

赵佳丽,张慧娟,梁夏丽,等. 基于蛋白质组学与动物实验探究宣肺化浊丸治疗湿热型肺炎的作用机制[J]. 中国实验动物学报, 2026, 34(3): 382-397.

ZHAO J L, ZHANG H J, LIANG X L, et al. Mechanism of XuanFei HuaZhuo Pill for treatment of damp-heat pneumonia based on proteomics and animal experiments [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2026, 34(3): 382-397.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2026.03.007

基于蛋白质组学与动物实验探究宣肺化浊丸治疗 湿热型肺炎的作用机制

赵佳丽^{1,2}, 张慧娟^{1,3}, 梁夏丽^{1,2}, 王燕如^{1,2}, 田雅文^{1,3},
张志明^{1,4}, 靳晓杰^{1,2,3*}, 刘永琦^{1,2*}

(1. 敦煌医学与转化教育部重点实验室, 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 甘肃省高校重大疾病
分子医学与中医药防治研究重点实验室, 兰州 730000; 3. 甘肃中医药
大学药学院, 兰州 730000; 4. 甘肃省中医院, 兰州 730050)

【摘要】 目的 本研究旨在探讨宣肺化浊丸(XuanFei HuaZhuo Pill, XFHZP)对湿热型肺炎(damp-heat pneumonia, DH)作用,并通过蛋白质组学技术揭示其治疗DH的机制,为中医药治疗肺炎提供实验依据。**方法** 建立DH大鼠模型,通过体征观察及评分(一般情况、舌、耳、爪甲、尿液、粪便);肺指数;肺组织苏木素-伊红(HE)染色;肺组织白介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定;血细胞计数:白细胞(WBC)、中心粒细胞(Gran)、单核细胞(Mon)、平均血小板体积(MPV);大鼠肺功能检测呼吸频率(F)和分钟通气量(MV)等,明确XFHZP治理DH的疗效。利用Astral DIA定量蛋白质组学技术检测空白对照(control, CON)组、DH组和XFHZP + DH组大鼠的右肺下叶,分析CON组和DH组、DH组和XFHZP + DH组之间的差异表达蛋白(DEPs)。并通过生物信息学进行DEPs的KEGG富集分析。采用免疫组化分析代表性DEPs的表达,采用Western Blot对DEPs及其下游蛋白的表达含量进行检测和验证。**结果** 与CON组相比,DH组大鼠出现狂躁、舌色红、耳背血管充盈、尿液色黄及粪便粘滞等症状,肺指数升高,肺组织HE染色出现肺泡壁增厚,炎细胞浸润,肺泡毛细血管充血扩等病变,肺组织中IL-6及TNF- α 含量显著升高($P < 0.05$),WBC、Gran、Mon、MPV及F显著升高($P < 0.05$),MV显著降低($P < 0.05$)。与DH组相比,XFHZP + DH组肺指数降低,肺组织HE染色观察到充血情况及肺组织炎性细胞浸润明显减轻,肺组织中IL-6及TNF- α 含量显著降低($P < 0.05$),WBC、Gran、Mon、MPV及F显著降低($P < 0.05$),MV显著升高($P < 0.05$)。蛋白质组学分析,表明CON组和DH组大鼠肺组织中有1348个DEPs,DH组和XFHZP + DH组大鼠肺组织中有448个差异蛋白,其中包括AAK1、CACNA1D1、eIF4E、HSD11B1、ROCK1、TDP1等。DEPs的KEGG通路富集分析显示,cGMP-PKG信号通路和胰岛素信号通路可能是XFHZP治疗DH的关键信号通路。免疫组化结果显示,DH大鼠肺组织中ROCK1和MKNK1的表达均上调,XFHZP治疗后均下调。Western Blot实验进一步表明DH大鼠肺组织中ROCK1和MKNK1的表达均上调,增加了MLC2和eIF4E的磷酸化;XFHZP通过抑制ROCK1和MKNK1的表达,减少MLC2和eIF4E的磷酸化,从而舒张气道平滑肌并抑制炎性因子释放。**结论** XFHZP对DH具有显著的疗效,其作用机制可能通过调控ROCK1和MKNK1的表达,抑制MLC2和eIF4E的磷酸化,进

【基金项目】 甘肃省科技计划项目-科技重大专项(22ZD1FA001),国家中医药管理局科研项目(2021ZYLCYJ08)。

Funded by Science and Technology Plan Project of Gansu Provincial-Major Science and Technology Special Project (22ZD1FA001), Research Project of National Administration of Traditional Chinese Medicine (2021ZYLCYJ08)。

【作者简介】 赵佳丽,女,在读硕士研究生,研究方向:肺系疾病的中西医结合防治基础。Email:zjl09082022@163.com

【通信作者】 刘永琦,男,博士,教授,博士生导师,研究方向:肺系疾病的中西医结合防治基础。Email:liuyongqi73@163.com;

靳晓杰,男,博士,副教授,博士生导师,研究方向:计算机辅助药物设计与中药现代化。Email:jxinlovedream@163.com。

* 共同通信作者

而舒张气道平滑肌并减轻炎症反应。本研究为 XFHZP 治疗 DH 提供了分子层面的科学依据,并为中医药治疗肺炎的机制研究提供了新思路。

【关键词】 宣肺化浊丸;湿热型肺炎;蛋白质组学;作用机制

【中图分类号】 Q95-33 【文献标志码】 A 【文章编号】 1005-4847 (2026) 03-0382-16

Mechanism of XuanFei HuaZhuo Pill for treatment of damp-heat pneumonia based on proteomics and animal experiments

ZHAO Jiali^{1,2}, ZHANG Huijuan^{1,3}, LIANG Xiali^{1,2}, WANG Yanru^{1,2}, TIAN Yawen^{1,3},
ZHANG Zhiming^{1,4}, JIN Xiaojie^{1,2,3*}, LIU Yongqi^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Dunhuang Medicine and Transformation of Ministry of Education, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Gansu University Key Laboratory for Molecular Medicine & Chinese Medicine Prevention and Treatment of Major Diseases, University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 3. College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 4. Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China)

