

# 失巢凋亡调控重症哮喘患者不同炎症表型的气道重塑机制及其潜在靶向中药化合物的预测

王婷<sup>1,2,3,4</sup>, 叶贝<sup>1,2,3,4</sup>, 蔡贝贝<sup>1,2,3,4</sup>, 饶玲<sup>1,2,3,4</sup>, 张妙芬<sup>1,2,3,4</sup>, 黄慧婷<sup>1</sup>, 詹少锋<sup>1</sup>, 江勇<sup>5</sup>, 黄秀芳<sup>1,2,3,4\*</sup>, 刘琼<sup>1\*</sup>

1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405
2. 广州中医药大学 岭南医学研究中心, 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. 深圳市中西医结合医院, 广东 深圳 518104

**摘要:** **目的** 探讨失巢凋亡相关基因在重症哮喘嗜酸性粒细胞表型和中性粒细胞表型中气道重塑的潜在调控机制及生物标志物, 并筛选靶向干预的中药化合物。 **方法** 首先利用支气管活检样本的测序数据, 通过加权基因共表达网络分析 (weighted correlation network analysis, WGCNA) 鉴定出重症哮喘嗜酸性粒细胞表型 (eosinophilic asthma, EA) 和中性粒细胞表型 (neutrophilic asthma, NA) 高度相关的基因模块。进一步筛选出与失巢凋亡相关的基因, 并与 WGCNA 结果映射以识别关键的调控基因。使用蛋白质分析通过进化关系 (protein analysis through evolutionary relationships, PANTHER) 进行通路富集, 揭示了这些基因可能参与的信号通路及病理表型。再利用受试者工作特征 (receiver operator characteristic, ROC) 分析, 鉴定出具有区分不同炎症表型和病理表型的潜在生物标志物。此外, 利用人类蛋白质图谱数据库 (human protein atlas, HPA) 数据库的单细胞测序数据, 对标志物在组织和肺细胞中的表达模式进行注释。同时回归临床, 借助 TcmBank 和 ETCM 数据库, 预测潜在调控这些标志物的中药化合物, 评估其药动学和毒理学特性, 通过分子对接验证标志物与化合物的结合亲和力。最后构建预测模型探索年龄、性别、吸烟与否在重症哮喘患者不同炎症表型发病与否的价值。 **结果** WGCNA 提示包含 54 个基因的黑色模块与重症 EA 高度相关, 包含 212 个基因的蓝色模块与重症 NA 高度相关。其中, 黑色模块识别出 5 个失巢凋亡基因, 蓝色模块识别出 16 个失巢凋亡基因, 这些基因均富集在与气道重塑显著相关的整合素信号通路。其中蛋白磷酸酶 2 调节亚基 B $\alpha$  亚型 (protein phosphatase 2 regulatory subunit balpha, PPP2R2A) 在重症 EA, 整合素亚基  $\beta$  5 (integrin subunit beta 5, ITGB5)、细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1, CCND1)、醛脱氢酶家族 1 成员 A1 (aldehyde dehydrogenase 1 family member A1, ALDH1A1) 在重症 NA 的气道重塑中具有较高的 ROC 诊断价值, 是潜在生物标志物。这些失巢凋亡基因在肺部高表达, 且在肺部 I 型肺泡上皮细胞、II 型肺泡上皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞等在气道重塑中发挥重要作用的细胞中高表达。而水飞蓟素、花生四烯酸、熊果酸与这些促进重塑的失巢凋亡基因结合亲和力良好, 具有潜在调控作用。此外, 研究发现年龄、吸烟、性别均对重症 EA、重症 NA 发病有所影响, 且年龄-吸烟-性别联合预测的影响大于任意单一因素的影响, 是哮喘异质性的的重要因素。 **结论** 水飞蓟素、花生四烯酸、熊果酸可能通过靶向失巢凋亡基因 PPP2R2A、ITGB5、CCND1 调控重症 EA、重症 NA 的气道重塑, 为未来重症哮喘个体化治疗提供了新的策略。

**关键词:** 重症哮喘; 嗜酸性粒细胞型哮喘; 中性粒细胞型哮喘; 失巢凋亡; 气道重塑; 水飞蓟素; 花生四烯酸; 熊果酸

**中图分类号:** R285; Q811.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)01-0203-13

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.01.020

收稿日期: 2024-07-23

**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目 (82204985); 广东省教育厅项目青年创新人才项目 (2022KQNCX013); 广东省自然面上项目 (2023A1515010807, 2024A1515012183); 广州市科技化项目 (2023A04J1854); 深圳市“医疗卫生三名工程”建设项目 (SZZYSM202206013); 国家中医优势专科建设项目 (广州中医药大学第一附属医院肺病科); 广东省重点科室 (中西医协同科室) 建设项目; 深圳市中西医结合医院内课题 (YJ-2023-106); 广州中医药大学青年拔尖人才 (团队) 培育“揭榜挂帅”项目; 深圳市宝安区医疗卫生科研项目 (BAYXH2024011); 广州中医药大学第一附属医院青优人才项目; 广东省中医药管理局项目 (20251334); 深圳市宝安区 2024 年度区属公立医院高质量发展研究项目 (BAGZL2024053); 深圳市科技创新局基础研究面上项目 (JCYJ20240813114911016); 深圳宝安区中医药临床研究专项 (2023ZYLYCZX-9, 2023ZYLYCZX-11); 深圳市宝安区医疗卫生科研项目 (2023JD124, 2023JD107, 2023JD105, 2023JD110, 2024JD289, 2024JD293, 2024JD316)

**作者简介:** 王婷, 博士研究生, 从事中医药防治呼吸系统疾病研究。Tel: (020)36591579 E-mail: 20201120081@stu.gzucm.edu.cn

**\*通信作者:** 刘琼, 主任中医师, 博士生导师, 从事中医药防治呼吸系统疾病研究。Tel: (020)36591579 E-mail: 1423254686@qq.com

黄秀芳, 助理研究员, 从事中医药防治呼吸系统疾病研究。Tel: (020)36591365 E-mail: huangxiufang@gzzyydxdfysy.wecom.work

## Regulation mechanism of airway remodeling in severe asthma patients with different inflammatory phenotypes by anoikis and prediction of potential compounds from traditional Chinese medicines

WANG Ting<sup>1,2,3,4</sup>, YE Bei<sup>1,2,3,4</sup>, CAI Beibei<sup>1,2,3,4</sup>, RAO Ling<sup>1,2,3,4</sup>, ZHANG Miaofen<sup>1,2,3,4</sup>, HUANG Huiting<sup>1</sup>, ZHAN Shaofeng<sup>1</sup>, JIANG Yong<sup>5</sup>, HUANG Xiufang<sup>1,2,3,4</sup>, LIU Qiong<sup>1</sup>

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

2. Lingnan Medical Research Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

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

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

5. Shenzhen Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shenzhen 518104, China

**Abstract: Objective** To explore the potential regulatory mechanisms and biomarkers of anoikis-related genes in airway remodeling in eosinophil and neutrophil phenotypes of severe asthma, and screen traditional Chinese medicine compounds for targeted intervention. **Methods** Sequencing data from bronchial biopsies were employed to discern gene modules correlated with eosinophilic asthma (EA) and neutrophilic asthma (NA) phenotypes of severe asthma via weighted gene co-expression network analysis (WGCNA). Anoikis-related genes were identified and integrated with WGCNA findings to delineate pivotal regulatory genes. The protein analysis through evolutionary relationships (PANTHER) pathway enrichment was used to elucidate the potential involvement of these genes in specific signaling pathways and pathological phenotypes. The receiver operator characteristic (ROC) facilitated the identification of biomarkers with the capacity to differentiate among various inflammatory and pathological profiles. Additionally, we annotated the expression patterns of these biomarkers in tissues and lung cells using single-cell sequencing data from the human protein atlas (HPA) database. Concurrently, we reverted to clinical relevance by predicting traditional Chinese medicine compounds that may regulate these biomarkers using the TcmBank and ETCM databases, assessing their pharmacokinetics and toxicological properties, and validating the binding affinity of biomarkers with compounds through molecular docking. Finally, a predictive model was constructed to explore the value of age, gender, and smoking status in the onset of different inflammatory phenotypes in patients with severe asthma. **Results** WGCNA analysis revealed a 54-gene black module strongly associated with EA and a 212-gene blue module associated with NA. Anoikis genes within these modules, five in the black and sixteen in the blue, were enriched in integrin pathways linked to airway remodeling. Protein phosphatase 2 regulatory subunit balpha (PPP2R2A) for EA and integrin subunit beta 5 (ITGB5), cyclin D1 (CCND1), and aldehyde dehydrogenase 1 family member A1 (ALDH1A1) for NA showed significant diagnostic potential in ROC analysis, indicating their potential as biomarkers. These genes were prominently expressed in lung tissue, particularly in cells pivotal to airway remodeling, such as type I and II alveolar epithelial cells, smooth muscle cells, and fibroblasts. Silymarin, arachidonic acid, and ursolic acid demonstrated strong binding affinity to these genes, suggesting regulatory potential. The study also identified age, smoking, and gender as influential factors in the pathogenesis of both EA and NA, with their combined effect being more substantial than any single factor, underscoring their role in asthma heterogeneity. **Conclusion** Silymarin, arachidonic acid, and ursolic acid may target the anoikis-related genes PPP2R2A, ITGB5, CCND1 to modulate airway remodeling in severe EA and NA, providing a novel strategy for personalized treatment of severe asthma in the future.

