

荆防颗粒通过抑制内质网应激改善急性肺损伤小鼠肠道屏障功能

王红伟¹, 杜汉文², 周恩宝², 刘天艺², 杨恩华², 孙成宏^{3*}, 赵明沂^{1*}

1. 沈阳药科大学临床药学院, 辽宁 沈阳 110016

2. 鲁南制药集团股份有限公司 经方与现代中药融合创新全国重点实验室, 山东 临沂 276005

3. 枣庄学院食品科学与制药工程学院, 山东 枣庄 277160

摘要:目的 通过蛋白组学联合分子生物学技术解析荆防颗粒对博来霉素诱导的急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 小鼠肠道屏障的改善作用及机制。方法 利用博来霉素气管滴注建立小鼠 ALI 模型, 并给予荆防颗粒进行干预。检测小鼠肺指数和肺组织病理学变化; ELISA 检测血清中二胺氧化酶 (diamine oxidase, DAO)、脂多糖特异性免疫球蛋白 A 抗体 (lipopolysaccharide specific immunoglobulin A antibody, LPS-SIgA) 和 D-乳酸水平; 试剂盒检测血清中丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 水平及过氧化氢酶 (catalase, CAT)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性; Label-free 蛋白组学技术检测结肠组织蛋白表达谱, 寻找荆防颗粒调控的差异表达蛋白和关键信号通路; Western blotting 检测结肠组织闭合蛋白 (Occludin)、闭锁小带蛋白 1 (zonula occludens 1, ZO-1)、激活转录因子 4 (activating transcription factor 4, ATF4)、C/EBP 同源蛋白 (C/EBP-homologous protein, CHOP)、磷酸化真核翻译起始因子 2 α (phosphorylated eukaryotic initiation factor 2 α , p-EIF2 α)、磷酸化蛋白质激酶 RNA 样内质网激酶 (phosphorylated protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, p-PERK) 的表达; Western blotting 检测肺组织核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)、血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 和 NAD(P)H 醌氧化还原酶 1 (NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1, NQO-1) 蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 荆防颗粒显著降低 ALI 小鼠肺指数 ($P<0.05$ 、 0.01), 改善肺组织病理损伤, 降低血清中 DAO、LPS-SIgA 和 D-乳酸水平 ($P<0.05$ 、 0.01), 上调结肠组织 Occludin 和 ZO-1 的表达 ($P<0.05$)。蛋白组学和 Western blotting 分析发现, 荆防颗粒调控了内质网蛋白加工紊乱, 进而下调 p-PERK、p-EIF2 α 、ATF4 及 CHOP 的表达 ($P<0.05$), 抑制结肠组织内质网应激。同时, 荆防颗粒降低了 ALI 小鼠血清中 ROS 和 MDA 水平 ($P<0.01$), 升高了 GSH 水平及 CAT、SOD 活性 ($P<0.05$), 并上调肺组织 Nrf2、HO-1 及 NQO-1 的表达 ($P<0.01$)。**结论** 荆防颗粒通过抑制内质网应激维持肠道屏障功能, 抑制肺组织氧化应激, 改善 ALI 小鼠肺损伤。

关键词: 荆防颗粒; 急性肺损伤; 肠道屏障; 内质网应激; 氧化应激

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2025)20-7450-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.20.016

Jingfang Granules improve intestinal barrier function in mice with acute lung injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress

WANG Hongwei¹, DU Hanwen², ZHOU Enbao², LIU Tianyi², YANG Enhua², SUN Chenghong³, ZHAO Mingyi¹

1. School of Clinical Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. State Key Laboratory of Integration and Innovation of Classic Formula and Modern Chinese Medicine, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276005, China

3. College of Food Science and Pharmaceutical Engineering, Zaozhuang University, Zaozhuang 277160, China

Abstract: Objective To evaluate the improvement effect and mechanism of Jingfang Granules (荆防颗粒) on intestinal barrier in mice with acute lung injury (ALI) induced by bleomycin through proteomics combined with molecular biology techniques. **Methods** The mice model of ALI was established using bleomycin tracheal instillation and then intervened with Jingfang Granules. Lung index

收稿日期: 2025-05-14

基金项目: 山东省重点研发计划 (2024CXPT074)

作者简介: 王红伟, 硕士研究生, 从事中药作用机制研究。E-mail: 48674682@qq.com

*通信作者: 赵明沂, 教授, 硕士生导师, 从事循证药理学、药理学及分子生物学研究。E-mail: zmy_dl@126.com

孙成宏, 副教授, 硕士生导师, 从事中药药理研究和中药新药研发。E-mail: sch658@163.com

and pathological changes in lung tissue of mice were detected. ELISA was used to detect the levels of diamine oxidase (DAO), lipopolysaccharide specific immunoglobulin A antibody (LPS-SIgA) and *D*-lactic acid in serum. The corresponding assay kits were used to measure the levels of malondialdehyde (MDA), reactive oxygen species (ROS), glutathione (GSH) and activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) in serum. The label-free proteomics technology was used to detect the protein expression profile of colon tissue, the differential expressed proteins and key signaling pathways regulated by Jingfang Granules were screened. Western blotting was used to detect the expressions of Occludin, zonula occludens 1 (ZO-1), activating transcription factor 4 (ATF4), C/EBP-homologous protein (CHOP), phosphorylated eukaryotic initiation factor 2 α (p-EIF2 α) and phosphorylated protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (p-PERK) in colon tissue. Western blotting was used to detect the expressions of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1) and NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO-1) proteins in lung tissue. **Results** Compared with model group, Jingfang Granules significantly reduced the lung index of ALI mice ($P < 0.05, 0.01$), improved the pathological damage of lung tissue, decreased the levels of DAO, LPS-SIgA and *D*-lactic acid in serum ($P < 0.05, 0.01$), up-regulated the expressions of Occludin and ZO-1 in colon tissue ($P < 0.05$). Proteomics and Western blotting analysis revealed that Jingfang Granules regulated the disorder of protein processing in endoplasmic reticulum, thereby down-regulating the expressions of p-PERK, p-EIF2 α , ATF4 and CHOP to inhibit endoplasmic reticulum stress in colon tissue of ALI mice ($P < 0.05$). Meanwhile, Jingfang Granules reduced the levels of ROS and MDA in serum of ALI mice ($P < 0.01$), increased GSH level and activities of CAT, SOD ($P < 0.05$), and up-regulated the expressions of Nrf2, HO-1 and NQO-1 in lung tissues ($P < 0.01$). **Conclusion** Jingfang Granules alleviate lung injury in ALI mice by inhibiting endoplasmic reticulum stress to preserve intestinal barrier function and suppressing pulmonary oxidative stress.