Corresponding author: LIU Yongqi. E-mail:liuyongqi73@163.com; JIN Xiaojie. E-mail:jinlovedream@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the differential therapeutic effects of XuanFei HuaZhuo pill (XFHZP) on rat pneumonia models with damp-heat pneumonia (DH) syndrome, and to elucidate the underlying mechanisms using proteomics, to provide experimental evidence for the use of traditional Chinese medicine (TCM) in the treatment of pneumonia. **Methods** A DH group model was established. Therapeutic effects were evaluated via clinical signs and scores (general information, tongue, ear, claw nail, urine, feces), lung index, histopathology (hematoxylin-eosin), enzyme-linked immunosorbent assay for pulmonary interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α levels, hematology (white blood cell count (WBC), granulocytes (Gran), monocytes (Mon), mean platelet volume (MPV)), and pulmonary function (respiratory frequency (F), minute ventilation (MV)). Astral data-independent acquisition quantitative proteomics was performed on the right inferior lung lobes from control (CON) group, DH group, and XFHZP + DH group to identify differentially expressed proteins (DEPs) between CON *vs.* DH and DH *vs.* XFHZP + DH groups. Key DEPs were verified by immunohistochemistry and Western Blot, including their downstream targets (phospho-MLC2, phospho-eIF4E). **Results** Compared with CON group, DH group exhibited hyperactive behavior, red tongues, ear-vessel dilation, yellow urine, and sticky feces, and displayed elevated lung indices, alveolar wall thickening, inflammatory infiltration, and capillary congestion, plus increased IL-6 and TNF- α ($P < 0.05$), WBC, Gran, Mon, MPV, F ($P < 0.05$), and reduced MV ($P < 0.05$). XFHZP treatment significantly ameliorated lung pathology, reduced IL-6, TNF- α ($P < 0.05$), and normalized WBC, Gran, Mon, MPV, F ($P < 0.05$), MV ($P < 0.05$) in DH rats (XFHZP + DH). Proteomics identified 1348 DEPs in the CON *vs.* DH and 448 in the DH *vs.* XFHZP + DH group, including AAK1, CACNA2D1, eIF4E, HSD11B1, ROCK1, TDP1. KEGG analysis highlighted cGMP-dependent protein kinase G and insulin-signaling pathways as potential mechanisms for XFHZP in DH pneumonia. ROCK1/MKNK1 was upregulated in DH lungs, accompanied by increased MLC2/eIF4E phosphorylation, which were suppressed by XFHZP. **Conclusions** XFHZP exerts significant therapeutic effects on DH syndrome pneumonia, likely by downregulating ROCK1/MKNK1 expression, inhibiting MLC2/eIF4E phosphorylation, relaxing airway smooth muscle, and attenuating inflammation. This study provides molecular-level evidence for XFHZP's efficacy and offers novel insights into TCM-based pneumonia treatment.

【Keywords】 XuanFei HuaZhuo Pill; damp-heat pneumonia; proteomics; mechanism

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肺炎是一种常见的下呼吸道感染疾病,影响肺部的终末气道、肺泡和肺间质,主要由疾病微

生物、理化因素、免疫损伤、过敏、药物所致^[1-2]。我国每年社区获得性肺炎的发病率高达 9.04%,

西北地区发病率为 6.11%,严重影响着人们的健康和生活质量^[1,3]。临床上一旦诊断出肺炎,应根据最可能的病原体、当地微生物学、患者特定病原体的危险因素、肺炎严重程度、患者偏好和潜在抗生素过敏以及成本效益评估,尽快开始经验性抗生素治疗^[2,4]。抗生素的过度使用与滥用已对全球公共卫生构成严峻挑战,这一问题在肺炎的临床治疗中尤为突出^[5-6]。世界卫生组织(World Health Organization, WHO)确定了 2019 年需要关注的全球健康十大威胁,其中包括抗生素耐药性^[7]。

近年来,中医药在呼吸系统疾病的治疗中被广泛应用且临床疗效显著,尤其在病毒性肺炎的治疗中,中医药展现出独特优势^[8]。中医学将肺炎多归属于“肺痹”“咳嗽”“肺炎喘嗽”“肺胀”等范畴^[5-6]。外感邪气,首先侵袭肺,导致肺的宣发肃降功能失常,发为肺炎。肺炎有多个证型,如风热犯肺证、湿热壅肺证、寒湿郁肺证^[5,9-10],其中湿热型是最常见的证型^[11]。

课题组前期研究表明,在宣肺化浊方治疗新冠肺炎的临床观察中,通过对比服用宣肺化浊方前后,患者临床症状、血液学指标和影像学检查,发现宣肺化浊方能明显降低患者体温,促进肺部炎症吸收,缓解临床症状等^[12]。一项随机对照实验结果显示,接受宣肺化浊丸(XuanFei HuaZhuo Pill, XFHZP)治疗的患者在多项指标上均表现出明显改善,研究组患者的住院时间较对照组明显缩短,进一步证实了 XFHZP 在肺炎治疗中的临床优势^[13]。综上所述, XFHZP 通过调节炎症因子水平、改善免疫功能及促进组织修复等多重机制,在肺炎治疗中展现出显著的临床疗效。但对湿热型肺炎(damp-heat pneumonia, DH)的治疗效果及作用机制,目前尚未有系统的探究。

系统生物学时代的到来为中医整体观提供了新的研究工具,“组学”技术能够更好地揭示中医治疗的作用机理^[14]。其中,转录组学、蛋白质组学和代谢组学是中药研究的主要策略^[15]。蛋白质组学技术为中医药作用机制的深入阐释提供了强大工具。蛋白质组学有助于发现分子靶点,开发新的生物活性化合物,阐明中医治疗的内在机制,一项蛋白质组学研究表明,仙连解毒方可能通过调节免疫细胞功能,发挥干预小鼠结

直肠癌湿热瘀毒证的作用^[16]。以上研究表明,蛋白质组学的快速发展使疾病-中医证候与现代技术的结合成为可能,从而为中医证候的分型提供了诊断或预后标志物,也为中医治疗提供了新依据。

因此,本研究旨在探讨 XFHZP 对 DH 大鼠模型的疗效,并通过蛋白质组学技术揭示其治疗 DH 的作用机制,为中医药治疗肺炎提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级健康 8 周龄雄性 Wistar 大鼠 24 只,体重(200 ± 20) g,购于甘肃中医药大学实验动物中心【SCXK(甘)2021-0001】,饲养于甘肃中医药大学 SPF 级科研实验中心【SYXK(甘)2021-0004】,饲养条件为温度(23 ± 2)℃,相对湿度 45% ~ 55%,自由进食和饮水,明暗周期 12 h,本实验经甘肃中医药大学伦理委员会审核批准(SY2024-277)。

1.1.2 主要试剂与仪器

XFHZP,甘肃省中医院院内制剂,批号 2230 1214;连花清瘟颗粒(Lianhua Qingwen Granules, LHQWG),北京以岭药业有限公司,批号 A2301174H。将 XFHZP 于研钵中研磨至粉末, XFHZP、LHQWG 分别以蒸馏水溶解,制备成混悬液,于 4℃ 保存备用。以成人临床用药剂量 XFHZP 每天 24 丸和 LHQWG 18 g/d,参照《中药药理研究方法学》^[17]及人和大鼠体表面积转换系数,确定药物用量, XFHZP、LHQWG 分别为 0.36、1.62 g/(kg·d)。

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, 1 mg/mL),北京索莱宝科技有限公司,批号 34231201006;大鼠白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒、大鼠肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor-α, TNF-α) ELISA 试剂盒,北京志超伟业生物技术有限公司,批号 ZC10049, ZC10160;蛋白磷酸酶抑制剂复合物 I,大连美仑生物技术有限公司,批号 MB12707;蛋白酶抑制剂 PMSF,北京索莱宝科技有限公司,批号 P0100-01;RIPA 裂解液,北京索莱宝科技有限公司,批号 R0010;5 × SDS-PAGE Loading buffer,苏州新赛美生物技术有限公司,批号 WB2001;ROCK1(PT0305R)PT® Rabbit mAb, Immunoway,批号 YM8179;MLC2(Phospho-Ser19)

