fig. 8 Enrichment analysis of GSEA pathway between model group and JZOL treatment group

表 3 JZOL 干预逆转通路比例

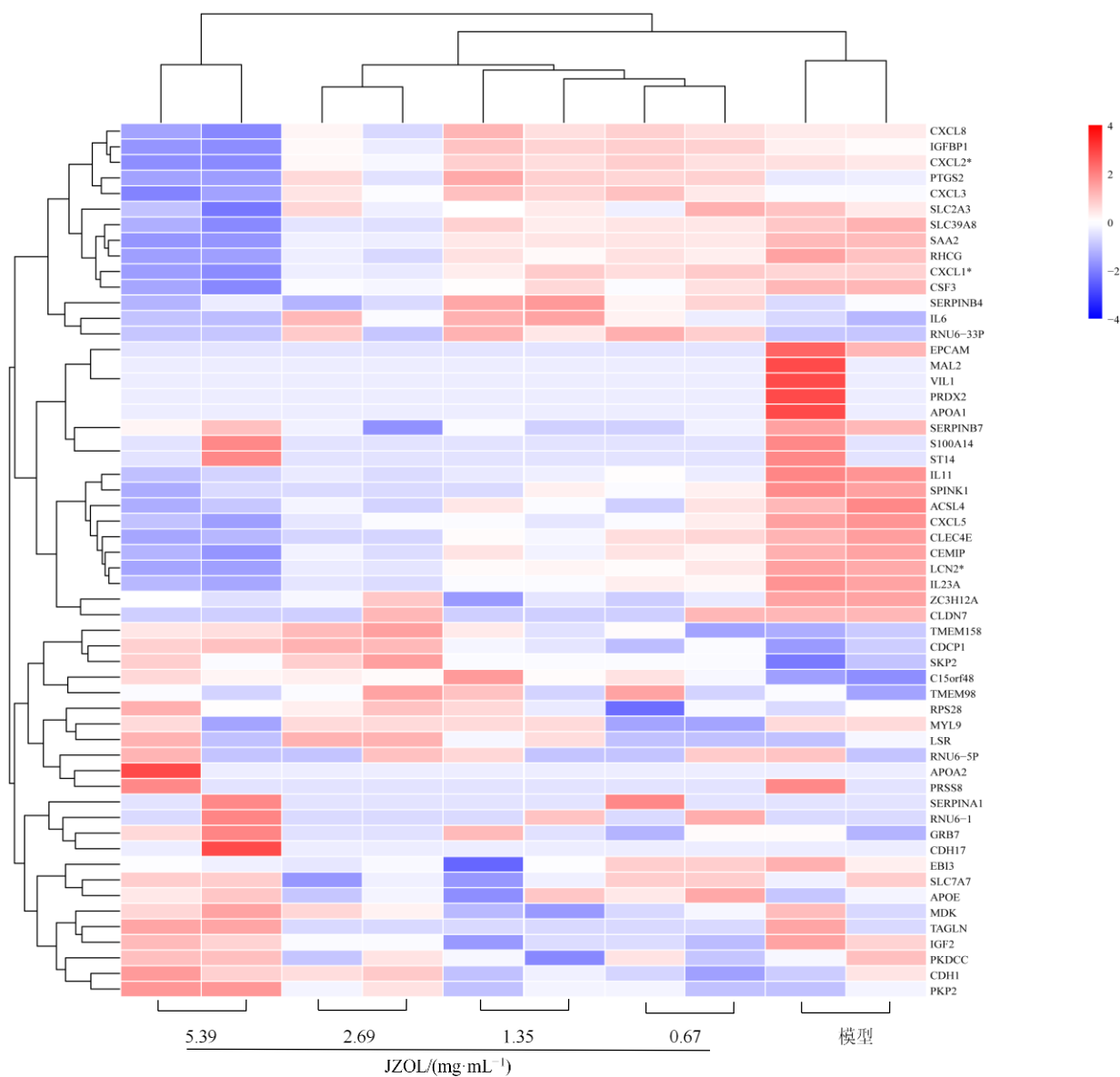
Table 3 Proportion of JZOL intervention reversal pathways

药物	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	抗炎指数/%
JZOL	5.39	34.8
	2.69	50.0
	1.35	32.6
	0.67	26.0

ACSL4)、趋化因子配体 3 (C-X-C motif chemokine ligand 3, CXCL3)、白细胞介素-6 (IL-6) 等都是与炎症相关的基因,说明炎症模型造模成功。以模型组与对照组比较获得的 56 个基因为炎症模型标志基因集,评价不同剂量 JZOL 对差异表达基因的调整能力。层次聚类结果显示(图 9),不同实验组两个样本可以聚类到一起,说明实验组内样本的一致性较好。差异表达基因热图显示,JZOL 能够显著逆转多数基因的表达,包括趋化因子配体 1 (C-X-C motif chemokine ligand 1, CXCL1)、趋化因子配体

