

宣肺败毒方来源 sRNA 靶向血管紧张素转换酶改善脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤

高银平^{1,3}, 张金君^{1,3}, 李薇薇^{1,3}, 陈春燕^{1,3}, 张玉莹^{1,3}, 郑涵月^{1,3}, 汪杰^{1,3}, 张晗^{1,2,3}, 苗琳^{1,2,3*}, 孙娜^{1,2,3*}

1. 天津中医药大学中医药研究院, 天津 301617
2. 天津中医药大学 省部级共建组分中药国家重点实验室, 天津 301617
3. 现代中药创制全国重点实验室, 天津 301617

摘要: 目的 探讨宣肺败毒方(Xuanfei Baidu Formula, XFBD)来源小RNA(small RNA, sRNA)通过靶向血管紧张素转换酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)对脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)诱导小鼠急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的保护作用及机制。方法 采用改良CTAB法提取XFBD的sRNA并建立文库,预测筛选靶向ACE的sRNA。通过双荧光素酶报告系统验证其靶向性,并在人肺微血管内皮细胞(human pulmonary microvascular endothelial cells, HPMEC)中筛选可抑制ACE表达的sRNA。采用ELISA、Western blotting和qRT-PCR检测sRNA对血管紧张素II(angiotensin II, Ang II)生成、核因子- κ B抑制蛋白 α (inhibitor of nuclear factor- κ B α , I κ B α)及炎症因子表达的影响。建立LPS诱导的ALI小鼠模型,设置对照组、模型组、卡托普利(10 mg/kg)组、XFBD(9.2 g/kg)组、NC-sRNA(10 nmol/只)组、ACE-sRNA-1(10 nmol/只)组和ACE-sRNA-26(10 nmol/只)组,每组6只。采用苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色和Micro-CT评估肺组织病理与影像学变化;检测外周血中白细胞数、中性粒细胞数及支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中总蛋白浓度、白细胞、中性粒细胞、淋巴细胞数量;免疫组化法检测肺组织中上皮型钙黏蛋白(vascular endothelial-cadherin, VE-cadherin)和细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)表达;Western blotting和qRT-PCR检测肺组织ACE-Ang II-Ang II 1型受体(Ang II type 1 receptor, AT1R)通路、I κ B α 及炎症因子表达;ELISA检测血清中Ang II和炎症因子水平。结果 从XFBD中筛选出50条潜在靶向ACE的sRNA,经验证26条具有靶向性,其中12条显著抑制HPMEC细胞中ACE表达($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。7条sRNA显著抑制Ang II生成,以ACE-sRNA-1/26作用最显著($P < 0.001$),并可抑制I κ B α 蛋白及炎症因子表达($P < 0.01$ 、 0.001)。动物实验中,模型组小鼠肺损伤严重($P < 0.001$);与模型组比较,ACE-sRNA-1和ACE-sRNA-26显著改善小鼠肺损伤($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001),上调肺组织VE-cadherin表达($P < 0.001$),下调肺组织ICAM-1、ACE、AT1R、I κ B α 和炎症因子表达($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001),同时降低血清Ang II和炎症因子水平($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 XFBD来源的ACE-sRNA-1和ACE-sRNA-26能够靶向抑制ACE表达及活性,减轻肺血管内皮炎症和屏障损伤,改善LPS诱导的小鼠ALI,其机制可能与调控ACE-Ang II-AT1R通路有关。

关键词: 血管紧张素转化酶;宣肺败毒方;sRNA;急性肺损伤;炎症;柚皮苷;虎杖苷;穗花牡荆苷;苦杏仁苷;甘草酸;马鞭草苷;芥子碱;毛蕊花糖苷;甘草苷;麻黄碱

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)04-1336-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.04.013

Xuanfei Baidu Formula derived from sRNA targeting angiotensin-converting enzyme ameliorates lipopolysaccharides-induced acute lung injury in mice

GAO Yinping^{1,3}, ZHANG Jinjun^{1,3}, LI Weiwei^{1,3}, CHEN Chunyan^{1,3}, ZHANG Yuying^{1,3}, ZHENG Hanyue^{1,3}, WANG Jie^{1,3}, ZHANG Han^{1,2,3}, MIAO Lin^{1,2,3}, SUN Na^{1,2,3}

1. Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China
2. State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin

收稿日期: 2025-09-12

基金项目: 天津市教委科研计划项目(2023KJ139)

作者简介: 高银平, 硕士研究生, 研究方向为中药学。E-mail: gaoyinping2000@163.com

*通信作者: 孙娜, 博士, 助理研究员, 从事中药抗肺部疾病的研究。E-mail: sn1635093846@163.com

苗琳, 博士, 研究员, 从事中药对人体保护性免疫、抗衰老和激素内分泌调控的研究。E-mail: mmmlin@tjutc.edu.cn

301617, China

3. State Key Laboratory of Chinese Medicine Modernization, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect and mechanism of small RNAs (sRNA) derived from Xuanfei Baidu Formula (宣肺败毒方, XFBD) targeting angiotensin-converting enzyme (ACE) in lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury (ALI) in mice. **Methods** The modified CTAB method was employed to extract sRNA from XFBD and a library was constructed, followed by prediction and screening of sRNAs targeting ACE. The targeting specificity was verified using a dual-luciferase reporter system, and sRNAs capable of suppressing ACE expression were screened in human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMEC). The effects of sRNA on angiotensin II (Ang II) generation, inhibitor of inhibitor of nuclear factor- κ B α (I κ B α) and inflammatory cytokine expressions were examined by ELISA, Western blotting and qRT-PCR. An LPS-induced ALI mice model was established, control group, model group, captopril (10 mg/kg) group, XFBD (9.2 g/kg) group, NC-sRNA (10 nmol/animal) group, ACE-sRNA-1 (10 nmol/animal) group and ACE-sRNA-26 (10 nmol/animal) group were set up, with six mice in each group. Hematoxylin-eosin (HE) staining and Micro CT were used to evaluate the pathological and imaging changes of lung tissue; The number of white blood cells and neutrophils in peripheral blood, as well as the total protein concentration, white blood cells, neutrophils and lymphocytes numbers in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected; Immunohistochemistry was used to detect the expressions of vascular endothelial-cadherin (VE-cadherin) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in lung tissue; Western blotting and qRT-PCR were used to detect the expressions of ACE-Ang II-Ang II type 1 receptor (AT1R) pathway, I κ B α and inflammatory factors in lung tissue; ELISA was used to detect the levels of Ang II and inflammatory factors in serum. **Results** A total of 50 potential ACE-targeting sRNAs were screened from XFBD, with 26 sRNAs validated to exhibit targeting effects, among which 12 sRNAs significantly inhibited ACE expression in HPMEC cells ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). Seven sRNAs significantly suppressed Ang II generation, with ACE-sRNA-1/26 demonstrating the most potent effect ($P < 0.001$), inhibited I κ B α protein and inflammatory factor expressions ($P < 0.01, 0.001$). In animal experiments, mice in model group had severe lung injury ($P < 0.001$); Compared with model group, ACE-sRNA-1 and ACE-sRNA-26 significantly improved lung injury in mice ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), up-regulated VE-cadherin expression in lung tissue ($P < 0.001$), down-regulated ICAM-1, ACE, AT1R, I κ B α and inflammatory factor expressions in lung tissue ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and reduced Ang II and inflammatory factor levels in serum ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** ACE-sRNA-1 and ACE-sRNA-26 derived from XFBD could target the inhibition of ACE expression and activity, alleviate pulmonary endothelial inflammation and barrier damage, and improve LPS-induced ALI in mice. The mechanism may be related to the regulation of ACE-Ang II-AT1R pathway.

Key words: angiotensin-converting enzyme; Xuanfei Baidu Formula; sRNA; acute lung injury; inflammation; naringin; polydatin; agnuside; amygdalin; glycyrrhizic acid; cornin; sinapine; verbascoside; liquiritin; ephedrine

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是以失控性炎症反应为核心的急性呼吸功能障碍性疾病, 临床表现为低氧血症、呼吸窘迫及弥漫性肺泡浸润, 严重时还可发展为急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) [1-2]。其中肺内皮细胞 (lung endothelial cell, EC) 功能障碍是驱动疾病进展的关键环节: 活化的 EC 通过分泌趋化因子促进炎性细胞浸润, 同时下调紧密连接蛋白表达导致微血管通透性增加, 形成“炎症-内皮损伤”恶性循环[3-4]。当前临床以肺保护性通气和液体管理为基石, 辅以糖皮质激素、表面活性物质和神经肌肉阻滞剂等药物, 但存在靶向性不足、不良反应明显等局限[5-6]。因此, 亟需寻找新型药物靶向性治疗 ALI, 以实现更精准、有效的干预。

血管紧张素转换酶 (angiotensin-converting enzyme, ACE) 作为肾素-血管紧张素系统 (renin-

angiotensin system, RAS) 的核心限速酶[7], 在肺微血管内皮中高表达且与内皮功能障碍密切相关[8]。ACE 通过催化血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 生成激活病理进程: Ang II 与 Ang II 1 型受体 (Ang II type 1 receptor, AT1R) 结合后[9], 触发核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) / 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路, 诱导肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 等促炎因子释放, 加剧肺泡损伤[4]。这一机制使 ACE 成为干预 ALI 的重要靶点。核酸类药物是一类可在转录后水平精准调控基因表达的小分子, 已成为新型治疗策略的研发热点[10]。继小分子和抗体药物之后, 核酸药物有望发展成为第 3 大类药物。传统中药水煎液中存在功能性小 RNA (small RNA, sRNA), 如半枝莲来源的 BZL-sRNA-20 靶向 Toll 样受体 4 (Toll-

like receptor 4, TLR4) 减轻病毒性 ALI^[11], 夏枯草来源的 XHC-sRNA-h3 通过靶向 ACE 缓解 Ang II 诱导的高血压^[12], 红景天来源的 HJT-sRNA-m7 改善博来霉素诱导的小鼠肺纤维化^[13], 提示中药来源 sRNA 具有靶向递送与治疗潜力。