Key words: Jingfang Granules; acute lung injury; intestinal barrier; endoplasmic reticulum stress; oxidative stress

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是由感染、创伤等多种原因导致的肺泡上皮细胞及毛细血管内皮细胞弥漫性损伤、肺水肿等为主要病理特点的炎症综合征, 其发展至严重阶段可导致急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) [1]。临床中多种危重病证的发病初期均表现为 ALI, 如脓毒血症和新型冠状病毒肺炎等 [2]。由于 ALI/ARDS 发生急促而猛烈, 且临床用药缺乏, 致使其病死率高达 30%~50% [1-2]。ALI 的发病机制复杂, 与过度炎症反应、氧化应激、细胞凋亡和自噬等密切相关, 氧化应激在 ALI 的病程演变中起着至关重要的作用 [3], 是导致肺泡上皮细胞功能障碍从而加剧 ALI 的关键机制 [4]。大量研究表明, 在 ALI 发生过程中, 肠道屏障功能被破坏, 肠道中的有害菌及其代谢产物透过肠道屏障, 通过“肠-肺”轴加重 ALI 肺损伤 [5]。因此, 改善肠道屏障功能可能是基于“肠-肺”改善 ALI 的有效方法。内质网应激在细胞应对外界压力及维持稳态中发挥关键作用, 其异常激活会导致一系列复杂的病理变化, 直接破坏肠道屏障的功能。内质网应激通过未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR) 途径影响肠道上皮细胞的生存与功能。在内质网应激状态下, 转录因子 C/EBP 同源蛋白 (C/EBP-homologous protein, CHOP) 和 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 等促凋亡因子的上调会导致肠道上皮

细胞的大量凋亡 [6]。这些凋亡不仅削弱了上皮细胞的更新能力, 还通过破坏紧密连接蛋白 [闭锁小带蛋白 1 (zonula occludens 1, ZO-1)、Claudins、闭合蛋白 (Occludin)] 的表达, 直接损害肠道屏障的结构, 导致“肠漏”的形成 [7], 这使得抑制内质网应激成为改善肠道屏障功能的一个重要靶点。

荆防颗粒是明代张时彻所著《摄生众妙方》中荆防败毒散的现代原方成方制剂, 全方由荆芥、防风、羌活、独活、川芎、柴胡、桔梗、枳壳、前胡、茯苓、甘草 11 味药材组成, 具有发汗解表、散风祛湿、活血化痰、止咳平喘的功效 [8]。前期研究发现, 荆防颗粒可通过抑制磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 轴调控糖酵解紊乱导致的免疫代谢重编程 [9], 抑制 CD200-CD200R 通路和肺泡炎症, 改善博来霉素导致的 ALI [10]。肖贺等 [11] 研究发现, 荆防颗粒可通过抑制小鼠肠道菌群失调, 平衡不饱和脂肪酸生物合成、丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸代谢, 氨基酰基 tRNA 生物合成, 三羧酸循环, 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成, 亚油酸代谢等通路治疗博来霉素诱导的 ALI。但荆防颗粒对 ALI 小鼠肠道屏障功能的影响尚未见报道。本研究利用博来霉素建立小鼠 ALI 模型, 考察荆防颗粒对肠道屏障功能的影响, 并进一步利用蛋白组学考察荆防颗粒改善 ALI 小鼠肠道屏障功能的机制。

1 材料

1.1 动物

50 只 SPF 级 C57BL/6J 小鼠, 6~7 周龄, 体重 18~20 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)2021-0008。小鼠于鲁南制药集团股份有限公司新药药理中心适应性饲养 7 d, 饲养条件为 12 h 光照/12 h 黑暗, 单笼饲养, 室温(25±2)℃, 自由饮水和进食。本实验中所有操作均符合相关动物实验伦理原则, 并获得鲁南制药集团股份有限公司新药药理中心实验动物伦理委员会批准(批准号 NH-IACUC-2024-010)。

1.2 药品与试剂

荆防颗粒由荆防颗粒浸膏和荆防颗粒挥发油按 500:1 组成, 荆防颗粒浸膏(批号 8022009004)和荆防颗粒挥发油(批号 8032009004)由山东新时代药业有限公司提供; 博来霉素(批号 21042411)购自杭州瀚晖制药有限公司; 舒泰 50(批号 7UX8A)购自法国维克有限公司; 盐酸塞拉嗪(批号 20200717)购自吉林省华牧动物保健品有限公司; Occludin 抗体、ZO-1 抗体、激活转录因子 4(activating transcription factor 4, ATF4)抗体、CHOP 抗体(批号分别为 ab216327、ab276131、ab270980、ab11419)购自英国 Abcam 公司; 磷酸化真核翻译起始因子 2 α (phosphorylated eukaryotic initiation factor 2 α , p-EIF2 α)抗体、磷酸化蛋白质激酶 RNA 样内质网激酶(phosphorylated protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, p-PERK)抗体、核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)抗体、血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)抗体、NAD(P)H 醌氧化还原酶 1(NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1, NQO-1)抗体(批号分别为 3398、3179、12721、43966、3187)购自美国 CST 公司; β -actin 抗体(批号 AF2811-1)购自上海碧云天生物技术有限公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 二抗(批号分别为 S0001、S0002)购自美国 Affinity Biosciences 公司; 小鼠二胺氧化酶(mouse diamine oxidase, DAO)ELISA 检测试剂盒、小鼠脂多糖特异性免疫球蛋白 A 抗体(lipopolysaccharide specific immunoglobulin A antibody, LPS-SIgA)ELISA 试剂盒(批号分别为 C07027531、CSB-E13066m)购自武汉华美生物有限公司; 小鼠 D-乳酸 ELISA 试剂盒(批号 MM-43853M2)购自武汉酶免生物科技有

限公司; 丙二醛(malondialdehyde, MDA)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、过氧化氢酶(catalase, CAT)以及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(批号分别为 20240911、20231212、20241015、20140918、A007-1-1、20240912)购自南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器

nano-UPLC EASYnLC1200 型高效液相色谱仪、Q-Exactive HFX 型质谱仪、酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); JY96-IIN 型细胞超声破碎机、JXH-100 型恒温混匀仪(上海净信科技有限公司); VORTEX-5 型涡旋仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); DYY-7C 型、DYCZ-40D 型电泳转膜设备(北京六一生物科技有限公司); Chemi Scope6200 型化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司); Tissue-Tec VIPTM 5 Jr 型全封闭组织脱水机、Tissue-Tec TECTM 5 型组织包埋机(日本樱花检验仪器株式会社); RM2235 型轮转式病理切片机、HI1210 型组织摊片机、ST5020 型自动染色机(德国徕卡仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

适应性饲养 7 d 后, 50 只雄性 C57BL/6J 小鼠按体重随机分为对照组、模型组和荆防颗粒低、中、高剂量(1、2、4 g/kg)组, 每组 10 只。小鼠禁食不禁水饲养 12 h 后, im 1.5 mg/mL 舒泰 50 和 1.5 mg/mL 盐酸塞拉嗪混合液(5 mL/kg)麻醉, 分离气管, 除对照组外, 其余小鼠从气管滴注 3 mg/kg 博来霉素以建立 ALI 模型^[5], 对照组滴注等体积的生理盐水。造模 24 h 后, 各给药组 ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续给药 6 d。

2.2 肺指数测定

末次给药 24 h 后, 小鼠 im 1.5 mg/mL 舒泰 50 和 1.5 mg/mL 盐酸塞拉嗪混合液(5 mL/kg)麻醉, 腹主动脉取血, 放入含有分离胶的促凝管, 室温静置 30 min 后, 4 000 r/min 离心 10 min, 收集血清。分离肺组织, 称定质量, 计算肺指数。

肺指数=肺质量/体质量

2.3 苏木素-伊红(HE)染色观察肺组织病理变化

取肺组织, 于 4%多聚甲醛溶液中固定, 脱水并经石蜡包埋后切片, 进行 HE 染色, 在光学显微镜下观察肺组织病理学变化。

2.4 ELISA 检测血清中 D-乳酸、LPS-SIgA 以及 DAO 水平

按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清中 D-乳酸、LPS-SIgA 以及 DAO 水平。