2 (C-X-C motif chemokine ligand 2, CXCL2)、脂质运载蛋白 2 (lipocalin 2, LCN2) 等,其中高剂量 JZOL 表现出较好的抗炎能力。

3.6.4 差异基因 KEGG 富集分析 KEGG 通路富集分析结果显示,与对照组相比,模型组共富集到 58 条通路,前 15 条富集通路见表 5。模型组富集通路集中在 IL-17 信号通路 (IL-17 signaling pathway)、细胞因子受体相互作用 (cytokine-cytokine receptor interaction)、TNF 信号通路 (TNF signaling pathway)、NOD 样受体信号通路等。从给药组差异基因富集结果来看,高剂量 JZOL 组对模型组细胞差异基因的影响最大,选择模型组和高剂量 JZOL 处理组差异基因作 KEGG 通路富集分析(表 6),富集到的通路涉及焦点黏附 (focal adhesion)、PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)、细胞外基质受体通路 (ECM-receptor interaction) 等。上述结果说明 JZOL 可能通过调控 IL-17、TNF、NOD 样受体、PI3K-Akt 信号通路和 ECM 受体通路的表达来发挥抗炎的作用。



蓝色为下调基因,红色为上调基因,白色为非差异基因;聚类方法为:欧氏距离,离差平方和。
Blue is the down-regulated gene, red is the up-regulated gene and white is the non-differential gene. The clustering method is Euclidean distance and sum of squares of deviations.

图 9 差异表达基因聚类分析图
Fig. 9 Cluster analysis diagram of differential expression genes

表 4 JZOL 干预对 IL-1β 处理后的 A549 细胞基因表达的影响

Table 4 Effect of JZOL intervention on gene expression of A549 cells induced by IL-1β

组别	差异基因总数	上调基因	下调基因
对照组 vs 模型组	56	30	26
JZOL 高剂量组 vs 模型组	42	12	30
JZOL 中高剂量组 vs 模型组	37	11	26
JZOL 中低剂量组 vs 模型组	28	7	21
JZOL 低剂量组 vs 模型组	19	5	14

表5 对照组和模型组 DEGs 的 KEGG 富集分析结果

Table 5 KEGG pathway enrichment analysis results of DEGs between control group and model group

序号	ID	KEGG 条目	P 值
1	hsa04657	IL-17 signaling pathway	9.29×10^{-13}
2	hsa04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	1.37×10^{-8}
3	hsa05323	Rheumatoid arthritis	4.51×10^{-8}
4	hsa04061	Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor	8.82×10^{-8}
5	hsa05134	Legionellosis	1.77×10^{-7}
6	hsa04668	TNF signaling pathway	1.97×10^{-7}
7	hsa05132	Salmonella infection	1.08×10^{-6}
8	hsa05167	Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection	3.34×10^{-6}
9	hsa05120	Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection	1.86×10^{-5}
10	hsa05133	Pertussis	2.53×10^{-5}
11	hsa04621	NOD-like receptor signaling pathway	4.41×10^{-5}
12	hsa05146	Amoebiasis	5.39×10^{-5}
13	hsa04062	Chemokine signaling pathway	5.54×10^{-5}
14	hsa04625	C-type lectin receptor signaling pathway	8.19×10^{-5}
15	hsa05200	Pathways in cancer	1.34×10^{-4}

表6 模型组和 JZOL 给药组 DEGs 的 KEGG 富集分析

Table 6 KEGG pathway enrichment analysis results of DEGs between model group and JZOL treatment group

序号	ID	KEGG 条目	P 值
1	hsa04512	ECM-receptor interaction	8.65×10^{-4}
2	hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	7.21×10^{-3}
3	hsa04510	Focal adhesion	1.64×10^{-2}
4	hsa05165	Human papillomavirus infection	0.22
5	hsa05323	Rheumatoid arthritis	0.07
6	hsa04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	0.42

3.6.5 差异基因 GO 富集分析 对差异基因进行通路富集, 比对到 GO 数据库中, 发现共富集通路 282 条, 其中 BP 得到 50 条富集通路, CC 得到 13 条富集通路, MF 得到 30 条富集通路, 筛选 Top10 富集通路制作气泡图(图 10-A)。结果显示, 与对照组相比, 模型组与 BP 相关的主要富集在细胞对外界刺激的反应、炎症反应、DNA 复制、胆固醇调节等过程; 与 CC 相关的主要富集在脂蛋白颗粒、细胞核等组分; 与 MF 相关的主要富集在趋化因子、ATP 酶活性、脂质结合、DNA 结合等功能。JZOL 给药后, JZOL 给药组富集到 2 644 个 GO 通路, 对各加药浓度处理后细胞的差异基因 GO 的富集结果进行分析, 列举 Top10 GO 富集通路整理并分析, 结果如图 10-B 所示。JZOL 干预后, 不同浓度给药组细胞都富集到免疫细胞记忆形成、Toll 样受体信号调节过程、细胞蛋白受体调节过程等。另外, 高剂量 JZOL 组细胞富集到碳水化合物代谢过程, 中、低剂量 JZOL 组细胞