Antibody, Signalway Antibody, 批号 11114; MLC2 Antibody, Signalway Antibody, 批号 21157; MKNK1 Rabbit pAb, 武汉爱博泰克生物科技有限公司, 批号 A18429; Anti-Phospho-eIF4E (S209) Antibody, 杭州华安生物技术有限公司, 批号 ET1608-66; eIF4E (PT0569R) PT[®] Rabbit mAb, Immunoway, 批号 YM8384; Goat anti-Rabbit, 杭州华安生物技术有限公司, 批号 HA1001; Goat anti-Mouse, 杭州华安生物技术有限公司, 批号 HA1006。RXZ-380A-LED 型智能人工气候 (改造后), 宁波江南仪器厂; WPB PLT-UNR-RT-2 型动物肺功能测试系统, 法国 EMKA 公司; Enspire 酶标仪, 珀金埃尔默仪器有限公司; Orbitrap Astral 型高分辨质谱仪, 赛默飞世尔科技公司; PowerPac Universal 型 SDS-PAGE 电泳系统, 美国 Bio-Rad 公司; ChemiDoc XRS⁺ 型化学发光成像系统, 美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 分组、造模及给药

采用人工气候箱和 LPS 建立 DH 大鼠模型。

具体操作如下:第 1 ~ 7 天在温度 (37 ± 2) ℃、湿度 90% ± 5% 的人工气候箱中饲养 4 h/d^[18], 在第 7 天给予 2 mg/kg LPS (1 mg/mL) 气管滴注。造模成功后的 DH 模型大鼠随机分为 DH 组、XFHZP 干预 DH (XFHZP + DH) 组、LHQWG 干预 DH (LHQWG + DH) 组, 每组 6 只, 另取 6 只正常大鼠作为空白对照 (control, CON) 组。XFHZP + DH 组及 LHQWG + DH 组分别给予 XFHZP 和 LHQWG 灌胃, CON 组、DH 组则给予等量 0.9% 生理盐水灌胃, 所有大鼠均自由摄食、饮水, 共 7 d。

1.2.2 一般状况观察

根据《中医临床诊疗术语 第 2 部分:证候》(GB/T 16751.2-2021)^[19], 参考文献^[20-25] 制定大鼠宏观表征采集量表, 见表 1。造模最后 1 d 分别由 2 位实验者独立对大鼠一般情况、舌、耳、爪甲、尿液和粪便进行评估并记录分值, 取 2 位实验者分值的平均值为该项体征的最终分值 (大鼠分组情况对 2 位操作者保密)。

表 1 寒湿型、湿热型大鼠宏观表征采集表

Table 1 Macro characterization collection table of cold-damp type and damp-heat type rats

观察项目		0 分	1 分	2 分	
Observation items		0 points	1 point	2 points	
主要体征 Major signs	一般情况 General information	精神状态	萎靡	正常	烦躁
		Mental state	Apathy	Normal	Irritability
		抓取反抗	容易控制	尝试逃离	剧烈反抗
		Capture resistance	Easy to control	Try to escape	Violent resistance
		是否扎堆	频繁扎堆	偶尔聚集	分散爬卧
		Whether to pile up	Frequent clustering	Occasional aggregation	Scattered crawling and lying
		性情活动	蜷缩懒动	活跃	撕咬打斗
		Temperament activity	Curl up and slouch	Active	Biting and fighting
	舌 Tongue	舌形	胖大	适中	瘦薄
		Shape	Macroglossia	Moderate	Thin
		舌色	色暗	淡红明润	色红
		Color	Dark	Rosy and lustrous	Red
耳 Ear	血管状态	塌陷	正常	充盈	
	Vascular status	Collapse	Normal	Fullness	
	耳背颜色	苍白	粉嫩	泛红	
	Color of ear dorsum	Pallor	Tender powder	Diffuse red	
次要体征 Minor signs	爪甲	颜色	苍白	淡红	鲜红
	Claw nail	Color	Pallor	Pale red	Bright red
	尿液	颜色	色淡清长	淡黄	色黄短赤
	Urine	Color	Clear and profuse urine	Pale yellow	Dark and scanty urine
	粪便	颜色	淡黄	深黄	棕色
	Feces	Color	Pale yellow	Dark yellow	Brown
	性状	柔软、不成形	成形松软	粘滞、腊肠样	
	Character	Loose, unformed stools	Soft and well-formed	Sticky, sausage-shaped stool	

1.2.3 肺指数

称量大鼠的体质量后解剖取肺并称取质量,用于肺指数的计算,公式为:肺指数 = (肺湿质量/体质量) × 100%。

1.2.4 肺组织病理学

大鼠左肺组织用 4% 多聚甲醛浸润固定 24 h 后,用不同浓度乙醇梯度脱水,二甲苯透明,浸蜡包埋,切片,苏木素-伊红(HE)染色,中性树胶封片。选择 3 个易于识别的病理变化:炎性细胞浸润、肺泡壁或气管壁血管扩张充血、肺泡腔或气管腔内液体渗出;在 0 ~ 4 分的尺度上进行分级评分:0 分:无病变或非常轻微的病变;1 分:轻度病变;2 分:中度病变;3 分:严重病变;4 分:极严重的病变。每个肺组织切片选取 3 个视野进行评分,以评估肺组织损伤的严重程度^[26]。

1.2.5 血细胞计数

各组大鼠采用 3% 戊巴比妥钠溶液 30 mg/kg 行腹腔注射麻醉后,于心尖取血 1 mL 左右,收集至已加入乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)抗凝剂的 Ep 管中,充分混匀。取 Ep 管中 200 μ L 血采用全自动血液细胞分析仪计算白细胞(white blood cell, WBC)、粒细胞(granulocyte, Gran)、单核细胞(monocyte, Mon)及平均血小板体积(mean platelet volume, MPV)。

1.2.6 肺功能测定

末次给药后大鼠禁食 12 h,采用动物肺功能测试仪测量各组大鼠肺功能呼吸频率(frequency, F)和每分钟通气量(minute volume, MV)。

1.2.7 ELISA 检测肺组织中炎性因子 IL-6 和 TNF- α 含量

将肺组织加入一定量 PBS 后,于 4 $^{\circ}$ C 匀浆研磨,3000 r/min 离心 15 min 后收集上清液,按照试剂盒说明书步骤进行操作,检测 IL-6 和 TNF- α 的含量。

1.2.8 蛋白质组学探讨 XFHZP 治疗 DH 的作用机制

本部分对 CON 组、DH 组和 XFHZP + DH 组大鼠右肺下叶的蛋白质进行液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)和数据独立采集(data-independent acquisition, DIA)技术来同时鉴定和定量蛋白质样本中存在的不同蛋白质。

1.2.9 蛋白质肽段检测

样品经液氮研磨后,用含 8 mol/L 尿素和 1% 蛋白酶抑制剂的裂解液超声提取蛋白,离心取上清并用 BCA 法定量;取等量蛋白经 TCA 沉淀(20%, 4 $^{\circ}$ C 2 h)、冷丙酮洗涤后,以胰蛋白酶(1:50)37 $^{\circ}$ C 过夜酶解,依次进行 DTT 还原(5 mmol/L, 56 $^{\circ}$ C 30 min)、IAA 烷化(15 mmol/L, 避光 15 min)和 TFA 酸化(pH = 2 ~ 3),除盐冻干后肽段定量。LC-MS/MS 采用 Vanquish Neo 纳升液相与 Astral 质谱联用, DIA 模式检测(正离子, 380 ~ 980 m/z; MS1 分辨率 240 000, MS2 设 299 扫描窗口, HCD 25 eV)。数据经 DIA-NN 分析(Trypsin 酶切, Carbamidomethyl 固定修饰, Oxidation/Acetyl 动态修饰, FDR < 1%)。