**Keywords:** severe asthma; eosinophilic asthma; neutrophilic asthma; anoikis; airway remodeling; silymarin; arachidonic acid; ursolic acid

哮喘是一种常见的慢性气道炎症性疾病，具有异质性和复杂性，其病理生理机制至今尚未完全阐明<sup>[1]</sup>。重症哮喘是哮喘中最具挑战性的类型，其患者往往对标准治疗反应不佳，病情反复发作，严重影响日常生活，并造成医疗资源的负担<sup>[2]</sup>。嗜酸粒细胞型哮喘（eosinophilic asthma, EA）是重症哮喘中最常见的炎症表型，中粒细胞型哮喘（neutrophilic asthma,

NA）在重症哮喘中虽然不如EA普遍，但NA患者往往对糖皮质激素治疗不敏感，增加了重症哮喘的控制难度<sup>[3]</sup>。探索重症EA、NA各自的特异性基因表达模式和信号通路，揭示潜在的生物标志物，对于重症哮喘精准医疗的发展具有重要意义<sup>[4]</sup>。

失巢凋亡是一种由细胞脱离其基质而引发的程序性细胞死亡形式<sup>[5]</sup>。靶向失巢凋亡抗组织侵袭

迁移、纤维化是目前前沿的研究热点<sup>[6]</sup>。哮喘患者的气道炎症和重塑结构变化可能导致上皮细胞与细胞外基质的接触丧失，触发失巢凋亡。失巢凋亡可能通过影响细胞外基质的组成和结构，使气道上皮细胞获得间充质细胞的形态和迁移能力，导致气道壁增厚和纤维化<sup>[7]</sup>，促进重症哮喘患者气道重塑的病理发展；同时，气道上皮细胞发生过度的失巢凋亡会破坏气道上皮屏障，增加哮喘易感性。然而，失巢凋亡在重症哮喘尤其是 EA 和 NA 气道重塑中的具体作用机制尚未被充分研究。因此，探索失巢凋亡在重症 EA 和 NA 气道重塑中的作用机制，挖掘具有诊断价值的生物标志物，对于理解重症哮喘的发病机制和揭示新的治疗靶点具有重要意义。筛选开发具有抗气道炎症生物活性的中药化合物是应对重症哮喘治疗挑战的重要策略，也是响应“十四五”中医药发展规划的现实举措。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据来源

在高通量基因表达数据库（gene expression omnibus, GEO）中检索“severe asthma”，筛选实验设计来源于临床样本，取样方法为支气管活检，且包含 EA、NA 2 种不同气道炎症表型以及健康对照样本的数据集。选择 GSE143303 为目标数据集。通过 lumi 包读取 illumina 测序原始数据，illuminaHumanv 4.db 注释探针文件，并通过 normalizeBetweenArray 函数进行矩阵标准化处理，最后构建 EA、NA 不同炎症表型与健康对照的分组数据，利用 FactoMineR 包、factoextra 包执行主成分分析（principal component analysis, PCA）。

### 1.2 重症 EA、NA 相关性模块鉴定

运用加权基因共表达网络分析（weighted correlation network analysis, WGCNA）鉴定与重症 EA、NA 显著相关的关键模块。构建权重基因网络，过滤低表达量基因及离散样本，设置 pickSoft Threshold 中 RsquaredCut 为 0.85，最佳软阈值为系统默认，模块内最少包含 50 个基因。提取 GSE14330 临床信息导入性状数据，分析不同样本和性状聚类情况，构建性状-模块相关性图，选择与 EA、NA 相关性最高的模块进行后续分析。

### 1.3 失巢凋亡调控重症 EA、NA 的基因及通路鉴定

失巢凋亡相关基因来自 GeneCards（<https://www.genecards.org/>）。将失巢凋亡基因与 EA、NA 不同炎症表型的重症哮喘 WGCNA 模块基因重叠，

鉴定出发挥调控作用的失巢凋亡基因。重叠部分的基因通过蛋白质分析通过进化关系（protein analysis through evolutionary relationships, PANTHER）（<https://www.pantherdb.org/>）进行通路注释和富集，以探索潜在的调控机制。

### 1.4 失巢凋亡调控重症 EA、NA 病理表型的关键靶基因鉴定

根据 PANTHER 通路富集结果，筛选出失巢凋亡靶向调控 EA、NA 不同炎症表型重症哮喘的潜在病理表型。从 GeneCards 获取病理表型相关基因进一步与失巢凋亡调控基因取交集，并对交集基因在 EA、NA 中的表达量以及对气道炎症分型的诊断价值进行表征，表征良好的基因被鉴定为关键靶基因。最后借助目前最全面的人类蛋白质图谱（human protein atlas, HPA）数据库（<https://www.proteinatlas.org/>）收录的共识组织基因数据及单细胞转录组学数据对关键靶基因在人体组织及肺部细胞的转录本表达水平进行注释，探索基因在组织及肺部各细胞中的表达情况。

### 1.5 年龄、性别、吸烟与重症 EA、NA 发病与否结局指标的预测评估

提取 GSE14330 临床信息，包括年龄、性别和吸烟情况，因仅有部分样本记载了烟龄，故予以剔除烟龄数据。利用 survival 和 rms 程序包，基于 Cox 比例风险模型（cox proportional-hazards model, COX）分析结果，以患病风险作为预测因子的结局。构建重症 EA、NA 患者不同炎症表型与年龄、性别、吸烟情况 3 个预测因子的诺莫图，并分别计算每个预测因子的曲线下面积（area under curve, AUC）值，绘制受试者工作特征（receiver operator characteristic, ROC）曲线进行模型评估。同时为评估预测模型的判别能力，构建校准曲线对比模型预测概率和观测概率的一致性；构建决策曲线分析（decision curve analysis, DCA）曲线观察随着阈概率变化，按照模型预测值进行干预的情况下净获益的变化，验证诺莫图诊断预测性能。

### 1.6 关键靶基因潜在的靶向中药化合物及结合亲和力和鉴定

通过 TcmBank（<https://www.tcmbank.cn/>）查找对关键靶基因具有潜在干预作用的中药化合物分子，通过 ETCM（<http://www.tcmip.cn/ETCM/>）表征化合物的药理、毒理学特性，借助 Cytoscape 软件构建关键靶基因与潜在中药化合物分子的关联网

络, 识别相互作用最高的化合物。随后通过 CB-Dock2 执行关键靶基因与中药化合物配体的分子对接, 并基于 AutoDock Vina 评估最佳结合位点的结合亲和力。

## 2 结果

### 2.1 数据概况

GSE143303 是患有重症哮喘不同炎症表型的

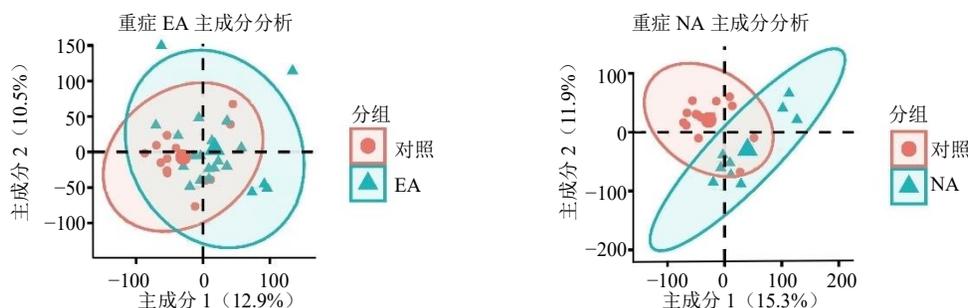


图 1 GSE143303 数据集 PCA

Fig. 1 PCA of GSE143303 data set

### 2.2 重症 EA、NA 相关性模块分析

WGCNA 分析旨在寻找协同表达的基因模块, 并探索基因网络与临床表型之间的关联, 以及模块中的核心基因。EA、NA 不同表型的数据最佳软阈值分别是 5 和 10, 在此条件下基因表达网络均符合无尺度网络的分布 (图 2-A、B), 且不同表型之间样本和临床性状展示出不同的聚类特征 (图 2-C、D)。经鉴定, 分别有 7 个模块与 EA、NA 密切相关 (图 2-E、F)。其中, 与 EA 正相关性最强的是黑色模块 (相关系数=0.59), 包含 54 个基因; 与 NA 正相关性最强的是蓝色模块 (相关系数=0.86), 包含 212 个基因。同时, 模块与模块、模块与性状之间关联显著 (图 2-G、H)。