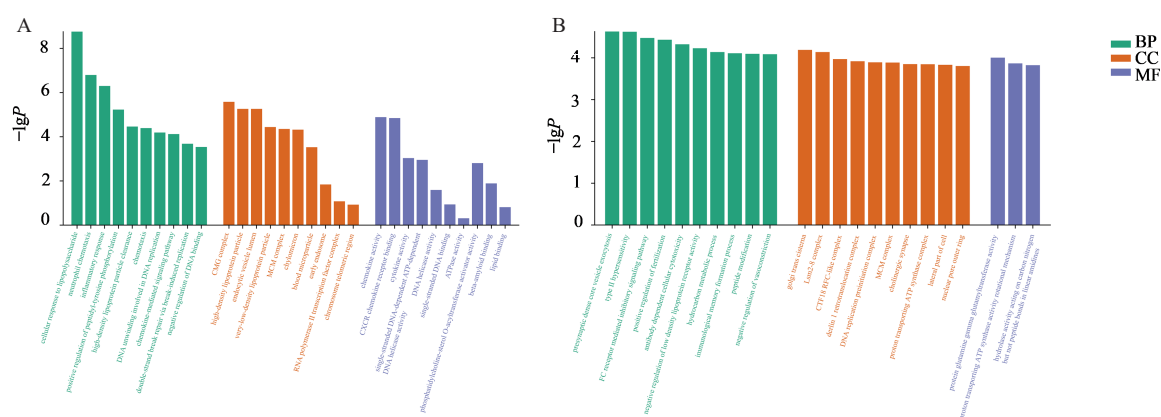
富集到细胞核 DNA 复制等生物过程。

3.7 qRT-PCR 检测结果

根据转录组学测序结果, 对炎症相关基因进行 qRT-PCR 验证。结果显示, 与对照组比较, 模型组细胞 *LCN2*、*CXCL2*、*CXCL1* 基因 mRNA 表达水平显著上调($P < 0.01$); 与模型组比较, JZOL 干预后, 给药组细胞 *LCN2*、*CXCL1*、*CXCL2* 基因 mRNA 表达水平均下调, JZOL 高剂量组和 JZOL 中高剂量组细胞 *CXCL1* 和 *LCN2* 基因 mRNA 表达水平显著下调($P < 0.05$), 上述结果说明不同浓度 JZOL 均能降低炎症基因的表达, 其中, JZOL 高剂量组炎症基因 mRNA 表达水平降低最显著, 说明高剂量 JZOL 对炎症反应的抑制作用最强, 与转录组测序结果一致。见图 11。

4 讨论

JZOL 是在民间儿科验方“羚羊清肺散”的基础上研制而成的现代中药复方制剂, 由山羊角、黄芩、平贝母、甘草、大黄、石膏、牛黄及青礞石 8 味中药配



A-对照组和模型组 DEGs 的 GO 功能富集分析;B-模型组和 JZOL 给药组 DEGs 的 GO 功能富集分析。

A- GO function enrichment analysis of DEGs between control group and model group; B- GO function enrichment analysis of DEGs between model group and JZOL treatment group.

图 10 GO 功能富集分析

Fig. 10 GO function enrichment analysis of DEGs

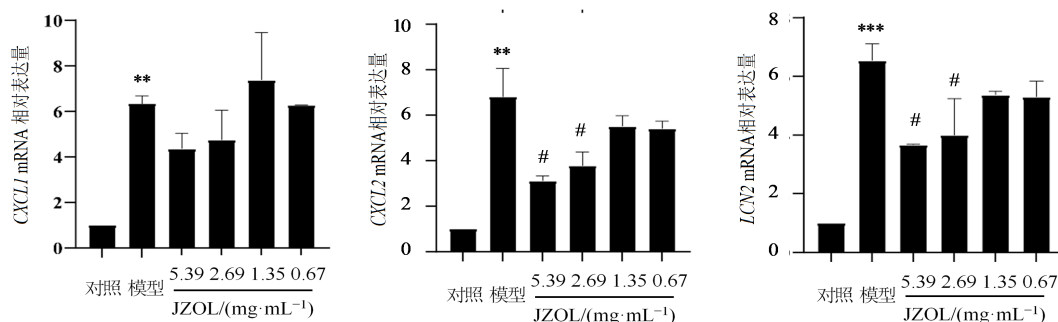
与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ 。** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group.