1.2.10 差异表达蛋白(differentially expressed proteins, DEPs)的筛选

根据每个蛋白在不同样本中的信号强度值,计算出蛋白的相对定量值,对相对定量值进行中位数归一化,将每个蛋白在样本中的相对定量值之比作为差异倍数(fold change, FC)。

1.2.11 差异表达蛋白质(differentially expressed proteins, DEPs)的京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析

KEGG 的通路主要包括:代谢、遗传信息处理、环境信息处理、细胞过程、人类疾病、药物开发等。基于生物学信息注释数据库 DAVID (<https://www.omicshare.com/tools/>)对 DEPs 通路进行注释。

1.2.12 免疫组化

将 CON 组、DH 组和 XFHZP + DH 组肺组织样本经 4% 多聚甲醛固定 24 h 后,进行脱水、透明化及石蜡包埋,并切片(4 ~ 6 μ m)。切片经脱蜡、梯度乙醇水化后,通过热诱导(heat induced epitope retrieval, HIER)或蛋白酶(proteolytic antigen retrieval, PIER)法进行抗原修复,随后用 3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶及封闭血清减少非特异性结合。特异性一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜或室温孵育 1 ~ 2 h,洗涤后加入酶标二抗(如 HRP 或 AP, 室温 30 ~ 60 min),DAB/AEC 显色显示抗原定位,苏木素复染增强对比度后封片。显微镜下先低倍镜(4 $\times$)观察染色强度(棕色越深提示抗原越多),再高倍镜(20 $\times$)分析分布模式(核/膜/

质),最后用 Image Scope 12. 4. 6 软件计算阳性细胞百分比(阳性细胞数/总细胞数 $\times$ 100%)。

1. 2. 13 Western Blot 检测蛋白表达

取 CON 组、DH 组和 XFHZP + DH 组冰冻的肺组织,加入钢珠匀浆后用 PBS 洗涤,离心后加入 5 倍体积裂解液,冰浴超声破碎,离心取上清并用 BCA 法测定蛋白浓度,调整至 5 mg/mL 备用。随后进行 SDS-PAGE 电泳(10%分离胶,5%浓缩胶),按计算量上样,90 V 转膜至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉-TBST 封闭 2 h。一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗膜后室温孵育 HRP 标记二抗 2 h,TBST 洗涤后显影成像,Image J 1. 8. 0 分析条带灰度值。

1. 3 统计学分析

差异表达蛋白 FC 使用 *T* 检验。KEGG 通路注释使用费希尔精确检验(Fisher's exact test)。实验数据使用 SPSS 26. 0 软件进行统计学分析。

计量资料结果以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。当实验数据满足正态分布时,采用单因素方差(One-way ANOVA)分析,此时若方差齐,则采用 LSD 法进行组间多重比较;若方差不齐,则采用 Dunnet's *T*3 检验进行组间多重比较。当实验数据不满足正态分布时,采用非参数检验的 Kruskal-Wallis *H* 检验进行组间多重比较,并在校正后进行分析。*P* < 0. 05 为具有统计学意义。

2 结果

2. 1 各组大鼠的体征变化情况

进一步对大鼠的舌、耳、爪甲、尿液和粪便等一般体征进行观察和量化表征,结果显示:与 CON 组相比,DH 组大鼠体征评分显著升高(*P* < 0. 01),与 DH 组相比,XFHZP + DH 组大鼠体征评分显著降低(*P* < 0. 05)(表 2,图 1)。

表 2 各组大鼠宏观体征评分比较($\bar{x} \pm s, n = 6$, 分)

Table 2 Comparison of macroscopic signs scores of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$, point)

组别 Groups	体征评分 Sign score		
	主要体征 Major signs		次要体征 Minor signs
	一般情况 General information	舌 Tongue	
CON 组 CON group	4. 00 $\pm$ 0. 60	1. 92 $\pm$ 0. 29	5. 75 $\pm$ 0. 45
DH 组 DH group	7. 67 $\pm$ 0. 49 **	3. 50 $\pm$ 0. 80 **	11. 33 $\pm$ 0. 89 **
XFHZP + DH 组 XFHZP + DH group	4. 25 $\pm$ 0. 45 #	2. 33 $\pm$ 0. 49 #	8. 00 $\pm$ 1. 13
LHQWG + DH 组 LHQWG + DH group	4. 17 $\pm$ 1. 19 #	2. 83 $\pm$ 0. 83 #	7. 92 $\pm$ 1. 00

注:与 CON 组相比, ** *P* < 0. 01; 与 DH 组相比, # *P* < 0. 05。(下图/表同)

Note. Compared with CON group, ** *P* < 0. 01. Compared with DH group, # *P* < 0. 05. (The same in the following figures and tables)

2. 2 XFHZP 对 DH 大鼠肺指数的影响

肺指数常被用来反映肺部炎性病变的严重程度,因此进一步的分析肺指数结果显示:与 CON 组相比,DH 组大鼠肺指数显著升高(*P* < 0. 01);与 DH 组相比,XFHZP + DH 组和 LHQWG + DH 组大鼠肺指数显著降低(*P* < 0. 01)。见表 3。

2. 3 XFHZP 对 DH 大鼠肺组织结构损伤的影响

HE 染色结果显示,CON 组肺泡结构清晰,肺泡壁薄且由单层扁平上皮构成,气道壁层次分明且通畅,肺泡血管分布均匀、结构完整,以及肺间

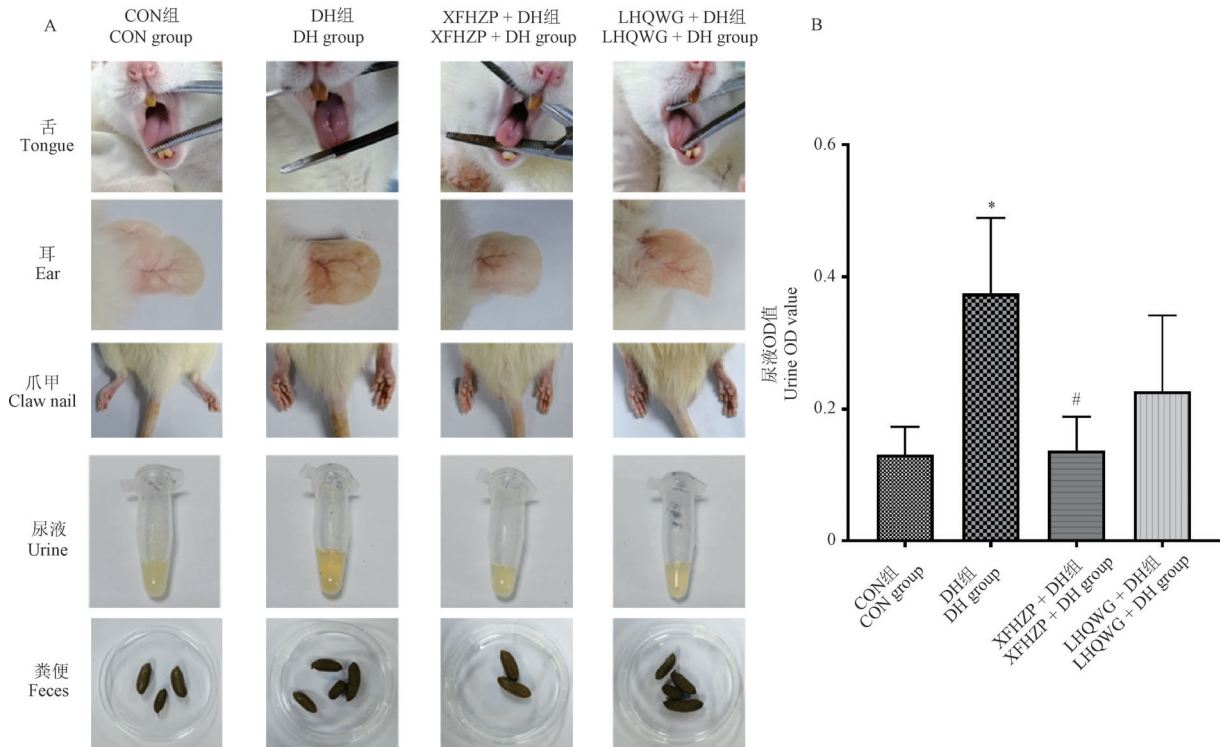
表 3 各组大鼠肺指数($\bar{x} \pm s, n = 6, \%$)