2.5 血清中氧化应激因子水平的检测

根据试剂盒说明书检测血清中 ROS、MDA、GSH 水平及 CAT、SOD 活性。

2.6 结肠组织蛋白质样品预处理

取适量新鲜结肠组织，剪成碎块，用 PBS 洗涤，加入适量 RIPA 裂解液，置于冰上研磨 4 min，重复研磨 3 次。研磨后的结肠组织在 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min 后，转移至新 EP 管。将样品在冰上超声 10 min，4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min，取上清，采用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白经丙酮沉淀、重溶、还原、烷基化、酶解、去除 SDC 和多肽脱盐处理后，用于后续检测。

2.7 nano-LC-MS/MS 分离与检测

每个样品取 2 μg 总蛋白，经 nano-UPLC 液相系统 EASY-nLC1200 进行分离后，联用配备纳升离子源的质谱仪 (QExactive HFX) 进行数据采集。

2.7.1 色谱条件 采用 Reprosil-Pur 120 C₁₈-AQ 反相色谱柱 (15 cm×100 μm, 1.9 μm)，流动相采用乙腈-水-甲酸体系，流动相 A 为 0.1%甲酸-98%水溶液 (乙腈为 2%)，流动相 B 为 0.1%甲酸-80%乙腈溶液 (H₂O₂ 为 20%)。色谱柱以 100%的 A 相平衡后，样品由自动进样器直接上样到色谱柱，再经色谱柱梯度分离，体积流量 300 nL/min。梯度洗脱：0~2 min, 2%~5% B；2~90 min, 5%~22% B；90~116 min, 22%~45% B；116~118 min, 45%~95% B；118~120 min, 95% B。

2.7.2 质谱条件：在正离子检测模式下，采用数据依赖性采集 (data-dependent acquisition, DDA) 方法。一级扫描 (full scan) 范围为 m/z 350~1 600，分辨率为 120 000，自动增益控制 (auto gain control, AGC) 为 3×10^6 ，最大离子注入时间 (max IT) 为 50 ms；一级扫描中强度最高的 20 个离子经四极杆筛选、高能碰撞解离 (high energy collision dissociation, HCD) 后进行碎片离子扫描。四极杆隔离窗口为 1.2，标准化碰撞能为 27%，AGC 为 1×10^5 ，max IT 为 110 ms。二级扫描分辨率为 15 000；根据色谱峰峰宽，动态排除时间设置为 45 s。

2.8 差异表达蛋白的生物信息学分析

以 unique peptide ≥ 1 ，差异倍数 (fold change,

FC) ≥ 1.2 或 ≤ 0.83 ，且 $P < 0.05$ 为筛选条件筛选差异表达蛋白，并将差异表达蛋白导入 KOBAS (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/kobas3>) 工具进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能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。

2.9 Western blotting 检测结肠组织和肺组织相关蛋白表达

称取部分结肠组织或肺组织，用剪刀剪碎后加入适量的 RIPA 裂解液裂解 30 min，4 ℃、10 000 r/min 离心 5 min，收集上清。采用 BCA 法测定蛋白浓度，加入 SDS 蛋白上样缓冲液，于沸水中煮 10 min 使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，加入 5%脱脂牛奶，室温封闭 2 h，加入一抗，4 ℃孵育过夜；TBST 洗涤后，加入二抗，室温孵育 2 h，使用 ECL 发光液显色，ChemiScope Capture 图像采集系统采集图像，Image J 软件分析条带灰度值。

2.10 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8.0.8 软件对数据进行统计分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间数据比较采用单因素方差分析。

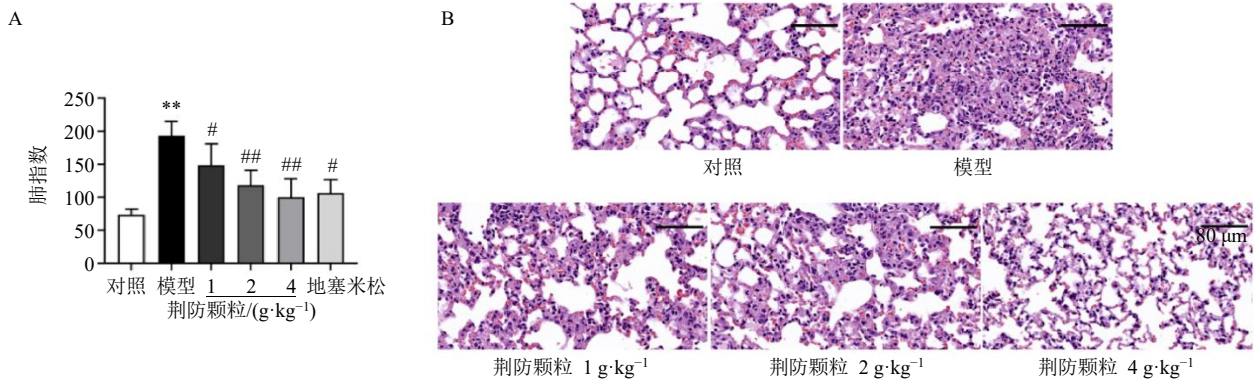
3 结果

3.1 荆防颗粒缓解博来霉素诱导的 ALI

利用博来霉素建立 ALI 小鼠模型，发现与对照组比较，模型组小鼠肺指数显著增加 (图 1-A, $P < 0.01$)，肺泡结构受到严重破坏，肺室间隔增厚，有明显炎性细胞浸润，伴有弥漫性出血 (图 1-B)，表明博来霉素导致小鼠肺组织水肿，且伴随明显的病理损伤。与模型组比较，荆防颗粒各剂量组小鼠肺指数显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)，肺泡结构改善，肺室间隔变薄，炎性浸润减轻，弥漫性出血减少，且呈剂量相关性，表明荆防颗粒显著抑制博来霉素诱导的 ALI，与以往研究结果一致^[9]。结合前期研究发现，荆防颗粒高剂量组药效稳定，因此，选择荆防颗粒高剂量组开展作用机制研究。

3.2 荆防颗粒改善 ALI 小鼠肠道屏障

肠道屏障是肠道组织的物理屏障和协调中心，在维持肠道稳定和全身免疫防御中起着关键作用^[12]。ALI 会破坏肠道屏障的完整性，导致肠道紧密连接破坏，进而引起微生物移位和肠道菌代谢产物 (如 D-乳酸、LPS 和 DAO 等) 穿过肠道屏障进入血液循环^[13]。结果显示，与对照组比较，模型组小鼠血



A-各组小鼠肺指数 ($n=10$); B-各组小鼠肺组织 HE 染色 ($\times 200$); 与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$, 下同。

A-lung index of mice in each group ($n=10$); B-HE staining of lung tissue of mice in each group ($\times 200$); * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs model group, same as below figures.