图 11 转录组学 qRT-PCR 验证结果

Fig. 11 Transcriptome qRT-PCR verification results

伍而成,临床主要用于小儿急性支气管炎符合痰热咳嗽者。在对 JZOL 组方组成进行文献调研时发现,临床常用小儿肺热咳嗽方(黄芩为主要药材)^[20]、贝母瓜蒌散和敏咳煎(贝母为主要药材)治疗咳嗽变异性哮喘,通过降低患者血液中嗜酸性粒细胞百分比和血清 IgE 水平^[21-22]来抑制机体炎症反应;麻杏石甘汤通过纠正 Th1/Th2 失衡降低炎症介质的生成和释放,发挥镇咳平喘的作用^[23-24]。在体内哮喘模型中,黄芩提取物黄芩苷通过抑制淋巴细胞增殖,减少金属蛋白酶 9(MMP-9)或组织金属蛋白酶抑制因子 1(TIMP1)的表达,降低血清 IL-4 含量,减轻气道炎症反应,抑制哮喘导致的气道重构纤维化^[25-26]。大黄提取物大黄素和没食子酸通过抑制转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、MMP-9 的表达、IL-33 介导的 ILC2 活化和下调 MyD88/NF- κB 信号通路的 Th2 细胞因子等抑制哮喘气道重塑^[27-28]。甘

草提取物甘草苷能够抑制炎症反应^[29],显著促进 Th1 细胞因子 IFN- γ 的产生,减少 Th2 细胞因子 IL-4 的产生^[30]。综合以上研究结果,推测 JZOL 具有治疗哮喘的潜在作用,其作用机制可能与调节炎症反应、抑制气道重塑、调节免疫平衡等多方面有关。然而目前尚无 JZOL 治疗哮喘的药效和分子机制研究。因此,本研究通过构建 OVA 致敏的支气管哮喘小鼠模型和 IL-1 β 诱导的 A549 细胞炎症模型,探究 JZOL 对哮喘所致气道炎症和气道高反应性的影响,旨在评价 JZOL 对哮喘的药效,并通过转录组测序技术探究其抗炎的分子机制。

Th2 型免疫反应在哮喘病理机制中扮演着重要角色,研究发现辅助型 T 细胞 2(T helper 2 cell, Th2) 所致的炎症反应在儿童和大多数成人哮喘的发生率达 80%^[31-32]。当外界刺激引发气道上皮细胞分泌细胞因子时,会诱导固有淋巴细胞产生 Th2 型细胞

因子,如IL-5、IL-4、IL-13等^[33]。其中,IL-4作为B细胞的生长因子,能够促使IgE的产生,并促进IgG向IgE的转化,同时还可以促进T细胞进一步极化成Th2细胞^[34-35]。这一系列反应导致Th2细胞数量急剧增加,进而引起肺组织炎症细胞浸润。Th2型炎症浸润主要由嗜酸性粒细胞组成,但也包括中性粒细胞和巨噬细胞。嗜酸性粒细胞在哮喘病理过程中起着重要作用,它们释放的炎症介质可以导致气道炎症和肿胀,加剧哮喘症状。中性粒细胞和巨噬细胞也参与了Th2型炎症反应的过程,加剧了肺组织的炎症反应和损伤^[36-37]。本研究结果显示,在哮喘模型小鼠中,肺组织切片显示大量炎性细胞浸润,长时间的炎症反应使气道结构发生改变,导致小鼠肺功能Penh值显著增大,小鼠BALF中嗜酸性粒细胞、中性粒细胞和巨噬细胞数量急剧增加,BALF中炎症因子TNF- α 浓度显著增加,血清中IgG1和IgE浓度显著增加,这些结果表明哮喘模型构建成功。而在JZOL干预后的实验组中,小鼠肺组织炎性细胞浸润情况显著改善,肺功能指标Penh值降低,BALF中嗜酸性粒细胞、中性粒细胞和巨噬细胞数量减少。这些结果提示JZOL对哮喘具有一定的治疗作用,能够抑制哮喘所致炎症反应来改善哮喘病理过程。

在过往的感染所致气道炎症的转录组学研究中发现,与对照组相比,模型组差异基因的KEGG富集通路主要集中在TNF、IL-17、NOD样受体信号通路和细胞因子受体相互作用通路等^[38-41],这些通路都是与炎症反应直接相关的。在本研究中,IL-1 β 诱导的A549细胞炎症模型的转录组学测序结果显示,差异基因的KEGG富集通路也主要集中在上述通路,且变化趋势相同。与过往研究结果比较,说明IL-1 β 诱导的A549细胞形成炎症模型具备部分气道炎症反应的转录组学特征,模型是可靠的。当气道上皮组织受到污染物、病毒、细菌或内毒素的侵袭时,会导致上皮细胞损伤,引发相应的细胞膜G蛋白受体和细胞内炎症反应的激活,进而启动下游炎症反应,最终可能引起呼吸道和肺部感染^[42]。在此过程中,特定的炎症介质或趋化因子^[13]不断产生,并汇聚到肺部,包括促炎因子如IL-1 β 、TNF- α 、IL-8、IL-6以及抗炎因子如IL-10、IL-13、IL-1Ra等,形成复杂的细胞因子网络^[43]。因此,本研究选择IL-1 β 作为诱导剂,用于诱导A549产生炎症反应。一些研究指出,IL-1 β 通过增强CD4⁺T细胞向Th2或Th17细胞转化,增强中性粒细胞的杀伤强度,引发局部或全身炎症反应^[44-45]。此外,IL-1 β 和免疫系统疾病的发展也密切相关,包括急性肺损伤、哮喘