Table 3 Lung index of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 6, \%$)

组别 Groups	肺指数 Lung index
CON 组 CON group	0. 42 $\pm$ 0. 06
DH 组 DH group	0. 83 $\pm$ 0. 06 **
XFHZP + DH 组 XFHZP + DH group	0. 50 $\pm$ 0. 04 ##
LHQWG + DH 组 LHQWG + DH group	0. 58 $\pm$ 0. 07 ##

注:与 DH 组相比, ## *P* < 0. 01。(下图/表同)

Note. Compared with DH group, ## *P* < 0. 01. (The same in the following figures and tables)



注:A:舌、耳、爪甲、尿液及粪便的表现;B:尿液 OD 值;与 CON 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 1 各组大鼠体征情况($n = 6$)

Note. A. Tongue, ear, claw nail, urine and feces performance. B. Urine OD value. Compared with the CON group, * $P < 0.05$.

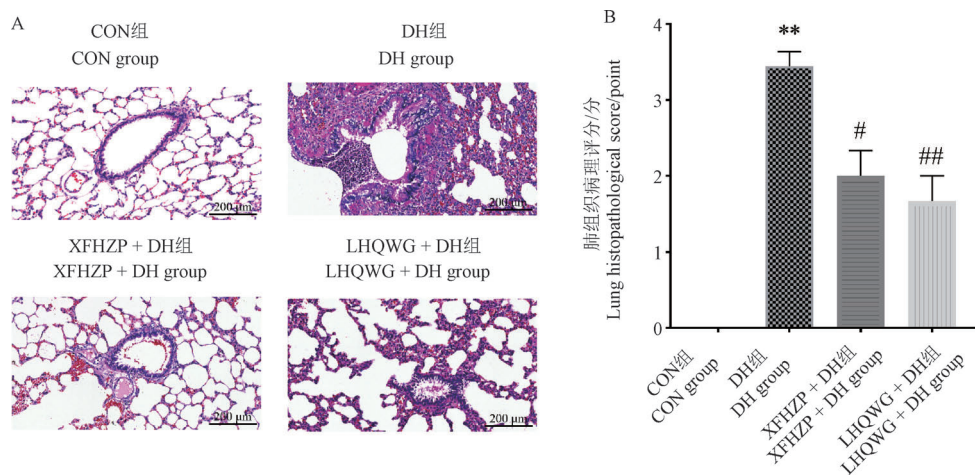
Figure 1 Signs of rats in each group($n = 6$)

质结构清晰无异常增生。与 CON 组相比,DH 组肺泡壁增厚,炎细胞浸润,肺泡毛细血管充血扩张。与 DH 组相比,XFHZP + DH 组和 LHQWG + DH 组充血情况及肺组织炎性细胞浸润明显减轻,整体 LHQWG + DH 组效果较为显著。各组

HE 染色结果见图 2A,评分见图 2B。

2.4 XFHZP 对 DH 大鼠肺组织炎性因子的影响

肺组织中炎性因子 IL-6、TNF- α 水平通常会明显升高。因此进一步通过 ELISA 检测大鼠肺组织中 IL-6、TNF- α 水平。结果显示,与 CON 组



注:A:各组大鼠肺组织 HE 染色结果;B:各组大鼠肺组织病理评分。

图 2 各组大鼠肺组织病理学表现(HE 染色)

Note. A. HE staining results of lung tissue of rats in each group. B. Pathological scores of lung tissues of rats in each group.

Figure 2 Pathological findings of lung tissues of rats in each group (HE staining)

相比,DH 组大鼠肺组织中 IL-6、TNF- α 水平均显著升高 ($P < 0.01$);与 DH 组相比,XFHZP、LHQWG 的干预显著降低了 IL-6 和 TNF- α 的表达 ($P < 0.01$)。见表 4。以上结果表明,本研究所构建的 DH 大鼠模型成功,XFHZP 能改善模型大鼠的肺部损伤程度。

表 4 各组大鼠肺组织 IL-6 及 TNF- α 水平
($\bar{x} \pm s, n = 6, \text{pg/mL}$)

Table 4 Levels of IL-6 and TNF- α in lung tissues of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 6, \text{pg/mL}$)

组别 Groups	IL-6	TNF- α
CON 组 CON group	314.4 $\pm$ 84.7	27.7 $\pm$ 6.3
DH 组 DH group	596.5 $\pm$ 26.2 **	79.6 $\pm$ 20.7 **
XFHZP + DH 组 XFHZP + DH group	478.6 $\pm$ 81.5 ##	38.0 $\pm$ 12.8 ##
LHQWG + DH 组 LHQWG + DH group	500.7 $\pm$ 62.0 ##	39.9 $\pm$ 11.1 ##

表 5 各组大鼠血细胞计数结果($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 5 Blood cell count results of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别 Groups	WBC/($10^9/\text{L}$)	Gran/($10^9/\text{L}$)	Mon/($10^9/\text{L}$)	MPV/fL
CON 组 CON group	3.64 $\pm$ 0.40	0.84 $\pm$ 0.05	0.10 $\pm$ 0.00	6.34 $\pm$ 0.35
DH 组 DH group	7.98 $\pm$ 1.37 **	2.98 $\pm$ 0.87 **	0.26 $\pm$ 0.05 **	7.36 $\pm$ 0.68 **
XFHZP + DH 组 XFHZP + DH group	4.52 $\pm$ 0.70 #	1.52 $\pm$ 0.38 #	0.12 $\pm$ 0.04 #	6.88 $\pm$ 0.08 #
LHQWG + DH 组 LHQWG + DH group	4.60 $\pm$ 0.72 #	1.68 $\pm$ 0.74	0.12 $\pm$ 0.04 #	6.84 $\pm$ 0.21 #

表 6 各组大鼠肺功能 F 和 MV($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 6 F and MV of lung function of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别 Groups	F/bmP	MV/mL
CON 组 CON group	385.1 $\pm$ 41.5	1261.4 $\pm$ 132.3
DH 组 DH group	431.8 $\pm$ 53.6 **	1045.2 $\pm$ 116.6 **
XFHZP + DH 组 XFHZP + DH group	404.7 $\pm$ 40.4 ##	1181.0 $\pm$ 141.3 ##
LHQWG + DH 组 LHQWG + DH group	430.0 $\pm$ 19.7	1198.8 $\pm$ 237.6 ##

