

# 金振口服液改善慢性阻塞性肺疾病合并痰热证大鼠模型的药效学评价及机制研究

胡梦雨, 杨钰冰, 施祎琳, 郭士铎, 杨婉婷, 张新庄, 曹亮, 肖伟, 武子寅\*, 王振中\*

中药制药过程控制与智能制造技术全国重点实验室(江苏康缘药业股份有限公司/南京中医药大学), 江苏 南京 211112

**摘要:**目的 系统评估金振口服液(Jinzhen Oral Liquid, JZOL)对慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)合并痰热证病理模型的治疗作用,并从肺功能改善、全身炎症抑制、气道黏液分泌调节、Th1/Th2和Th17/Treg免疫平衡恢复以及转录组表达谱调控等维度,阐明其药理作用机制。方法 采用香烟烟雾联合脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)鼻腔滴注的方式,持续8周建立大鼠COPD模型;随后通过风热暴露联合LPS滴注9d,构建COPD合并痰热证复合模型。将模型大鼠随机分为模型组、地塞米松(0.2 mg/kg)组和JZOL低、中、高剂量(0.8、1.6、3.2 g/kg)组,连续给药7d。通过检测肺功能指标、全身症状及体征、血清炎症因子、肺组织病理以及肺组织T细胞亚群比例,综合评价JZOL的药效;进一步采用转录组测序及qRT-PCR技术,验证JZOL对脂质运载蛋白2(lipocalin 2, *Lcn2*)、吲哚胺2,3-双加氧酶1(indoleamine 2,3-dioxygenase 1, *Ido1*)、细胞周期蛋白E1(cyclin E1, *Ccne1*)、同源框B8(homeobox protein B8, *HoxB8*)、G蛋白偶联受体17(G protein-coupled receptor 17, *Gpr17*)等关键差异基因的调控作用。结果 复合造模成功诱导了大鼠严重的气流受限、发热、便秘症状,以及组织和细胞病理学变化。与模型组比较,JZOL显著改善肺功能( $P<0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ),显著降低血清中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)和中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)水平( $P<0.001$ ),显著减轻支气管上皮杯状细胞增生及酸性黏蛋白分泌( $P<0.05$ 、 $0.001$ ),并纠正失衡的Th1/Th2和Th17/Treg细胞比例( $P<0.05$ 、 $0.001$ )。转录组及qRT-PCR验证结果显示,JZOL通过下调免疫微环境与蛋白酶失衡相关基因、抑制异常细胞周期与气道重塑基因、上调肺再生关键因子并调节发育因子,以及激活组织修复与炎症消退路径等多途径机制改善COPD。结论 JZOL通过多靶点抑制全身及局部炎症反应、调节T细胞免疫平衡,从而有效改善COPD合并痰热证大鼠的肺功能及全身症状。

**关键词:**慢性阻塞性肺疾病;金振口服液;痰热证;炎症;免疫调节;转录组测序

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:0253-2670(2026)09-3429-16

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.09.015

## Pharmacodynamic evaluation and mechanistic study of Jinzhen Oral Liquid in rats with chronic obstructive pulmonary disease complicated by phlegm-heat syndrome

HU Mengyu, YANG Yubing, SHI Yiling, GUO Shiduo, YANG Wanting, ZHANG Xinzhuang, CAO Liang, XIAO Wei, WU Ziyin, WANG Zhenzhong

State Key Laboratory of Technologies for Chinese Medicine Pharmaceutical Process Control and Intelligent Manufacture (Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd. & Nanjing University of Chinese Medicine), Nanjing 211112, China

**Abstract: Objective** To systematically evaluate the therapeutic effects of Jinzhen Oral Liquid (金振口服液, JZOL) on a pathological model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) complicated with phlegm-heat syndrome, and to elucidate its pharmacological mechanisms from multiple dimensions, including improvement of pulmonary function, suppression of systemic inflammation, regulation of airway mucus secretion, restoration of Th1/Th2 and Th17/Treg immune balance, and modulation of transcriptomic expression profiles. **Methods** A rat COPD model was established through eight weeks of cigarette smoke exposure combined with

收稿日期: 2026-01-26

基金项目: 国家产业基础再造和制造业高质量发展专项(TC2308068); 基因组学研究平台建设(SK2023D01009)

作者简介: 胡梦雨(2001—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂技术与产品开发。E-mail: 18651678026@163.com

\*通信作者: 王振中(1968—), 男, 研究员级高级工程师, 博士生导师, 研究方向为中药新药创制与过程控制。E-mail: kyywz@163.com

武子寅(1986—), 男, 副主任药师, 研究方向为中药新药创制与过程控制。E-mail: wzy1903@kanion.com

intranasal lipopolysaccharide (LPS) instillation. Subsequently, a compound model of COPD with phlegm-heat syndrome was induced by 9 d of wind-heat exposure combined with LPS instillation. Model rats were randomly assigned to model group, dexamethasone (0.2 mg/kg) group and JZOL low-, medium-, high-dose (0.8, 1.6, 3.2 g/kg) groups, and received continuous oral administration for 7 d. Therapeutic efficacy was comprehensively evaluated by assessing pulmonary function parameters, systemic symptoms and signs, inflammatory factors in serum, lung histopathological changes and proportions of lung T cell subsets in lung tissue. Furthermore, transcriptomic sequencing and qRT-PCR were employed to validate the regulatory effects of JZOL on key differentially expressed genes, including lipocalin-2 (*Lcn2*), indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (*Ido1*), cyclin E1 (*Ccne1*), homeobox protein B8 (*Hoxb8*) and G protein-coupled receptor 17 (*Gpr17*). **Results** The compound modeling successfully induced severe airflow limitation, fever, constipation, and histopathological and cytopathological alterations in rats. Compared with model group, JZOL significantly improved lung function ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ), significantly reduced levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), C-reactive protein (CRP) and neutrophil elastase (NE) in serum ( $P < 0.001$ ), significantly reduced bronchial epithelial goblet cell proliferation and acid mucin secretion ( $P < 0.05, 0.001$ ), and corrected imbalanced Th1/Th2 and Th17/Treg cells ratios ( $P < 0.05, 0.001$ ). The transcriptome and qRT-PCR validation results showed that JZOL improved COPD through multiple mechanisms, including downregulation of immune microenvironment and protease imbalance related genes, inhibition of abnormal cell cycle and airway remodeling genes, upregulation of key lung regeneration factors and regulation of developmental factors, as well as activation of tissue repair and inflammation resolution pathways. **Conclusion** JZOL effectively improves lung function and systemic symptoms in COPD rats with phlegm heat syndrome by inhibiting systemic and local inflammatory responses through multiple targets, regulating T cell immune balance.

**Key words:** chronic obstructive pulmonary disease; Jinzhen Oral Liquid; phlegm-heat syndrome; inflammation; immunomodulation; transcriptome sequencing

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是全球范围内导致发病率和死亡率上升的主要原因之一, 预计到 2030 年将成为全球第 3 大死因<sup>[1]</sup>。据“全球疾病负担研究 (Global Burden of Disease, GBD)”统计, 2019 年中国的 COPD 病例数和死亡人数分别占世界的 21% 和 32%<sup>[2]</sup>。COPD 的病理生理学特征主要表现为持续性的气流受限、气道重塑、肺气肿以及慢性的气道和全身炎症反应<sup>[2]</sup>。尽管吸烟是其主要诱因, 但环境污染、生物燃料暴露以及反复的呼吸道感染在疾病进展中亦扮演着关键角色<sup>[3]</sup>。在 COPD 的临床进程中, 急性加重 (acute exacerbation of COPD, AECOPD) 是导致疾病进展、肺功能恶化和患者生活质量下降的关键事件<sup>[4]</sup>。AECOPD 常由呼吸道病毒或细菌感染诱发, 导致气道炎症急剧加重。在中医学理论体系中, AECOPD 的临床表现为发热、咳嗽剧烈、痰多色黄质黏、喘息气粗、大便秘结、舌红苔黄腻等, 被归类为“痰热壅肺证”<sup>[5-6]</sup>。这一证候不仅反映了肺部局部的“痰热”病理, 还涉及全身性的代谢紊乱和免疫失调。

现代病理生理学研究正在逐步揭示“痰热证”的生物学本质。“痰”的形成主要涉及气道杯状细胞化生、黏蛋白 5AC (Mucin 5AC, MUC5AC) 的过度合成与分泌, 以及黏液纤毛清除系统的功能障碍<sup>[6-7]</sup>;

这一过程受多种蛋白酶的调控, 其中中性粒细胞弹性蛋白酶 (neutrophil elastase, NE) 扮演了核心角色, 它不仅直接刺激黏液分泌, 还破坏气道基质<sup>[8]</sup>。而“热”则与全身性的细胞因子风暴、中性粒细胞过度激活以及氧化应激反应密切相关<sup>[6]</sup>。研究表明, 在 AECOPD 阶段, 以中性粒细胞为主的炎症细胞大量浸润, 释放脂质运载蛋白 2 (lipocalin 2, *Lcn2*) 等促炎介质, 进一步加剧组织损伤。此外, 免疫微环境的失衡, 特别是 Th17/Treg 细胞比例的倒置, 导致机体无法有效控制炎症反应, 形成持续的自身免疫样损伤<sup>[9]</sup>。

目前的常规治疗手段如支气管舒张剂 ( $\beta_2$  受体激动剂、抗胆碱能药物) 和吸入性糖皮质激素<sup>[10]</sup>, 虽然能缓解症状, 但在解决“痰热”证候特有的黏液高分泌和免疫失衡方面存在局限性<sup>[11]</sup>。长期使用糖皮质激素还可能增加肺炎风险<sup>[12]</sup>, 且部分重症患者对激素存在抵抗<sup>[13]</sup>。因此, 寻找能够多靶点干预、既能抗炎又能化痰、且具有免疫调节作用的药物, 是目前 COPD 治疗领域的研究热点。因此, 从中药复方中寻找能够多靶点、整体调节机体炎症与免疫状态的治疗策略, 已成为该领域的研究热点。

金振口服液 (Jinzhen Oral Liquid, JZOL) 是专为儿童研制开发的中药复方新药, 由山羊角、平贝母、大黄、黄芩、青礞石、石膏、人工牛黄和甘草

8味中药组成<sup>[14]</sup>,具有清热解毒、祛痰止咳的功效,广泛应用于小儿支气管炎、支气管肺炎及病毒性肺炎等疾病的治疗<sup>[15-16]</sup>。现代药理学研究表明,JZOL及其主要功效成分(如黄芩苷、栀子苷、大黄酸、胆酸等)具有显著的抗病毒、抗炎及解热作用<sup>[17-18]</sup>。网络药理学分析提示,JZOL可能通过调节核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)及Toll样受体信号通路发挥治疗作用<sup>[17-18]</sup>。尽管JZOL在临床应用广泛,但其对呼吸道常见病COPD,特别是“合并痰热证”这一复杂病理状态的干预作用机制尚不明确。现有的研究多集中于抗病毒或抗炎模型<sup>[19]</sup>,缺乏能够完整模拟“COPD基础病理+急性痰热诱导”的复合动物模型研究。此外,关于JZOL是否能够通过调节辅助性T细胞亚群(Th1/Th2、Th17/Treg)的平衡来恢复免疫稳态,是否能够通过抑制NE来改善气道黏液重塑,以及能否通过调节基因转录网络来恢复肺组织的再生能力和炎症消退能力尚属未知。