和肺癌等^[46-48]。具体表现在,IL-1 β 刺激后,机体收到感染信号,固有免疫被激活,特征识别受体及时做出相应反应,主要包括toll样受体、NOD样受体和RIG样受体^[49-51]等。同时IL-17信号通路被激活^[52-53],释放大炎症因子如TNF、IL-6、IL-8等,募集嗜酸性粒细胞,进一步增强Th2型免疫反应。另外,呼吸道上皮细胞的直接感染也会增强肺脏中趋化因子的分泌,如CXCR趋化因子受体及其配体(CXCL家族)等^[13]。趋化因子CXCL1和CXCL2能够激活NOD样受体、RIG样受体和Toll样受体信号通路,增加促炎细胞因子的释放,其中Toll样受体5(TLR5)广泛存在于呼吸道上皮细胞,对检测呼吸道感染具有重要作用^[54]。本研究结果显示,对模型组差异基因显著富集的IL-17信号通路的差异基因CXCL1、CXCL2、LCN2进行qRT-PCR实验验证,发现模型组PCR结果与转录组测序结果一致。JZOL给药后,上述基因mRNA表达都被逆转,说明JZOL可能通过抑制CXCL1、CXCL2、LCN2基因的转录活性,进而抑制IL-17信号通路的激活,来改善细胞炎症反应,并且高剂量JZOL效果更好。研究发现,在过敏原诱导的气道炎症反应中,Th17细胞分泌的IL-17被认为是中性粒细胞聚集的媒介,当IL-17信号通路激活时,肺脏中嗜酸性粒细胞和巨噬细胞的积累增多,从而影响气道对乙酰甲胆碱的高反应性^[55-56]。中性粒细胞通过Toll样受体2的作用进一步促进Th17细胞的分化,导致Th17细胞数量增多^[57]。临床证据表明,IL-17在哮喘患者的肺组织、肺泡灌洗液、痰液和外周血中表达显著上调^[58-62],严重哮喘患者气道中的中性粒细胞数量增加^[63]。动物实验显示,在OVA致敏的哮喘小鼠模型中,肺组织IL-17的表达量增加^[64]。上述实验数据提示IL-17可能也是诱发哮喘发病和疾病严重程度的重要细胞因子。综合上述研究结果,提示JZOL治疗哮喘所致炎症反应的分子机制可能与抑制IL-17信号通路有关,今后可以在此基础上做更深入的探索。

本研究通过体内外实验表明JZOL对支气管哮喘的治疗作用,包括抑制气道炎症反应,降低气道高反应性,改善气道重塑现象。具体来说,体内实验表明,JZOL能够改善小鼠肺组织炎性细胞浸润,降低小鼠肺功能Penh值,减少BALF中巨噬细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞的数量,降低BALF和血清中炎症因子的浓度。体外实验基于转录组测序结果,发现JZOL对A549细胞炎症反应的作用机制可能涉及TNF、IL-17、Toll样受体、RIG样受体、NOD样受体信号通路和ECM受体通路等,JZOL直