2.5 XFHZP 对 DH 大鼠血细胞计数的影响

大量文献报道,血细胞计数除与炎症相关外,还与中医寒热证密切相关,尤其是 WBC、Gran、Mon 和 MPV^[27-29]。因此进一步的血细胞计数结果显示,与 CON 组相比,DH 组大鼠全血中 WBC、Gran、Mon 和 MPV 均显著增加 ($P < 0.01$);与 DH 组相比,XFHZP + DH 组和 LHQWG + DH 组大鼠全血中 WBC、Mon 和 MPV 均显著降低 ($P < 0.05$),XFHZP + DH 组大鼠 Gran 显著降低 ($P < 0.05$)。见表 5。

2.6 XFHZP 对 DH 大鼠肺功能的影响

肺炎大鼠肺功能受损,气体交换受限,MV 降低,氧气不足,通过增加 F 来补偿。肺功能结果显示,与 CON 组比,DH 组大鼠肺功能 F 显著升高、MV 显著降低 ($P < 0.01$);与 DH 组比,XFHZP + DH 组大鼠肺功能 F 显著降低、MV 显著升高 ($P < 0.01$)。表明,XFHZP 在促进肺功能恢复方面,对 DH 大鼠表现出显著的治疗效果。见表 6。

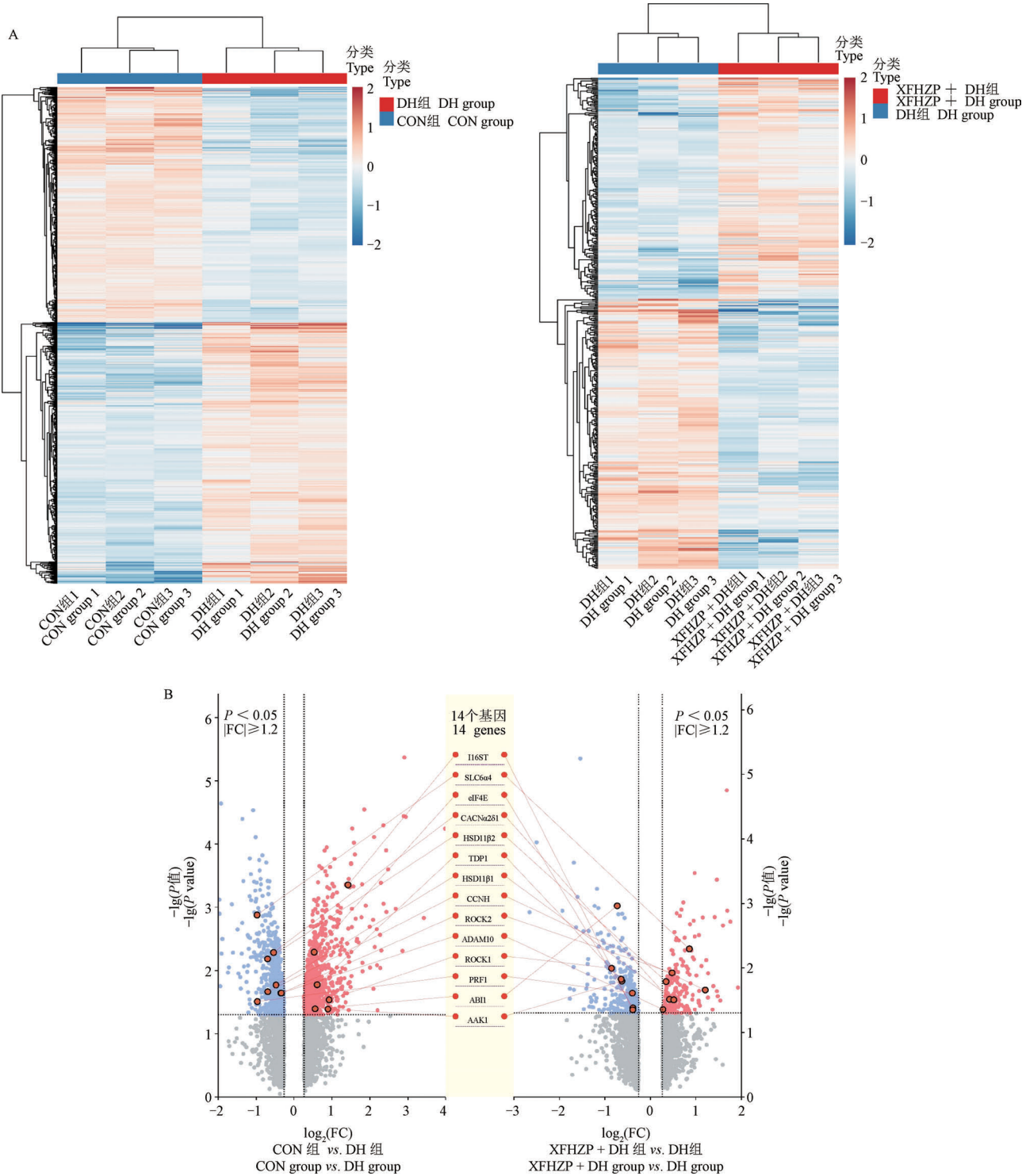
2.7 蛋白质组学分析 XFHZP 治疗 DH 的作用机制

2.7.1 DEPs 的筛选

以 $P < 0.05, \text{FC} > 1.2$,分析所得 DEPs,研究结果显示,CON 组与 DH 组相比,DEPs 有 1348 个,其中上调 DEPs 有 715 个,下调 DEPs 有 633 个;XFHZP + DH 组与 DH 组相比,DEPs 有 448 个,其中上调 DEPs 有 199 个,下调 DEPs 有 249 个。分析所得 DEPs,得到“V”字表达(CON 组和 DH 组上调且 XFHZP + DH 组和 DH 组下调,或 CON 组和 DH 组下调且 XFHZP + DH 组和 DH 组上调)的 DEPs 有 AAK1、ABL1、CACN α 2 δ 1、

eIF4E、HSD11β1、IL6ST、ROCK1、SLC6A4、TDP1 等 155 个, 样本 DEPs 见图 3。

2. 7. 2 DEPs 的 KEGG 富集分析
以上述 DEPs, 分别对 CON 组和 DH 组、



注:A:差异蛋白热图;B:差异蛋白火山图;红色点:上调的显著性 DEPs;蓝色点:下调的显著性 DEPs;灰色点:无差异变化的蛋白质。

图 3 差异蛋白热图和火山图

Note. A. Differential protein heat map. B. Volcano plot of differential proteins. Red dots. Significantly up-regulated DEPs. Blue dots. Significantly down regulated DEPs. Gray dots. Proteins without differential changes.