基于此,本研究拟采用“香烟烟雾暴露+脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)气管滴注”联合“高温高湿+LPS二次攻击”的方法,建立符合临床特征的COPD合并痰热证SD大鼠模型;整合肺功能检测、组织病理学、血清生化及流式细胞术,并结合高通量转录组测序(RNA-seq)及qRT-PCR实验,从器官、组织、细胞及分子水平,全方位评估JZOL的药效。本研究重点探讨了JZOL对免疫微环境与蛋白酶失衡、细胞周期与气道重塑、肺发育与再生以及组织修复与基质重构等基因模块的调控作用,旨在为JZOL拓展临床适应证及阐明其科学内涵提供坚实的实验依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF级雄性SD大鼠,体质量180~220 g,购自上海市必凯科翼生物科技有限公司,许可证号SCXK(沪)2023-0009。所有大鼠均饲养于屏障环境动物房内,环境温度21~25℃,相对湿度40%~70%,维持12h昼夜交替光照循环,自由进食饮水。实验开展前,大鼠适应性饲养7d。动物实验经江苏省康缘药业股份有限公司动物伦理委员会批准(批准号2024030509),所有动物实验操作均严格遵守实验动物伦理委员会的指导原则。

### 1.2 药品与试剂

JZOL(批号230623,国药准字Z10970018)由江苏康缘药业股份有限公司提供;地塞米松(批号23110201)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;LPS(批号H2316432)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;大鼠TNF- $\alpha$ ELISA试剂盒(批号L23091)、大鼠白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)ELISA试剂盒(批号L23085)购自美国R&D公司;NE ELISA试剂盒(批号CSB23070258)购自CUSABIO;C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)ELISA试剂盒(批号2309005)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;CD4抗体(批号9321086)购自美国BD公司; $\gamma$ 干扰素(interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )抗体(批号2308010)购自美国Novusbio公司;IL-4抗体(批号GR3386518-2)、PE/Cy7<sup>®</sup>偶联试剂盒(批号GR340210)、APC偶联试剂盒(批号GR339902)购自英国Abcam公司;CD3抗体(批号2310162)、IL-17A抗体(批号2309215)、CD25抗体(批号2308109)、FOXP3抗体(批号2311003)购自美国Thermo公司;苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染液(批号20230912)、糖原PAS染色试剂盒(含苏木素,批号20230806)购自北京索莱宝科技有限公司;4%多聚甲醛(批号69080900)购自Biosharp公司;佛波酯/离子霉素混合物(批号2307008)、雷非德菌素A/莫能霉素混合物(批号2307009)购自杭州联科生物技术有限公司;TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit(批号AK230911A)购自日本TaKaRa公司;FreeZol Reagent(批号R711-02-2309)、HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit(批号R312-02-2308)、ChamQ SYBR qPCR Master Mix(批号Q311-02-2310)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

### 1.3 仪器

MCSES-01型多通道烟雾暴露系统[亿科过程控制技术(苏州)有限公司];AniRes2005型小动物肺功能分析系统(北京贝兰博科技有限公司);DHG-9033BS-III型烘箱(上海新苗医疗器械制造有限公司);FDTH-V0-13型电子体温计(东莞市医脉实业有限公司);TAIJI-IE型小动物麻醉机、AniRes2005型小动物肺功能分析系统(深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司);3K15型低温高速离心机(美国Sigma公司);FORMA 700型超低温冰箱、NanoDrop One超微量分光光度计、Quant Studio 3

型实时荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo 公司); HBS-SCANX 型全波长酶标分析仪(南京德铁生物科技有限公司); SQS-120P 型玻片扫描影像系统(Tekscray 公司); DxFlex 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司); Agilent 4150 型 TapeStation 系统(美国 Agilent 公司); NovaSeq 6000 型测序平台(美国 Illumina 公司); LP-J8A 型电子秤(昆山优科维特电子科技有限公司); HistoCore Arcadia H 型石蜡包埋机、HistoCore BIOCUT 型石蜡切片机(德国 Leica 公司); T100 Thermal 型梯度 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

### 2.1 动物模型建立、分组与给药

**2.1.1 COPD 合并痰热证动物模型构建** 为精确模拟 COPD 合并痰热证的临床病理过程,参考邢小香等<sup>[20]</sup>的研究构建了“慢性基础病变+急性诱导”的 2 阶段复合造模法。

第 1 阶段: COPD 模型建立(1~8 周)。将 36 只大鼠随机分为对照组( $n=6$ )和造模组( $n=30$ )。对照组大鼠饲养于通风良好的洁净环境中,经鼻滴注生理盐水。造模组大鼠采用 LPS 滴注联合香烟烟雾暴露法建立 COPD 模型:大鼠每周 2 次经鼻腔滴注 LPS 溶液(1 mg/kg),并结合使用多通道烟雾暴露系统进行被动吸烟暴露,每日 2 次,每次暴露于 10 支香烟产生的烟雾中,持续 8 周。第 1 阶段结束后,采用小动物肺功能分析系统测定各组大鼠的潮气量(vital capacity, VC)、呼气峰流速(peak expiratory flow, PEF)及呼出 50%肺活量时的流速(forced expiratory flow, FEF50%)。各项指标显著低于对照组判定为 COPD 造模成功。

第 2 阶段: COPD 合并痰热证模型建立(第 9 周)。在确认 COPD 成模的基础上,除对照组外,其余造模大鼠(30 只)进入痰热证诱导阶段:从第 9 周第 1 天起,将大鼠置于特制的烘箱环境中进行风热刺激。环境参数设定:温度( $38\pm 1$ )℃,相对湿度 50%,风速 1 m/s。每次暴露 30 min,每日 2 次,间隔 >3 h,持续 9 d。此步骤旨在模拟中医“外感风热”及“热邪蕴肺”的病理环境。在第 9 周第 6 天,大鼠经鼻滴注高剂量(2 mg/kg) LPS 溶液,以模拟感染诱发的急性加重,进一步加重气道黏液分泌(化痰)与炎症反应。滴注当天不进行热暴露。

**2.1.2 动物分组与给药** 第 2 阶段造模结束后,将 30 只造模成功的 COPD 合并痰热证大鼠随机分为

模型组、地塞米松(0.2 mg/kg)组和 JZOL 低、中、高剂量(0.8、1.6、3.2 g/kg)组,分别相当于临床剂量的 0.36、0.72、1.45 倍,每组 6 只。于第 2 阶段造模结束后的第 2 天开始给药,各给药组 ig 相应药物(10 mL/kg),对照组和模型组 ig 等体积的生理盐水,1 次/d,连续给药 7 d。

### 2.2 一般行为学观察与生理指标监测

实验全过程密切监测大鼠的生理状态,以评估模型特征及药物的全身效应。在整个实验期间,每周记录 1 次大鼠的体质量变化。在第 2 阶段造模及给药期间,每日使用医用电子体温计监测并记录大鼠的直肠温度。同时,每日记录各组大鼠的进食量、饮水量和粪便状态。粪便状态采用 Bristol 粪便分型评分量表(表 1)进行量化评估,这一指标用于评估“肺与大肠相表里”理论下的肠道功能变化。末次给药结束后,拍照记录各组大鼠的身体毛色、舌象及足底情况,以进行综合状态评估。

表 1 Bristol 粪便分型评分量表

Table 1 Bristol stool pattern scale

评分指标	分数
大便呈分散颗粒状或块状,质硬似坚果	1
大便呈腊肠状,成块,表面凹凸不平	2
大便呈腊肠状,表面可见裂痕	3
大便外形似腊肠或似蛇形,光滑柔软	4
大便呈柔软团块状,断面、边缘清楚光滑	5
大便呈糊状或绒状,粗边蓬松,边界不清	6
大便呈水样,无固体物质	7

1、2 级提示存在便秘,3、4 级为正常理想便形,5~7 级提示存在腹泻。

Levels 1 and 2 indicate constipation, levels 3 and 4 represent the normal ideal stool form, levels 5—7 suggest diarrhea.

### 2.3 肺功能检测

造模第 1 阶段结束后对大鼠进行气管插管,使用小动物肺功能分析系统测定大鼠 VC、PEF、FEF 50%。给药结束后,各组大鼠禁食不禁水 12 h,使用小动物麻醉机对大鼠进行麻醉并实施气管插管。连接至小动物肺功能分析系统,系统自动记录并计算以下关键呼吸力学参数:第 0.3 秒用力呼气容积(forced expiratory volume 0.3 s, FEV0.3)、用力呼气量(forced vital capacity, FVC)、PEF,并计算 FEV 0.3/FVC 值,以判断 COPD 大鼠模型成功构建<sup>[21]</sup>。

### 2.4 样本采集与处理

肺功能检测完成后,立即通过腹主动脉采血,血液样本使用低温高速离心机 3 000 r/min 离心 10

min 后分离血清, 分装并置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 用于 ELISA 检测。迅速开胸, 结扎左肺, 分离并取出左肺中叶及支气管组织, 置于 4%多聚甲醛中固定, 用于组织病理学检查; 取左肺下叶及右肺组织, 用于制备单细胞悬液进行流式细胞术检测以及转录组测序。

## 2.5 组织病理学检测

为了评估 JZOL 对肺组织结构的影响, 进行 HE 染色和 AB-PAS 染色。将采集的肺中叶及支气管组织立即置于 4%多聚甲醛溶液中固定, 经梯度乙醇脱水后, 使用石蜡包埋机进行包埋。随后使用切片机制备厚度为  $4\text{ }\mu\text{m}$  的连续切片。

**2.5.1 HE 染色** 将切片脱蜡至水后, 使用 HE 染液进行染色, 其中苏木素染细胞核, 伊红染细胞质。染色完成后, 切片经梯度乙醇脱水、二甲苯透明, 并用中性树胶封片。最后, 使用玻片扫描影像系统在 200、400 倍视野下进行观察和图像采集。

**2.5.2 AB-PAS 染色** 组织切片脱蜡水化后, 采用 AB-PAS 染液进行染色。该方法通过过碘酸氧化和 Schiff 试剂反应, 特异性地将杯状细胞分泌的酸性黏蛋白染成蓝色或蓝紫色, 并用苏木素复染细胞核。染色后的切片在 200 倍视野下观察, 以评估支气管黏液分泌情况。

## 2.6 血清中炎症因子水平的检测

按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、NE 和 CRP 水平。

## 2.7 肺组织 T 淋巴细胞亚群检测

为评估 JZOL 对肺局部免疫微环境的影响, 采用流式细胞术分析 T 细胞亚群比例。将新鲜肺组织经胶原酶 IV 与 DNase I 消化、 $70\text{ }\mu\text{m}$  滤网滤过及红细胞裂解后制备单细胞悬液; 随后利用佛波酯/离子霉素及布雷非德菌素 A/莫能霉素混合物刺激 4~5 h, 以促进胞内因子滞留。孵育结束后吸取细胞悬液至新的流式管中,  $300\times g$  离心 5 min, 弃上清, 用 1 mL PBS 重悬细胞沉淀,  $300\times g$  离心 5 min, 弃上清, 用  $100\text{ }\mu\text{L}$  PBS 重悬, 用于后续染色。

针对不同的 T 细胞亚群进行特异性染色, Th1 细胞用 FITC CD3、APC-Cy7 Anti-Rat CD4、PE-Cy7 IFN- $\gamma$  进行标记; Th2 细胞用 FITC CD3、APC-Cy7 Anti-Rat CD4 和 APC IL-4 进行标记; Th17 细胞用 FITC CD3、APC-Cy7 Anti-Rat CD4 和 PerCP-Cyanine 5.5 IL-17A 进行标记; Treg 细胞用 APC-Cy7 Anti-Rat CD4、APC CD25 和 PE FOXP3 进行标记。4  $^{\circ}\text{C}$