### 2.3 失巢凋亡基因参与整合素信号通路调控重症 EA、NA

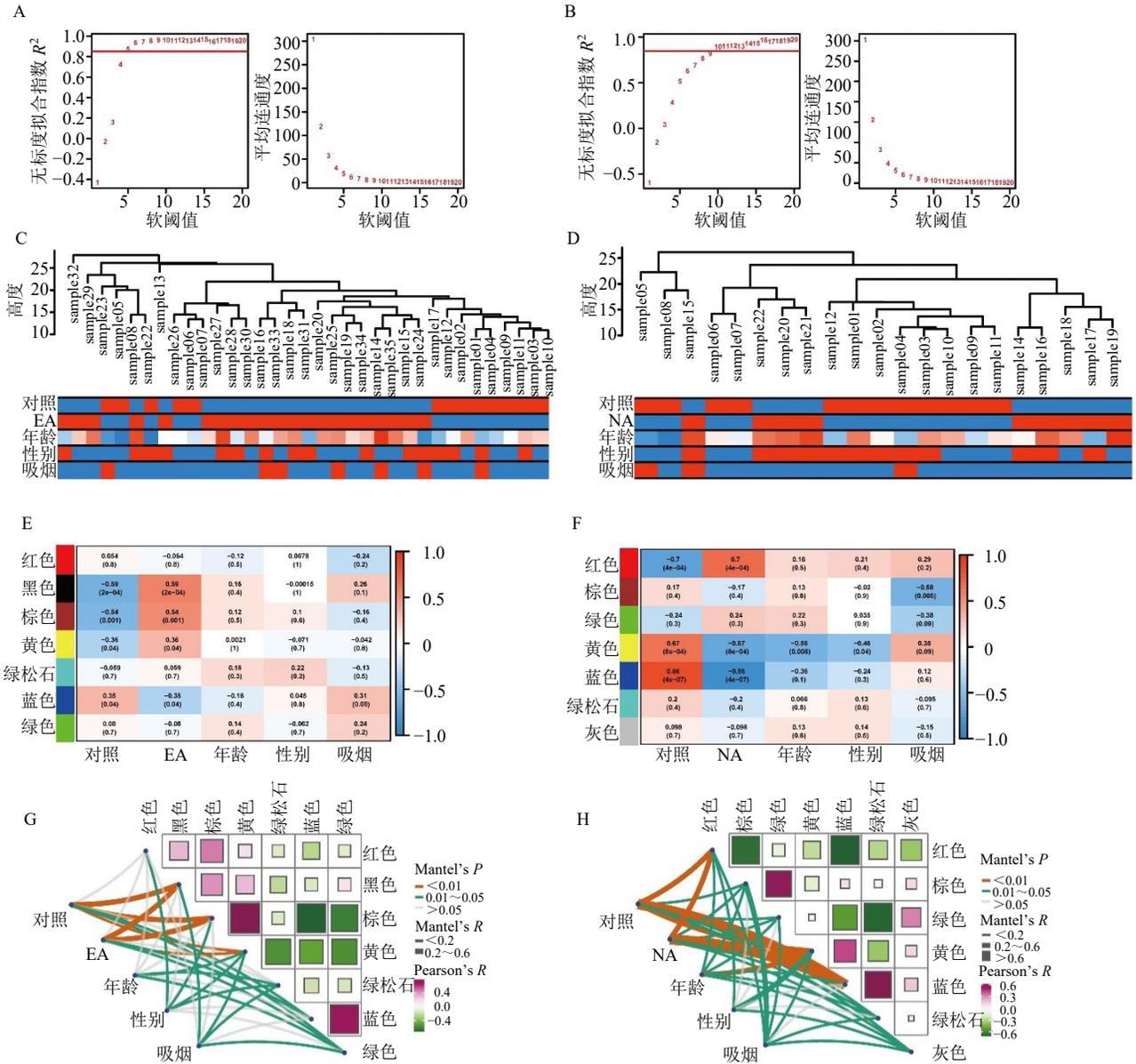
GeneCards 共收录 919 个失巢凋亡相关基因 (数据库访问时间: 2024 年 5 月 22 日), 与 EA 正相关性最强的黑色模块有 5 个重叠基因, 与 NA 正相关性最强的蓝色模块有 16 个重叠基因。分别对重叠基因进行 PANTHER 通路富集, 发现不同炎症表型均在整合素信号通路上富集 (图 3-A、B)。整合素信号通路是与哮喘气道重塑显著相关的途径。此外, 失巢凋亡调控 EA 的基因还富集在血管生成、成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factors, FGF) 信号通路等与气道重塑同样相关的途径; 失巢凋亡调控 NA 的基因也在 p53 通路、磷脂酰肌醇

患者和健康人的支气管活检标本的转录组测序数据, 包括了 22 例 EA 患者、9 例 NA 患者和 13 例健康对照者。PCA 是一种使用广泛的数据降维算法, 能够直观展示组间数据的分布情况。结果显示, EA 与对照组、NA 与对照组的样本组成均有一定的分离性, 不同炎症表型间展示出不同的样本分布情况 (图 1)。

3-激酶信号 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 激酶通路等参与细胞增殖、凋亡过程的途径富集。由此可见, 失巢凋亡可能通过参与整合素信号通路调控重症 EA、NA 的气道重塑病理表型。

### 2.4 失巢凋亡基因调控重症 EA、NA 气道重塑

GeneCards 共收录 5 503 个气道重塑表型相关基因 (数据库访问时间: 2024-05-22), 与 EA-失巢凋亡有 2 个重叠基因, 分别是活化 C 激酶 1 受体 (receptor for activated C kinase 1, RACK1)、蛋白磷酸酶 2 调节亚基 B $\alpha$  亚型 (protein phosphatase 2 regulatory subunit balpha, PPP2R2A) (图 4-A); 与 NA-失巢凋亡有 11 个重叠基因, 分别是整合素亚基  $\beta$ 5 (integrin subunit beta 5, ITGB5)、肿瘤坏死因子受体超家族成员 1A (tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A, TNFRSF1A)、细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1, CCND1)、血清/糖皮质激素调节激酶 1 (serum/glucocorticoid regulated kinase 1, SGK1)、醛脱氢酶家族 1 成员 A1 (aldehyde dehydrogenase 1 family member A1, ALDH1A1)、醌氧化还原酶 1 [NAD (P) H:quinone oxidoreductase 1, NQO1]、S100 钙结合蛋白 A8 (S100 calcium binding protein A8, S100A8)、NME/NM23 核苷二磷酸激酶 1 (NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 1, NME1)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A (cyclin dependent kinase inhibitor 1A, CDKN1A)、三叶因子 3 (trefoil factor 3, TFF3) 和干扰素  $\alpha$  诱



A-重症 EA 无尺度网络的分布; B-重症 NA 无尺度网络的分布; C-重症 EA 样本树状图和性状热图; D-重症 NA 样本树状图和性状热图; E-重症 EA 模块-性状相关性; F-重症 NA 模块-性状相关性; G-重症 EA 模块与模块、模块与性状的相关性; H-重症 NA 模块与模块、模块与性状的相关性。

A-distribution of scale-free networks in severe EA; B-distribution of scale-free networks in severe NA; C- tree map and character heat map of severe EA sample; D-tree map and character heat map of severe NA sample; E-module-trait correlation of severe EA; F-module-trait correlation of severe NA; G-correlation between modules and modules, modules and traits in severe EA; H-correlation between modules and modules, modules and traits in severe NA.

图 2 重症 EA、NA 不同炎症表型 WGCNA 分析

Fig. 2 WGCNA of distinct inflammatory phenotypes in severe EA and NA

导蛋白 27 (interferon alpha inducible protein 27, IFI27) (图 4-B)。其中, PPP2R2A 在重症 EA 和对照、重症 EA 和重症 NA 中均具有差异表达 (图 4-C); ITGB5、CCND1、ALDH1A1、S100A8、NME1、TFF3 和 IFI27 在重症 NA 和对照、重症 NA 和重症 EA 中均具有差异表达 (图 4-D)。此外, 重症 EA 中 PPP2R2A (AUC=0.85) 及重症 NA 中 ITGB5

(AUC=0.93)、TNFRSF1A (AUC=0.77)、CCND1 (AUC=0.97)、ALDH1A1 (AUC=0.91) 均展示出极佳的诊断预测效能 (图 4-E)。并且, PPP2R2A (AUC=0.70)、ITGB5 (AUC=0.80)、CCND1 (AUC=0.83)、ALDH1A1 (AUC=0.87) 在鉴别重症 EA 和重症 NA 气道炎症表型具有良好价值 (图 4-F)。综上, 失巢凋亡基因 PPP2R2A 可能是调控重

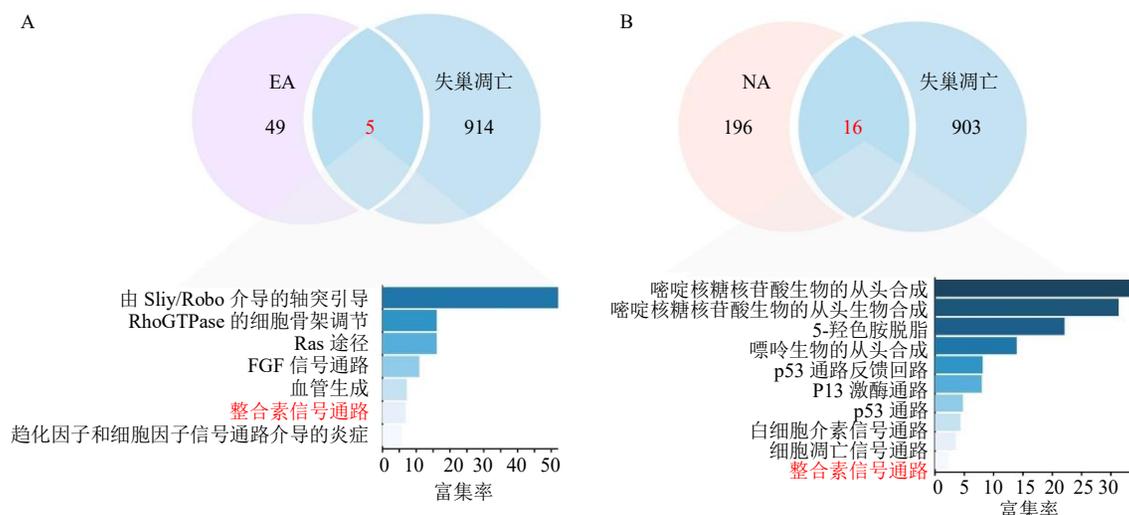


图 3 失巢凋亡调控重症 EA (A)、NA (B) 的基因及通路  
 Fig. 3 Anoikis regulated genes and pathways in severe EA (A) and NA (B)