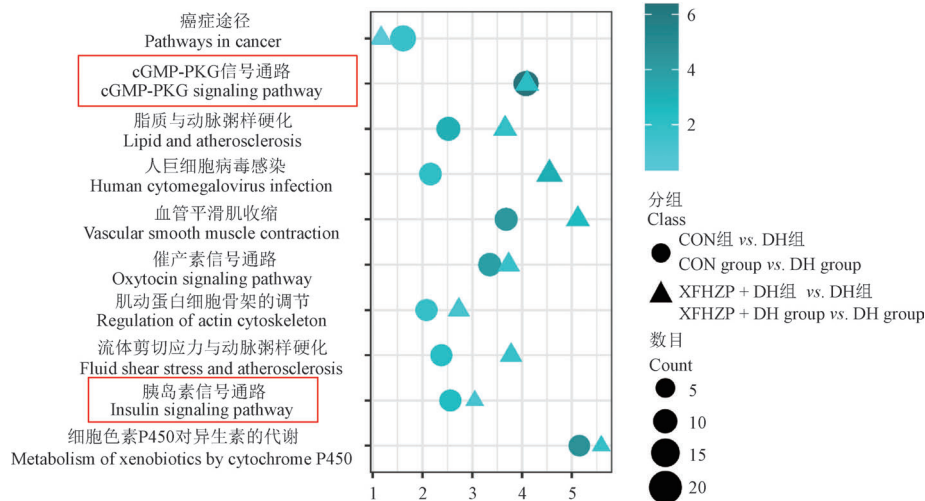
Figure 3 Differential protein heat map and volcano map

XFHHP + DH 组和 DH 组进行 KEGG 通路富集分析,得到共同的相关通路有:癌症途径、cGMP-PKG 信号通路、血管平滑肌收缩、胰岛素信号通路、细胞色素 P450 对异生素的代谢等,见图 4。将富集到的通路及其相关蛋白整理,结果见表 7。结合文献调研发现,环磷酸鸟苷-蛋白激酶 G (cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase G, cGMP-PKG) 信号通路和胰岛素信号通路与肺炎的病理生理过程密切相关^[30-31]。基于以上两条信号通路的 KEGG 数据分析(<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>, rno04022、rno04910)、DEPs 分析及大量文献调研:Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 1 (Rho-associated coiled-

coil containing protein kinase 1, ROCK1) 被激活后促进肌球蛋白轻链 2 (myosin light chain 2, MLC2) 的磷酸化导致气道平滑肌收缩,丝裂原活化蛋白激酶相互作用激酶 1 (MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1, MKNK1) 被激活后促进真核翻译起始因子 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E, eIF4E) 的磷酸化增加促炎因子释放^[32-33]。因此,研究人员猜测,XFHHP 可能通过抑制 ROCK1-MLC2 控制气道平滑肌收缩,抑制 MKNK1-eIF4E 减少炎症因子释放治疗 DH。

2.8 XFHHP 治疗 DH 肺组织 ROCK1 和 MKNK1 蛋白分布情况

为了验证蛋白质组学的结果,采用免疫组织



注:cGMP-PKG 信号通路和胰岛素信号通路是 XFHHP 干预 DH 的可能有效通路。

图 4 DEPs 参与的 KEGG

Note. CGMP-PKG signaling pathway and insulin signaling pathway are the possible effective pathways for XFHHP to intervene DH.

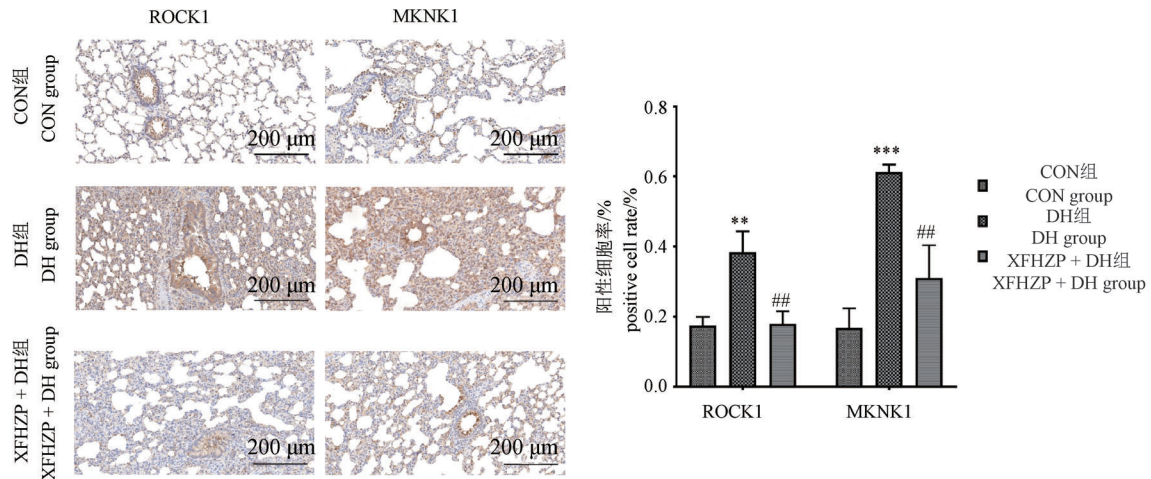
Figure 4 KEGG participated by DEPs

化学染色,对关键蛋白 ROCK1 和 MKNK1 进行检测,结果发现,与 CON 组相比,DH 组肺组织中 ROCK1 和 MKNK1 阳性细胞显著增加,具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$);XFHHP 组显著抑制肺组织中 ROCK1 和 MKNK1 阳性细胞的增加,具有统计学意义($P < 0.01$)。说明 XFHHP 可能通过 ROCK1 调控 cGMP-PKG 信号通路、通过 MKNK1 调控胰岛素信号通路来发挥作用。结果如图 5 所示。

2.9 Western Blot 检测 ROCK1 和 MKNK1 及下游蛋白的表达

通过免疫组化验证了关键靶点 ROCK1 和

MKNK1,但是对其下游通路相关蛋白产生影响尚不清楚,因此对 ROCK1 和 MKNK1 的下游相关蛋白 MLC2、p-MLC2、eIF4E 和 p-eIF4E 表达进行了检测。结果显示,与 CON 组相比,DH 组 ROCK1 和 MKNK1 的表达升高,具有统计学意义($P < 0.001$),并能明显提高 MLC2、eIF4E 的表达及其磷酸化,具有统计学意义($P < 0.001$);与 DH 组相比,XFHHP 可显著降低 ROCK1 和 MKNK1 的表达,具有统计学意义($P < 0.001$),并能明显降低 MLC2 ($P < 0.001$)、p-MLC2 ($P < 0.001$)、eIF4E ($P < 0.001$) 及 p-eIF4E ($P < 0.05$) 的表达,具有统计学意义。见图 6。