避光染色 30min, 经洗涤、离心、弃上清和重悬细胞后, 使用流式细胞仪进行上机检测和数据采集。

## 2.8 转录组测序与生信分析

使用 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 提取各组大鼠肺组织总 RNA。利用 NanoDrop One 测定  $A_{260}/A_{280}$  值, 并采用 Agilent 4150 TapeStation 评估 RNA 完整性 (RIN)。筛选  $A_{260}/A_{280}$  为 1.8~2.2 且  $\text{RIN}\geq 7.0$  的高质量 RNA 样本, 根据 Illumina 标准流程完成转录组文库构建, 并通过 NovaSeq 6000 测序平台进行双端测序。

使用 Cutadapt v1.9 和 FastQC v0.11.9 软件对原始数据进行质量控制及评估。利用 HISAT2 v2.2.1 软件将过滤后的 Reads 比对至参考基因组。采用 StringTie v2.1.6 进行转录组组装及定量; 使用 DESeq2 软件筛选差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 标准设定为  $P\leq 0.05$  且  $|\log_2$  差异倍数 (fold change, FC)  $|\geq 1$ 。采用主成分分析 (principal component analysis, PCA) 评估样本间差异及模型成功率。利用超几何检验进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能 [包含生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF)、细胞成分 (cellular component, CC)] 及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。基于所有基因的表达水平, 使用 preranked GSEA 工具结合 KEGG 与 GO 数据库进行基因集富集分析, 根据标准化富集分数 (normalized enrichment score, NES) 评估通路整体调控趋势。

## 2.9 qRT-PCR 分析

使用 FreeZol Reagent 提取组织 RNA, 按 cDNA 合成试剂盒说明书使用并反转录为 cDNA。根据转录组数据, 使用 NCBI 数据库设计目的基因的引物序列, 由南京擎科生物公司进行引物合成, 引物长度为 18~22 bp, 引物序列见表 2。根据 PCR 试剂盒及反应体系, 在 Quant Studio 3 型实时荧光定量 PCR 系统上进行 PCR 反应。以  $\beta$ -actin 为内参基因, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算目的基因的表达量。

## 2.10 统计学分析

所有实验数据均采用 GraphPad Prism 9.5.1 软件进行统计分析与作图。所有实验数据以  $\bar{x}\pm s$  表示。多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 或双因素方差分析 (Two-way ANOVA), 组间两两比较采用 Dunnett's post-hoc test。

表2 引物序列

Table 2 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')	基因	引物序列 (5'-3')
<i>Actb</i>	F: CCCGCGAGTACAACCTTCTT R: AACACAGCCTGGATGGCTAC	<i>Hoxb8</i>	F: ACCCTTCGCAAATCCAGGAG R: AGGGTCGTAGCCGTAGAAGT
<i>Tmprss11a</i>	F: GTCCCTGATGATGGCGGTAG R: GCTGGAGGGCGATACTTCTC	<i>Isl1</i>	F: ACCTGCTTTGTTAGGGACGG R: GTGCAGCTGCTTTTCGTTGA
<i>Ido1</i>	F: ACTGGAGGAGCTGCCTGATA R: GGGGGAGCTGACTCTAAGGA	<i>Klk6</i>	F: AGAGGGACTTACAGGTCGGA R: CATAACAGGGGACCTCCAGA
<i>Duox1</i>	F: ACGACAGCGATCTCCGATTC R: ATGGGCGCTCATTCTAGGTG	<i>Gpr17</i>	F: GGATCAGTAGAGGACGCTGC R: CCTCCACGACTTTGCACTCT
<i>Ccn1</i>	F: ACAGCTAGCGCGGTGTAG R: GGAAGTGGAACTCAGACCCG	<i>Col26a1</i>	F: CCATCACACGGTGACAAGGA R: GAGAGTCCTCACGAGGTTGG
<i>Top2a</i>	F: TGTGGAGAAGCGTCCAAGTC R: TGACAACCTCCATGGTGACCG	<i>ppy</i>	F: CCAATACCCACTCGCTCAGG R: AGCCCTCTGTTCATGCGTAG
<i>Lcn2</i>	F: GGGCTGTCCGATGAACTGAA R: AATGCATTGGTCGGTGGGAA		

*Tmprss11a*-跨膜丝氨酸蛋白酶 11A; *Ido1*-吡啶胺 2,3-双加氧酶 1; *Duox1*-双氧化酶 1; *Ccn1*-细胞周期蛋白 E1; *Top2a*-DNA 拓扑异构酶 II α; *Hoxb8*-同源框 B8; *Isl1*-胰岛因子 1; *Klk6*-激肽释放酶相关肽酶 6; *Gpr17*-G 蛋白偶联受体 17; *Col26a1*-XXVI 型胶原蛋白 α1; *ppy*-胰高血糖素样肽。

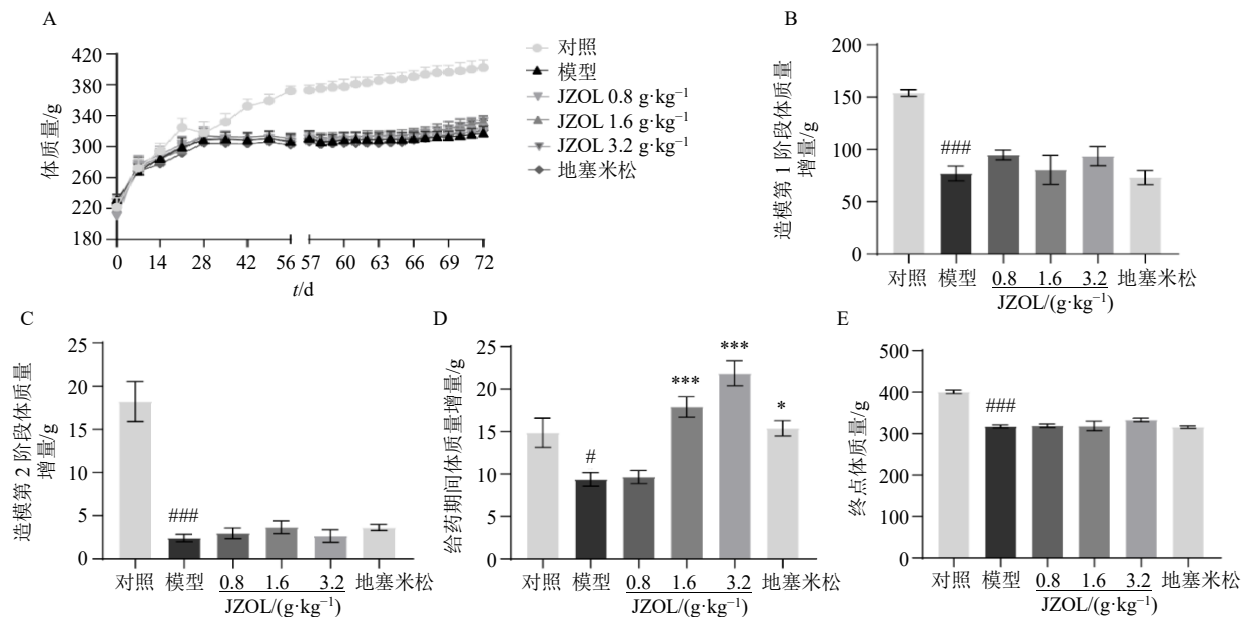
*Tmprss11a*-transmembrane serine protease 11A; *Ido1*-indoleamine 2,3-dioxygenase 1; *Duox1*-dual oxidase 1; *Ccn1*-cyclin E1; *Top2a*-DNA topoisomerase II α; *Hoxb8*-homeobox protein B8; *Isl1*-ISL LIM homeobox 1; *Klk6*-Kallikrein related peptidase 6; *Gpr17*-G protein-coupled receptor 17; *Col26a1*-collagen type XXVI α1; *ppy*-pancreatic polypeptide.

### 3 结果

#### 3.1 JZOL 改善 COPD 合并痰热证大鼠的全身症状及体征

在模型建立过程中,大鼠的体质量变化直观反映了疾病对机体代谢的消耗及生长发育的抑制。结

果显示,与对照组比较,模型组大鼠在第 1 阶段(造模第 0~56 天)及第 2 阶段(痰热证造模,第 57~72 天)期间,体质量增长均受到显著抑制 ( $P < 0.001$ ,图 1-A~C),这种体质量增长迟缓符合 COPD 慢性消耗性疾病的特征。尽管实验终点各受试药物



A-实验期间大鼠体质量生长曲线; B、C-COPD 造模期间(造模第 1 阶段)及合并痰热证造模期间(造模第 2 阶段)大鼠体质量增量; D-给药期间大鼠体质量增量; E-实验终点各组大鼠体质量; 与对照组比较:  $^{\#}P < 0.05$   $^{###}P < 0.001$ ; 与模型组比较:  $^*P < 0.05$   $^{**}P < 0.01$   $^{***}P < 0.001$ , 下同。

A-body weight growth curve of rats during experimental period; B, C-body weight increments in rats during the modeling phase of COPD (stage I) and the combined phlegm-heat syndrome modeling phase (stage II); D-body weight increments in rats during drug administration period; E-final body weights across experimental groups;  $^{\#}P < 0.05$   $^{###}P < 0.001$  vs control group;  $^*P < 0.05$   $^{**}P < 0.01$   $^{***}P < 0.001$  vs model group, same as below figures.

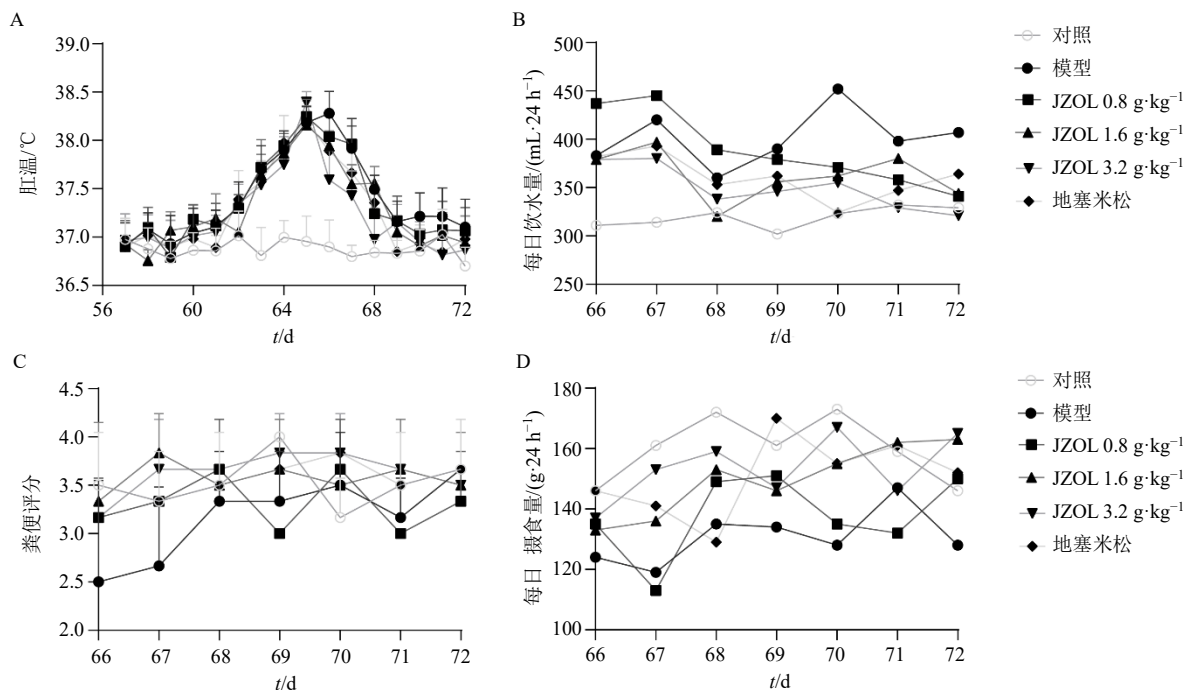
图 1 各组大鼠体质量变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 1 Changes in body weight of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组大鼠体质量与模型组相比未见显著差异(图 1-E),然而在给药治疗期,JZOL 各剂量组大鼠的体质量增长均优于模型组,其中 JZOL 中、高剂量组及地塞米松组的体质量增量显著高于模型组 ( $P < 0.05、0.001$ ,图 1-D),表明 JZOL 能有效改善 COPD 合并痰热证大鼠的全身营养状况。