图 1 荆防颗粒缓解博来霉素诱导的 ALI ($\bar{x} \pm s$)

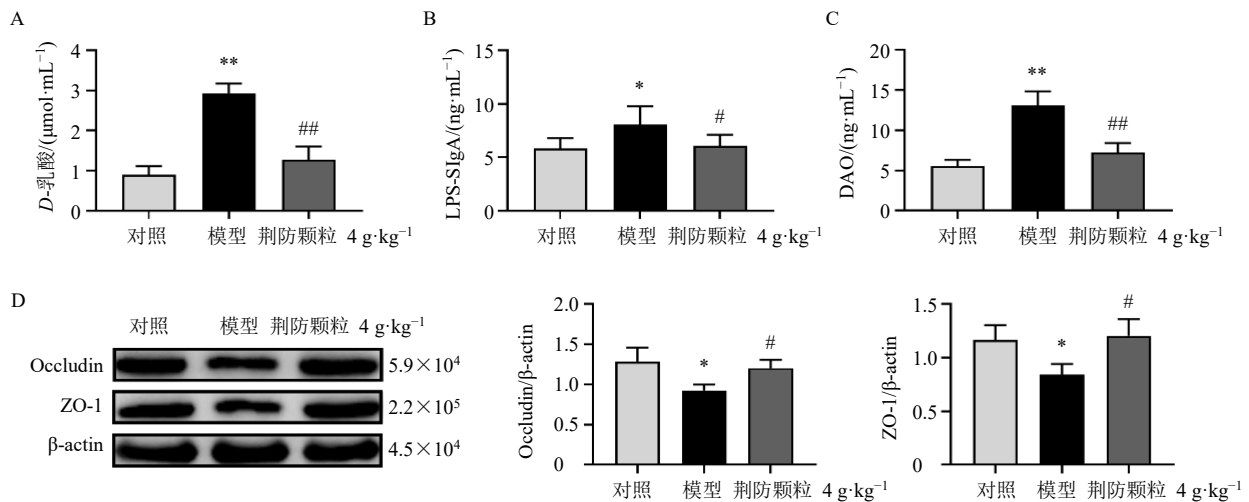
Fig. 1 Jingfang Granules alleviate bleomycin-induced ALI ($\bar{x} \pm s$)

清中 *D*-乳酸、LPS-SIgA 和 DAO 水平显著升高 (图 2-A~C, $P<0.05$ 、 0.01), 结肠组织中紧密连接蛋白 Occludin 和 ZO-1 的表达显著降低 (图 2-D, $P<0.05$), 表明博来霉素通过降低紧密连接蛋白的表达破坏肠道屏障功能, 导致结肠组织对 *D*-乳酸、LPS 和 DAO 的通透性增加。与模型组比较, 荆防颗粒高剂量组小鼠血清中 *D*-乳酸、LPS-SIgA 和 DAO 水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), 结肠组织中 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$), 表明荆防颗粒能够改善 ALI 小鼠的肠道屏障功能, 抑制结

肠组织对 *D*-乳酸、LPS 和 DAO 的通透性。

3.3 荆防颗粒调控 ALI 小鼠结肠组织内质网蛋白质加工

利用蛋白组学技术在小鼠结肠组织中鉴定出 4 146 个蛋白, 以 unique peptide ≥ 1 、FC ≥ 1.2 或 ≤ 0.83 且 $P<0.05$ 为筛选条件筛选差异表达蛋白, 并利用火山图进行可视化。结果发现, 与对照组比较, 模型组小鼠结肠组织中 119 个蛋白发生变化, 其中 24 个蛋白表达增加, 95 个蛋白表达减少 (图 3-A); 与模型组比较, 荆防颗粒高剂量组小鼠结肠组织中

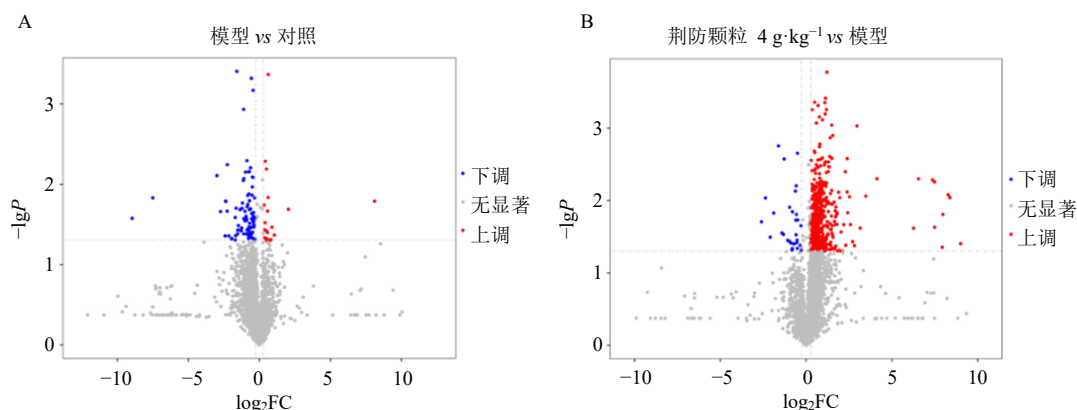


A~C-各组小鼠血清中 *D*-乳酸、LPS-SIgA 和 DAO 水平 ($n=10$); D-各组小鼠结肠组织中 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达 ($n=3$)。

A~C-levels of *D*-lactic acid, LPS-SIgA and DAO in serum of mice in each group ($n=10$); D-expressions of Occludin and ZO-1 protein in colon tissue of mice in each group ($n=3$).

图 2 荆防颗粒改善 ALI 小鼠肠道屏障功能 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 2 Jingfang Granules improve intestinal barrier function in ALI mice ($\bar{x} \pm s$)



A-模型组 vs 对照组火山图; B-荆防颗粒高剂量组 vs 模型组火山图。

A-volcano plot of model group vs control group; B-volcano plot of Jingfang Granules high-dose group vs model group.

图 3 蛋白质组学火山图

Fig. 3 Volcanic diagram of proteomics

484 个蛋白发生变化, 其中 454 个蛋白表达增加, 30 个蛋白表达减少 (图 3-B), 且其中 47 个蛋白与模型组和对照组之间的差异表达蛋白有交集 (图 4)。利用 KOBAS 工具对这 47 个差异表达蛋白进行 GO 功能富集分析, 结果见图 5, 这些蛋白主要参与了生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF) 和细胞组分 (cellular component, CC)。筛选 $P < 0.05$ 且排名前 50 的 GO 功能富集结果, 发现与 BP 有关的富集类别有 22 个, 包括内质网对高尔基体囊泡介导的转运 (endoplasmic reticulum to Golgi vesicle-mediated transport)、蛋白质折叠 (protein folding)、蛋白分泌 (protein secretion)、蛋白质结合 (protein binding)、核外运 (nuclear export) 以及蛋白质稳定化 (protein stabilization) 等; 与 CC 相关的富集类别有 16 个, 包括细胞质 (cytoplasm)、胞质溶胶 (cytosol)、内质网 (endoplasmic reticulum)、膜 (membrane)、内质网膜 (endoplasmic reticulum membrane) 以及核 (nucleus) 等; 与 MF 相关的富集类别有 12 个, 包括蛋白质同源二聚活性 (protein homodimerization activity)、mRNA 结合 (mRNA binding)、翻译调节器活动 (translation regulator activity)、组蛋白脱乙酰酶结合 (histone deacetylase binding)、蛋白质折叠伴侣 (protein folding chaperone) 以及磷脂酰胆碱结合 (phosphatidylcholine binding) 等。通过 GO 功能富集分析发现, 荆防颗粒调控的结肠组织蛋白参与了内质网膜的组成, 且与内质网蛋白加工和转运密切相关。