中医学认为, ALI 归属于“风温肺热病”范畴, 其临床表现与“爆喘”“喘脱”“喘证”等病证高度契合; 以“肺热壅痹”为核心, 表现为高热、喘促、痰黄黏稠等热毒壅肺证候。宣肺败毒方 (Xuanfei Baidu Formula, XFBD) 由麻杏石甘汤 (《伤寒论》)、麻杏薏甘汤、葶苈大枣泻肺汤 (《金匱要略》)、苇茎汤 (《外台秘要》)、不换金正气散 (《太平惠民和剂局方》) 5 个古代经典名方加减化裁而来, 为《新型冠状病毒肺炎诊疗方案》中推荐的“三药三方”之一。由麻黄 6g、石膏 30g、麸炒苍术 10g、广藿香 15g、青蒿 12g、虎杖 20g、马鞭草 30g、薏苡仁 30g、芦根 30g、葶苈子 15g、苦杏仁 15g、化橘红 15g、甘草 10g 配伍而成。作为抗疫代表性方剂, 临床证实可多靶点改善新型冠状病毒感染相关肺损伤^[14-15], 其机制涉及抑制中性粒细胞浸润、调节巨噬细胞极化等^[16]。前期研究表明 XFBD 能缓解新型冠状病毒 S1 蛋白诱导的肺组织病理改变, 但其活性成分是否包含靶向 ACE 的 sRNA 及其调控炎症通路的机制尚未阐明。本研究通过构建 XFBD 的 sRNA 文库, 筛选靶向 ACE 的功能性 sRNA; 利用脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 诱导的 ALI 小鼠模型, 探究其是否通过抑制 Ang II 生成、下调 NF- κ B 抑制蛋白 α (inhibitor of NF- κ B α , I κ B α) 表达及炎症因子释放发挥肺保护作用, 为中药 sRNA 治疗肺部炎症提供依据。

1 材料

1.1 细胞与动物

人 HEK293T 胚胎肾细胞 (批号 CRL-3216) 购自美国 ATCC 公司; 人肺微血管内皮细胞 (human pulmonary microvascular endothelial cells, HPMEC, 批号 ZQY105) 购自上海中乔新舟生物科技有限公司。

SPF 级雄性 Balb/C 小鼠, 7 周龄, 体质量 18~22 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 生产许可证号 SCXK (京) 2021-0006。动物饲养于天津中医药大学动物实验中心 SPF 级屏障环境中, 温度 20~26 °C, 相对湿度 40%~70%, 12 h 明暗交替。动物实验经天津中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号 TCM-LAEC2025001g1052)。

1.2 药品与试剂

所有 sRNA 由曜源生物科技 (上海) 有限公司合成; 青链霉素 (批号 2033117) 购自美国 Gibco 公司; 内皮细胞生长因子 (endothelial cell growth factor, ECGS, 批号 CSP148)、双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (批号 11402ES60) 购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; 胎牛血清 (批号 04-001-1A) 购自以色列 Biological Industries 公司; Ang I (批号 HY-P1032)、Ang II (批号 HY-13948) 购自美国 MedChemExpress LLC 公司; Lipofectamine[®] 2000 试剂 (批号 11668030)、Lipofectamine[®] RNAiMAX 试剂 (批号 13778150) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 人 Ang II 试剂盒 (批号 ml060570) 购自上海酶联生物科技有限公司; 人 IL-1 β ELISA 试剂盒 (批号 MM-0181H1)、人 IL-6 ELISA 试剂盒 (批号 MM-0049H1)、人 TNF- α ELISA 试剂盒 (批号 MM-0122H1)、小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒 (批号 MM-0163M1)、小鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒 (批号 MM-0040M1)、小鼠 TNF- α ELISA 试剂盒 (批号 MM-0132M1)、小鼠 Ang II ELISA 试剂盒 (批号 MM-0207M1) 购自江苏酶免实业有限公司; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染液套装 (批号 G1120)、三溴乙醇 (批号 T161626) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; LPS (批号 L2637)、鞘氨醇 (d18:1, 批号 860490P) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 卡托普利 (批号 T1462) 购自上海陶术生物科技股份有限公司; XFBD 喷干粉 (批号 TRT200302) 购自天津现代中药创新中心, UHPLC 分析其主要活性成分柚皮苷、虎杖苷、穗花牡荆苷、苦杏仁苷、甘草酸、马鞭草苷、芥子碱、毛蕊花糖苷、甘草苷、麻黄碱的质量分数分别为 5.491%、0.845%、0.504%、0.497%、0.480%、0.449%、0.363%、0.346%、0.340%、0.119%; psi-CHECK2.0-ACE 质粒 (批号 G0309446-1) 购自通用生物 (安徽) 股份有限公司; ACE 抗体 (批号 24743-1-AP)、细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 抗体 (批号 10831-1-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; Ang II 抗体 (批号 bs-0587R) 购自北京博奥森生物技术有限公司; I κ B α 抗体 (批号 4812s)、 β -actin 抗体 (批号 4970S) 购自美国 CST 公司; 上皮型钙黏蛋白 (vascular endothelial-cadherin, VE-cadherin) 抗体 (批号 sc-52751) 购自圣克鲁斯生物技术 (上海) 有限公司。

1.3 仪器

Fresco21 型离心机、HERAcell150i 型 CO₂ 细胞培养箱、840-317500 型 NanoDrop One 分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Centrifuge 5810R 型 Eppendorf 恒温混匀仪(德国 Eppendorf 公司); INFINITEF50 型 TECAN 酶标仪(瑞士 TECAN 公司); CFX96 型 Bio-Rad 实时定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); A-195034-3F26 型电泳仪、21T5561-320 型凝胶成像系统(上海天能科技有限公司); AT680 型显影仪(美国通用电气公司); BX41 型正置光学显微镜(日本 Olympus 公司); Quantum GX2 型 Micro-CT 仪(美国珀金埃尔默公司); ECLIPSE TS2 型 Nikon 倒置显微镜(北京恒三江仪器销售有限公司); SQP 型 Sartorius 电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司); E400 型 Nikon 荧光显微镜(日本 NIKON 公司); BC-5000VET 型全自动血细胞分析仪(深圳迈瑞公司)。

2 方法

2.1 改良 CTAB 法提取 XFBD 中 sRNA

取 10 g XFBD 喷干粉,加水至 500 mL 浸提 40 min,沸煮 30 min 后文火浓缩至 10 mL。用 DEPC 水溶解 CTAB、PVP、Tris 等组分制备 CTAB 裂解液,调 pH 8.0 定容灭菌^[17]。使用改良 CTAB 法提取 XFBD 中 sRNA^[17],经异丙醇沉析、氯仿纯化、乙醇洗涤后沉淀干燥,干燥物于 -80 °C 保存备用。

2.2 sRNA 测序和预处理

将“2.1”项下得到的 sRNA 送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行 RNA 测序。检测 RNA 的浓度和完整性,确认 RNA 浓度、总量、RINe 值达到标准后,使用 Illumina Novaseq 6000 测序平台进行真核生物 mRNA-seq 测序,建库分析统计得到的全部 sRNA 长度分布和 RPM 值,去除匹配人和小鼠基因组的序列,得到 XFBD 来源的 sRNA 序列。

2.3 靶向 ACE 的 XFBD 来源 sRNA 筛选

选取丰度排名前 1 000 的 sRNA,使用 RNA hybrid 筛选可以靶向 ACE 的 sRNA,按照最小结合能(minimum free energy, MFE)从小到大排序得到前 50 条进行后续实验验证。

2.4 细胞实验

2.4.1 细胞模型的建立

(1) Ang I 诱导的 HPMEC 细胞反应: HPMEC 细胞用含 10%胎牛血清、1%ECGS、1%青链霉素的 ECM 完全培养基,于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中

培养,细胞密度 ≥80%时,使用 0.05%胰酶消化后进行常规传代培养。HPMEC 细胞以 1.5 × 10⁵ 个/mL 种板,待细胞密度达到 80%进行细胞转染实验,转染 sRNA 48 h 后,给予 Ang I (200 nmol/L) 刺激 1 h。

(2) Ang II 诱导的 HPMEC 细胞反应: HPMEC 细胞以 1.5 × 10⁵ 个/mL 种板,待细胞密度达到 80%,给予 Ang II (1 μmol/L) 刺激 1 h。

(3) LPS 诱导的 HPMEC 细胞炎症模型:取对数生长期的 HPMEC 细胞,离心重悬后调整细胞密度为 1.5 × 10⁵ 个/mL 种板,待细胞密度达到 80%进行细胞转染实验,转染 sRNA 24 h 后,给予 LPS (2 μg/mL) 刺激 12 h。