症 EA 气道重塑表型的关键靶基因；失巢凋亡基因 ITGB5、CCND1、ALDH1A1 可能是调控重症 NA 气道重塑表型的关键靶基因。这些基因在肺部的表达量相较于其他多数组织高（图 5）。同时，基于人体的单细胞转录本数据提示 PPP2R2A 在肺部多种细胞表达，包括 I 型肺泡上皮细胞、II 型肺泡上皮细胞、粒细胞、巨噬细胞、内皮细胞、成纤维细胞等；ITGB5 则在平滑肌细胞表达最高，其次为成纤维细胞和巨噬细胞；CCND1 在 I 型肺泡上皮细胞、II 型肺泡上皮细胞及分泌细胞表达量丰富；在巨噬细胞中高表达，其次为分泌细胞（图 6）。调控肺组织细胞中高表达的靶点，对于抑制气道上皮细胞向间充质细胞的转化及成纤维细胞的增殖具有重要意义。

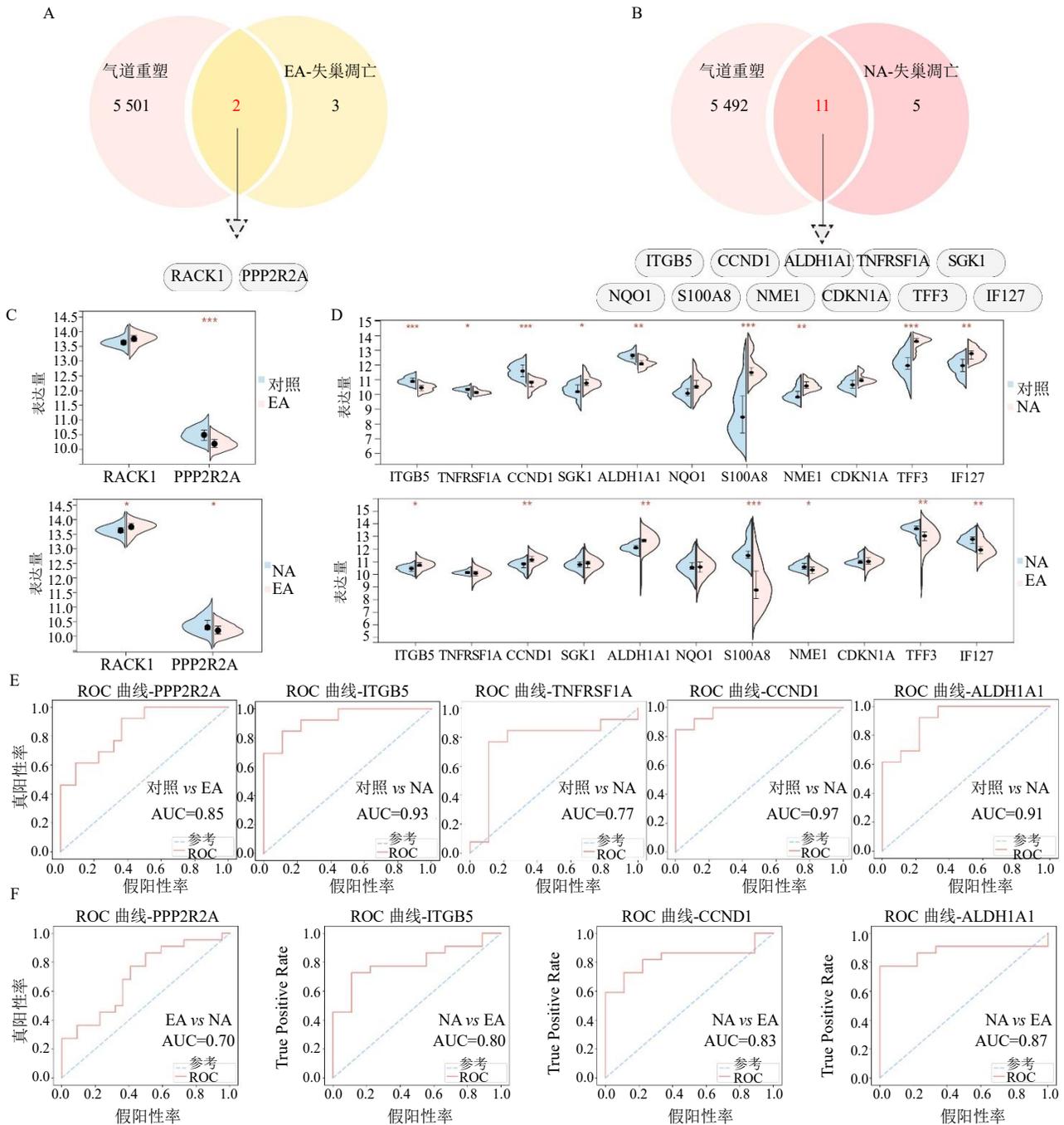
### 2.5 年龄、性别、吸烟在重症 EA、NA 的诊断预测价值

GSE14330 记载的临床数据包括年龄、性别、吸烟。其中吸烟分为不吸烟者和曾经吸烟者。为判断以上因素在重症哮喘气道重塑发病中的影响情况，通过诺莫图观察其单独评分标尺，通过计算预测因子表达评分之和来判断其在重症哮喘气道重塑发展中的风险率。同时绘制 ROC 曲线、校准曲线、DCA 决策曲线评价模型稳健度。结果提示，年龄、性别在重症 EA、NA 患者中的发病风险预测均 > 50%（图 7-A、B）。ROC 结果提示，年龄在重症 EA、NA 表型中的诊断价值最高（AUC 值均 > 0.7），且在 NA 中的诊断性能优于 EA（图 7-C、D）。校准曲

线提示，诺莫图的总体拟合良好，预测概率与实际概率较吻合（图 7-E、F）。DCA 决策曲线提示，年龄、性别、吸烟 3 个因素对重症 EA、NA 患者发病的合并影响大于任一因素的影响（图 7-G、H）。

### 2.6 潜在干预重症 EA、NA 气道重塑中失巢凋亡的中药化合物

本研究揭示了重症哮喘患者中失巢凋亡基因 PPP2R2A、ITGB5、CCND1 和在不同炎症表型气道重塑过程中的关键作用。通过综合分析，识别出 59 种与这些基因相互作用的中药化合物分子，其中水飞蓟素（C25H22O10）、花生四烯酸（C20H32O2）和熊果酸（C30H48O3）显示出与这些基因高度的互作性（图 8-A）。这些化合物来源于降气化痰药、散结化痰药、清热解毒药以及活血散瘀药等，反映了中医药侧重通过化痰、散瘀法治疗哮喘气道重塑的思想，同时侧面说明了“痰、瘀”病理因素在气道重塑发病中的重要作用。同时，水飞蓟素、花生四烯酸、熊果酸高药物血浆蛋白结合率（>95%）和低人体肝毒性的药动学特性及毒理学特性也支持了上述化合物在安全有效治疗重症哮喘气道重塑方面的潜力（图 8-B）。此外，进一步的分子对接分析验证了这些中药化合物与失巢凋亡基因之间的结合亲和力（图 9）。其中水飞蓟素与 PPP2R2A、ITGB5、CCND1 的结合亲和力评分均超过 -9，表明其可能在调控气道重塑中发挥重要作用。花生四烯酸和熊果酸虽然亲和力略低于水飞蓟素，但评分均超过 -6，仍具有良好的结合潜力。



A-气道重塑基因与 EA-失巢凋亡交集韦恩图; B-气道重塑基因与 NA-失巢凋亡交集韦恩图; C-气道重塑-EA-失巢凋亡关键基因表达量小提琴图; D-气道重塑-NA-失巢凋亡关键基因表达量小提琴图; E-关键基因在对照组和重症 EA、NA 的鉴别诊断 ROC 曲线; F-关键基因在重症 EA、NA 的鉴别诊断 ROC 曲线。

A-venn diagram of intersection between airway remodeling genes and EA-anoikis; B-venn diagram of intersection between airway remodeling genes and NA-anoikis; C-violin plot of expression levels of key genes in airway remodeling-EA-anoikis; D-violin plot of expression levels of key genes in airway remodeling-NA-anoikis; E-ROC curve for differential diagnosis of key genes in control group and severe EA and NA; F-ROC curve for differential diagnosis of key genes in severe EA and NA.