接作用于 *CXCL1*、*CXCL2* 和 *LCN2* 炎症基因,进一步抑制 IL-17 信号通路的激活。本研究阐述了 JZOL 对哮喘的药效和炎症机制探索,为金振口服液增加支气管哮喘新适应证提供实验数据支持,为后续深入挖掘 JZOL 治疗呼吸系统疾病的药效提供研究方向参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] GBD Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. *Lancet*, 2020, 396(10258): 1204-1222.
- [2] Reddel H K, Bacharier L B, Bateman E D, et al. Global Initiative for Asthma Strategy 2021: Executive summary and rationale for key changes [J]. *Eur Respir J*, 2021, 59 (1): 2102730.
- [3] 廖小刚,朱爱勇,王欣国,等. 中国成人哮喘患病率的Meta分析 [J]. *中国循证医学杂志*, 2020, 20(10): 1164-1172.
Liao X G, Zhu A Y, Wang X G, et al. The prevalence of asthma among adults in China: A Meta-analysis [J]. *Chin J Evid Based Med*, 2020, 20(10): 1164-1172.
- [4] Ren J G, Wang D Z, Lei L, et al. Preliminary analysis on relationship between traditional efficacy of Chinese medicine and modern pharmacological action [J]. *China J Chin Mater Med*, 2017, 42(10): 1979-1983.
- [5] Huntley A, Ernst E. Herbal medicines for asthma: A systematic review [J]. *Thorax*, 2000, 55(11): 925-929.
- [6] Cui J, Xu F, Tang Z, et al. Bu-Shen-Yi-Qi formula ameliorates airway remodeling in murine chronic asthma by modulating airway inflammation and oxidative stress in the lung [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108694.
- [7] 袁斌,白晓红,陈华,等. 小儿病毒性肺炎中医临床诊疗指南(修订) [J]. *南京中医药大学学报*, 2023, 39(3): 293-300.
Yuan B, Bai X H, Chen H, et al. Guideline for the diagnosis and treatment of pediatric viral pneumonia in Chinese medicine (revision) [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2023, 39(3): 293-300.
- [8] Reddy A T, Lakshmi S P, Reddy R C. Murine model of allergen induced asthma [J]. *J Vis Exp*, 2012(63): e3771.
- [9] 罗培灿,文彬,杨万斌,等. 寒、热证候大鼠大肠癌启动时 ATP 酶和琥珀酸脱氢酶活性的变化 [J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(2): 310-312, 515-516.
Luo P C, Wen B, Yang W B, et al. Changes of activities of ATP and SDH in rats with cold and heat syndrome [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2017, 35(2): 310-312, 515-516.
- [10] 李晓俊,李亚,卞晴晴,等. 中西医结合治疗对慢性阻塞性肺疾病痰热证急性加重-稳定期大鼠免疫因子的影响研究 [J]. *中国全科医学*, 2022, 25(2): 197-205.
Li X J, Li Y, Bian Q Q, et al. Effect of integrated Chinese and western medicine treatment on immune factors in a rat model with phlegm-heat syndrome in acute Exacerbation-stable stage of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Chin Gen Pract*, 2022, 25(2): 197-205.
- [11] 鲁德珏. 白细胞介素: 27 在支气管哮喘气道炎症和气道重构中的作用 [D]. 济南: 山东大学, 2020.
Lu D G. The role of interleukin-27 in airway inflammation and airway remodeling in bronchial asthma [D]. Jinan: Shandong University, 2020.
- [12] 李梦雯. 麻杏石甘汤干预哮喘气道炎症的效应机制及配伍研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.
Li M W. Study on the effect mechanism and compounding of Ma Xing Shi Gan Tang in interfering with airway inflammation in asthma [D]. Nanjing: Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2021.
- [13] Tan Q, Duan L M, Huang Q, et al. Interleukin-1 β promotes lung adenocarcinoma growth and invasion through promoting glycolysis via p38 pathway [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 6491-6509.
- [14] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [15] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(4): 357-360.
- [16] Liao Y, Smyth G K, Shi W. featureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(7): 923-930.
- [17] Subramanian A, Tamayo P, Mootha V K, et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(43): 15545-15550.
- [18] 徐小波,武子寅,张新庄,等. 银杏二萜内酯葡胺注射液及其银杏二萜内酯成分抗人脐静脉内皮细胞氧糖剥夺损伤的转录组学研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(13): 4233-4244.
Xu X B, Wu Z Y, Zhang X Z, et al. Transcriptome study of Diterpene Ginkgolides Meglumine Injection and its components against oxygen-glucose deprivation damage in HUVEC-T1 cells [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54 (13): 4233-4244.
- [19] Carbonetto P, Luo K X, Sarkar A, et al. GoM DE: Interpreting structure in sequence count data with differential expression analysis allowing for grades of membership [J]. *Genome Biol*, 2023, 24(1): 236.
- [20] 董若兰,巩静,董浩旭,等. 叶望云教授治疗小儿咳嗽变异性哮喘经验 [J]. *中西医结合研究*, 2021, 13(5): 350-352.
Dong R L, Gong J, Dong H X, et al. Professor ye Wangyun's experience in treating cough variant asthma in