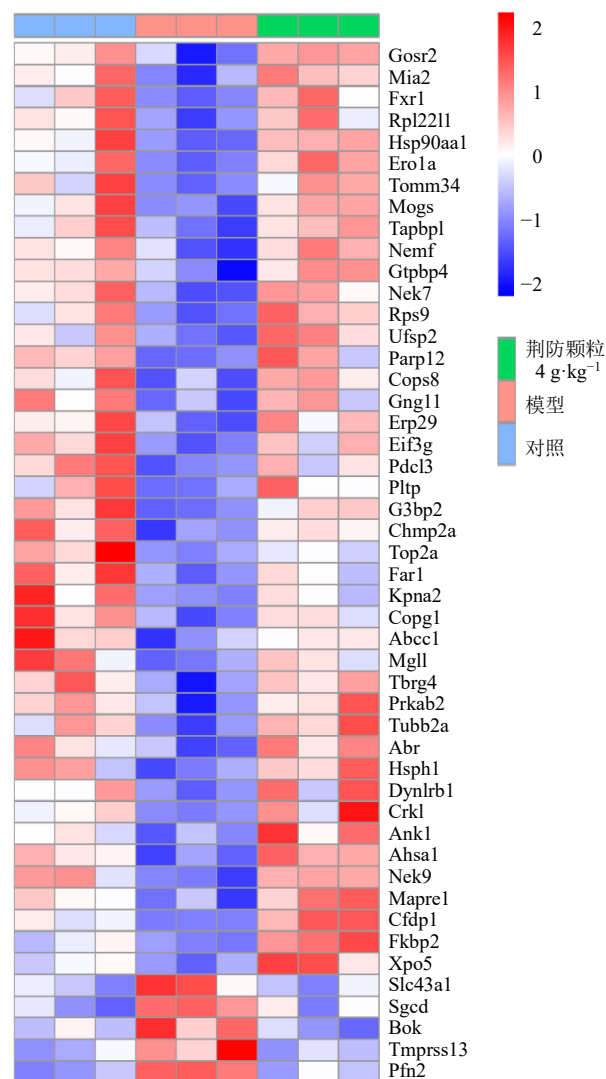


图 4 差异表达蛋白热图

Fig. 4 Heatmap of differential expressed proteins

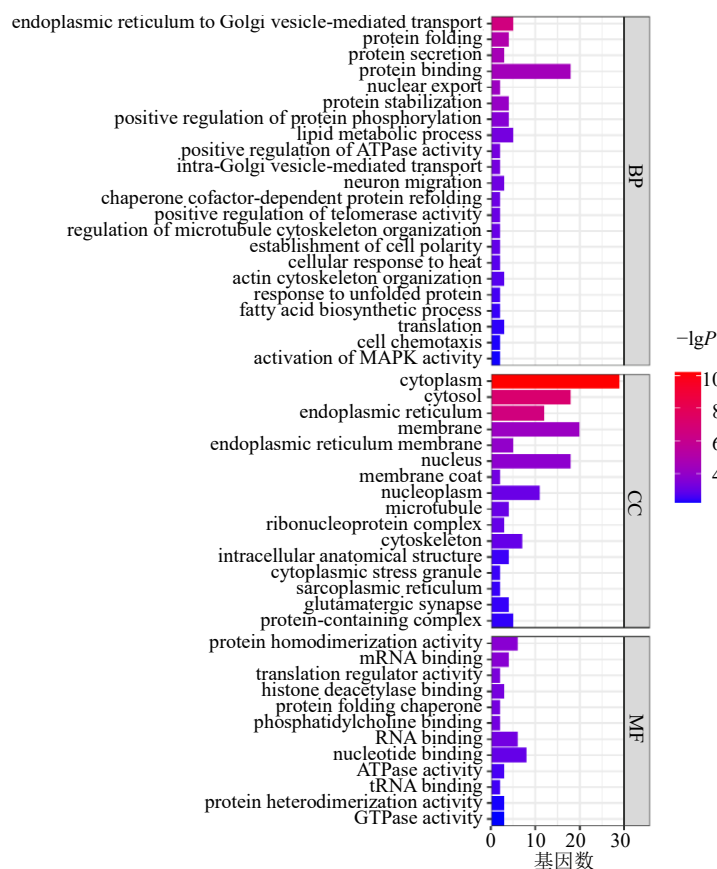


图 5 差异表达蛋白 GO 富集分析

Fig. 5 GO enrichment analysis of differentially expressed proteins

KEGG 富集分析 (图 6-A) 发现, 荆防颗粒调控的信号通路主要包括内质网蛋白加工 (protein processing in endoplasmic reticulum)、RNA 的转运 (RNA transport)、肥厚型心肌病 (hypertrophic cardiomyopathy)、Apelin 信号通路 (apelin signaling pathway)、胰岛素信号通路 (insulin signaling pathway) 以及内源性大麻素逆向信号传导 (retrograde endocannabinoid signaling) 等。其中, 调控最显著的是内质网蛋白加工, 且参与该信号通路的蛋白主要包括内质网驻留蛋白 29 (endoplasmic reticulum resident protein 29, Erp29)、热休克蛋白 1 (heat shock 105 kDa/110 kDa protein 1, Hsp1)、内质网氧化还原酶 1A (endoplasmic reticulum oxidoreductase 1 alpha, Ero1a)、甘露糖基寡糖葡萄糖苷酶 (mannosyl oligosaccharide glucosidase, Mogs) 以及热休克蛋白 90α (heat shock protein HSP90-alpha, Hsp90aa1) (图 6-B)。

3.4 荆防颗粒抑制 ALI 小鼠结肠组织内质网应激

内质网蛋白加工紊乱会导致内质网应激。进一步利用 Western blotting 分析发现, 与对照组比较,

模型组小鼠结肠组织 p-PERK、p-EIF2α、ATF4 和 CHOP 蛋白表达水平显著升高 (图 7, $P < 0.05$ 、 0.01), 表明 ALI 小鼠结肠组织伴随显著的内质网应激。与模型组比较, 荆防颗粒高剂量组小鼠结肠组织 p-PERK、p-EIF2α、ATF4 和 CHOP 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 表明荆防颗粒显著抑制 ALI 小鼠结肠组织内质网应激。

3.5 荆防颗粒抑制 ALI 小鼠氧化应激

课题组前期通过肠道菌群分析和代谢组学发现, 荆防颗粒通过调控 *Akkermansia*、*Lachnospiraceae_NK4A136_group* 等肠道菌调节不饱和脂肪酸生物合成信号通路^[11]。而作为“肺-肠”轴的重要联系媒介, 肠道屏障可能参与了肠道微生物对肺组织不饱和脂肪酸诱导的脂质过氧化过程, 因此, 进一步研究了荆防颗粒对肺组织脂质过氧化的影响。结果发现, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 ROS 和 MDA 水平显著升高 (图 8-A、B, $P < 0.01$), GSH 水平及 CAT、SOD 活性显著降低 (图 8-C~E, $P < 0.01$), 肺组织中 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 蛋白表达水平显著降低 (图 8-F, $P < 0.01$), 表明