图 4 失巢凋亡基因在重症 EA、NA 气道重塑的诊断价值表征

Fig. 4 Characterization of diagnostic value of anoikis-associated gene in airway remodeling of severe EA and NA

### 3 讨论

重症哮喘是指在过去的 1 年中, 需要使用全球

哮喘防治创议建议的第 4 级或第 5 级哮喘药物才能

够维持控制, 或即使在上述治疗下仍表现为“未控

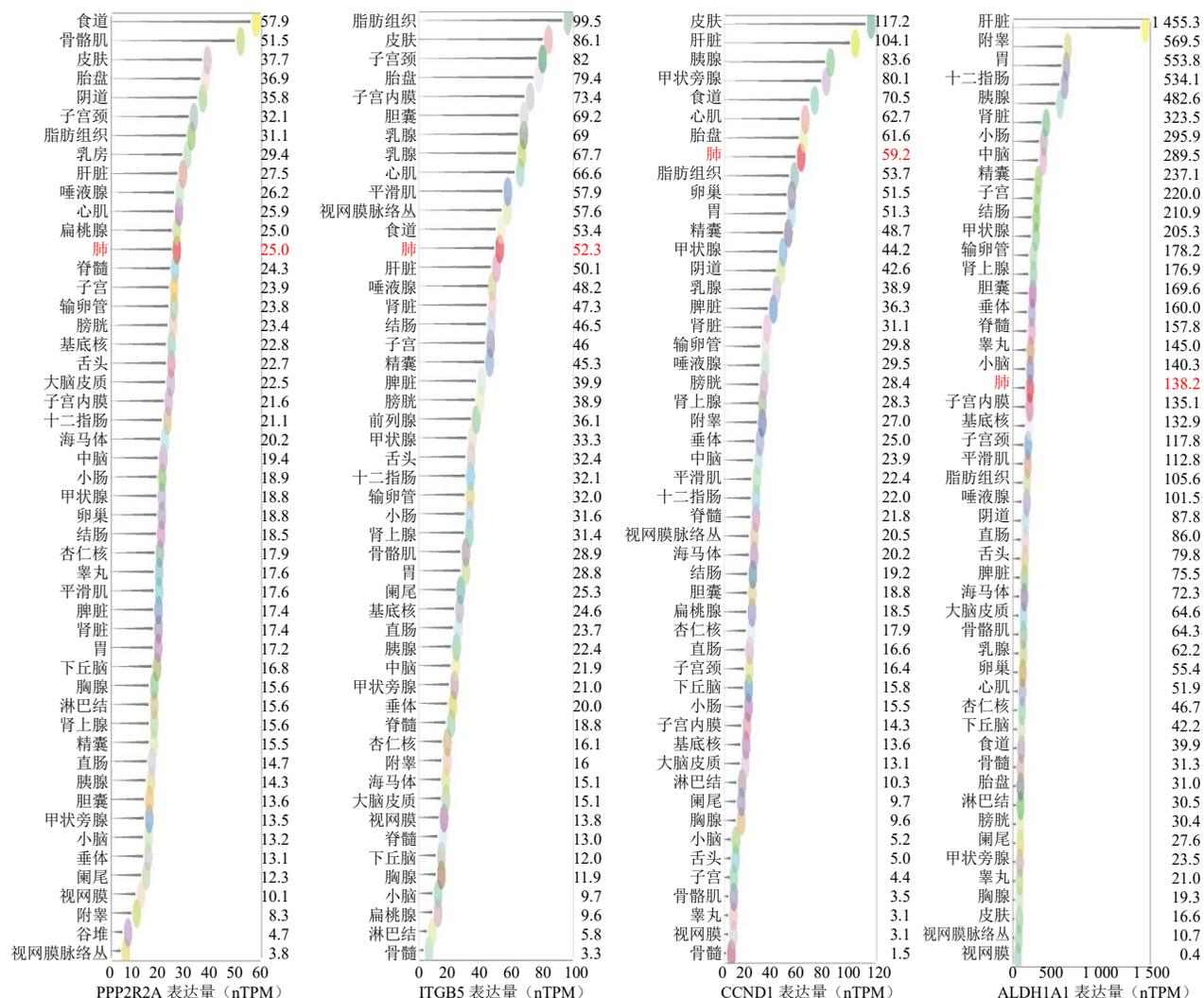


图5 关键靶基因在人体组织表达量景观

Fig. 5 Expression landscape of key target genes in human tissues

制”的哮喘<sup>[8]</sup>。虽然重症哮喘患者人数仅占哮喘患病人数的小部分，但重症哮喘急诊就医率和住院率分别为轻中度哮喘患者的数十倍，也是哮喘致死的主要原因<sup>[9]</sup>。炎症细胞内流浸润气道导致炎症不消退是哮喘难以控制的重要原因，而不同的炎症表型在重症哮喘中展示出不一样的病理特点，所导致的疾病严重程度不一。目前，重症哮喘的抗炎治疗，如吸入性皮质类固醇主要对气道嗜酸性粒细胞增多敏感<sup>[10]</sup>，而NA对糖皮质激素无效或耐药，并且可以通过上调相关炎症因子的表达使哮喘更难以控制<sup>[11]</sup>。提示针对重症哮喘不同炎症表型的研究对于控制急性发作率和治疗具有重要临床意义。因此，探索不同哮喘表型的分子特征，可以为哮喘靶向治疗提供更加针对性的选择。

失巢凋亡是一种特殊形式的程序性细胞死亡，

是由细胞与细胞外基质或其他相邻细胞失去接触而导致的细胞凋亡。在正常生理条件下，失巢凋亡可防止细胞在不适宜的地方生长从而维持组织稳态<sup>[12]</sup>。然而，在病理条件下，过度的失巢凋亡可能会导致细胞异常增生和迁移，进而促进病理发展。本研究提示，在重症哮喘中失巢凋亡可能通过整合素信号通路介导气道重塑。气道重塑是重症哮喘的关键病理特征，与病情的严重程度和预后密切相关。气道重塑包括气道壁增厚、平滑肌增生、气道上皮下基质沉积导致的上皮下纤维化等病理改变，最终导致气道狭窄和气流受限，显著影响哮喘患者的气道功能。研究表明，上皮间充质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)的激活是气道重塑的关键，在此过程中，上皮细胞获得间充质细胞的特征，细胞运动性和迁移能力增强，促进气道重塑的