- children [J]. Res Integr Tradit Chin West Med, 2021, 13 (5): 350-352.
- [21] 黄青松, 肖玮, 吴建英. 敏咳煎治疗咳嗽变异性哮喘疗效观察 [J]. 新中医, 2013, 45(10): 23-25.
Huang Q S, Xiao W, Wu J Y. Observation on therapeutic effect of Minke Decoction on cough variant asthma [J]. J N Chin Med, 2013, 45(10): 23-25.
- [22] 王诗蕴. 贝母瓜蒌散治疗咳嗽变异性哮喘40例 [J]. 广西中医药, 2016, 39(5): 34-35.
Wang S W/Y. Treatment of 40 cases of cough variant asthma with *Fritillaria* Gualou Powder [J]. Guangxi J Tradit Chin Med, 2016, 39(5): 34-35.
- [23] 桑杲, 陈志敏. 麻杏石甘汤治疗小儿支气管哮喘的药理研究及临床应用进展 [J]. 浙江中医杂志, 2006, 41(6): 366-368.
Sang G, Chen Z M. Pharmacological research and clinical application progress of Moxing Shigan Decoction in the treatment of bronchial asthma in children [J]. Zhejiang J Tradit Chin Med, 2006, 41(6): 366-368.
- [24] 陈慧, 汪受传. 汪受传运用麻黄杏仁甘草石膏汤化裁治疗儿科肺系疾病验案4则 [J]. 江苏中医药, 2020, 52(10): 51-53.
Chen H, Wang S C. WANG Shouchuan's experience in treating pediatric pulmonary diseases with modified Mahuang Xingren Gancao Shigao Decoction: Four proven case studies [J]. Jiangsu J Tradit Chin Med, 2020, 52(10): 51-53.
- [25] 张毓娴, 李静, 齐薛浩, 等. 黄芩汤对支气管哮喘大鼠外周血淋巴细胞CaN活性与淋巴细胞增殖及气道炎症影响 [J]. 四川中医, 2019, 37(4): 44-47.
Zhang Y X, Li J, Qi X H, et al. Effect of Huangqi Decoction on peripheral blood lymphocyte CaN activity, lymphocyte proliferation and airway inflammation for asthmatic rats [J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2019, 37 (4): 44-47.
- [26] 吴世满, 武永杰, 刘丽, 等. 黄芩苷和川芎嗪对哮喘大鼠气道壁重构的影响与机制探讨 [J]. 华中科技大学学报 (医学版), 2009, 38(4): 491-494.
Wu S M, Wu Y J, Liu L, et al. Effect of baicalin and ligustrazine on airway wall remodeling and underlying mechanism in asthmatic rats [J]. Acta Med Univ Sci Technol Huazhong, 2009, 38(4): 491-494.
- [27] 袁晓芳, 王宋平. 大黄素对哮喘小鼠气道重塑的干预效果及机制 [J]. 广西医学, 2019, 41(11): 1410-1414.
Yuan X F, Wang S P. Effect and mechanism of emodin intervention on airway remodeling in asthmatic mice [J]. Guangxi Med J, 2019, 41(11): 1410-1414.
- [28] Wang X H, Zhao H Q, Ma C H, et al. Gallic acid attenuates allergic airway inflammation via suppressed interleukin-33 and group 2 innate lymphoid cells in ovalbumin-induced asthma in mice [J]. Int Forum Allergy Rhinol, 2018, 8(11): 1284-1290.
- [29] 吕小华, 陈科, 刘钰瑜, 等. 甘草酸对慢性哮喘小鼠骨代谢的影响 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(1): 110-111.
Lü X H, Chen K, Liu Y Y, et al. Effect of Glycyrrhizin on bone metabolism in a mouse model [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2013, 24(1): 110-111.
- [30] 王冰冰, 傅祖红, 胡振红. 复方甘草酸苷对哮喘大鼠的免疫调节作用 [J]. 华南国防医学杂志, 2009, 23(5): 16-18.
Wang B B, Fu Z H, Hu Z H. Immune regulation of compound glycyrrhizin in asthmatic rats [J]. Mil Med J South China, 2009, 23(5): 16-18.
- [31] Permaul P, Hoffman E, Fu C X, et al. Allergens in urban schools and homes of children with asthma [J]. Pediatr Allergy Immunol, 2012, 23(6): 543-549.
- [32] Antó J M, Sunyer J, Basagaña X, et al. Risk factors of new-onset asthma in adults: A population-based international cohort study [J]. Allergy, 2010, 65(8): 1021-1030.
- [33] Martinez-Gonzalez I, Steer C A, Takei F. Lung ILC2s link innate and adaptive responses in allergic inflammation [J]. Trends Immunol, 2015, 36(3): 189-195.
- [34] Holgate S T. Innate and adaptive immune responses in asthma [J]. Nat Med, 2012, 18(5): 673-683.
- [35] Jain V V, Perkins D L, Finn P W. Costimulation and allergic responses: Immune and bioinformatic analyses [J]. Pharmacol Ther, 2008, 117(3): 385-392.
- [36] Djukanović R, Roche W R, Wilson J W, et al. Mucosal inflammation in asthma [J]. Am Rev Respir Dis, 1990, 142(2): 434-457.
- [37] Kay A B. The role of T lymphocytes in asthma [J]. Chem Immunol Allergy, 2006, 91: 59-75.
- [38] 肖顺丽. 清金化痰汤抑制NETs形成减轻急性肺损伤的机制研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2023.
Xiao S L. Study on the Mechanism of Qingjin Huatan Decoction in Inhibiting the Formation of NETs and Alleviating Acute Lung Injury [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2023.
- [39] 王佳新, 徐耀迪, 郑鑫, 等. 吸入气管内雾化脂多糖致急性肺损伤小鼠肺组织转录组分析 [J]. 解放军医学院学报, 2023, 44(6): 668-677.
Wang J X, Xu Y D, Zheng X, et al. Transcriptome analysis of lung tissue in mice with intratracheal aerosolized lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2023, 44(6): 668-677.
- [40] 万常青, 程宁宁, 苏彦斌, 等. 人呼吸道合胞病毒感染不同细胞基因的差异表达分析 [J]. 微生物学免疫学进展, 2023, 51(5): 11-16.
Wan C Q, Cheng N N, Su Y B, et al. Analysis of differentially gene expression in different cells infected