发热与便秘是痰热证的核心临床表现。结果显示,模型组大鼠在痰热证造模及维持期间(第 63~72 天),直肠温度较对照组显著升高 ( $P < 0.05$ ,图

2-A),成功模拟了急性加重期的发热症状。给予高剂量 JZOL 治疗后,大鼠直肠温度在第 66~68 及第 71 天显著低于模型组,展现出确切的解热作用(图 2-A)。此外,模型组大鼠在第 66 天出现明显的粪便评分下降(1~2 级),表现为颗粒状干硬粪便,提示存在便秘及津液亏损。JZOL 治疗后,大鼠的粪便性状逐渐恢复正常(3~4 级),且日均饮水量和进食量恢复至接近正常水平(图 2-B~D),提示 JZOL 具有通腑泄热、恢复胃肠功能的全身调节作用。



A-造模第 2 阶段至实验结束, 各组大鼠每日肛温; B~D-给药期间每日记录各组大鼠进食量、饮水量及粪便状态。  
A-daily rectal temperature of rats in each group from the second stage of modelling to the end of the experiment; B-D-daily food intake, water intake and fecal status of rats in each group during the administration period.

图 2 COPD 造模期各组大鼠直肠温度、摄食饮水量及粪便评分 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 2 Rectal temperature, food and water intake and fecal score in rats of each group during COPD modelling period ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 3.2 JZOL 显著改善 COPD 大鼠肺功能及缓解气流受限

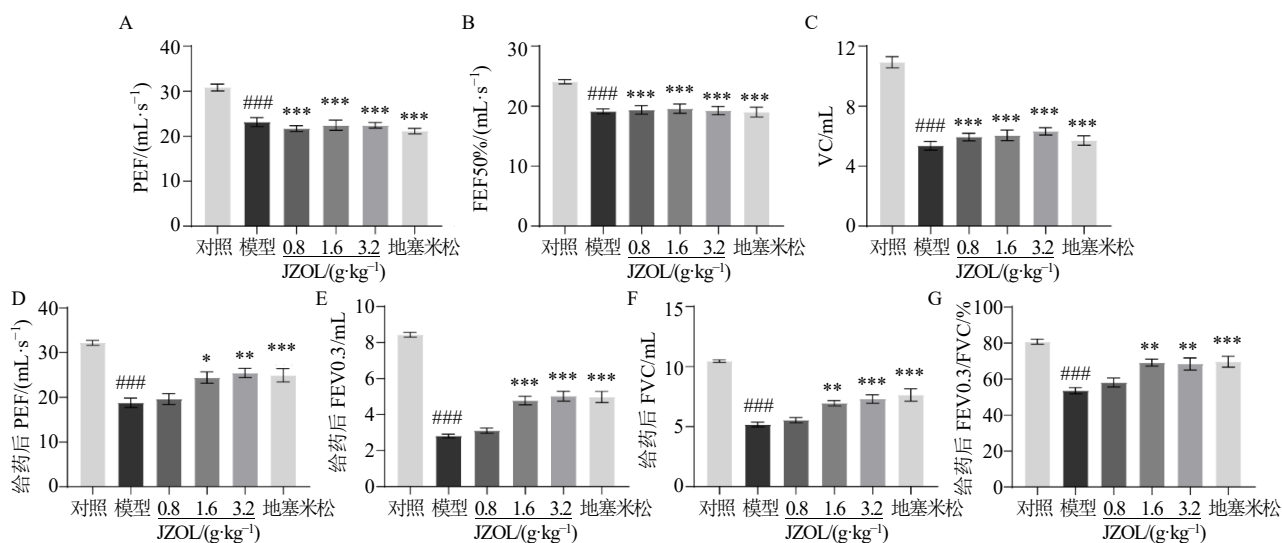
造模第 1 阶段结束后,模型组大鼠的 PEF、FEV<sub>50%</sub>及 VC 均显著低于对照组 ( $P < 0.001$ ),表明慢性支气管炎及气道阻塞已形成(图 3-A~C)。在实验终点(治疗结束后),模型组大鼠表现出严重的限制性与阻塞性通气功能障碍,其 PEF、FEV<sub>0.3</sub>、FVC 及 FEV<sub>0.3</sub>/FVC 值均较对照组显著下降 ( $P < 0.001$ )。特别是 FEV<sub>0.3</sub>/FVC 值的下降,是 COPD 气流受限的金标准。JZOL 干预表现出明显的剂量相关性疗效:低剂量组改善不明显,而中、高剂量

组的上述肺功能指标均较模型组显著回升 ( $P < 0.05、0.01、0.001$ ,图 3-D~G),其疗效与阳性对照药地塞米松相当。表明 JZOL 能有效降低气道阻力,恢复肺组织的顺应性。

### 3.3 JZOL 抑制全身炎症反应及 NE 活性

如图 4 所示,与对照组比较,模型组大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 CRP 水平显著升高 ( $P < 0.001$ ),提示体内存在剧烈的炎症级联反应;与模型组比较,JZOL 中、高剂量组及地塞米松组大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 CRP 水平显著降低 ( $P < 0.001$ )。

NE 为中性粒细胞活化的标志物及气道黏液高



A~C-造模第1阶段结束后,测定各大鼠VC、PEF、FEF50%; D~G-给药结束后,检测各组大鼠FEV0.3、FVC、PEF,并计算FEV0.3/FVC值。  
A—C-VC, PEF and FEF50% of rats in each group after the first stage of modeling; D—G-PEF, FVC and FEV0.3/FVC ratio of rats in each group after the administration period.

图3 各组大鼠肺功能变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 3 Changes in pulmonary function of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

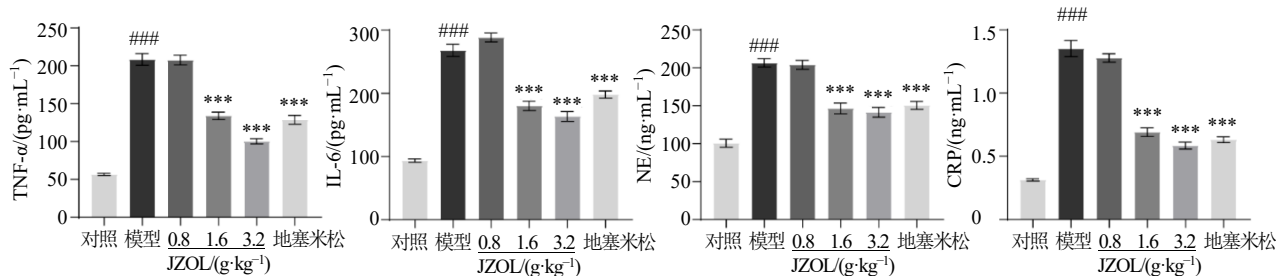


图4 各组大鼠血清中炎症因子水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 4 Levels of inflammatory cytokine in serum of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

分泌的关键诱导因子,与对照组比较,模型组大鼠血清中NE水平显著升高( $P < 0.001$ );与模型组比较,JZOL中、高剂量组及地塞米松组血清中NE水平显著降低( $P < 0.001$ )。NE的降低不仅意味着中性粒细胞浸润的减少,更从机制上解释了JZOL改善气道黏液阻塞(化痰)的潜在途径。

### 3.4 JZOL 改善肺组织病理损伤并抑制气道黏液高分泌

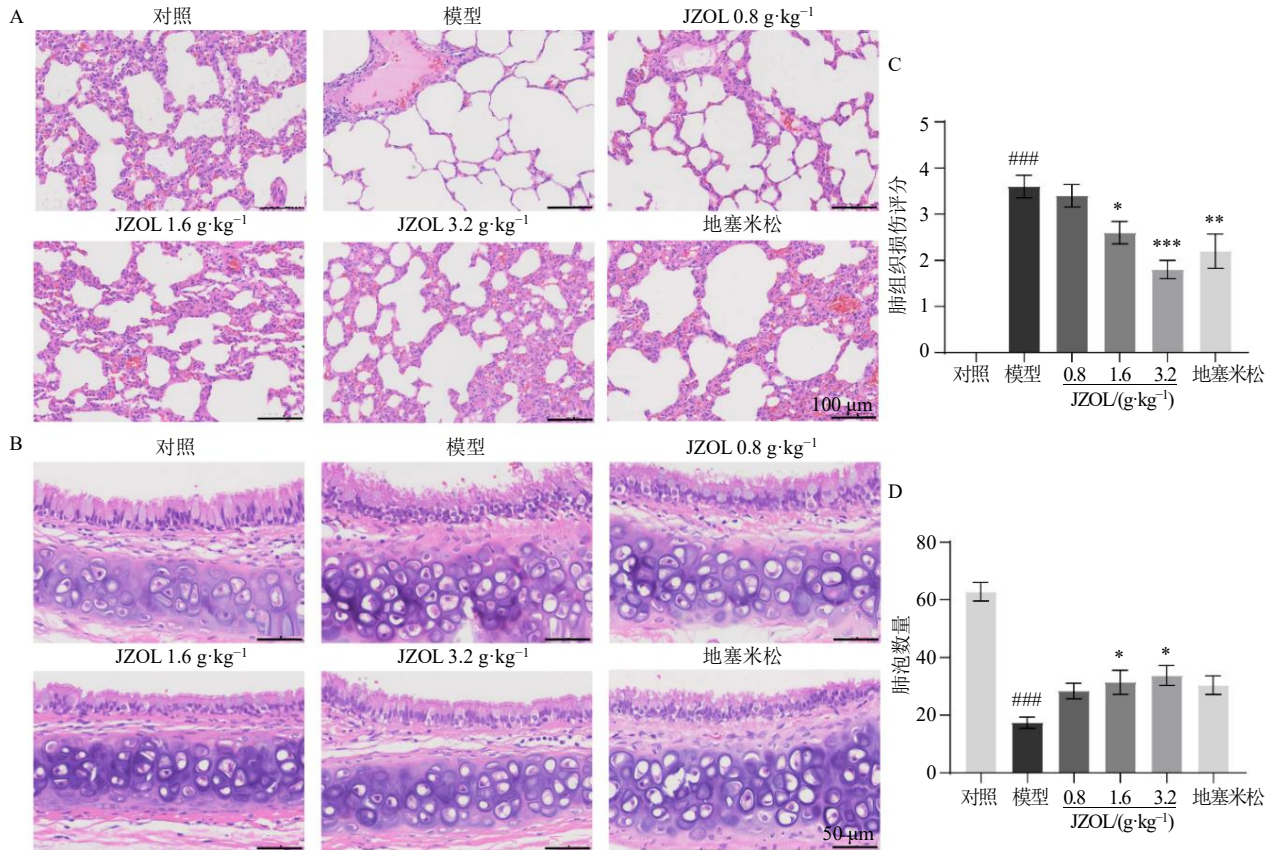
如图5所示,模型组肺组织出现典型的COPD病理改变,包括肺泡壁断裂、融合形成肺大泡(肺气肿),单位视野内肺泡数量显著减少,支气管壁增厚,腔内可见大量炎性细胞浸润及脱落的纤毛。JZOL高剂量组及地塞米松组显著减轻了上述病理损伤,肺泡结构相对完整,炎性浸润明显减少。