2.4.2 细胞转染

(1) HEK293T 细胞转染实验: HEK293T 细胞用含 10%胎牛血清、1%青链霉素的 DMEM 高糖完全培养基,于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养,细胞密度 ≥80%时,使用 0.25%胰酶消化后进行常规传代培养。取对数生长期的 HEK293T 细胞,离心重悬后以 1.5 × 10⁵ 个/mL 种板。待细胞密度达到 80%,将阴性对照、psi-CHECK2.0-ACE 过表达载体 (1 μg/μL) 及 sRNA (20 nmol/L) 共转染至 HEK293T 细胞中,记为 psi-CHECK2.0 组、psi-CHECK2.0-ACE 组、ACE-sRNA 组,转染 48 h。同样构建 psi-CHECK2.0-ACE 组、NC-sRNA 组、ACE-sRNA-1 组与 MUT-ACE-sRNA-1 组、ACE-sRNA-26 组与 MUT-ACE-sRNA-26 组,转染 48 h。

(2) HPMEC 细胞转染实验: HPMEC 细胞以 1.5 × 10⁵ 个/mL 种板,待细胞密度达到 80%,转染 sRNA (20 nmol/L),分别记为 ACE-sRNA 组、NC-sRNA 组,转染 24 h 或 48 h。

2.4.3 ACE 双荧光素酶报告基因实验 用转染试剂依据分组情况将载体和 sRNA 转染至 HEK293T 细胞中,按照说明书分析荧光素酶活性,检测 sRNA 对 ACE 的靶向性。

2.4.4 qRT-PCR 检测 ACE、IL-6、IL-1β、TNF-α 的 mRNA 表达 按“2.4.2 (2)”项下方法处理 24 h,收集细胞,检测 ACE 的 mRNA 表达。按“2.4.1 (2)”项下方法处理后,收集细胞,检测 IL-6、IL-1β、TNF-α 的 mRNA 表达。按照试剂盒说明书提取细胞中总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1,将 GAPDH 作为内参基因,采用 2^{-ΔΔCt} 计算各基因的相对表达量。

2.4.5 Western blotting 检测 Ang II 和 IκBα 的蛋白

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	种属	上游引物序列 (5'-3')	下游引物序列 (5'-3')
<i>ACE</i>	人	CTGGAGAAGCCGGCCGACGG	CCCCCGACGCAGGGAGACGG
<i>IL-6</i>	人	GGTACATCCTCGACGGCATCT	GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC
<i>IL-1β</i>	人	CTCGCCAGTGAAATGATGGCT	GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT
<i>TNF-α</i>	人	CTGCCCAATCCCTTTATT	CCCAATTCTCTTTTGGAGCC
<i>GAPDH</i>	人	ATGATTCTACCCACGGCAAG	CTGGAAGATGGTGATGGGTT
<i>ATIR</i>	小鼠	TTATGTAGCAGTGTAAGC	AGGCAGATTGTATGATATG
<i>ACE</i>	小鼠	GCAGCCACTCTACCTGAACC	GCGCCACCAAATCATAGATGTTG
<i>IL-6</i>	小鼠	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
<i>IL-1β</i>	小鼠	CACCTTCTTTTCCTTCATCTTTG	GTCGTTGCTTGCTCTCCTTGTA
<i>TNF-α</i>	小鼠	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
<i>GAPDH</i>	小鼠	ATGATTCTACCCACGGCAAG	CTGGAAGATGGTGATGGGTT

表达 按“2.4.1 (1)”和“2.4.2 (2)”项下方法处理后,收集细胞,PBS洗涤后,机械刮取并加入RIPA缓冲液裂解细胞,离心取上清。采用BCA法测定蛋白浓度,以5 \times 上样缓冲液调整至1 μ g/ μ L,100 $^{\circ}$ C金属浴10min使蛋白变性。蛋白样品经10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至PVDF膜,加入5%脱脂牛奶于室温封闭2h,分别加入Ang II、I κ B α 、 β -actin一抗,于4 $^{\circ}$ C孵育过夜;TBST洗膜3次,加入二抗,室温孵育1h,将PVDF膜浸入显影液中孵育1min,使用Amersham Image 600软件曝光成像。

2.4.6 ELISA 检测 Ang II、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平 按“2.4.1 (1)”和“2.4.2 (2)”项下方法处理后,收集细胞上清液,按照ELISA试剂盒说明书测定Ang II水平。按“2.4.1 (3)”和“2.4.2 (2)”项下方法处理后,收集细胞上清液,按照ELISA试剂盒说明书测定IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平。

2.5 动物实验

2.5.1 脂质递送 sRNA 的制备 将10 nmol sRNA溶于300 μ L 无菌无酶水;称量10 mg 脂质溶于1 mL 脂质溶剂(氯仿-甲醇4:1)中,终质量浓度为10 mg/mL;取10 μ L 脂质于玻璃管中,加入sRNA溶液,充分混匀后,于90 $^{\circ}$ C水浴锅中加热15 min,期间不断混匀,冷却至室温。

2.5.2 动物分组、给药与 ALI 模型的构建 雄性BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组、卡托普利(10 mg/kg)组、XFBD(9.2 g/kg)^[16]组、NC-sRNA(10 nmol/只)组、ACE-sRNA-1(10 nmol/只)组和ACE-sRNA-26(10 nmol/只)组,每组6只。小鼠造模前ig卡托普利、XFBD、NC-sRNA、ACE-sRNA-1、ACE-sRNA-26或无菌无酶水预处理3 d。第3天

给药6 h后,ip三溴乙醇(150 mg/kg)麻醉,切开颈部皮肤1 cm,分离组织暴露气管,采用微量注射器气管穿刺注入4 mg/mL LPS(2 μ L/g),缝合切口并消毒,置于37 $^{\circ}$ C垫侧卧供氧复苏,监测4 h排除呼吸窘迫,术后观察生理状态。

2.5.3 Micro-CT 检测小鼠肺部损伤程度 气管注射LPS 12 h后,将麻醉的小鼠水平固定,预扫描定位使肺组织居于扫描视野中心。设置扫描参数:电压90 kV,电流180 μ A,空间分辨率78 μ m,单帧曝光时间2 000 ms,执行360 $^{\circ}$ 环形扫描(总时长4.5 min)。根据文献方法^[18]进行影像学评分:肺部实变面积为0,0分;0<肺部实变面积<5%,1分;5% \leq 肺部实变面积<25%,2分;25% \leq 肺部实变面积<50%,3分;50% \leq 肺部实变面积 \leq 75%,4分;肺部实变面积>75%,5分。

2.5.4 血常规检测 小鼠腹主动脉采血后,取20 μ L全血置于含枸橼酸钠1.5 mL抗凝管内,使用全自动血细胞分析仪进行血常规(白细胞、中性粒细胞)检测。

2.5.5 支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中总蛋白浓度、白细胞、中性粒细胞、淋巴细胞数量的检测 取血后暴露胸腔,钝性分离右肺组织并行分叶结扎。预充PBS后,经气管切口插入灌洗针头,丝线双重结扎固定防漏气。缓慢注入灌洗液至左肺,负压回抽回收BALF,离心取上清液,采用BCA法检测总蛋白浓度。沉淀用100 μ L PBS重悬后,使用全自动血细胞分析仪检测白细胞、中性粒细胞、淋巴细胞的数量。

2.5.6 HE 染色观察肺组织病理变化 小鼠肺组织经福尔马林固定、石蜡包埋后,制备5 μ m切片,进行HE染色,于显微镜下观察并采集图像,按文献

方法^[19-20]进行病理等级评分。

2.5.7 免疫荧光检测小鼠肺组织中 VE-cadherin 和 ICAM-1 的表达 小鼠肺组织于 4%多聚甲醛溶液中固定后,分别加入 VE-cadherin 和 ICAM-1 一抗,4 °C 孵育过夜;PBS 洗涤后,加入荧光素标记的二抗避光孵育 1h,滴加 DAPI 染液染色细胞核,于荧光显微镜下观察并拍照,采用 Image J 软件分析阳性蛋白表达的荧光强度。

2.5.8 qRT-PCR 检测小鼠肺组织中 ACE、AT1R、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的 mRNA 表达 取小鼠肺组织,按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

2.5.9 Western blotting 检测小鼠肺组织中 ACE、I κ B α 的蛋白表达 取小鼠肺组织,加入 RIPA 裂解缓冲液于冰上匀浆,离心后提取蛋白。按“2.4.5”项下方法检测 ACE、I κ B α 的蛋白表达。

2.5.10 ELISA 检测血清中 Ang II、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平 按照 ELISA 试剂盒说明书检测小鼠血清中 Ang II、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平。

2.6 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 Graphpad 10.0 软件进行数据统计分析,采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)评估多组间均值的差异。

3 结果

3.1 靶向 ACE 的 sRNA 的筛选及验证

将虚拟筛选获得 XFBD 来源的 50 条 sRNA 分别与 psi-CHECK2.0-ACE 质粒共转染于 HEK293T 细胞后,如图 1-A 所示,与 psi-CHECK2.0-ACE 组比较,双荧光素酶报告基因检测出 26 条 sRNA (ACE-sRNA-1、2、3、4、7、8、9、10、11、12、13、14、16、17、18、20、21、22、23、26、29、36、37、42、43、50) 可显著抑制海肾荧光素酶活性与萤火虫素酶活性的比值 ($P < 0.001$)。进一步将 26 条 sRNA 转染于 HPMEC 细胞后,如图 1-B 所示,与 NC-sRNA 组比较,12 条 sRNA (ACE-sRNA-1、2、8、11、12、18、21、22、23、26、36、37) 显著降低 ACE 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。基于 Ang I 诱导的 ACE 活性筛选平台发现,只有 7 条 sRNA (ACE-sRNA-1、2、11、22、26、36、37) 既能阻断 Ang II 生成 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001,图 1-D),又能抑制 Ang I 诱导的细胞内 Ang II 表达的上调 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001,图 1-C、E),其中 ACE-sRNA-1、26 效果最显著 ($P < 0.001$)。表