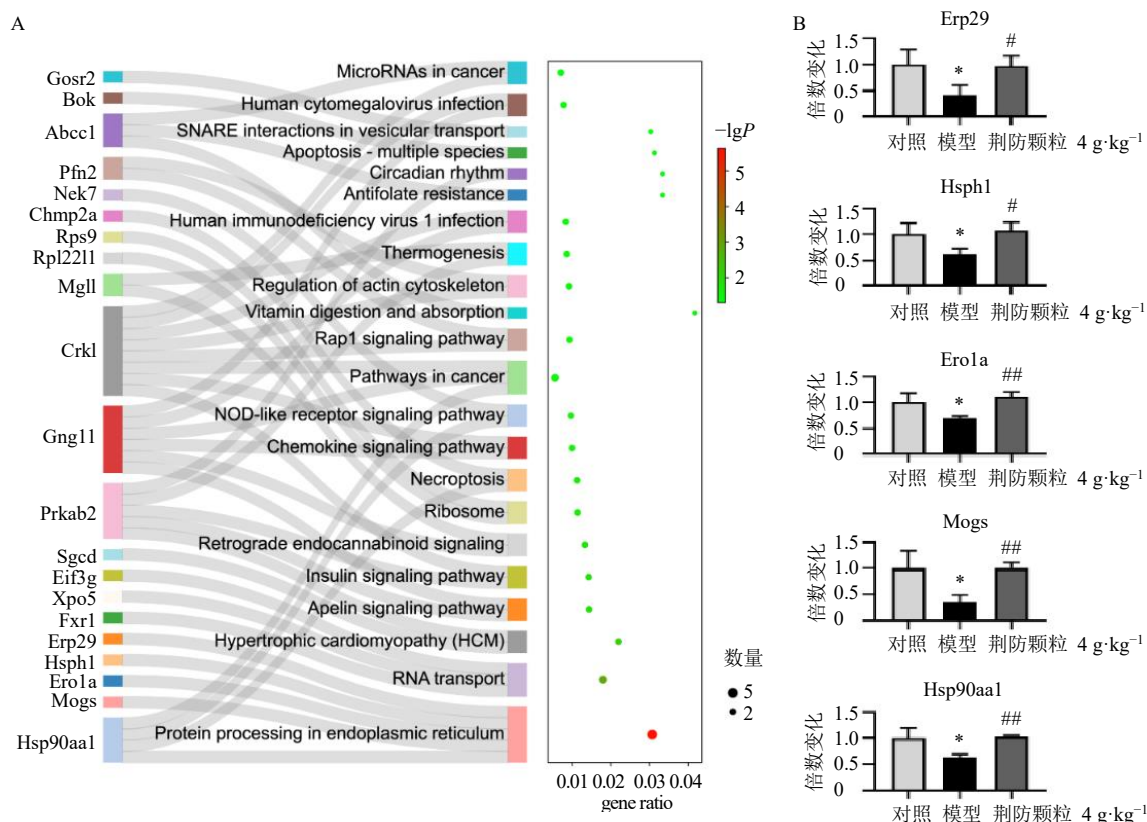


图 6 差异表达蛋白 KEGG 富集分析 (A) 及内质网蛋白加工相关蛋白变化倍数 (B)

Fig. 6 KEGG enrichment analysis of differentially expressed proteins (A) and fold changes in endoplasmic reticulum protein processing-related proteins (B)

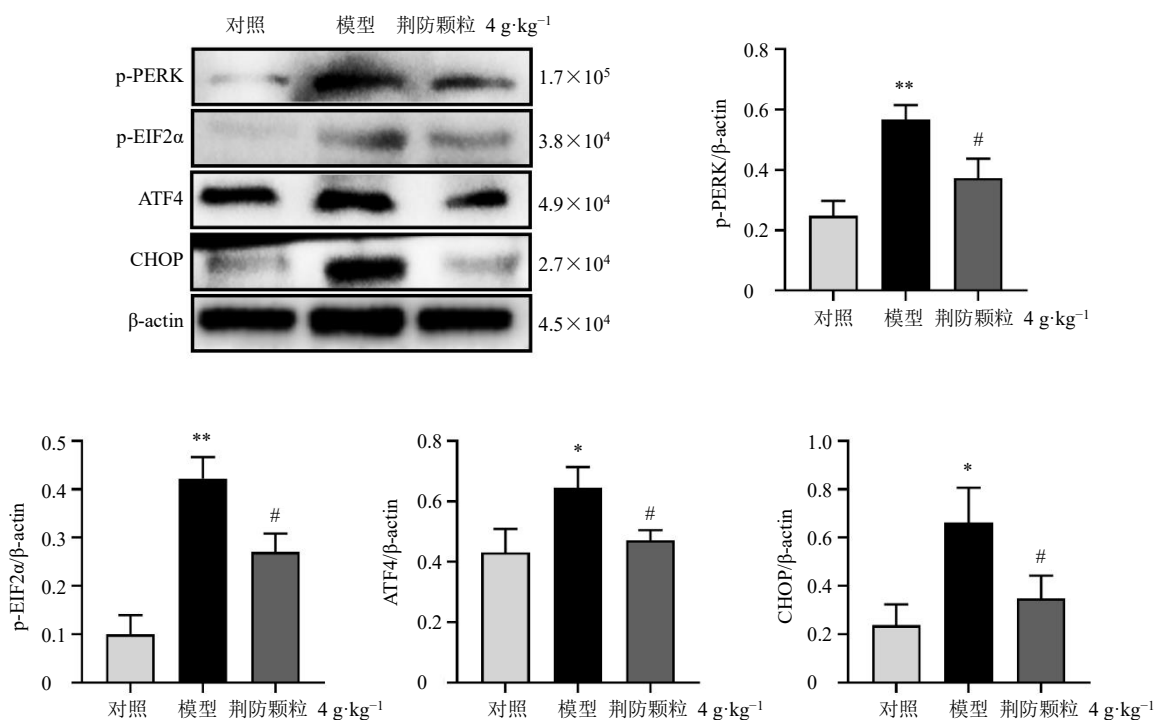
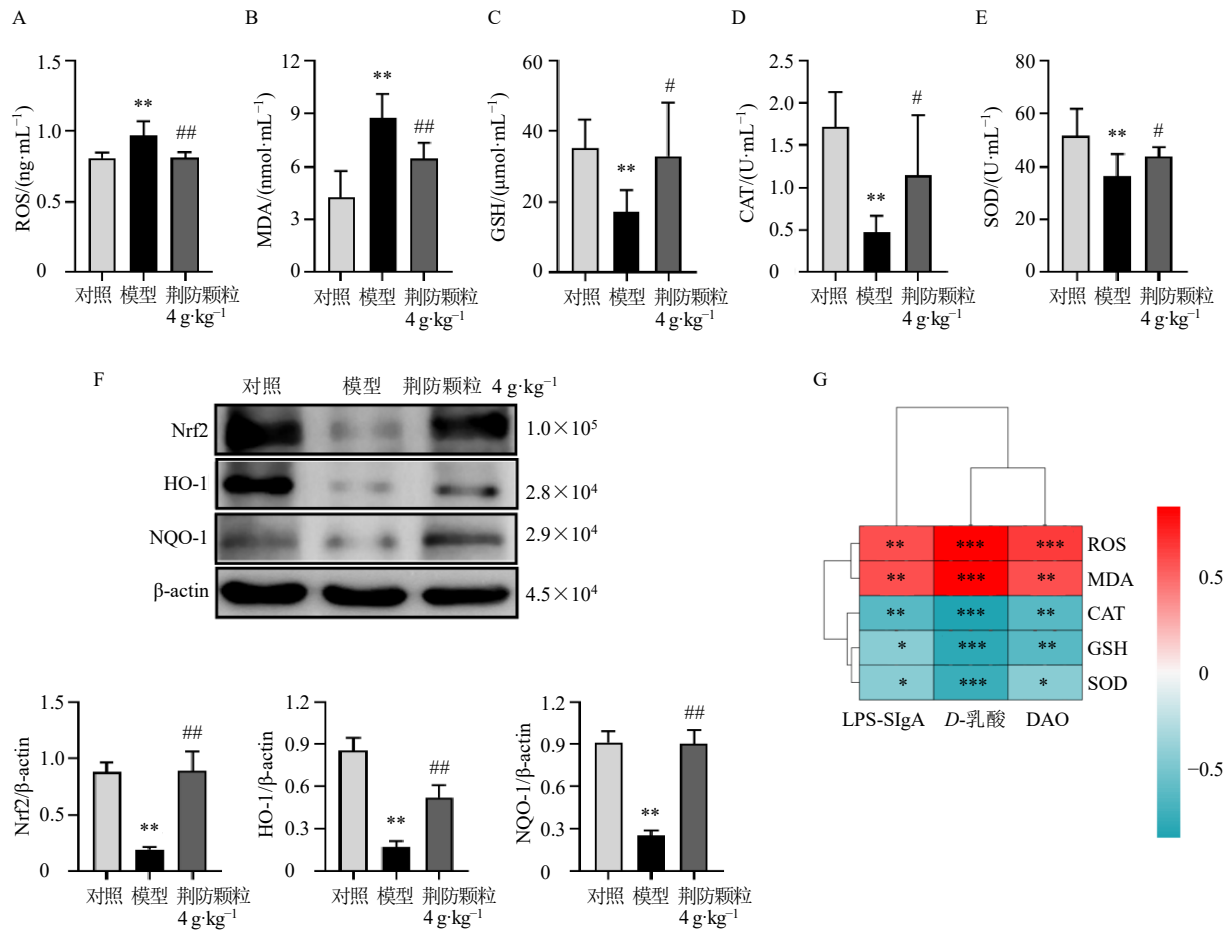