如图6所示,AB-PAS染色特异性显示了支气管上皮的黏液分泌情况。模型组支气管上皮杯状细胞

显著增生肥大,PAS阳性染色(紫红色,代表酸性黏蛋白)区域面积显著增加( $P < 0.001$ ),提示存在严重的黏液高分泌(痰液潴留)。JZOL中、高剂量组显著减少了PAS阳性区域的比例( $P < 0.001$ ),表明其能有效抑制杯状细胞化生及黏蛋白的过度合成与分泌。这一病理发现与肺功能改善及NE水平下降高度一致,证实了JZOL“祛痰”功效的生物学基础。

### 3.5 JZOL 调节肺组织 Th1/Th2 及 Th17/Treg 细胞免疫失衡

流式细胞术分析深入揭示了JZOL对肺部适应性免疫应答的调节作用。如图7、8所示,模型组大鼠肺组织中CD4<sup>+</sup>T细胞亚群分布出现显著紊乱,即Th1细胞(IFN-γ<sup>+</sup>)及Th17细胞(IL-17A<sup>+</sup>)比例显著升高,而Th2细胞(IL-4<sup>+</sup>)及Treg细胞(Foxp3<sup>+</sup>)比例相对降低,导致Th1/Th2及Th17/Treg



A、B-右肺中叶 HE 染色 (×200) 及肺组织损伤评分; C、D-支气管 HE 染色 (×400) 及视野内肺泡数量统计结果。

A, B-HE staining of right middle lung lobe (× 200) and lung tissue injury score; C, D-HE staining of bronchus (× 400) and statistical results of alveolar count per field.

图 5 各组大鼠肺组织及支气管 HE 染色 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 5 HE staining of lung and bronchial tissues of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

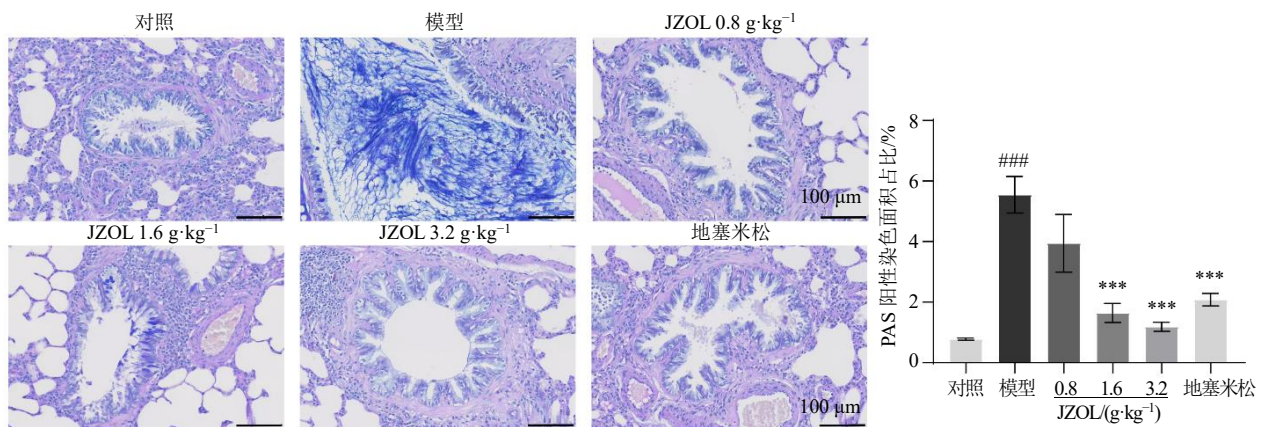
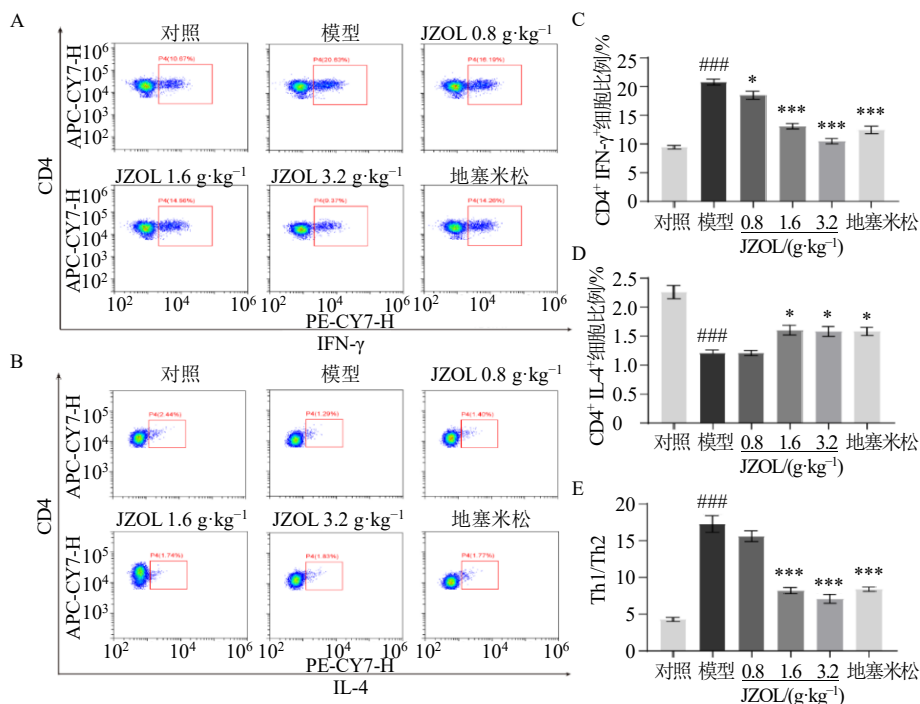


图 6 各组大鼠支气管 AB-PAS 染色及 PAS 阳性染色面积占比统计 (×200;  $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 6 AB-PAS staining of bronchial tissue and PAS positive staining area percentage of rats in each group (× 200;  $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

值显著失衡 ( $P < 0.001$ )。这种以 Th1 和 Th17 优势为主的免疫表型与 COPD 的慢性持续性炎症及自身免疫机制密切相关。JZOL 干预后显著逆转了这一趋势, 大鼠肺组织 Th1 及 Th17 细胞比例显著下调,

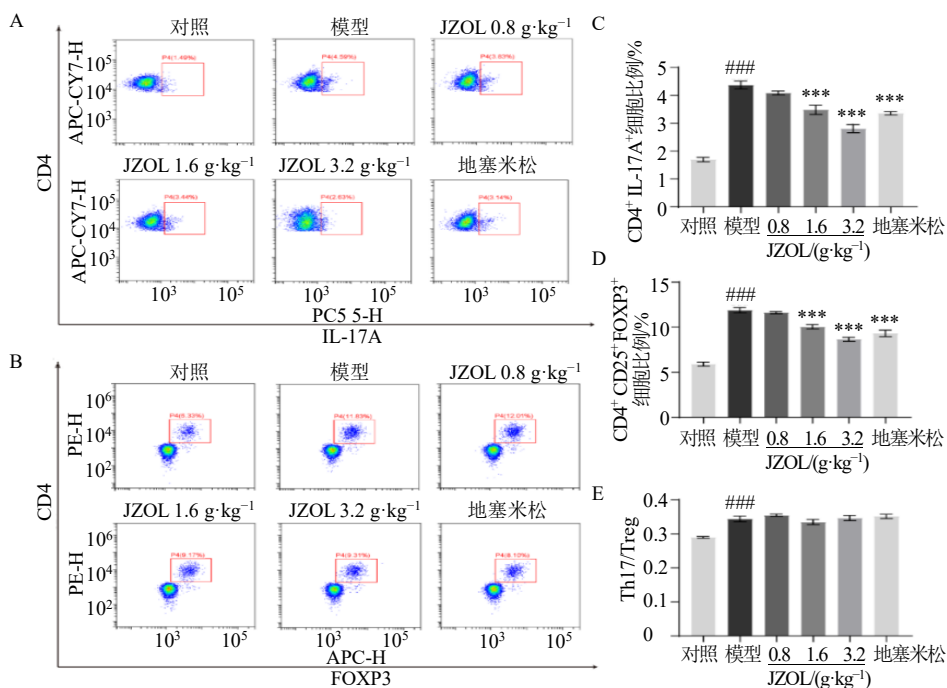
从而有效恢复了 Th17/Treg 的免疫平衡。这一结果提示, JZOL 并非单纯的免疫抑制, 而是通过“免疫重塑”来恢复机体的免疫耐受, 减轻过度的免疫炎症损伤。



A、B-流式细胞术检测肺组织 Th1、Th2 细胞分群比例；C~E-肺组织 Th1、Th2 细胞分群比例和 Th1/Th2 值。  
A, B-proportions of Th1 and Th2 cell subsets in lung tissue detected by flow cytometry; C—E-proportions of Th1 and Th2 cell subsets in lung tissue and Th1/Th2 value.

图 7 各组大鼠肺组织 Th1、Th2 细胞分群比例 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 7 Th1 and Th2 cells subset proportions in lung tissue of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )



A、B-流式细胞术检测肺组织 Th17、Treg 细胞分群比例；C~E-肺组织 Th17、Treg 细胞分群比例和 Th17/Treg 值。  
A, B-proportions of Th17 and Treg cell subsets in lung tissue detected by flow cytometry; C—E-proportions of Th17 and Treg cell subsets in lung tissue and Th17/Treg value.