明 ACE-sRNA-1、26 通过靶向 ACE 抑制其表达及催化活性阻断 Ang I 向 Ang II 的转化。

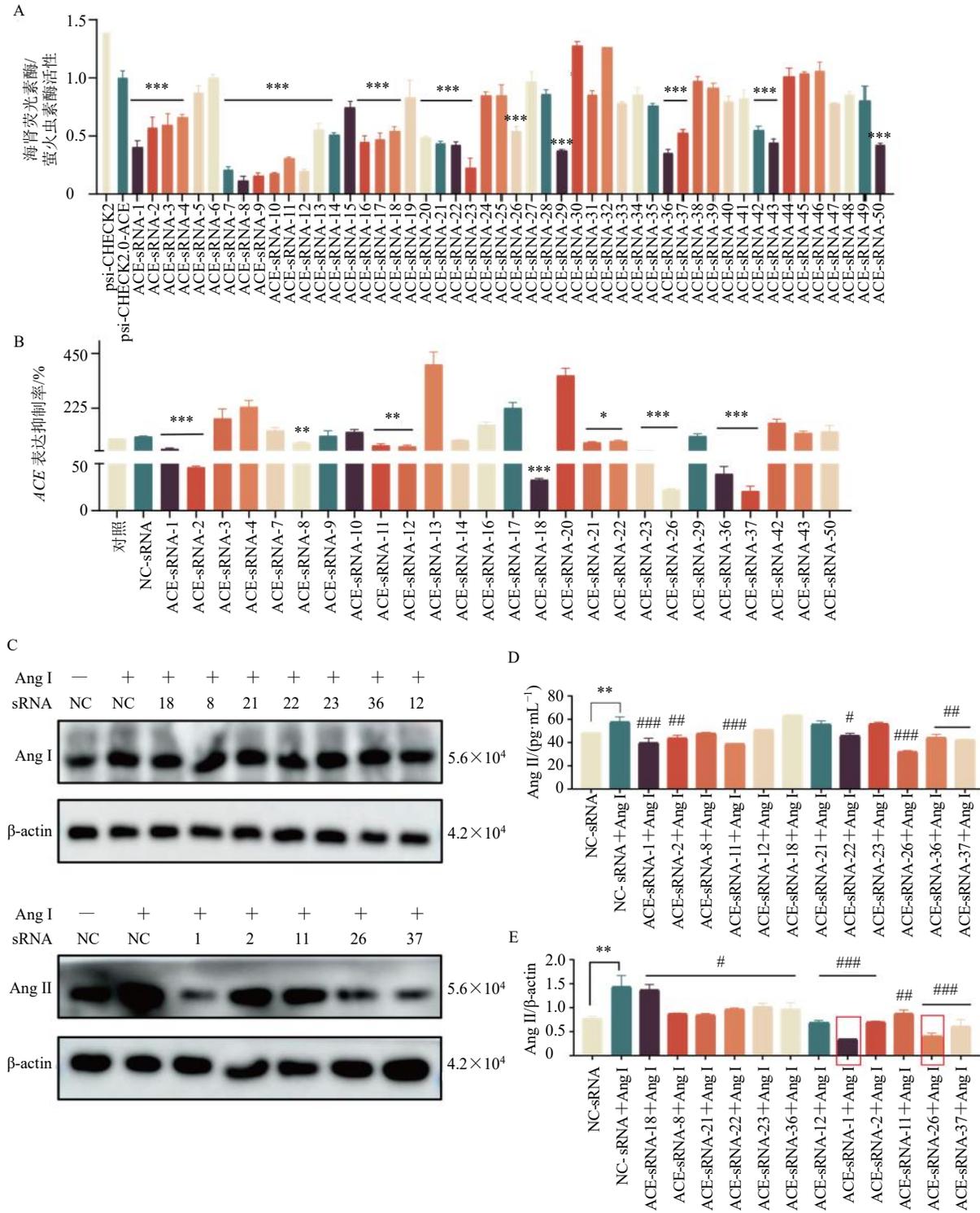
3.2 sRNA 靶向 ACE 抑制 I κ B α 蛋白表达减轻 HPMEC 细胞炎症反应

ACE 通过催化 Ang I 转化为 Ang II,激活 AT1R 受体,促进促炎因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的释放。如图 2-A 所示,Ang II 刺激 HPMEC 细胞后上述炎症因子 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01),表明 Ang II 成功激活炎症信号通路。如图 2-B、C 所示,在 Ang I 刺激条件下,I κ B α 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$),并发现 11 条靶向 ACE 的 sRNA 可显著抑制 I κ B α 蛋白表达 ($P < 0.01$ 、0.001),其中 ACE-sRNA-1、26 效果最显著 ($P < 0.001$),表明其抑制 ACE 活性发挥高效抗炎作用。进一步验证其靶向特异性,当 ACE-sRNA-1、26 与 ACE 的结合位点发生突变时,对 ACE 的抑制作用消除 ($P < 0.01$,图 2-D)。如图 2-E 所示,在 LPS 诱导的 HPMEC 炎症模型中,ACE-sRNA-1、26 显著抑制炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的释放 ($P < 0.01$),进一步证实其通过靶向 ACE 抑制炎症反应的分子机制。

3.3 ACE-sRNA-1 和 26 缓解 LPS 诱导的小鼠 ALI

与对照组比较,模型组小鼠肺泡间隔增厚伴显著炎性浸润,肺泡壁毛细血管扩张及广泛出血点,肺组织病理评分显著升高 ($P < 0.001$,图 3-A);双肺弥漫性斑片状密度增高影,肺纹理模糊,肺门区见类圆形病灶,影像学评分显著升高 ($P < 0.001$,图 3-B)。ACE-sRNA-1 和 ACE-sRNA-26 处理后较 NC-sRNA 组显著改善上述病理损伤:肺泡间隔增厚缓解,肺部高密度影范围缩小、肺纹理清晰度改善,影像学评分降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较,卡托普利组和 XFBD 组小鼠肺组织病理损伤明显改善 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。与 NC-sRNA 组比较,ACE-sRNA-1 组和 ACE-sRNA-26 组肺组织病理评分显著降低 ($P < 0.001$),ACE-sRNA-26 组影像学评分显著降低 ($P < 0.05$)。

如图 3-C、D 所示,与对照组比较,模型组小鼠外周血白细胞数、中性粒细胞数和 BALF 中总蛋白浓度、白细胞数、中性粒细胞数、淋巴细胞数显著升高 ($P < 0.001$);与模型组比较,卡托普利组和 XFBD 组小鼠外周血白细胞数、中性粒细胞数和 BALF 中白细胞数、中性粒细胞数、淋巴细胞数显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001),卡托普利组 BALF 中总蛋白浓度显著降低 ($P < 0.001$);与 NC-sRNA