图 7 荆防颗粒抑制 ALI 小鼠结肠组织内质网应激 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Jingfang Granules inhibit endoplasmic reticulum stress of colon tissue in ALI mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A~E-各组小鼠血清中 ROS、MDA、GSH 水平及 CAT、SOD 活性 ($n=6$); F-各组小鼠肺组织 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 蛋白表达 ($n=3$); G-氧化应激因子与肠道屏障指标的 Spearman 相关性。

A—E-levels of ROS, MDA, GSH and activities of CAT and SOD in serum of mice in each groups ($n=6$); F-expressions of Nrf2, HO-1 and NQO-1 proteins in lung tissues of mice in each group ($n=3$); G-Spearman correlation between oxidative stress factors and intestinal barrier indicators.

图 8 荆防颗粒抑制 ALI 小鼠氧化应激 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 8 Jingfang Granules inhibit oxidative stress in ALI mice ($\bar{x} \pm s$)

ALI 小鼠伴随着明显的氧化应激反应。与模型组比较, 荆防颗粒高剂量组小鼠血清中 ROS 和 MDA 水平显著降低 ($P<0.01$), GSH 水平和 CAT、SOD 活性显著升高 ($P<0.05$), 肺组织 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$), 表明荆防颗粒显著抑制 ALI 小鼠氧化应激反应。通过 Spearman 相关性分析 (图 8-G) 发现, 血清促氧化相关因子 (ROS、MDA) 与肠道屏障相关因子 (D-乳酸、DAO、LPS-SIgA) 呈正相关, 抗氧化相关因子 (CAT、GSH、SOD) 与肠道屏障相关因子 (D-乳酸、DAO、LPS-SIgA) 呈负相关, 表明荆防颗粒可能通过改善肠道屏障功能, 防止肠道有毒物质进入血液循环, 以抑制肺组织氧化应激。

4 讨论

自从“肠-肺”轴的概念被提出以来, 越来越

的证据表明肠道屏障的破坏和 ALI 之间有着错综复杂的密切联系^[11]。在肺和肠道损伤期间, 一些病原体及其代谢产物可以通过肠道屏障进入血液, 并被肠道和呼吸道的免疫细胞识别, 从而引发一连串局部和远处炎症反应^[12-13]。本研究发现, 在博来霉素诱导的 ALI 小鼠血清中, 肠道菌产生的 D-乳酸、LPS 和 DAO 的含量显著升高, 提示 ALI 小鼠肠道通透性明显增加。上皮屏障是维持肠道结构稳定性的重要组成部分。肠道上皮细胞通过一系列蛋白质复合物如紧密连接蛋白相互连接, 形成抵抗外部感染的重要屏障^[14-15]。博来霉素诱导的 ALI 小鼠结肠组织中 Occludin 和 ZO-1 的表达显著降低, 提示 ALI 伴随着紧密连接蛋白的丢失, 从而引起肠道屏障功能的破坏。肠道屏障受损后, LPS 等细菌毒素进入体循环, 加剧远处组织的免疫反应。研究显示, 来

自肠道微生物群的 LPS 可以被运输到肺部并激活其免疫反应^[16]。给予荆防颗粒干预后,小鼠血清中 D-乳酸、LPS 和 DAO 的含量显著降低,且 Occludin 和 ZO-1 等紧密连接蛋白的表达显著升高,表明荆防颗粒显著改善了 ALI 小鼠肠道屏障功能。

本研究进一步通过蛋白组学解析荆防颗粒改善 ALI 小鼠肠道屏障功能的机制,结果发现,荆防颗粒调控了 ALI 小鼠结肠组织内质网蛋白质加工过程。内质网是蛋白质合成、成熟、折叠、修饰和降解发生的主要细胞器^[17]。如果内质网中蛋白质加工的最佳平衡被打破,会引起 UPR,以延缓翻译并促进蛋白质加工和降解^[18]。但在某些严重情况下,UPR 激活的保护机制不足以恢复正常的内质网功能,细胞因过强的内质网应激而凋亡。PERK 作为激活内质网应激的主要蛋白激酶之一,正常情况下,会与内质网常驻伴侣蛋白 BiP 结合,并处于非活性状态。当内质网应激发生时,PERK 发生二聚化和自身磷酸化而被激活。激活的 PERK 磷酸化 eIF2 α ,促进转录因子 ATF4 的翻译,ATF4 进入细胞核,启动一系列基因的转录^[19]。持续的内质网应激可通过多种机制引发炎症,如在炎症肠病中,持续的内质网应激损害肠黏膜屏障功能、调节宿主细胞的先天性或适应性免疫反应以及调节肠道微生物群,最终导致肠黏膜损伤和肠道屏障功能的破坏^[20-23]。本研究利用 Western

blotting 技术证实,荆防颗粒在调控 ALI 小鼠结肠组织内质网蛋白质加工过程紊乱后,进一步抑制了 p-PERK、p-eIF2 α 、ATF4 及 CHOP 表达,从而减轻内质网应激,改善肠道屏障功能(图 9)。

课题组前期通过肠道菌群分析和代谢组学发现,荆防颗粒通过调控 Akkermansia、Lachnospiraceae_NK4A136_group 等肠道菌调节肠道不饱和脂肪酸生物合成信号通路^[11]。不饱和脂肪酸生物合成使体内不饱和脂肪酸累积,引起脂质过氧化,从而增加肺组织氧化应激负荷,导致急性肺损伤。因此,通过调控肠道菌群影响氧化应激,可能是荆防颗粒改善 ALI 的重要机制。而肠道菌群对远端组织的影响,肠道屏障的破坏是一个重要的环节。肠组织内质网应激过强,会导致肠道屏障破坏,从而建立了肠道菌群与肺组织氧化应激联系的媒介。本研究发现,ALI 小鼠伴随着显著的氧化应激相关指标 ROS 和 MDA 的上调,以及抗氧化相关指标 GSH、CAT 以及 SOD 的下调,同时肺组织抗氧化相关蛋白 Nrf2、HO-1 以及 NQO-1 表达减少。通过 Spearman 相关性分析发现,血清促氧化相关因子(ROS、MDA)与肠道屏障相关因子(D-乳酸、DAO、LPS-SIgA)呈正相关,抗氧化相关因子(CAT、GSH、SOD)与肠道屏障相关因子(D-乳酸、DAO、LPS-SIgA)呈负相关,表明荆防颗粒可能通过改善