图 8 各组大鼠肺组织 Th17、Treg 细胞分群比例 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

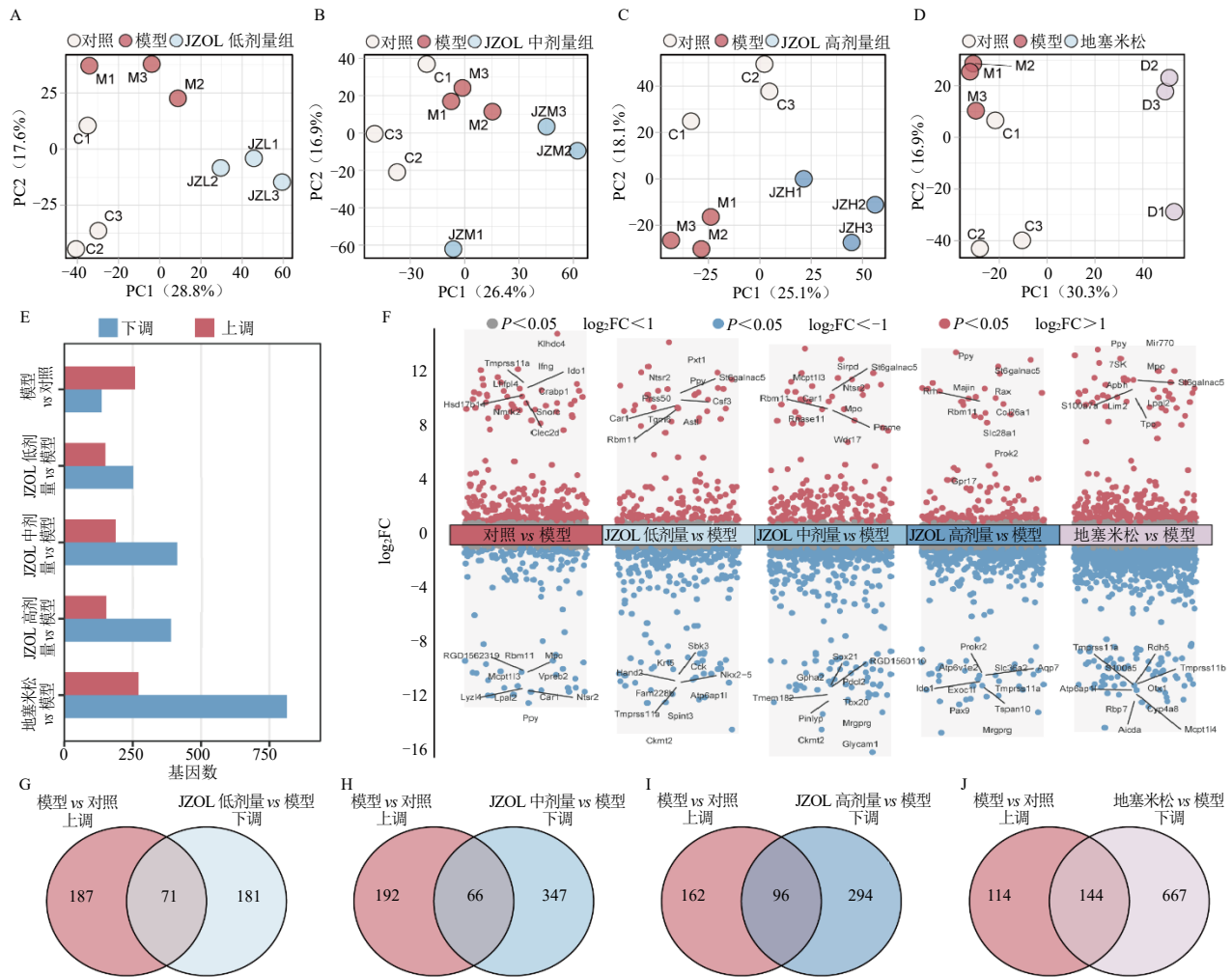
Fig. 8 Th17 and Treg cells subset proportions in lung tissue of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 3.6 COPD 痰热证模型的差异基因特征分析

为了从整体层面评估 COPD 痰热证模型对大鼠肺组织基因表达的影响以及 JZOL 的干预效应, 对各组样本进行 PCA。PCA 结果 (图 9-A~D) 显示, 对照组、模型组以及 JZOL 各剂量组和地塞米松组在转录组水平上呈现出清晰的空间分离, 且组内生物学重复样本高度聚集。表明香烟烟雾暴露联合 LPS 及风热暴露成功诱导了肺组织基因表达的剧烈改变, 且 JZOL 在全基因组水平上对疾病诱导的异常转录谱具有明显的纠正作用。此外, 地塞米松组也显示出明显的分离, 但其轨迹与 JZOL 组略有不同, 提示两者可能通过部分重叠但非完全相

同的机制发挥作用。

通过对比模型组与对照组, 筛选出 DEGs, 以界定 COPD 在分子层面的病理特征。如图 9-E 所示, 模型组有 395 个 DEGs, 其中 258 个基因上调, 137 个基因下调。这种“上调为主”的模式 (占 65.3%) 提示 COPD 痰热证是一种以基因转录过度激活 (如炎症因子、蛋白酶等) 为主要特征的病理状态。火山图展示的前 10 名 DEGs 进一步揭示了具有统计学意义的关键基因变化 (图 9-F)。例如,  $\gamma$  干扰素 (interferon- $\gamma$ , *Ifn $\gamma$* ) 呈现显著上调, 伴随 *Ido1* 协同升高。这表明肺部处于强烈的 Th1 型炎症反应状态, 且伴随代谢免疫调节的异常激活。此外, *Tmprss11a*



A~D-各组 PCA 图; E-各组 DEGs 数量; F-模型组 vs 对照组、JZOL 各剂量组 vs 模型组、地塞米松组 vs 模型组的 DEGs 火山图, 图中标记出显著上调/下调的前 10 个基因; G~J-模型组 vs 对照组上调基因的交集与各给药组 vs 模型组下调基因重叠基因 Venn 图。

A—D-PCA plots in each group; E-number of DEGs in each group; F-DEGs volcano plot of model group vs control group, JZOL each dose groups vs model group, dexamethasone group vs model group, with the top 10 significantly upregulated/downregulated genes marked in the plot; G—J-Venn map of intersection of up-regulated genes in model group vs control group and down-regulated genes in each treatment group vs model group.

图 9 基于的转录组基因表达谱分析

Fig. 9 Transcriptome-based gene expression profile analysis

表达量剧增，该基因的高表达通常与病毒易感性增加及上皮屏障破坏相关。同时，Lcn2 显著升高，提示中性粒细胞的持续活化。

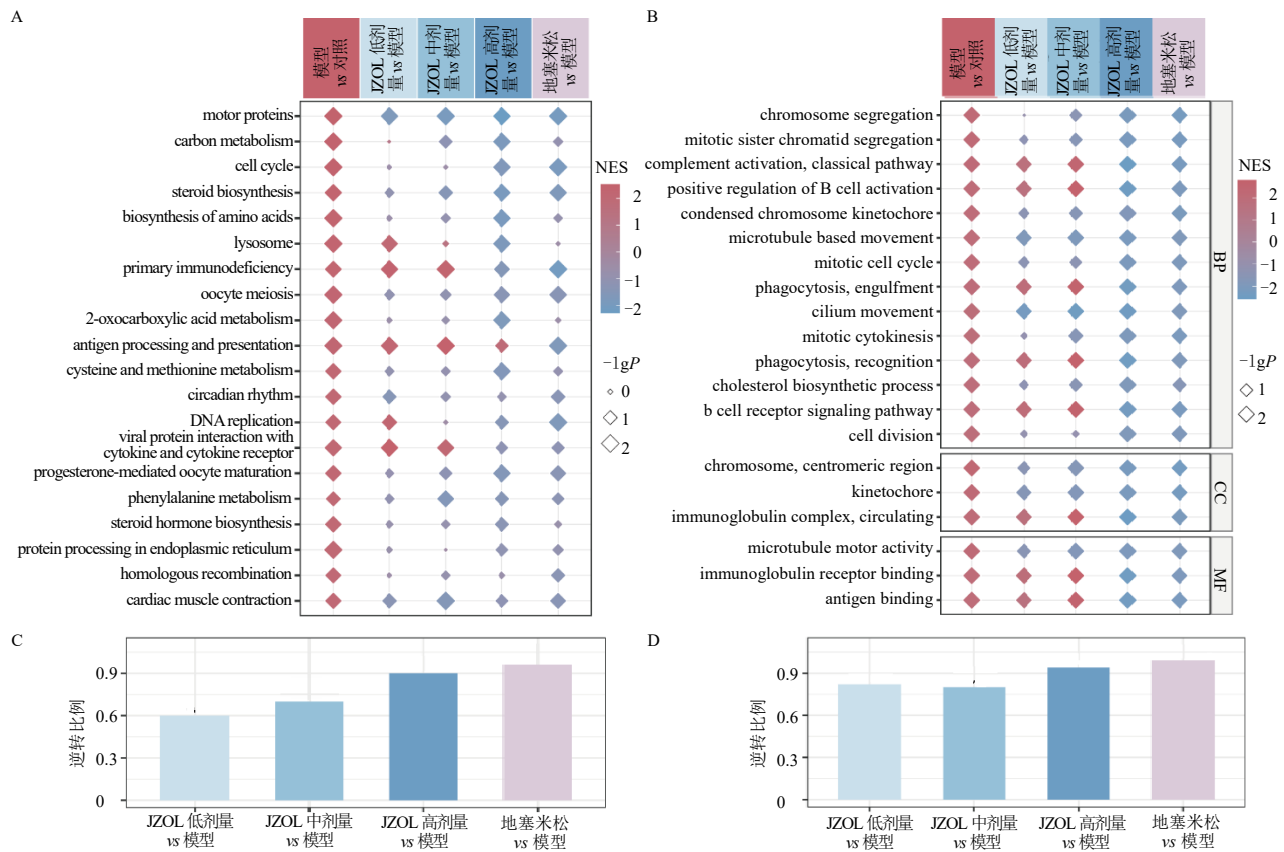
### 3.7 JZOL 对疾病基因的逆转作用评估

为了量化 JZOL 的治疗效果，分析了 JZOL 各剂量组相对于模型组的 DEGs，并重点关注其对上述模型致病基因的逆转能力。Venn 图分析显示，JZOL 能够剂量相关性地逆转模型组的异常基因表达 (图 9-G~J)。JZOL 高剂量组表现出最优的逆转效果，成功将 96 个在模型组中异常上调的基因显著下调，占 JZOL 高剂量组 vs 模型组总差异基因的 24.6%。这一比例优于地塞米松 (17.7%)，说明 JZOL 在纠正特定病理环节上可能具有独特优势。与模型组比较，JZOL 治疗后显著下调 *Tmprss11a*、*Idol*、*Lcn2*、*Ifng*、*Ccne1* 和 *Top2a* 表达，上调 *Ppy*、*Hoxb8*、*Klk6*、*Gpr17* 和 *Col26a1* 的表达 (图 9-F)。

### 3.8 JZOL 对疾病特征通路的系统性逆转

进一步利用 GSEA 分析量化药物对 COPD 疾病状态的逆转程度。将模型组 vs 对照组显著富集的通路定义为“疾病特征通路”。分析结果显示，JZOL 对疾病特征通路的逆转作用呈现明确的剂量相关性。在 KEGG 通路层面 (图 10-B)，JZOL 低、中、高剂量组的逆转率分别为 60%、70%和 90%；在 GO 生物学过程层面 (图 10-D)，JZOL 低、中、高剂量组的逆转率分别为 82%、80%和 94%。值得注意的是，JZOL 高剂量组的逆转率接近地塞米松组 (KEGG: 97.5%；GO: 99%)，提示其在转录组水平上具有强大的纠偏能力。

GSEA-KEGG 分析结果 (图 10-A) 显示，模型组中显著上调的细胞周期、DNA 复制、原发性免疫缺陷、抗原处理与呈递等通路，在 JZOL 给药组中均呈现显著的负富集，表明药物有效抑制了异常的



A-各组基因显著富集的 GSEA-KEGG 前 20 条通路气泡图；B-各给药组对疾病模型失调 GSEA-KEGG 通路的逆转比例柱状图；C-各组基因显著富集的 GSEA-GO 前 20 条通路气泡图；D-各给药组对疾病模型失调 GSEA-GO 的逆转比例柱状图。

A-top 20 significantly enriched GSEA-KEGG pathways in each group (bubble plot); B-reversal proportion of dysregulated GSEA-KEGG pathways in the disease model by each administration group (histogram); C-top 20 significantly enriched GSEA-GO pathways in each group (bubble plot); D-reversal proportion of dysregulated GSEA-GO pathways in the disease model by each administration group (histogram).