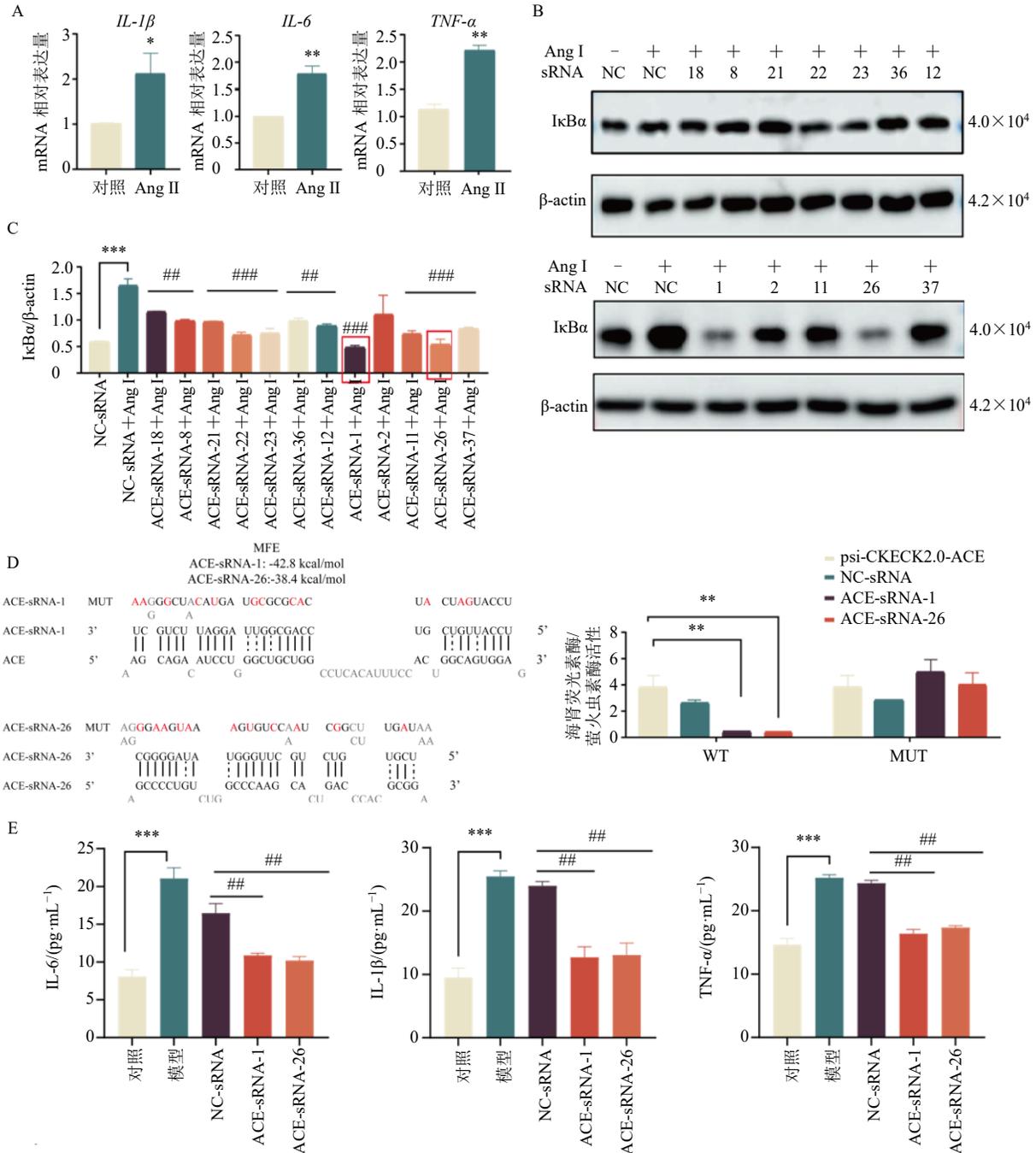


A-XFBD 来源的 sRNAs 靶向 ACE 的双荧光报告基因检测结果, 与 psi-CHECK2.0-ACE 组比较: *** $P < 0.001$; B-sRNA 对 HPMEC 细胞中 ACE 表达的抑制率, 与 NC-sRNA 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; C~E-sRNA 转染 HPMEC 细胞与 Ang I 共孵育后培养液中 Ang II 水平及蛋白表达, 与 NC-sRNA 组比较: ** $P < 0.01$, 与 NC-sRNA + Ang I 组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ 。

A-results of dual-fluorescent reporter gene assay targeting ACE using sRNAs derived from XFBD, *** $P < 0.001$ vs psi-CHECK2.0-ACE group; B-inhibition rate of ACE expression in HPMEC cells by sRNA, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs NC-sRNA group; C~E-Ang II level in culture medium and protein expression after co-incubation of sRNA-transfected HPMEC cells with Ang I, ** $P < 0.01$ vs NC-sRNA group, # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs NC-sRNA + Ang I group.

图 1 靶向 ACE 的 sRNA 筛选及验证 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Screening and validation of sRNAs targeting ACE ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

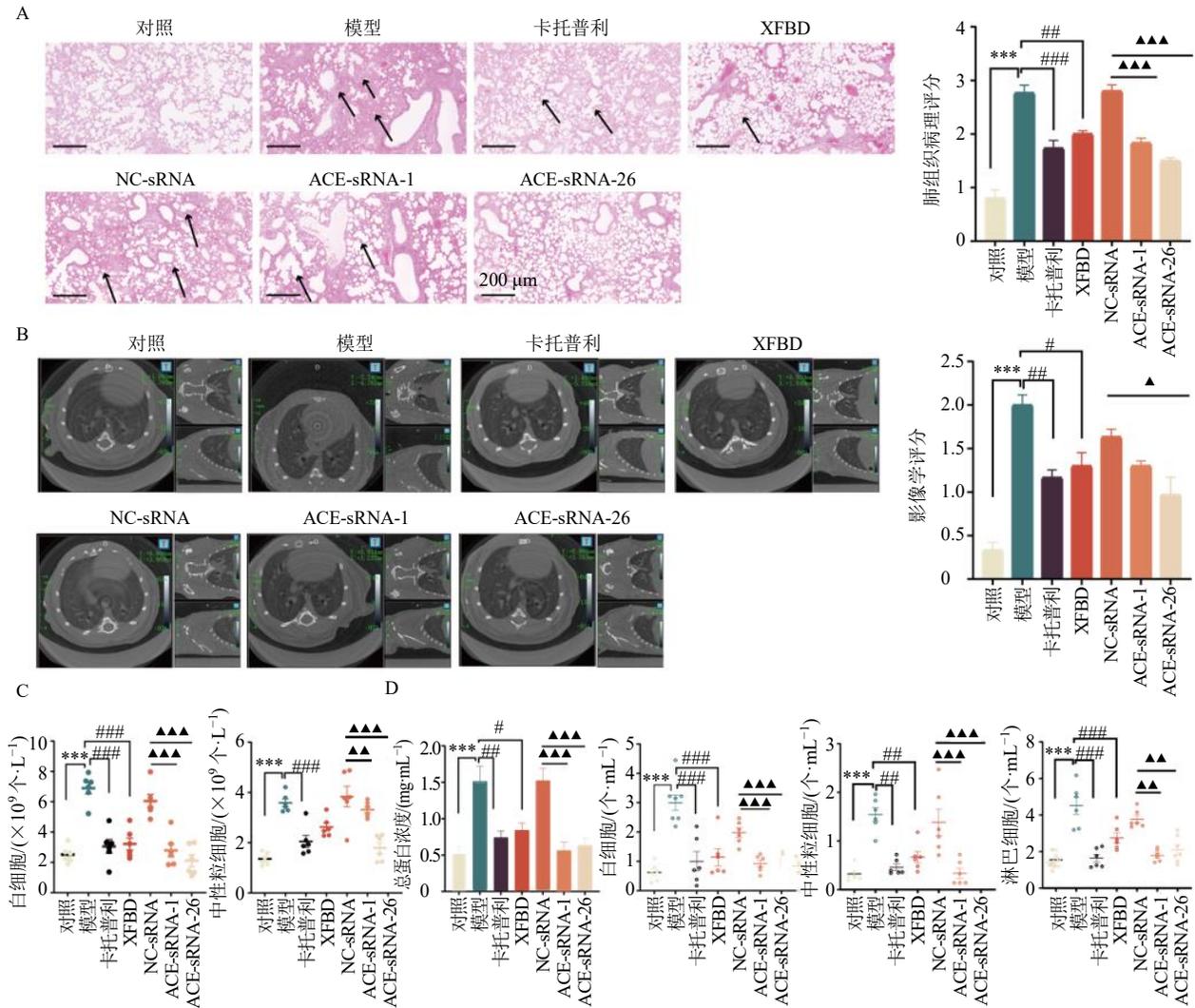


A-Ang II 促进 HPMEC 细胞中炎症因子 *IL-1β*、*IL-6*、*TNF-α* 的 mRNA 表达，与对照组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ；B、C-12 条 sRNA 对 HPMEC 细胞中 IκBα 蛋白表达的抑制作用，与 NC-sRNA 组比较：*** $P < 0.001$ ，与 NC-sRNA+Ang I 组比较：### $P < 0.01$ #### $P < 0.001$ ；D-ACE-sRNA-1、26 序列突变位点及双荧光素酶报告基因系统检测野生型与突变型 ACE-sRNA-1、26 靶向 ACE 的情况，与 psi-CHECK2.0-ACE 组比较：** $P < 0.01$ ；E-ACE-sRNA-1、26 抑制 LPS 诱导 HPMEC 细胞中炎症因子 IL-6、IL-1β、TNF-α 的释放，与对照组比较：*** $P < 0.001$ ，与 NC-sRNA 组比较：### $P < 0.01$ 。

A-Ang II promotes mRNA expressions of inflammatory factors *IL-1β*, *IL-6* and *TNF-α* in HPMEC cells, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; B, C-inhibitory effect of 12 sRNAs on IκBα protein expression in HPMEC cells, *** $P < 0.001$ vs NC-sRNA group, ### $P < 0.01$ #### $P < 0.001$ vs NC-sRNA + Ang I group; D-ACE-sRNA-1 and 26 sequence mutation sites and dual luciferase reporter gene system detection of wild-type and mutant ACE-sRNA-1 and 26 targeting ACE, ** $P < 0.01$ vs psi-CHECK2.0-ACE group; E-ACE-sRNA-1 and 26 inhibits release of inflammatory factors IL-6 IL-1β, and TNF-α in LPS-induced HPMEC cells, *** $P < 0.001$ vs control group, ### $P < 0.01$ vs NC-sRNA group.

图 2 sRNA 靶向抑制 ACE 活性对下游 IκBα 蛋白及炎症因子变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of sRNA on changes in ACE downstream IκBα protein and inflammatory factors through inhibition of ACE activity ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-各组小鼠肺组织病理变化 ($\times 100$) 及病理评分 ($n=3$), 箭头指示肺部炎性变化、肺泡间隔变化、出血点以及肺泡壁病理改变和病理部位; B-各组小鼠肺部影像检测及影像学评分 ($n=3$); C-各组小鼠外周血中白细胞数和中性粒细胞数 ($n=6$); D-各组小鼠 BALF 中总蛋白浓度、白细胞数、中性粒细胞数和淋巴细胞数 ($n=6$); 与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$; 与 NC-sRNA 组比较: $\blacktriangle P<0.05$ $\blacktriangle\blacktriangle P<0.01$ $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle P<0.001$, 图 4、5 同。

A-pathological changes ($\times 100$) and pathological scores ($n=3$) of lung tissues of mice in each group, arrows indicate inflammatory changes in lungs, alveolar septal changes, bleeding points, as well as pathological alterations and affected areas of alveolar walls; B-pulmonary imaging detection and imaging score of mice in each group ($n=3$); C-number of white blood cells and neutrophils in peripheral blood of mice in each group ($n=6$); D-total protein concentration, white blood cell count, neutrophil count and lymphocyte numbers in BALF of mice in each group ($n=6$); * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs model group; $\blacktriangle P<0.05$ $\blacktriangle\blacktriangle P<0.01$ $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle P<0.001$ vs NC-sRNA group, same as Figs. 4, 5.