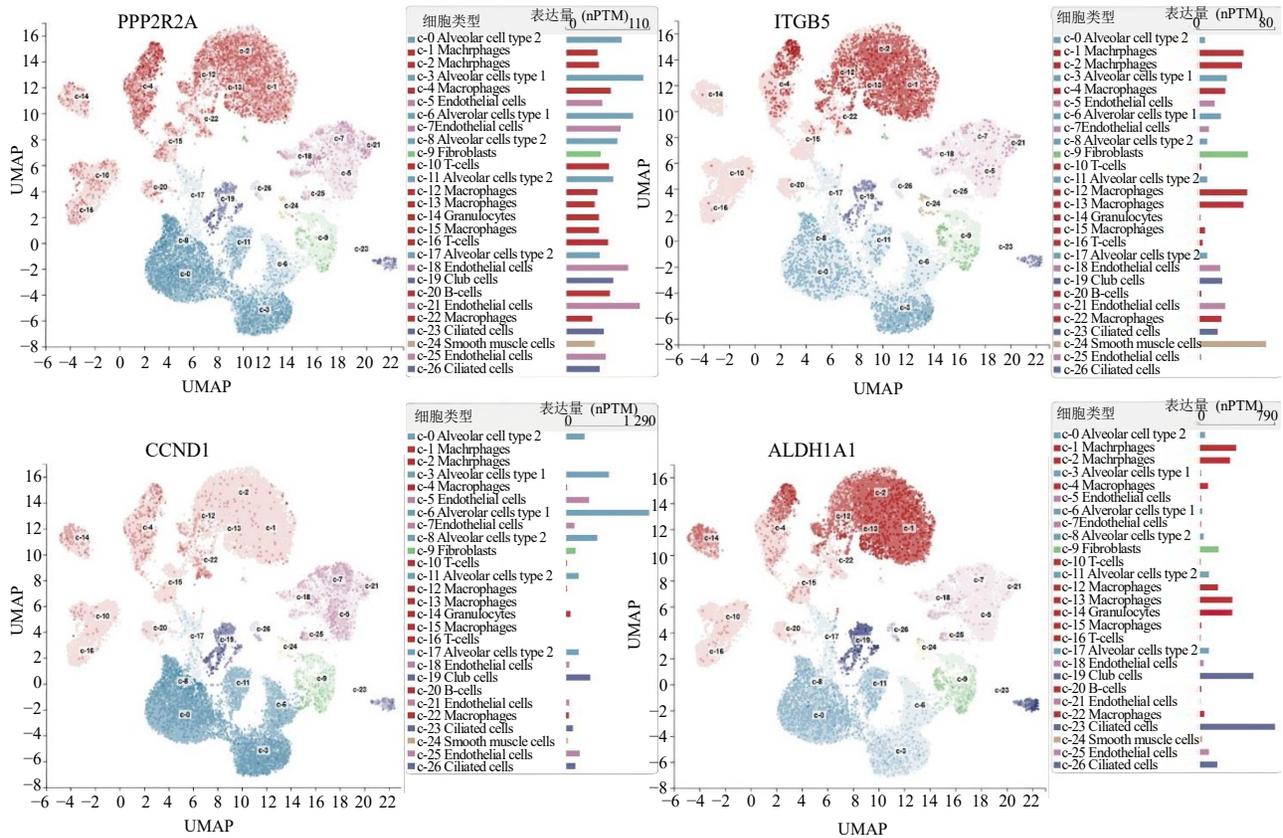


图 6 关键靶基因在人体肺部的单细胞转录本表达水平

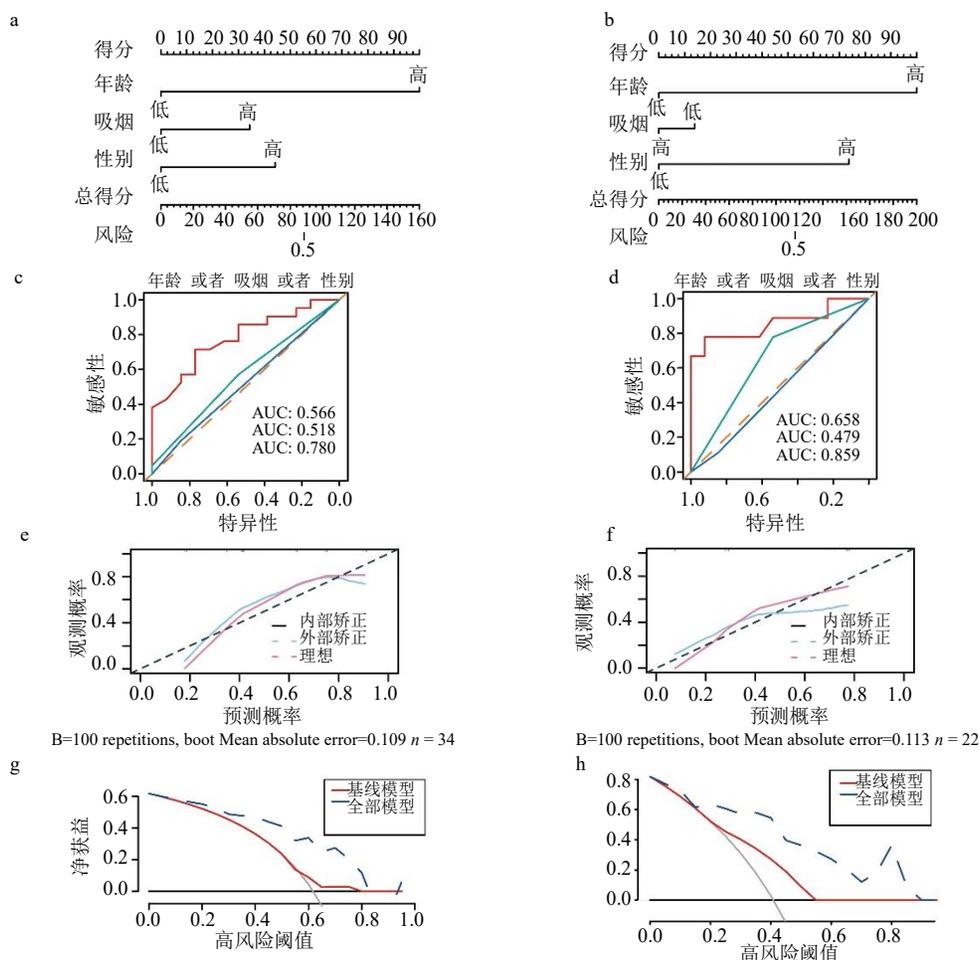
Fig. 6 Expression levels of key target genes in human lung single-cell transcriptome profiles

发展<sup>[13]</sup>。值得注意的是，失巢凋亡通过调控细胞的生存和迁移参与 EMT 过程。本研究发现失巢凋亡在重症 EA、NA 的病理机制可能与整合素信号通路密切相关。整合素是一类介导细胞与细胞外基质相互作用的跨膜受体，整合素信号通路的激活同样促进细胞的黏附、增殖和迁移，导致气道重塑、血管生成、肺纤维化等肺结构改变。诱导黏附的整合素信号传导可以抑制失巢凋亡的发生<sup>[14]</sup>，同时促进气道上皮细胞的 EMT<sup>[15]</sup>。因此，失巢凋亡在重症哮喘气道重塑中发挥重要作用，其机制可能与整合素信号通路介导的 EMT 有关。

PPP2R2A 作为蛋白磷酸酶 2A 的调节亚基之一，参与细胞增殖、DNA 复制、凋亡和细胞迁移的多种激酶和信号通路<sup>[16]</sup>。PPP2R2A 增强 Th17 细胞的分化<sup>[17]</sup>，而 Th17 又通过分泌白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 等细胞因子参与免疫反应及 EA 气道炎症和气道重塑<sup>[18-19]</sup>。另外 PPP2R2A 是间隙连接蛋白 Cx-43 及紧密连接蛋白 Zo-1 维持表皮屏障功能的必需因素<sup>[20]</sup>。ITGB5 是细胞表面的一种整合素受体，ITGB5 增强中性粒细胞与血管内皮

细胞的黏附，加剧炎症反应<sup>[21]</sup>，并且 ITGB5 可通过参与气道上皮细胞的增殖和迁移，影响气道结构的重塑过程，进而影响 NA<sup>[22]</sup>。CCND1 是细胞进程的关键调节因子，在细胞增殖和迁移中起关键作用<sup>[23]</sup>，能够促进气道上皮细胞和成纤维细胞的增殖，导致气道壁增厚和平滑肌增生，从而促进气道重塑的发展。ALDH1A1 是一种参与细胞分化和抗氧化反应的酶，它在维持细胞功能和抵御氧化应激中起着重要作用<sup>[23]</sup>。在 NA 中，可能通过减少氧化应激，减轻炎症细胞的活化和炎症介质的释放，保护气道细胞免受炎症损伤，从而减缓气道重塑进程<sup>[24-25]</sup>。综上，PPP2R2A 可能通过增强 Th17 细胞的分化诱导重症 EA 气道重塑的加重；ITGB5、CCND1 和 ALDH1A1 可能是从参与气道上皮细胞的增殖和迁移、促进气道上皮细胞和成纤维细胞的增殖促进重症 NA 的气道重塑进程。

水飞蓟素是从中药水飞蓟中提取的一种黄酮木脂素类化合物，其显著抗氧化、抗炎、抗纤维化的药理作用，使其具有良好的清热解毒功效<sup>[26-28]</sup>。研究表明，水飞蓟素能够降低哮喘小鼠模型中嗜酸



a-重症 EA 患者中年龄、性别、吸烟因素的预测诺莫图；b-重症 NA 患者中年龄、性别、吸烟因素的预测诺莫图；c-重症 EA 患者中年龄、性别、吸烟因素的 ROC 曲线；d-重症 NA 患者中年龄、性别、吸烟因素的 ROC 曲线；e-重症 EA 患者中年龄、性别、吸烟因素的校准曲线；f-重症 NA 患者中年龄、性别、吸烟因素的校准曲线；g-重症 EA 患者中年龄、性别、吸烟因素的 DCA 决策曲线；h-重症 NA 患者中年龄、性别、吸烟因素的 DCA 决策曲线。

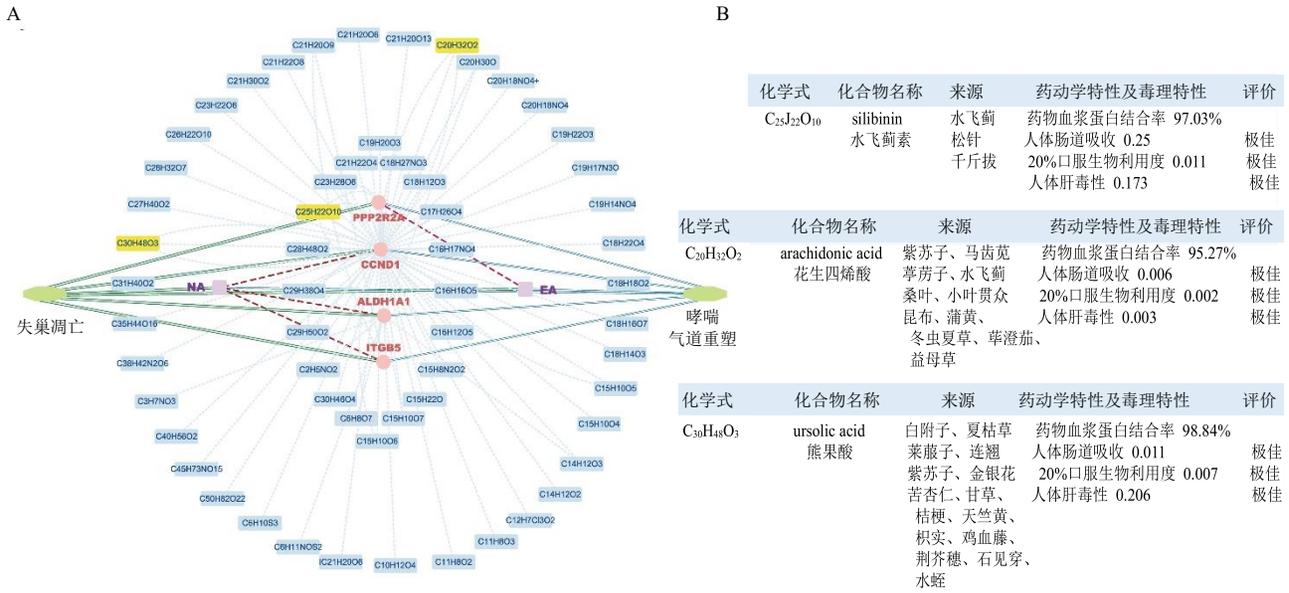
a-nomogram for predicting age, gender and smoking factors in patients with severe EA; b-nomogram for predicting age, gender and smoking factors in patients with severe NA; c-ROC curve of age, gender and smoking factors in patients with severe EA; d-ROC curve of age, gender and smoking factors in patients with severe NA; e-calibration curve of age, gender and smoking factors in patients with severe EA; f-calibration curve of age, gender and smoking factors in patients with severe NA; g-DCA decision curve of age, gender and smoking factors in patients with severe EA; h-DCA decision curve of age, gender and smoking factors in patients with severe NA.