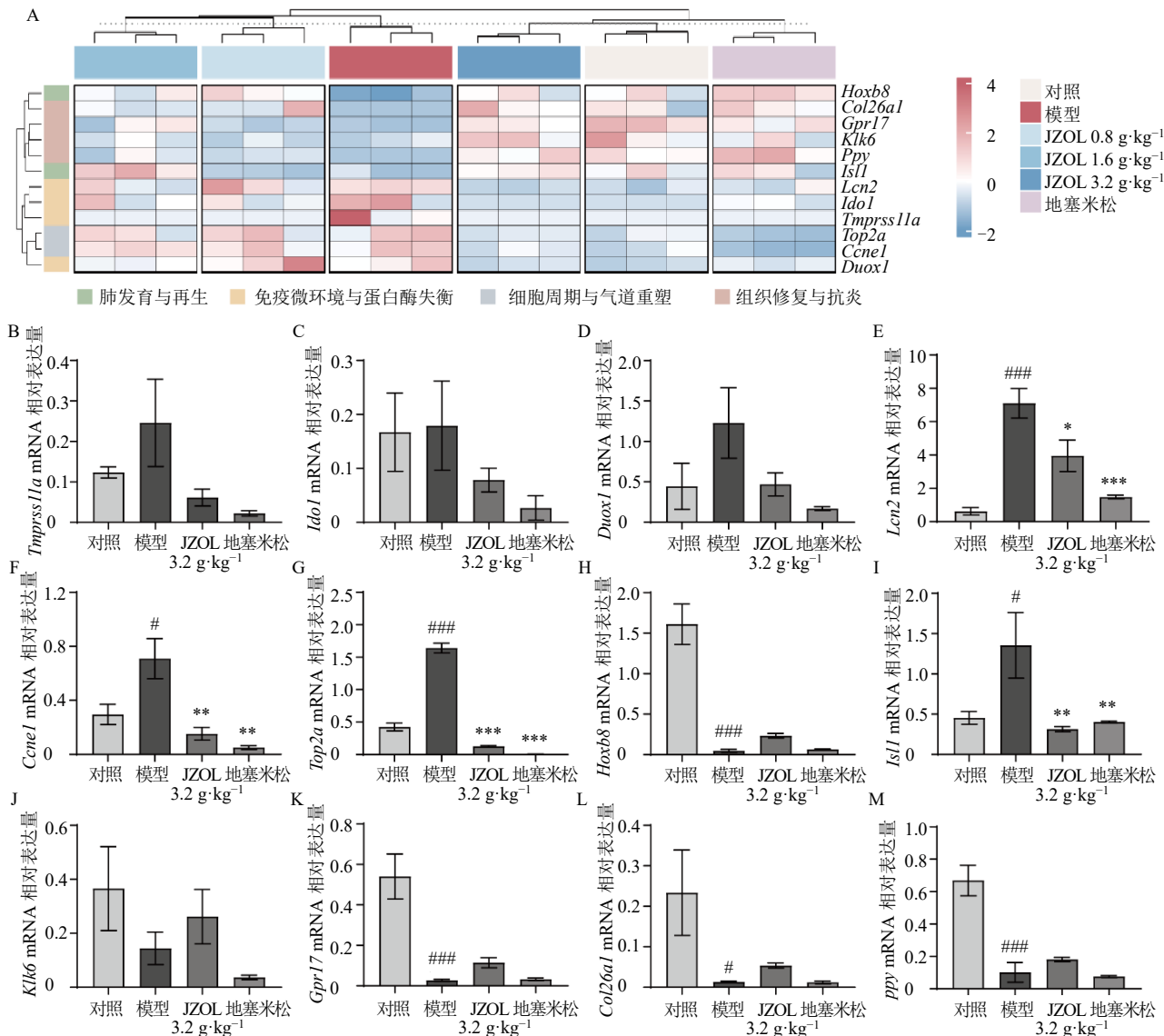
图 10 JZOL 对 KEGG 富集通路与 GO 功能的影响

Fig. 10 Effect of JZOL on KEGG enrichment pathways and GO function

细胞代谢、细胞周期活动及过度激活的免疫应答。GSEA-GO 分析结果 (图 10-C) 进一步证实了上述发现。模型组中与纤毛运动、微管依赖性运动、有丝分裂细胞周期相关的基因集显著富集, 提示气道上皮细胞可能存在病理性的增殖与骨架重排。此外, 吞噬作用和补体激活相关条目的异常上调反映了过度的炎症吞噬反应。JZOL 治疗显著下调了上述与增殖、炎症及细胞骨架运动相关的基因集, 使转录谱趋于正常化。

### 3.9 JZOL 对 COPD 模型相关功能基因模块的验证

基于 RNA-seq 转录组测序及 qRT-PCR 验证, 系统解析了 JZOL 对 COPD 模型大鼠肺组织中 4 个核心基因模块的调控效应 (图 11)。结果证实, JZOL 通过多靶点网络恢复了肺组织的转录稳态。免疫微环境与蛋白酶失衡模块相关基因 (图 11-B~E), 如 *Duox1*、*Tmprss11a*、*Ido1*、*Lcn2* 在模型组中呈显著高表达, 反映了中性粒细胞介导的蛋白酶级联反应与氧化应激增强。JZOL 干预显著下调了上述基因,



A-基于 RNA-seq 数据的 DEGs 热图, 展示了对照组、模型组、JZOL 各剂量组及地塞米松组中 4 个功能模块 (免疫微环境与蛋白酶失衡、细胞周期与气道重塑、肺发育与再生、组织修复与抗炎) 基因表达的层次聚类分析; B~M-关键基因 mRNA 相对表达量的 qRT-PCR 验证结果。A-heatmap of DEGs based on RNA-seq data, hierarchical clustering analysis of gene expression in four functional modules (immune microenvironment and protease imbalance, cell cycle and airway remodeling, lung development and regeneration, tissue repair and anti-inflammation) across control group, model group, JZOL each dose groups and dexamethasone group; B~M-qRT-PCR validation of relative mRNA expression of key genes.

图 11 JZOL 调节 COPD 模型小鼠关键基因模块的表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 11 Modulation of key gene modules by JZOL in COPD model mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

其中对炎症核心标志物 *Lcn2* 的抑制具有显著统计学差异 ( $P < 0.05$ ), 表明药物有效阻断了炎症微环境的恶性循环。针对模型组异常激活的细胞周期与气道重塑抑制模块 (图 11-F、G), JZOL 显著抑制了增殖关键基因 *Ccne1* 和 *Top2a* 的表达 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 提示其能通过阻滞结构细胞增殖来减轻气道壁增厚, 遏制病理性气道重塑。对于组织再生与修复模块的基因 (图 11-H、I), 模型组表现为再生因子 *Hoxb8* 的耗竭及发育因子 *Isl1* 的病理性重激活, JZOL 治疗不仅回升了 *Hoxb8* 水平, 保护了内源性祖细胞库, 还显著下调了 *Isl1* ( $P < 0.01$ ) 以纠正异常发育程序。同时, JZOL 逆转了组织修复、基质重构与神经调节模块相关基因 (图 11-J~M), 包括上调模型组被抑制的炎症消退受体 *Gpr17* 及基质基因 *Col26a1* 表达, 标志着主动修复与基质重建过程的启动。

#### 4 讨论

COPD 合并痰热证是临床常见的病证, 其病理机制涉及气道阻塞、全身炎症失控及免疫功能紊乱的复杂网络。本研究通过构建“香烟+LPS+风热”复合大鼠模型, 成功复现了该证候的气流受限、发热、便秘及黏液高分泌等核心特征。本研究通过多维度的实验证实, JZOL 不仅能改善 COPD 大鼠的肺功能和病理结构, 更在转录组水平上实现了对疾病网络的系统性重塑。qRT-PCR 验证揭示了 JZOL 通过下调免疫微环境与蛋白酶失衡相关基因 (*Lcn2*、*Ido1*、*Tmprss11a*、*Duox1*), 抑制异常细胞周期与气道重塑基因 (*Ccne1*、*Top2a*), 上调肺再生关键因子 (*Hoxb8*) 并调节发育因子 (*Isl1*), 以及激活组织修复与炎症消退路径 (*Gpr17*、*Klk6*、*Col26a1*、*Ppy*) 等多途径机制改善 COPD。

“痰”是 COPD 气道阻塞的主要病理基础, 而 NE 是驱动这一过程的关键分子开关<sup>[9]</sup>。NE 不仅能直接破坏气道结构蛋白, 还能通过激活 EGFR 信号通路, 上调 MUC5AC 黏蛋白基因的表达, 导致杯状细胞化生和黏液高分泌<sup>[12]</sup>。本研究中, 模型组大鼠表现出显著的 NE 水平升高和 AB-PAS 染色阳性 (黏液增多), 这与肺功能 (FEV<sub>0.3</sub>/FVC) 的下降呈正相关。JZOL 治疗显著降低了血清 NE 水平, 并同步减少了气道杯状细胞的黏液合成。

在具体效应分子层面, JZOL 下调了 *Tmprss11a* 和 *Duox1* 表达。*Tmprss11a* 是一种气道跨膜丝氨酸蛋白酶, 其高表达与 COPD 气道炎症及黏液高分泌

密切相关。*Duox1* 作为气道上皮主要的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 来源, 在香烟烟雾刺激下表达上调, 驱动 MUC5AC 黏蛋白的生成及上皮屏障损伤。JZOL 对这 2 个基因的抑制, 从分子层面解释了其“清热化痰”、改善气道黏液阻塞的药效基础。推测这一作用可能与 JZOL 中的主要功效成分——栀子苷和黄芩苷有关。文献证实, 黄芩苷能直接抑制 NE 的活性及释放<sup>[22]</sup>, 而栀子苷则能通过抑制氧化应激减少 NE 诱导的 MUC5AC 表达<sup>[23]</sup>。此外, JZOL 中的平贝母含有的贝母素也被报道具有显著的抗炎和抑制黏液分泌作用<sup>[24]</sup>。JZOL 通过“抑制 NE 活性-减少痰液生成”这一轴线, 实现了“化痰开窍”的治疗效应, 从而缓解了气道阻塞。

痰热证的“热”在分子水平上对应于全身性的炎症反应综合征, 并且高度关联于失控的蛋白酶级联反应。本研究检测到模型组 TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 CRP 水平呈爆发式升高, 是导致全身症状 (如发热、消瘦) 的根源。此外, 本研究发现, 模型组肺组织中 *Tmprss11a* 和 *Lcn2* 高表达, 而 JZOL 对此进行了显著抑制。如上所述, *Tmprss11a* 不仅与炎症相关, 且能激活流感病毒及冠状病毒的表面蛋白, 加剧感染风险。在 COPD 患者中, *Tmprss11a* 的异常升高使肺部处于对病毒“极度易感”的状态<sup>[25-26]</sup>, 这是 AECOPD 频发的重要分子基础。JZOL 下调 *Tmprss11a*, 相当于为气道预先产生抗病毒效应。此外, *Lcn2* 作为中性粒细胞活化的标志物, 能稳定基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9) 并诱导中性粒细胞迁移。结合药效学结果中血清 NE 活性的显著降低, JZOL 通过多靶点平息了蛋白酶风暴, 直接保护了肺泡弹性纤维和基底膜, 这在 HE 染色中肺气肿病变的减轻上得到了直观体现。