图 3 ACE-sRNA-1 和 26 缓解 LPS 诱导的小鼠 ALI ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 3 ACE-sRNA-1 and 26 alleviated LPS-induced ALI in mice ($\bar{x} \pm s$)

组比较, ACE-sRNA-1 组和 ACE-sRNA-26 组小鼠外周血白细胞数、中性粒细胞数和 BALF 中总蛋白浓度、白细胞数、中性粒细胞数、淋巴细胞数显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001)。

如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肺组织内皮损伤标志物 VE-cadherin 荧光强度显著降低 ($P<0.01$), 炎症标志物 ICAM-1 荧光强度显著升高

($P<0.001$); 与模型组比较, 卡托普利组和 XFBD 组小鼠肺组织 VE-cadherin 荧光强度显著升高 ($P<0.01$ 、 0.001), ICAM-1 荧光强度显著降低 ($P<0.001$); 与 NC-sRNA 组比较, ACE-sRNA-1 组和 ACE-sRNA-26 组小鼠肺组织 VE-cadherin 荧光强度显著升高 ($P<0.001$), ICAM-1 荧光强度显著降低 ($P<0.001$)。以上结果表明 ACE-sRNA-1、26 对 ALI

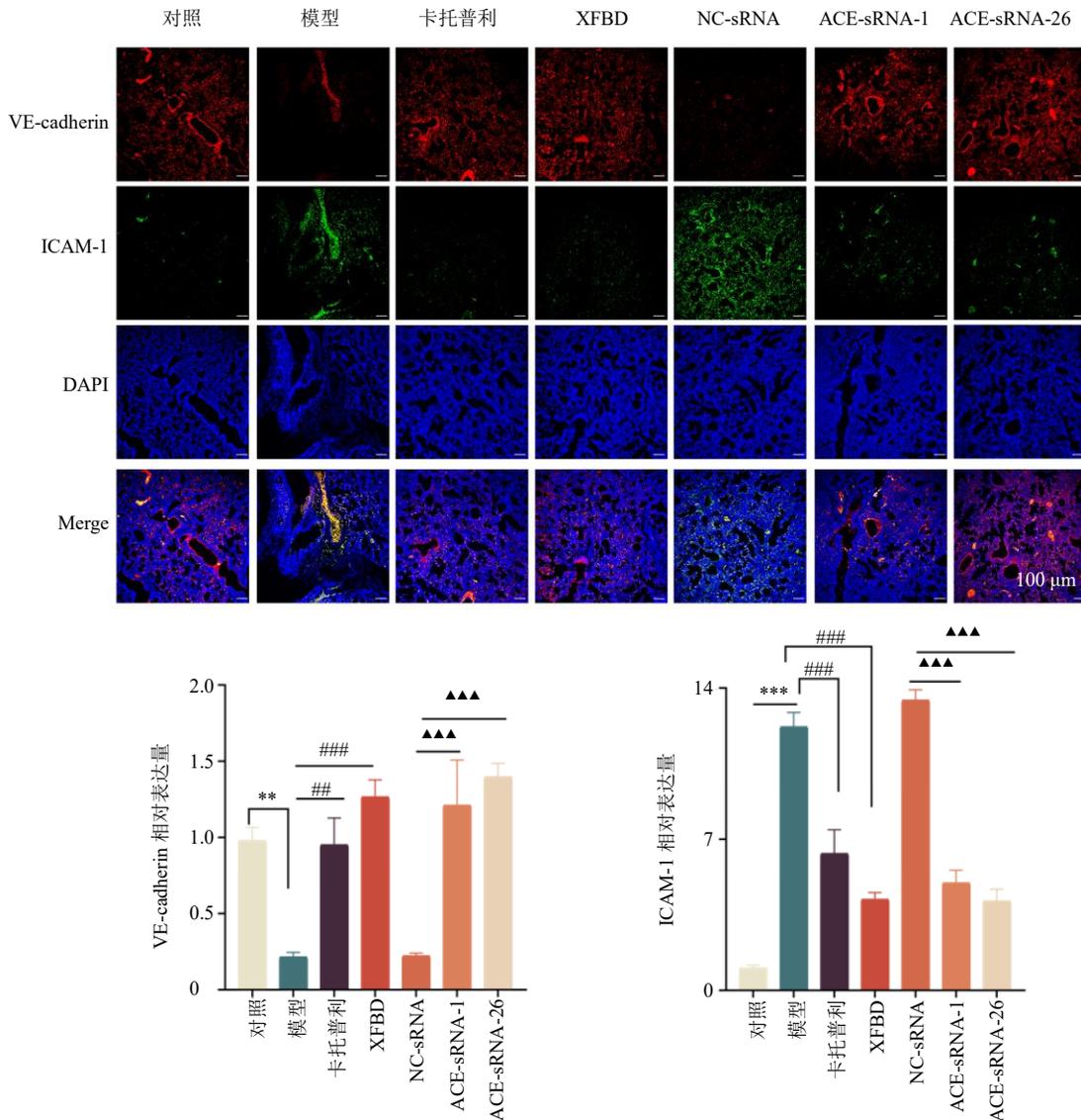


图 4 ACE-sRNA-1 和 26 对 LPS 诱导的 ALI 小鼠肺内皮炎症损伤的影响 (×200; $\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Fig. 4 Effects of ACE-sRNA-1 and 26 on pulmonary endothelial inflammatory damage in LPS-induced ALI mice (× 200; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

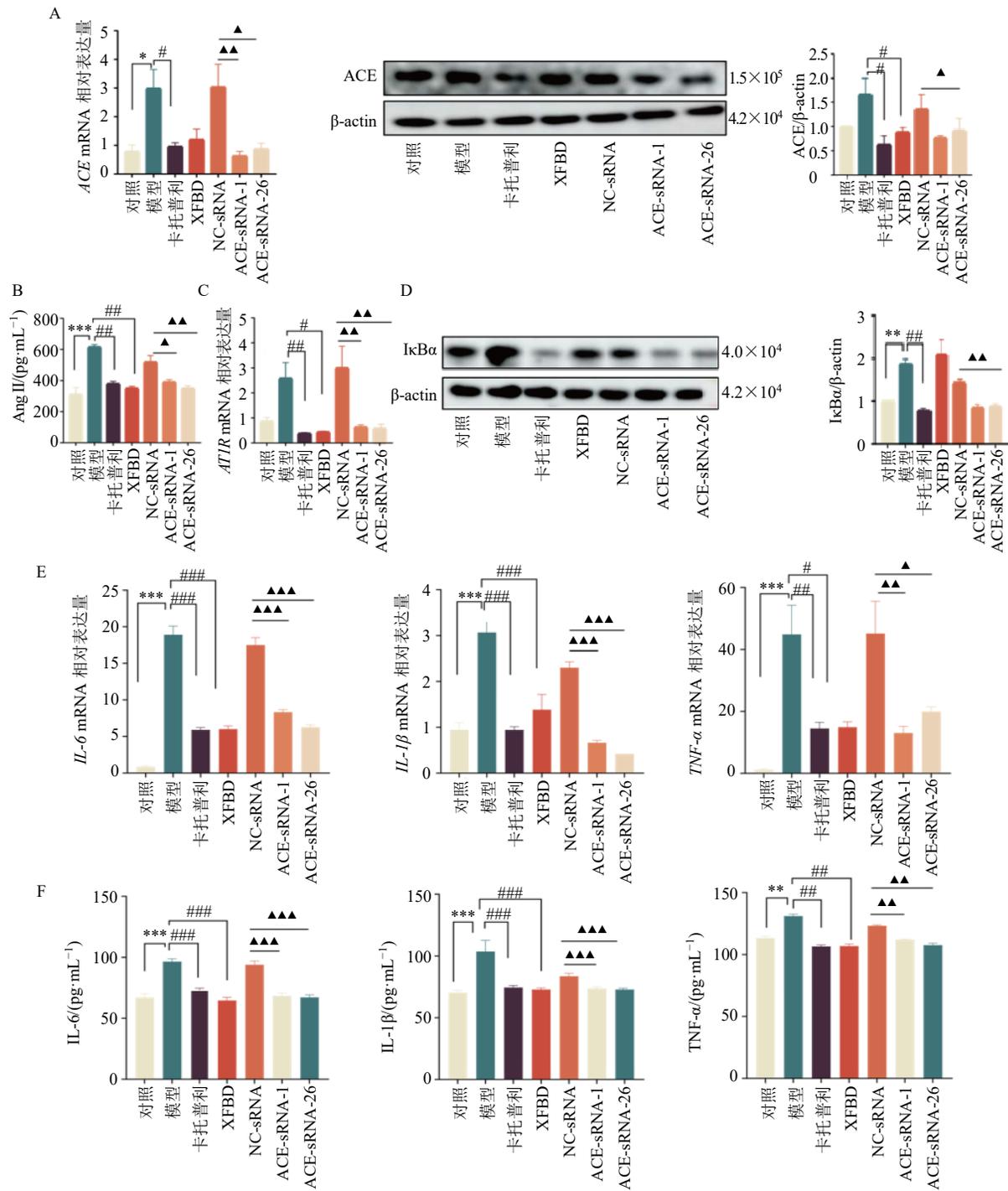
小鼠肺组织内皮损伤及炎症反应具有改善作用。

3.4 ACE-sRNA-1 和 26 对 LPS 诱导的 ALI 小鼠肺组织 ACE-Ang II-AT1R 通路及下游 IκBα、炎症因子表达的影响

如图 5-A~C 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肺组织中 ACE mRNA 表达、血清 Ang II 水平显著升高 ($P < 0.05, 0.001$), 肺组织 ACE 蛋白表达及 AT1R mRNA 表达水平升高但无显著性差异, 表明 ACE-Ang II-AT1R 通路被激活。与模型组比较, 卡托普利组和 XFBD 组小鼠肺组织中 ACE 蛋白表达、AT1R mRNA 表达、血清 Ang II 水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 卡托普利组小鼠肺组织中 ACE

mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), XFBD 组小鼠肺组织中 ACE mRNA 表达水平降低但无显著性差异, 表明 XFBD 可有效抑制 LPS 诱导的 ACE-Ang II-AT1R 通路的异常激活。与 NC-sRNA 组比较, ACE-sRNA-1 组小鼠肺组织中 ACE mRNA 表达、血清 Ang II 水平、肺组织 AT1R mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), ACE-sRNA-26 组小鼠肺组织 ACE mRNA 及蛋白表达、血清 Ang II 水平、肺组织 AT1R mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。

如图 5-D 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肺组织中 IκBα 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), 提



A-各组小鼠肺组织 ACE mRNA ($n=6$) 及蛋白表达 ($n=3$); B-各组小鼠血清 Ang II 水平 ($n=6$); C-各组小鼠肺组织 *AT1R* mRNA 表达 ($n=6$); D-各组小鼠肺组织 *IκBα* 蛋白表达 ($n=3$); E-各组小鼠肺组织中炎症因子 mRNA 表达 ($n=6$); F-各组小鼠血清中炎症因子水平 ($n=6$). A-expressions of ACE mRNA ($n=6$) and protein ($n=3$) in lung tissues of mice in each group; B-Ang II level in serum of mice in each group ($n=6$); C-expression of *AT1R* mRNA in lung tissue of mice in each group ($n=6$); D-expression of *IκBα* protein in lung tissue of mice in each group ($n=3$); E-mRNA expressions of inflammatory factors in lung tissues of mice in each group ($n=6$); F-inflammatory cytokine levels in serum of mice in each group ($n=6$).

图 5 ACE-sRNA-1 和 26 对 LPS 诱导的 ALI 小鼠肺组织 ACE-Ang II-AT1R 通路及 *IκBα* 蛋白和炎症因子表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 5 Effects of ACE-sRNA-1 and 26 on expressions of ACE-Ang II-AT1R pathway and *IκBα* protein and inflammatory factors in lung tissues of LPS-induced ALI mice ($\bar{x} \pm s$)

示 LPS 诱导 NF- κ B 通路的活化; 与模型组比较, 卡托普利组 I κ B α 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 与 NC-sRNA 组比较, ACE-sRNA-1 组和 ACE-sRNA-26 组 I κ B α 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。如图 5-E、F 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肺组织及血清中促炎因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, 卡托普利组和 XFBD 组小鼠肺组织及血清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 与 NC-sRNA 组比较, ACE-sRNA-1 组和 ACE-sRNA-26 组肺组织及血清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。表明 ACE-sRNA-1 和 26 通过靶向抑制 ACE-Ang II-AT1R 轴及其下游 I κ B α 信号, 从而阻断 LPS 诱导的炎症级联反应。

4 讨论

ALI 及其严重形式 ARDS 是由肺部感染、脓毒症、创伤等多种因素触发的失控性炎症反应^[21-22], 其核心病理机制是肺毛细血管内皮屏障损伤导致的内皮细胞通透性增加、肺泡间质水肿^[23]。当前治疗 ALI 的临床药物存在剂量大、短疗程疗效欠佳等不良反应。中药因其作用效果好、不良反应小等优点成为潜在治疗替代方案, 课题组前期研究证实 XFBD 能够改善新型冠状病毒刺突蛋白诱导的小鼠 ALI; XFBD 通过调节中性粒细胞和巨噬细胞浸润的程序性细胞死亡蛋白-1 (programmed death-1, PD-1) /IL-17A 通路改善肺损伤^[16,24]。近年来, 中药来源 sRNA 在 ALI 治疗中显示出潜力。研究表明炙甘草来源的 TNF- α -sRNA-9 靶向 TNF- α 缓解小鼠肺损伤^[25]; 半枝莲来源 sRNA 减轻病毒性 ALI^[11]; 组织金属蛋白酶抑制剂 1 (tissue inhibitor of metalloproteinases 1, TIMP1)-siRNA 抑制纤维化相关基因 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 表达从而治疗 ALI^[26]; miR-23a-5p 拮抗剂能够减轻 LPS 诱导小鼠的炎症、氧化应激、肺组织损伤和肺功能障碍等^[27]。然而 XFBD 中的 sRNA 是否具有类似作用尚不明确。

ACE 在肺微血管内皮细胞表面高表达, 通过催化 Ang II 生成, 激活 AT1R, 促进 NF- κ B 通路活化, 进而促进 IL-6、TNF- α 等促炎因子释放, 形成内皮损伤与炎症反应的恶性循环^[28-29]。本研究发现 Ang II 刺激 HPMEC 细胞后, 炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平显著升高, 但 XFBD 来源 sRNA 是否能通过靶向 ACE 达到抗炎的作用尚不清楚。为了探

究 sRNA 抑制 ACE 的精准性, 先从 XFBD 中筛选出靶向 ACE 的 sRNA, 通过双荧光素酶报告基因系统鉴定出 26 条具有靶向作用的 sRNA, 其中 12 条可抑制 HPMEC 细胞中 ACE 表达。文献报道 Ang I 刺激会引起 Ang II 水平升高^[9], 本研究结果同样证实 Ang I 刺激 HPMEC 细胞后 Ang II 表达上调, 其中 7 条 sRNA 显著抑制 Ang I 向 Ang II 转化, 以 ACE-sRNA-1 和 ACE-sRNA-26 效果最为显著。RAS 系统中 Ang II 与 AT1R 结合, 激活 NF- κ B、Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2) /信号转导与转录激活因子 (signal transducer and activator of transcription, STATs) 和 MAPK 等通路促进 IL-6、TNF- α 等炎症因子释放^[9,30-31]。本研究结果证实 Ang II 刺激 HPMEC 细胞后炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平升高。ACE-sRNA-1 和 26 能抑制 Ang II/AT1R 下游 I κ B α 蛋白表达。与文献报道^[12]相似, 突变目的基因 ACE 与 sRNA 的结合位点, sRNA 靶向 ACE 作用消失, 证实其特异性。表明 ACE-sRNA-1 和 ACE-sRNA-26 在细胞层面通过双重机制发挥作用: 一方面在转录后水平靶向抑制 ACE 表达, 另一方面阻断其催化活性, 共同减少 Ang II 合成, 抑制 NF- κ B 通路的激活, 降低 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平。

研究显示, 地黄中的 Rgl-exomiR-7972 能够靶向 G 蛋白偶联受体 161 (G protein-coupled receptor 161, *GPR161*) 基因改善 LPS 诱导的小鼠 ALI^[32], 为中药 sRNA 治疗 ALI 提供了理论支持。同时有文献报道, 敲除 ACE 表达或干预 ACE 活性与 ALI/ARDS 的易感性和预后相关; 在高氧或机械通气诱导 ACE 基因敲除小鼠 ALI 模型中, 肺泡上皮损伤和中性粒细胞浸润明显减少, 肺功能得到改善^[33-34]; 酸抽吸诱导的 ALI 小鼠肺组织和血浆中 Ang II 水平升高, ACE 失活后肺组织和血浆中 Ang II 水平显著降低^[35]。但 XFBD 中靶向 ACE 的 sRNA 是否可以治疗小鼠 ALI 尚需进一步验证。文献报道, LPS 诱导的 ALI 小鼠肺组织会出现肺泡间隔增厚、炎性细胞浸润肺泡腔出血及水肿的病理损伤现象^[36], 同时伴随 BALF 中白细胞等炎性细胞比例的升高^[37], 促炎因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 以及趋化因子高表达^[36], 肺组织氧化应激和内皮屏障损伤等现象^[38]。本研究结果显示, 在 LPS 诱导的小鼠 ALI 模型中同样出现上述现象, 而 ACE-sRNA-1 和 ACE-sRNA-26 展现出显著保护效应, ACE-sRNA-1 和 ACE-sRNA-26 能够改善肺泡结构损伤, 减轻间隔增厚和炎性浸

润；逆转内皮屏障破坏，恢复 VE-cadherin 表达并抑制 ICAM-1 表达上调；降低系统炎症水平，肺组织及血清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平下降；缓解促炎细胞因子引起的肺部免疫失调，BALF 及外周血中白细胞和中性粒细胞数减少。