- with human respiratory syncytial virus [J]. Prog Microbiol Immunol, 2023, 51(5): 11-16.
- [41] 陈玉洁, 朱真真, 王晓巍, 等. 慢性鼻窦炎伴鼻息肉合并哮喘患者临床特征及转录组分析 [J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2021, 28(4): 245-249.
- Chen Y J, Zhu Z Z, Wang X W, et al. Clinical characteristics and transcriptome analysis of patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps and asthma [J]. Chin Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2021, 28(4): 245-249.
- [42] Deshpande R, Zou C B. *Pseudomonas aeruginosa* induced cell death in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(15): 5356.
- [43] Bhargava M, Wendt C H. Biomarkers in acute lung injury [J]. Transl Res, 2012, 159(4): 205-217.
- [44] Sutton C E, Lalor S J, Sweeney C M, et al. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity [J]. Immunity, 2009, 31(2): 331-341.
- [45] Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D, et al. NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases [J]. Redox Biol, 2015, 4: 296-307.
- [46] Joosten L A B, Netea M G, Dinarello C A. Interleukin-1 β in innate inflammation, autophagy and immunity [J]. Semin Immunol, 2013, 25(6): 416-424.
- [47] Ridker P M, MacFadyen J G, Thuren T, et al. Effect of interleukin-1 β inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: Exploratory results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial [J]. Lancet, 2017, 390(10105): 1833-1842.
- [48] Jia X H, Cao B, An Y Q, et al. Rapamycin ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting IL-1 β and IL-18 production [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 67: 211-219.
- [49] Shaw P J, Lamkanfi M, Kanneganti T D. NOD-like receptor (NLR) signaling beyond the inflammasome [J]. Eur J Immunol, 2010, 40(3): 624-627.
- [50] Geddes K, Magalhães J G, Girardin S E. Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors [J]. Nat Rev Drug Discov, 2009, 8(6): 465-479.
- [51] Wicherska-Pawłowska K, Wróbel T, Rybka J. Toll-like receptors (TLRs), NOD-like receptors (NLRs), and RIG-I-like receptors (RLRs) in innate immunity. TLRs, NLRs, and RLRs ligands as immunotherapeutic agents for hematopoietic diseases [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(24): 13397.
- [52] Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, et al. IL-17 cytokine family [J]. J Allerg Clin Immunol, 2004, 114(6): 1265-1273.
- [53] Song X Y, Qian Y C. The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling [J]. Cytokine, 2013, 62(2): 175-182.
- [54] Gewirtz A T, Navas T A, Lyons S, et al. Cutting edge: Bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression [J]. J Immunol, 2001, 167(4): 1882-1885.
- [55] Chakir J, Shannon J, Molet S, et al. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: Effect of steroids on TGF- β , IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression [J]. J Allergy Clin Immunol, 2003, 111(6): 1293-1298.
- [56] Hymowitz S G, Filvaroff E H, Yin J P, et al. IL-17s adopt a cystine knot fold: Structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding [J]. EMBO J, 2001, 20(19): 5332-5341.
- [57] Wilson A S, Randall K L, Pettitt J A, et al. Neutrophil extracellular traps and their histones promote Th17 cell differentiation directly via TLR2 [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 528.
- [58] Molet S, Hamid Q, Davoine F, et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines [J]. J Allergy Clin Immunol, 2001, 108(3): 430-438.
- [59] Sun Y C, Zhou Q T, Yao W Z. Sputum interleukin-17 is increased and associated with airway neutrophilia in patients with severe asthma [J]. Chin Med J, 2005, 118(11): 953-956.
- [60] Bullens D M, Truyen E, Coteur L, et al. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: Linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? [J]. Respir Res, 2006, 7(1): 135.
- [61] Hashimoto T, Akiyama K, Kobayashi N, et al. Comparison of IL-17 production by helper T cells among atopic and nonatopic asthmatics and control subjects [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2005, 137(Suppl 1): 51-54.
- [62] Zhao Y, Yang J, Gao Y D, et al. Th17 immunity in patients with allergic asthma [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2010, 151(4): 297-307.
- [63] Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, et al. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1999, 160(5 Pt 1): 1532-1539.
- [64] Schnyder-Candrian S, Togbe D, Couillin I, et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma [J]. J Exp Med, 2006, 203(12): 2715-2725.