COPD 不仅仅是炎症性疾病, 更是一种免疫失调性疾病<sup>[27]</sup>。本研究显示, 模型组中 *Ido1* 表达显著上调, 而 JZOL 将其逆转至正常水平。*Ido1* 是色氨酸代谢的限速酶, 其过度活化导致局部微环境色氨酸耗竭和犬尿酸堆积<sup>[28]</sup>。虽然 *Ido1* 在急性期具有免疫调节作用, 但在 COPD 慢性病程中, 持续的高 *Ido1* 活性会导致 T 细胞增殖停滞、凋亡增加, 并诱导免疫耐受或向致病性 Th17 偏转, 形成“免疫耗竭”状态<sup>[29]</sup>。流式细胞术结果证实了模型组 Th17/Treg 比例的严重失衡 (Th17 优势)。JZOL 对 *Ido1* 的抑制, 解除了色氨酸剥夺对 T 细胞的代谢限制, 有助于恢复效应 T 细胞的活力并纠正 Th17/Treg

平衡。这种代谢-免疫重编程效应,使得机体能够重新建立正常的免疫监视和耐受机制,防止自身免疫样损伤对肺组织的持续侵蚀。此外,转录组测序结果显示,JZOL 显著逆转了原发性免疫缺陷和抗原处理与呈递通路,并显著抑制 B 细胞活化的正调控和 B 细胞受体信号通路等 GO 功能。既往研究表明,这些通路和 GO 功能的富集往往反映了 COPD 中 B 细胞受体信号的异常激活及抗原提呈细胞对 T 细胞的过度刺激。综上,通过重塑 Th17/Treg 平衡,JZOL 不仅在急性期抗炎,更在长期病程中恢复了肺组织的免疫稳态,有助于减少急性加重的频率。

COPD 治疗的终极挑战在于肺组织的不可逆损伤。本研究发现,JZOL 能够上调一组与组织再生及气道重塑密切相关的基因 (*Hoxb8*、*Gpr17*、*Klk6*、*Col26a1*)。*Hoxb8* 标记了一群具有自我更新能力的髓系祖细胞,这些细胞可分化为修复型巨噬细胞或中性粒细胞,参与清除坏死碎片和促进组织重建<sup>[30]</sup>。其表达回升提示 JZOL 可能动员了骨髓或肺内驻留的再生性祖细胞库。*Gpr17* 作为尿嘧啶核苷酸和半胱氨酰白三烯的受体,被认为是组织损伤的“传感器”和炎症消退的“开关”<sup>[31]</sup>。在肺组织中,*Gpr17* 敲除小鼠表现出更严重的炎症和纤维化,JZOL 上调 *Gpr17*,可能通过负反馈机制抑制了 CysLT1 受体介导的炎症反应<sup>[32]</sup>,标志着肺组织从“促炎阶段”向“消退修复阶段”的转换。*Klk6* 参与细胞外基质的生理性周转和少突胶质细胞/上皮细胞的修复<sup>[33]</sup>。*Col26a1* 是一种含 Emilin 结构域的非纤维胶原,参与基质组装<sup>[34]</sup>。COPD 的核心病理是肺泡壁破坏(肺气肿)。模型组 *Col26a1* 表达受到抑制,JZOL 使其回升。这提示 JZOL 可能激活了基质重塑程序,对抗蛋白酶介导的降解。这与血清 NE 活性的降低相呼应:一方面减少破坏(NE 下调),一方面促进重建(*Col26a1* 上调)。综上,这些基因的协同激活证明,JZOL 不仅能抗炎,更能再生,通过重塑细胞外基质和激活内源性祖细胞,促进受损肺泡结构的物理性修复。

综上,本研究采用基本符合临床病理特征的复合大鼠模型,系统证实了 JZOL 在治疗 COPD 合并痰热证方面的显著疗效。JZOL 不仅能有效改善肺功能、减轻全身及气道炎症,还能缓解发热和便秘等全身症状。JZOL 的作用机制不仅仅局限于单一的抗炎范畴,而是通过“炎症抑制-免疫平衡-气道重塑”的多靶点、多途径模式发挥疾病修饰作用。这

些发现科学地阐释了 JZOL “清热解毒、祛痰止咳”传统功效的现代生物学内涵,明确了其在 AECOPD 治疗中的独特优势,即在抗炎的同时兼顾化痰与免疫调节,为该药的临床应用及二次开发提供了坚实的实验依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] GBD 2015 Chronic Respiratory Disease Collaborators. Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990—2015: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 [J]. *Lancet Respir Med*, 2017, 5(9): 691-706.
- [2] Yin P, Wu J Y, Wang L J, et al. The burden of COPD in China and its provinces: Findings from the global burden of disease study 2019 [J]. *Front Public Health*, 2022, 10: 859499.
- [3] Li J Y, Ye Z G. The potential role and regulatory mechanisms of MUC5AC in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Molecules*, 2020, 25(19): 4437.
- [4] Zhang H L, Si Y M, Du Y, et al. Exploration of biomarkers for efficacy evaluation of traditional Chinese medicine syndromes of acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease based on metabolomics [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1302950.
- [5] Chen Y K, Zhang W B. Zhuye Shigao Decoction combined with Qingqi Huatan Pills in alleviating the acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (phlegm-heat stagnating in the lungs) via the IL-6-mediated JAK1/STAT3 signaling pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 7942623.
- [6] 张真, 伊明洋, 李伟珂, 等. 从基础证探讨中药复方治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重的用药规律及分子调控机制 [J]. *中草药*, 2025, 56(17): 6278-6300.
- [7] Tian P W, Wen F Q. Clinical significance of airway mucus hypersecretion in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Transl Int Med*, 2015, 3(3): 89-92.
- [8] Voinow J A, Shinbashi M. Neutrophil elastase and chronic lung disease [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(8): 1065.
- [9] Šileikienė V, Jurgauskienė L. Role of regulatory T cells in pulmonary ageing and COPD development [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(8): 3721.
- [10] Agustí A, Celli B R, Criner G J, et al. Global initiative for chronic obstructive lung disease 2023 report: GOLD executive summary [J]. *Arch De Bronconeumología*, 2023, 59(4): 232-248.

- [11] Shah B K, Singh B, Wang Y K, *et al.* Mucus hypersecretion in chronic obstructive pulmonary disease and its treatment [J]. *Mediat Inflamm*, 2023, 2023(1): 8840594.
- [12] Cagle S D, Landrum L S, Kennedy A M. Chronic obstructive pulmonary disease: Diagnosis and management [J]. *Am Fam Physician*, 2023, 107(6): 604-612.
- [13] Pitre T, Lupas D, Mah J, *et al.* Biologic therapies for chronic obstructive pulmonary disease: A systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis*, 2025, 22(1): 2449889.
- [14] Fan Q H, Wu C M, Du Y W, *et al.* Comparison of Jinzhen Oral Liquid and ambroxol hydrochloride and clenbuterol hydrochloride oral solution in the treatment of acute bronchitis in children: A multicenter, non-inferiority, prospective, randomized controlled trial [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2024, 14(12): 5186-5200.
- [15] Feng J, Gao X, Chen X L, *et al.* Mechanism of Jinzhen Oral Liquid against influenza-induced lung injury based on metabonomics and gut microbiome [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 303: 115977.
- [16] Cui X, Liang L, Geng H J, *et al.* Efficacy, safety and mechanism of Jinzhen Oral Liquid in the treatment of acute bronchitis in children: A randomized, double-blind, multicenter clinical trial protocol [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 948236.
- [17] Guo J Y, Wang D M, Wang M J, *et al.* Systematically characterize the substance basis of Jinzhen Oral Liquid and their pharmacological mechanism using UPLC-Q-TOF/MS combined with network pharmacology analysis [J]. *J Food Drug Anal*, 2019, 27(3): 793-804.
- [18] Liu L X, Li H B, Zhang J Y, *et al.* Quality markers screening of traditional Chinese medicine prescriptions based on the multi-factor analysis strategy: Jin-Zhen Oral Liquid as a case [J]. *Arab J Chem*, 2024, 17(1): 105433.
- [19] Upadhyay P, Wu C W, Pham A, *et al.* Animal models and mechanisms of tobacco smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [J]. *J Toxicol Environ Health Part B*, 2023, 26(5): 275-305.
- [20] 邢小香, 付子坚, 赵鹏, 等. 基于代谢组学研究通塞颗粒治疗 AECOPD 痰热证大鼠机制 [J]. *时珍国医国药*, 2024, 35(7): 1587-1594.
- [21] 李嘉萌, 杨容芳, 余丰君, 等. 不同工艺的芪蛭益肺颗粒对 COPD 模型大鼠的药效学对比研究 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2019, 21(11): 2428-2435.
- [22] Jakimiuk K, Gesek J, Atanasov A G, *et al.* Flavonoids as inhibitors of human neutrophil elastase [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2021, 36(1): 1016-1028.
- [23] Liu L P, Wu Q, Chen Y P, *et al.* Updated pharmacological effects, molecular mechanisms, and therapeutic potential of natural product geniposide [J]. *Molecules*, 2022, 27(10): 3319.
- [24] 沈莹, 孙海峰. 平贝母化学成分及药理作用研究进展 [J]. *化学工程师*, 2018, 32(6): 62-66.
- [25] Zhang C, Zhang Y K, Zhang S N, *et al.* Intracellular autoactivation of TMPRSS11A, an airway epithelial transmembrane serine protease [J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(36): 12686-12696.
- [26] van den Berge M, Steiling K, Timens W, *et al.* Airway gene expression in COPD is dynamic with inhaled corticosteroid treatment and reflects biological pathways associated with disease activity [J]. *Thorax*, 2014, 69(1): 14-23.
- [27] Lourenço J D, Ito J T, de Arruda Martins M, *et al.* Th17/Treg imbalance in chronic obstructive pulmonary disease: Clinical and experimental evidence [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 804919.
- [28] Zeng S Y, Zhang Y Q, Li S R, *et al.* From metabolic alterations to chronic inflammation: Mechanisms and immunoregulation of metabolic reprogramming in COPD [J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1698832.
- [29] Liu L L, Zhou M, Sun S W, *et al.* Developmental immune network of airway lymphocytes and innate immune cells in patients with stable COPD [J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1614655.
- [30] Van Deren D A, De S, Xu B, *et al.* Defining the *Hoxb8* cell lineage during murine definitive hematopoiesis [J]. *Development*, 2022, 149(8): dev200200.
- [31] Fumagalli M, Daniele S, Lecca D, *et al.* Phenotypic changes, signaling pathway, and functional correlates of GPR17-expressing neural precursor cells during oligodendrocyte differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(12): 10593-10604.
- [32] Maekawa A, Xing W, Austen K F, *et al.* GPR17 regulates immune pulmonary inflammation induced by house dust mites [J]. *J Immunol*, 2010, 185(3): 1846-1854.
- [33] Hackett T L, Osei E T. Modeling extracellular matrix-cell interactions in lung repair and chronic disease [J]. *Cells*, 2021, 10(8): 2145.
- [34] Pinezich M R, Tamargo M A, Fleischer S, *et al.* Pathological remodeling of distal lung matrix in end-stage cystic fibrosis patients [J]. *J Cyst Fibros*, 2022, 21(6): 1027-1035.