图 7 年龄、性别、吸烟在重症 EA、NA 的诊断预测模型

Fig. 7 Age-gender-smoking diagnostic prediction model for severe EA and NA

性粒细胞、中性粒细胞细胞数量及 IL-4、IL-5 和 IL-13 等炎症因子含量<sup>[26]</sup>。重要的是，水飞蓟素可以显著抗肺部纤维化，抑制肺组织中的胶原沉积及气道重塑的经典标志物 TGF- $\beta$ 1 的表达<sup>[29]</sup>，并在抑制细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT 潜力巨大<sup>[30]</sup>。研究表明，水飞蓟素可以通过阻断纤维连接蛋白 1 (fibronectin 1, FN1) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路，下调 CCND1 的表达以降低 EMT 相关标志物如 Snail、Slug 的表达<sup>[31]</sup>；通过降低和基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9)

的蛋白和 mRNA 表达发挥抑制细胞增殖、迁移和侵袭能力的药理作用<sup>[32]</sup>。遗憾的是，目前并没有水飞蓟素与 PPP2R2A、ITGB5 相互作用的直接证据。花生四烯酸是一种重要的人体必须脂肪酸，也是人体中含量最高、分布最广的多不饱和脂肪酸，其代谢途径在免疫反应和哮喘等炎症疾病中起关键作用<sup>[33]</sup>。紫苏子、葶苈子等多种降气化痰药均是花生四烯酸的成分来源。此外，花生四烯酸及其衍生介质抑制参与哮喘发病机制的几种炎症细胞（如嗜酸性粒细胞）的趋化性和功能，并在体外对气道上皮



A-TcmBank 预测的生物标志物潜在的干预中药化合物；B-ETCM 表征关键潜在在中药化合物的药动学、毒理学特性。

A-TcmBank was used to predicts biomarkers for potential intervention compounds in TCM; B-ETCM was used to characterize pharmacokinetic and toxicological properties of potential compounds in TCM.

图 8 关键靶基因-中药化合物关联网络及化合物信息

Fig. 8 Key target gene-compounds in TCM association network and information of compounds

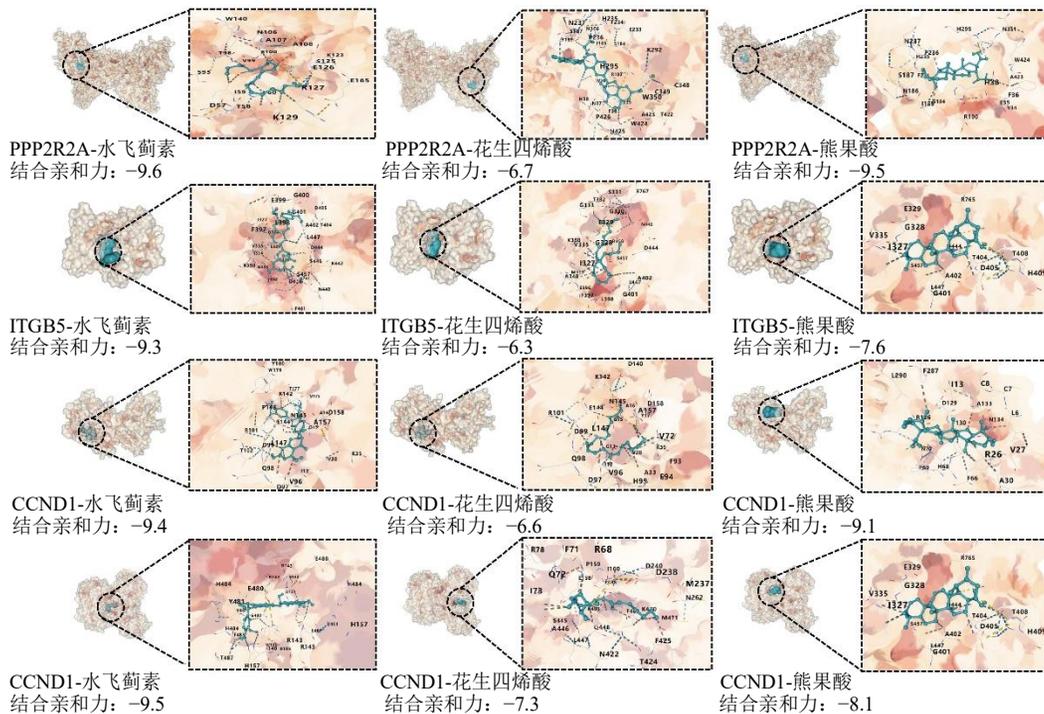


图 9 最佳结合位点的分子对接及结合亲和力评分

Fig. 9 Molecular docking of optimal binding site and binding affinity scoring

细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞具有抗重塑作用，同时诱导粒细胞凋亡、抑制增殖，并帮助启动组织修复和愈合<sup>[34-36]</sup>。熊果酸是一种存在于多种植物中

的天然三萜化合物，来源于多种散结化痰药（如白附子、莱菔子、昆布）、清热解毒药（夏枯草、连翘、金银花）以及活血散瘀药（如鸡血藤、石见穿、水

蛭)。研究表明,熊果酸能够下调 CCND1 表达抑制异常的细胞周期和增殖<sup>[37]</sup>,也可能通过抑制 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88)/核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 通路减少炎症介质的产生和释放,减轻气道炎症来间接影响气道重塑,并减缓哮喘气道重塑的进程<sup>[38-40]</sup>。综上,水飞蓟素、花生四烯酸以及熊果酸均能从一定程度上改善哮喘患者的气道炎症及气道重塑。

哮喘异质性受到多种因素的影响,包括年龄、性别、吸烟与否、环境因素及社会经济地位等。在此,本研究对年龄、性别、吸烟在哮喘发病中的影响地位进行了评估。结果发现,年龄和性别对重症哮喘 EA 和 NA 表型均有较好的预测价值。但烟草的使用同样是哮喘发病的独立危险因素,并且吸烟对哮喘的控制水平、治疗效果及预后均有不良影响<sup>[41]</sup>。哮喘发病年龄通常用于区分不同的成人哮喘临床表型,12岁常被界定为早发性成人哮喘和迟发性成人哮喘的分水岭。早发性成人哮喘更可能是特应性的,且哮喘发作的频率更高,而患有迟发性成人哮喘的更可能是女性、吸烟者,其相对应的气流阻塞水平也更高<sup>[42]</sup>。年龄方面,据统计,与男性相比,女性哮喘的发病率更高,尤其是青春期后女性比男性更容易患哮喘且病情更严重<sup>[43]</sup>,且哮喘发作的概率随着女性基线年龄的增加而降低,而男性则没有明显相关性<sup>[44]</sup>。同时,年龄和性别也关系着哮喘的炎症表型。实验证明,嗜酸性粒细胞浸润的程度随豚鼠的年龄和性别而变化,成年动物(雄性和雌性)中嗜酸性粒细胞的比例较高<sup>[45]</sup>。但在老年人的肺中没有注意到嗜酸性粒细胞的增加,主要是中性粒细胞的积累<sup>[46]</sup>。综上,探索和关注年龄、性别、吸烟在哮喘异质性中的作用,针对这些因素指导哮喘患者个体化治疗和预防有一定助益。

本研究通过对重症哮喘患者的气道嗜酸粒细胞炎症表型、中性粒细胞浸润的炎症表型支气管活检样本的转录组数据进行二次深入分析,以明确失巢凋亡在不同炎症表型发病机制的关键靶基因及其干预重症哮喘的通路机制,并探索潜在生物标志物在重症哮喘患者 EA、NA 表型中的区分诊断价值及其在肺内细胞表达情况。最后回归临床,预测具有调控潜在生物标志物作用的关键中药化合物成分,借助化合物的药理学及毒理学特性、化合物与潜在生物标志物的结合亲和力表征评价干预药物