与文献报道^[35,39-40]一致，LPS 激活了 ACE-Ang II-AT1R 轴，导致小鼠肺组织中 ACE、AT1R 的 mRNA 及 ACE 蛋白表达上调，血清 Ang II 水平升高，并伴随着 I κ B α 积累和 NF- κ B 通路激活，而 ACE-sRNA-1 和 ACE-sRNA-26 干预后以上指标均被逆转。结果表明这 2 种 sRNA 通过抑制 ACE 表达及活性，阻断 Ang II-AT1R-NF- κ B 信号通路，最终缓解“炎症-内皮损伤”恶性循环。本研究尚存在一定局限，如未使用 ACE 特异性敲除的转基因动物模型进一步验证靶点特异性，未设置多个有效药物的联用组来验证 sRNA 是否具有协同或拮抗效应。

综上，本研究发现 XFB 来源的 ACE-sRNA-1/26 通过靶向抑制 ACE 表达及催化活性减轻 LPS 诱导的 ALI，其机制可能与 Ang II-AT1R-I κ B α 信号通路相关，为中药来源 sRNA 治疗 ALI 提供新机制视角和治疗策略。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Fu Z L, Wu X Y, Zheng F S, *et al.* Activation of the AMPK-ULK1 pathway mediated protective autophagy by sevoflurane anesthesia restrains LPS-induced acute lung injury (ALI) [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 108: 108869.
- [2] 张文, 姚晓燕, 周文慧, 等. 木犀草素防治急性肺损伤的药理作用研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2024, 39(9): 2448-2452.
- [3] Qian Y S, Wang Z W, Lin H R, *et al.* TRIM47 is a novel endothelial activation factor that aggravates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice via K63-linked ubiquitination of TRAF2 [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 148.
- [4] 刘燕, 徐磊, 史玉柱, 等. 基于 NLRP3 炎症通路探讨滨蒿提取物对急性肺损伤小鼠的保护作用机制 [J]. *中草药*, 2025, 56(16): 5837-5846.
- [5] Ji C, Hao X Y, Li Z Y, *et al.* Phillyrin prevents sepsis-induced acute lung injury through inhibiting the NLRP3/Caspase-1/GSDMD-dependent pyroptosis signaling pathway [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2024, 57(3): 447-462.
- [6] Wheeler A P, Bernard G R. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: A clinical review [J]. *Lancet*, 2007, 369(9572): 1553-1564.
- [7] Jobe A, Antony P, Altabbal S, *et al.* Interaction of hemorphins with ACE homologs [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 3743.
- [8] Takei Y, Yamada M, Saito K, *et al.* Increase in circulating ACE-positive endothelial microparticles during acute lung injury [J]. *Eur Respir J*, 2019, 54(4): 1801188.
- [9] Bader M, Muscha Steckelings U, Alenina N, *et al.* Alternative renin-angiotensin system [J]. *Hypertension*, 2024, 81(5): 964-976.
- [10] Sun X Y, Setrerrahmane S, Li C C, *et al.* Nucleic acid drugs: Recent progress and future perspectives [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9: 316.
- [11] Zhao D D, Qin Y H, Liu J Q, *et al.* Orally administered BZL-sRNA-20 oligonucleotide targeting TLR4 effectively ameliorates acute lung injury in mice [J]. *Sci Chin Life Sci*, 2023, 66(7): 1589-1599.
- [12] Tang K G, Wang X N, Zhao Y, *et al.* Oral administration of the herbal oligonucleotide XKC-sRNA-h3 prevents angiotensin II-induced hypertension in mice [J]. *Sci Chin Life Sci*, 2023, 66(10): 2370-2379.
- [13] Li X Y, Liang Z, Du J C, *et al.* Herbal decoctosome is a novel form of medicine [J]. *Sci China Life Sci*, 2019, 62(3): 333-348.
- [14] 刘菊, 崔瑛, 白明学, 等. 基于中医药防治新型冠状病毒肺炎的用药探析 [J]. *中草药*, 2020, 51(4): 860-865.
- [15] Xiong W Z, Wang G, Du J, *et al.* Efficacy of herbal medicine (Xuanfei Baidu Decoction) combined with conventional drug in treating COVID-19: A pilot randomized clinical trial [J]. *Integr Med Res*, 2020, 9(3): 100489.
- [16] Wang Y Y, Wang X, Li Y X, *et al.* Xuanfei Baidu Decoction reduces acute lung injury by regulating infiltration of neutrophils and macrophages via PD-1/IL17A pathway [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 176: 106083.
- [17] Cao Y H, Lin Y X, Sun N, *et al.* A comprehensive analysis of the Bencao (herbal) small RNA Atlas reveals novel RNA therapeutics for treating human diseases [J]. *Sci China Life Sci*, 2023, 66(10): 2380-2398.
- [18] Choi E J, Jin G Y, Bok S M, *et al.* Serial micro-CT assessment of the therapeutic effects of rosiglitazone in a bleomycin-induced lung fibrosis mouse model [J]. *Korean J Radiol*, 2014, 15(4): 448-455.
- [19] Xiao K, He W X, Guan W, *et al.* Mesenchymal stem cells reverse EMT process through blocking the activation of NF- κ B and Hedgehog pathways in LPS-induced acute lung injury [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(10): 863.

- [20] Liu B H, Wang Z, He R Y, *et al.* Buformin alleviates sepsis-induced acute lung injury via inhibiting NLRP3-mediated pyroptosis through an AMPK-dependent pathway [J]. *Clin Sci*, 2022, 136(4): 273-289.
- [21] Zhu J Q, Zhou J H, Feng B, *et al.* MSCs alleviate LPS-induced acute lung injury by inhibiting the proinflammatory function of macrophages in mouse lung organoid-macrophage model [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2024, 81(1): 124.
- [22] Wang Y, Wang Y C, Ma J, *et al.* Yu Ping Feng San ameliorates LPS-induced acute lung injury and gut barrier dysfunction in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 312: 116452.
- [23] Bos L D J, Ware L B. Acute respiratory distress syndrome: Causes, pathophysiology, and phenotypes [J]. *Lancet*, 2022, 400(10358): 1145-1156.
- [24] Wang Y Y, Sang X Q, Shao R, *et al.* Xuanfei Baidu Decoction protects against macrophages induced inflammation and pulmonary fibrosis via inhibiting IL-6/STAT3 signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 283: 114701.
- [25] 姜振宇, 王小娜, 汤克功, 等. 炙甘草来源的 sRNA 可能通过靶向 TNF- α 缓解轻度 ADRS 模型小鼠的肺损伤 [J]. *基础医学与临床*, 2023, 43(7): 1030-1039.
- [26] Chernikov I V, Staroseletz Y Y, Tatarnikova I S, *et al.* siRNA-mediated Timp1 silencing inhibited the inflammatory phenotype during acute lung injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 1641.
- [27] Chen Y F, Hu F, Wang X G, *et al.* microRNA-23a-5p is involved in the regulation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury by targeting HSP20/ASK1 [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 9942557.
- [28] Erdős E G. Conversion of angiotensin I to angiotensin II [J]. *Am J Med*, 1976, 60(6): 749-759.
- [29] Mascolo A, Scavone C, Rafaniello C, *et al.* The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the heart and lung: Focus on COVID-19 [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 667254.
- [30] Legrand M, Khanna A K, Ostermann M, *et al.* The renin-angiotensin-aldosterone-system in sepsis and its clinical modulation with exogenous angiotensin II [J]. *Crit Care*, 2024, 28(1): 389.
- [31] Rao A, Bhat S A, Shibata T, *et al.* Diverse biological functions of the renin-angiotensin system [J]. *Med Res Rev*, 2024, 44(2): 587-605.
- [32] Qiu F S, Wang J F, Guo M Y, *et al.* Rgl-exomiR-7972, a novel plant exosomal microRNA derived from fresh *Rehmanniae Radix*, ameliorated lipopolysaccharide-induced acute lung injury and gut dysbiosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 165: 115007.
- [33] Guo Z F, Tongmuang N, Li C, *et al.* Inhibiting endothelial cell Mst1 attenuates acute lung injury in mice [J]. *bioRxiv*, 2023: 2023.09.27.559864.
- [34] Chen J J, Sun M, Zhou M, *et al.* Associations between I/D polymorphism in the ACE gene and lung cancer: An updated systematic review and a Meta-analysis [J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 158.
- [35] Krenn K, Tretter V, Kraft F, *et al.* The renin-angiotensin system as a component of biotrauma in acute respiratory distress syndrome [J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 806062.
- [36] 孔令玉, 厉玲. 黄芩苷通过 NF- κ B 信号通路改善 LPS 诱导的急性肺损伤 [J]. *解剖科学进展*, 2025, 31(5): 726-729.
- [37] 许艳青, 王欣之, 崔小兵, 等. 清半夏及其效应成分对急性肺损伤炎症反应的改善作用研究 [J]. *南京中医药大学学报*, 2025, 41(8): 1055-1065.
- [38] Wu Y H, Yu X, Wang Y W, *et al.* Ruscogenin alleviates LPS-triggered pulmonary endothelial barrier dysfunction through targeting NMMHC IIA to modulate TLR4 signaling [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(3): 1198-1212.
- [39] Yi X L, Xu C M, Yang J, *et al.* Tiliroside protects against lipopolysaccharide-induced acute kidney injury via intrarenal renin-angiotensin system in mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(21): 15556.
- [40] Wu Y, Yang X, Ju Y Y, *et al.* Fraxinol attenuates LPS-induced acute lung injury by equilibrating ACE-Ang II-AT1R and ACE2-Ang (1-7)-Mas and inhibiting NLRP3 [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 979-989.

[责任编辑 李亚楠]