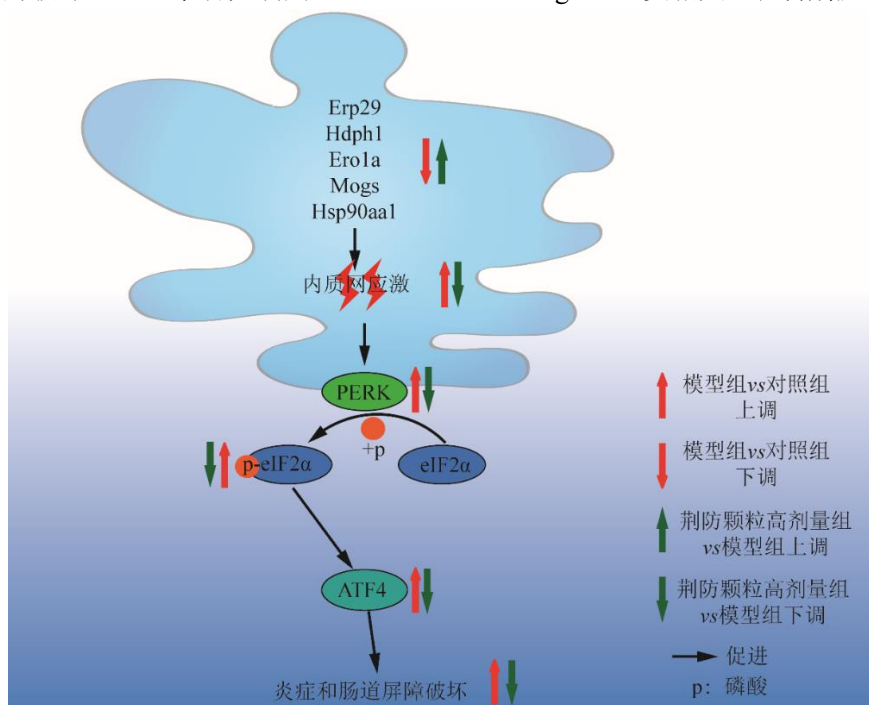


图 9 荆防颗粒通过抑制内质网应激改善 ALI 小鼠肠道屏障

Fig. 9 Jingfang Granules improve intestinal barrier in ALI mice by inhibiting endoplasmic reticulum stress

肠道屏障功能抑制肺组织氧化应激。以上结果提示,在肠道屏障破坏的条件下,肠道菌产生的不饱和脂肪酸可能通过“肠-肺”轴加重肺组织氧化应激。而经荆防颗粒干预后,上述指标均向正常水平靠近,提示荆防颗粒对 ALI 小鼠肠道屏障的改善作用有利于肺组织的抗氧化效应。

综上,本研究利用蛋白组学联合 Western blotting 技术解析荆防颗粒改善 ALI 小鼠肠道屏障功能的机制,发现荆防颗粒通过调控结肠组织内质网蛋白质加工过程紊乱,抑制内质网应激,改善 ALI 小鼠肠道屏障功能,抑制肺组织氧化应激,改善 ALI 小鼠肺损伤。本研究首次从肠道屏障功能的角度解析了荆防颗粒改善 ALI 的机制,进一步丰富了荆防颗粒通过“肠-肺”轴改善 ALI 的科学内涵,并为其预防和治疗 ALI 的临床应用提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Butt Y, Kurdowska A, Allen T C. Acute lung injury: A clinical and molecular review [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2016, 140(4): 345-350.
- [2] Matthay M A, Zemans R L, Zimmerman G A, et al. Acute respiratory distress syndrome [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 18.
- [3] Zhang Y W, Cui Y F, Feng Y B, et al. *Lentinus edodes* polysaccharides alleviate acute lung injury by inhibiting oxidative stress and inflammation [J]. *Molecules*, 2022, 27(21): 7328.
- [4] Li J C, Lu K M, Sun F L, et al. Panaxydol attenuates ferroptosis against LPS-induced acute lung injury in mice by Keap1-Nrf2/HO-1 pathway [J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 96.
- [5] Wang J, Xue X Y, Zhao X T, et al. Forsythiaside A alleviates acute lung injury by inhibiting inflammation and epithelial barrier damages in lung and colon through PPAR- γ /RXR- α complex [J]. *J Adv Res*, 2024, 60: 183-200.
- [6] Yang Y, Fan X X, Ji Y, et al. Glycine represses endoplasmic reticulum stress-related apoptosis and improves intestinal barrier by activating mammalian target of rapamycin complex 1 signaling [J]. *Anim Nutr*, 2022, 8(1): 1-9.
- [7] Tan Y R, Shen S Y, Shen H Q, et al. The role of endoplasmic reticulum stress in regulation of intestinal barrier and inflammatory bowel disease [J]. *Exp Cell Res*, 2023, 424(1): 113472.
- [8] 王秀文, 张丛慧, 韦方娇, 等. 基于网络药理学和代谢组学探究荆防颗粒对类风湿关节炎的保护作用及机制 [J]. *中草药*, 2024, 55(23): 8067-8078.
- [9] Sun X, Xiang H, Liu Z, et al. Jingfang Granules (荆防颗粒) alleviates bleomycin-induced acute lung injury through regulating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 318(Pt A): 116946.
- [10] Lv K, Li M Y, Sun C H, et al. Jingfang Granule alleviates bleomycin-induced acute lung injury via CD200-CD200R immunoregulatory pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 311: 116423.
- [11] 肖贺, 孙兴旭, 孙成宏, 等. 基于肠道菌群测序和粪便代谢组学的荆防颗粒保护急性肺损伤机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(7): 1915-1923.
- [12] Rodríguez-Colman M J, Schewe M, Meerlo M, et al. Interplay between metabolic identities in the intestinal crypt supports stem cell function [J]. *Nature*, 2017, 543(7645): 424-427.
- [13] Zhao L N, Xiao J, Li S L, et al. The interaction between intestinal microenvironment and stroke [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2023, 29(Suppl 1): 185-199.
- [14] Xie B, Wang M Y, Zhang X Y, et al. Gut-derived memory $\gamma\delta$ T17 cells exacerbate sepsis-induced acute lung injury in mice [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 6737.
- [15] Enaud R, Prevel R, Ciarlo E, et al. The gut-lung axis in health and respiratory diseases: A place for inter-organ and inter-Kingdom crosstalks [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 9.
- [16] Ma Y G, Yang X Y, Chatterjee V, et al. The gut-lung axis in systemic inflammation. Role of mesenteric lymph as a conduit [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2021, 64(1): 19-28.
- [17] Sözen Z C, Cevhertas L, Nadeau K, et al. Environmental factors in epithelial barrier dysfunction [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2020, 145(6): 1517-1528.
- [18] 赵惊怡, 赵丹阳, 张钊龙, 等. 肠-肺轴在脓毒症相关急性肺损伤中的作用 [J]. *实用休克杂志: 中英文*, 2024, 8(1): 39-42.
- [19] Liu Q, Tian X L, Maruyama D, et al. Lung immune tone via gut-lung axis: Gut-derived LPS and short-chain fatty acids' immunometabolic regulation of lung IL-1 β , FFAR2, and FFAR3 expression [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2021, 321(1): L65-L78.
- [20] Wang R, Wang Z H, Ma Y T, et al. Particle-induced osteolysis mediated by endoplasmic reticulum stress in prosthesis loosening [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(11): 2611-2623.
- [21] Shergalis A G, Hu S, Bankhead III A, et al. Role of the ERO1-PDI interaction in oxidative protein folding and disease [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 210: 107525.
- [22] Chen P, Sharma A, Weiher H, et al. Biological mechanisms and clinical significance of endoplasmic reticulum oxidoreductase 1 alpha (ERO1 α) in human cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2024, 43(1): 71.
- [23] Marciniak S J, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease [J]. *Physiol Rev*, 2006, 86(4): 1133-1149.

[责任编辑 李亚楠]