的潜力。同时,通过构建预测模型探索了年龄、性别、吸烟与否对于重症 EA、NA 发病与否结局指标的关系。以期为未来重症哮喘不同炎症表型患者的个体化治疗提供基于生物信息学的靶点依据及新药设计思路。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Papi A, Brightling C, Pedersen S E, *et al.* Asthma [J]. *Lancet*, 2018, 391(10122): 783-800.
- [2] Schoettler N, Strek M E. Recent advances in severe asthma: From phenotypes to personalized medicine [J]. *Chest*, 2020, 157(3): 516-528.
- [3] Wenzel S E. Asthma phenotypes: The evolution from clinical to molecular approaches [J]. *Nat Med*, 2012, 18(5): 716-725.
- [4] Jones T L, Neville D M, Chauhan A J. Diagnosis and treatment of severe asthma: A phenotype-based approach [J]. *Clin Med*, 2018, 18(Suppl 2): s36-s40.
- [5] Chen D, Yi R B, Hong W F, *et al.* Anoikis resistance of small airway epithelium is involved in the progression of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1155478.
- [6] Yin J, Wang J, Zhang X X, *et al.* A missing piece of the puzzle in pulmonary fibrosis: Anoikis resistance promotes fibroblast activation [J]. *Cell Biosci*, 2022, 12(1): 21.
- [7] Vermeer P D, Denker J, Estin M, *et al.* MMP9 modulates tight junction integrity and cell viability in human airway epithelia [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 296(5): L751-L762.
- [8] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组, 中国哮喘联盟. 重症哮喘诊断与处理中国专家共识 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2017, 40(11): 813-829.
- [9] Pretolani M, Bergqvist A, Thabut G, *et al.* Effectiveness of bronchial thermoplasty in patients with severe refractory asthma: Clinical and histopathologic correlations [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 139(4): 1176-1185.
- [10] Nelson R K, Bush A, Stokes J, *et al.* Eosinophilic asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2020, 8(2): 465-473.
- [11] Zhang X L, Xu Z X, Wen X, *et al.* The onset, development and pathogenesis of severe neutrophilic asthma [J]. *Immunol Cell Biol*, 2022, 100(3): 144-159.
- [12] Taddei M L, Giannoni E, Fiaschi T, *et al.* Anoikis: An emerging hallmark in health and diseases [J]. *J Pathol*, 2012, 226(2): 380-393.
- [13] 李艳丽, 张宇婧, 闫永彬. 基于上皮细胞-间充质转化的搜风愈喘方调控哮喘大鼠气道重塑的机制研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2024, 35(2): 208-215.
- [14] Alanko J, Mai A, Jacquemet G, *et al.* Integrin endosomal signalling suppresses anoikis [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(11): 1412-1421.
- [15] Tan M L, Huang W J, Wang Y, *et al.* Integrin- $\beta$ 4 regulates the dynamic changes of phenotypic characteristics in association with epithelial-mesenchymal transition (EMT) and RhoA activity in airway epithelial cells during injury

- and repair [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(3): 1254-1270.
- [16] Shen S N, Yue H, Li Y, *et al.* Upregulation of miR-136 in human non-small cell lung cancer cells promotes Erk1/2 activation by targeting PPP2R2A [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(1): 631-640.
- [17] Pan W L, Nagpal K, Suárez-Fueyo A, *et al.* The regulatory subunit PPP2R2A of PP2A enhances Th1 and Th17 differentiation through activation of the GEF-H1/RhoA/ROCK signaling pathway [J]. *J Immunol*, 2021, 206(8): 1719-1728.
- [18] 杨志明, 成俊芬. Th17 细胞及其在支气管哮喘发病中的作用 [J]. 中华哮喘杂志: 电子版, 2012, 6(1): 30-34.
- [19] 韩露, 王楠, 陈子, 等. 靶向 Th17 细胞免疫治疗中重度哮喘的作用 [J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2018, 12(7): 405-409.
- [20] Gerner L, Youssef G, O'Shaughnessy R F L. The protein phosphatase 2A regulatory subunit Ppp2r2a is required for connexin-43 dephosphorylation during epidermal barrier acquisition [J]. *Exp Dermatol*, 2013, 22(11): 754-756.
- [21] 刘秋怡, 符州. 中性粒细胞在哮喘发生发展的作用 [J]. 临床医学进展, 2023, 13(3): 3194-3199.
- [22] 张星慧, 常晓悦. 中性粒细胞性哮喘与其相关细胞因子 [J]. 国际呼吸杂志, 2017, 37(23): 1815-1818.
- [23] 盖晓燕, 常春, 王娟, 等. 中性粒细胞型哮喘患者的气道炎症与小气道重构分析 [J]. 北京大学学报: 医学版, 2018, 50(4): 645-650.
- [24] Misso N L A, Thompson P J. Oxidative stress and antioxidant deficiencies in asthma: Potential modification by diet [J]. *Redox Rep*, 2005, 10(5): 247-255.
- [25] El-Sherbeeney N A, Hassan Z A, Ateyya H. *Tiron* ameliorates oxidative stress and inflammation in a murine model of airway remodeling [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 39: 172-180.
- [26] 朴东云, 李俊峰, 延光海. 水飞蓟素对哮喘小鼠炎症的保护作用研究 [J]. 全科口腔医学杂志: 电子版, 2019, 6(20): 157.
- [27] 龙涛, 张慧丹, 孟璐, 等. 水飞蓟素在慢性疾病中的抗氧化作用研究概述 [J]. 药学研究, 2023, 42(5): 335-339.
- [28] 赵晓迎. 水飞蓟素与干扰素  $\alpha$ -2b 联合恩替卡韦治疗乙肝肝硬化患者的效果比较 [J]. 中国民康医学, 2021, 33(18): 145-147.
- [29] Ko J W, Shin N R, Park S H, *et al.* Silibinin inhibits the fibrotic responses induced by cigarette smoke via suppression of TGF- $\beta$ 1/Smad 2/3 signaling [J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 106(Pt A): 424-429.
- [30] Xu S Y, Zhang H Y, Wang A F, *et al.* Silibinin suppresses epithelial-mesenchymal transition in human non-small cell lung cancer cells by restraining RHBDD1 [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2020, 25: 36.
- [31] Xie W J, Li H S, Lin Q, *et al.* Network pharmacological analysis and experimental validation of the effects of silybin on proliferation, migration, and immunotherapy of papillary thyroid cancer [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2024, 24(6): 672-690.
- [32] Jiang Y, Song H B, Jiang L, *et al.* Silybin prevents prostate cancer by inhibited the ALDH1A1 expression in the retinol metabolism pathway [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 574394.
- [33] Luo Y C, Jin M L, Lou L J, *et al.* Role of arachidonic acid lipoxygenase pathway in Asthma [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2022, 158: 106609.
- [34] Insuela D B R, Ferrero M R, Coutinho D S, *et al.* Could arachidonic acid-derived pro-resolving mediators be a new therapeutic strategy for asthma therapy? [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 580598.
- [35] Barnig C, Frossard N, Levy B D. Towards targeting resolution pathways of airway inflammation in asthma [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 186: 98-113.
- [36] Brash A R. Arachidonic acid as a bioactive molecule [J]. *J Clin Invest*, 2001, 107(11): 1339-1345.
- [37] Yang M H, Hu C X, Cao Y B, *et al.* Ursolic acid regulates cell cycle and proliferation in colon adenocarcinoma by suppressing cyclin B1 [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 622212.
- [38] Kashyap D, Sharma A, Tuli H S, *et al.* Ursolic acid and oleanolic acid: Pentacyclic terpenoids with promising anti-inflammatory activities [J]. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 2016, 10(1): 21-33.
- [39] Seo D Y, Lee S R, Heo J W, *et al.* Ursolic acid in health and disease [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2018, 22(3): 235-248.
- [40] 罗艳, 李玉林, 尹恒. 熊果酸调控 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路改善 GDM 大鼠糖脂代谢及炎症反应和氧化应激 [J]. 中国妇幼健康研究, 2024, 35(1): 6-12.
- [41] 屈媛媛, 曹淼, 王静, 等. 1990—2019 年中国哮喘患病、疾病负担趋势及其危险因素研究 [J]. 中国全科医学, 2024, 27(13): 1594-1600.
- [42] Tan D J, Walters E H, Perret J L, *et al.* Age-of-asthma onset as a determinant of different asthma phenotypes in adults: A systematic review and meta-analysis of the literature [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2015, 9(1): 109-123.
- [43] Loewenthal L, Busby J, McDowell R, *et al.* Impact of sex on severe asthma: A cross-sectional retrospective analysis of UK primary and specialist care [J]. *Thorax*, 2024, 79(5): 403-411.
- [44] Hansen S, Probst-Hensch N, Keidel D, *et al.* Gender differences in adult-onset asthma: Results from the Swiss SAPALDIA cohort study [J]. *Eur Respir J*, 2015, 46(4): 1011-1020.
- [45] Regal J F, Regal R R, Meehan J L, *et al.* Primary prevention of asthma: Age and sex influence sensitivity to allergen-induced airway inflammation and contribute to asthma heterogeneity in guinea pigs [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2006, 141(3): 241-256.
- [46] Meyer K C, Rosenthal N S, Soergel P, *et al.* Neutrophils and low-grade inflammation in the seemingly normal aging human lung [J]. *Mech Ageing Dev*, 1998, 104(2): 169-181.