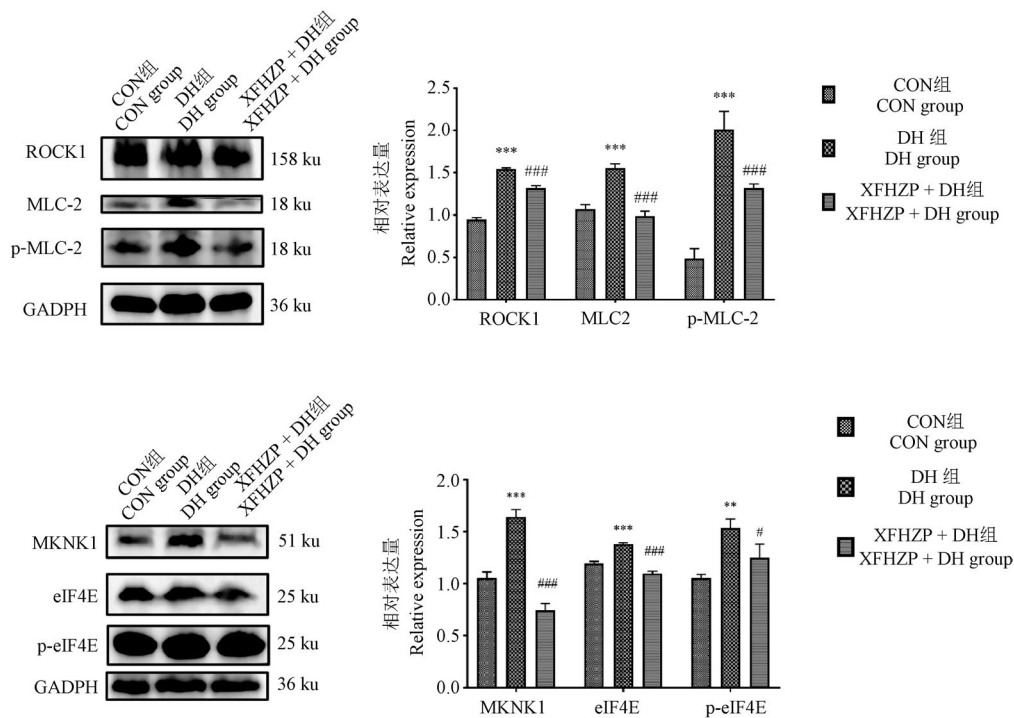


注:与 CON 组相比,*** $P < 0.001$ 。(下同)

图 5 XFHZP 对 DH 大鼠肺组织中 ROCK1、MKNK1 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. Compared with CON group, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 5 Effect of XFHZP on the expression of ROCK1 and MKNK1 in lung tissue of rats with DH ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



注:与 DH 组相比,### $P < 0.001$ 。

图 6 XFHZP 对 DH 大鼠肺组织中 ROCK1、MKNK1 及其下游蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. Compared with DH group, ### $P < 0.001$.

Figure 6 Effect of XFHZP on the expression of ROCK1, MKNK1 and their downstream proteins in the lung tissue of DH rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论

WHO 发布 2024 世界卫生统计报告:COVID-19 和下呼吸道感染均为全球十大死因,对公共卫

生安全造成极大威胁^[34]。中医辨证治疗肺炎疗效确切^[35],课题组前期研究表明,宣肺化浊方在临床治疗肺炎有较好的疗效^[12,36],但其对 DH 的作用和机制,目前仍缺乏全面且系统的研究。因

表 7 KEGG 富集通路-基因信息
Table 7 KEGG enrichment pathway-gene information

通路 Pathway	基因 Genes
人巨细胞病毒感染 Human cytomegalovirus infection	<i>Rock</i> 、 <i>Vegfa</i> 、 <i>Calml3</i> 、 <i>Gna12</i> 、 <i>Casp9</i> 、 <i>Tsc1</i> 、 <i>Sos1</i> 、 <i>Gnb4</i> 、 <i>Plcb1</i> 、 <i>Gnai1</i> 、 <i>Ppp3cb</i> 、 <i>Gnb1</i> 、 <i>Gnao1</i> 、 <i>Gng5</i> 、 <i>Itp3</i> 、 <i>Gna11</i>
cGMP-PKG 信号通路 cGMP-PKG signaling pathway	<i>Rock</i> 、 <i>Npr2</i> 、 <i>Calml3</i> 、 <i>Gna12</i> 、 <i>Prkg1</i> 、 <i>Pde5a</i> 、 <i>Atp1a2</i> 、 <i>Atp1a3</i> 、 <i>Plcb1</i> 、 <i>Gnai1</i> 、 <i>Atp2b2</i> 、 <i>Gucy1b1</i> 、 <i>Ppp3cb</i> 、 <i>Ednra</i> 、 <i>Slc8a1</i> 、 <i>Itp3</i> 、 <i>Atp2b4</i> 、 <i>Gna11</i> 、 <i>Gucy1a2</i>
脂质与动脉粥样硬化 Lipid and atherosclerosis	<i>Rock</i> 、 <i>Atf6</i> 、 <i>Calml3</i> 、 <i>Casp9</i> 、 <i>Apoa4</i> 、 <i>Plcb1</i> 、 <i>Camk2a</i> 、 <i>Camk2g</i> 、 <i>Ppp3cb</i>
血管平滑肌收缩 Vascular smooth muscle contraction	<i>Rock</i> 、 <i>Npr2</i> 、 <i>Calml3</i> 、 <i>Gna12</i> 、 <i>Prkg1</i> 、 <i>Plcb1</i> 、 <i>Gucy1b1</i> 、 <i>Ednra</i> 、 <i>Itp3</i> 、 <i>Ppp1r14a</i> 、 <i>Ramp2</i> 、 <i>Gna11</i> 、 <i>Myh10</i> 、 <i>Gucy1a2</i>
催产素信号通路 Oxytocin signaling pathway	<i>Rock</i> 、 <i>Npr2</i> 、 <i>Calml3</i> 、 <i>Gucy1b1</i> 、 <i>Ppp3cb</i> 、 <i>Gnao1</i> 、 <i>Itp3</i> 、 <i>Cacnb2</i> 、 <i>Gucy1a2</i>
肌动蛋白细胞骨架的调节 Regulation of actin cytoskeleton	<i>Rock</i> 、 <i>Limk2</i> 、 <i>Gna12</i> 、 <i>Itgb5</i> 、 <i>Sos1</i> 、 <i>Cfl2</i> 、 <i>Rlc-a</i> 、 <i>C8b</i> 、 <i>Fgf1</i> 、 <i>Arhgap35</i> 、 <i>C6</i> 、 <i>Pfn2</i> 、 <i>Myh10</i>
流体剪切应力与动脉粥样硬化 Fluid shear stress and atherosclerosis	<i>Gstm7</i> 、 <i>Vegfa</i> 、 <i>Acr2a</i> 、 <i>Calml3</i> 、 <i>Kdr</i> 、 <i>Gstp1</i> 、 <i>Gstm2</i> 、 <i>Gstm4</i> 、 <i>Gstm5</i>
胰岛素信号通路 Insulin signaling pathway	<i>Eif4e</i> 、 <i>Flot1</i> 、 <i>Flot2</i> 、 <i>Ppp1r3d</i> 、 <i>Pygl</i> 、 <i>Fasn</i> 、 <i>Ptpn1</i> 、 <i>Hk2</i> 、 <i>Hk3</i> 、 <i>Rps6</i> 、 <i>Mknk1</i> 、 <i>Shc1</i> 、 <i>Cblb</i>
细胞色素 P450 对异生素的代谢 Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	<i>Cyp2s1</i> 、 <i>Gstm7</i> 、 <i>Hsd11b1</i> 、 <i>Cyp2f2</i> 、 <i>Gstp1</i> 、 <i>Ephx1</i> 、 <i>Gstm2</i> 、 <i>Cbr1</i> 、 <i>Gstm4</i> 、 <i>Gstm5</i>
癌症途径 Pathway in cancer	<i>Sos1</i> 、 <i>Col4a1</i> 、 <i>Gnb4</i> 、 <i>Pten</i> 、 <i>Gstp1</i> 、 <i>Gstm7</i> 、 <i>Gstm2</i> 、 <i>Plcb1</i> 、 <i>Gnai1</i> 、 <i>Camk2a</i> 、 <i>Camk2g</i> 、 <i>Ednra</i> 、 <i>Gnb1</i> 、 <i>Fgf1</i> 、 <i>Gng5</i> 、 <i>Gstm4</i> 、 <i>Calml3</i> 、 <i>Rock</i> 、 <i>Gna11</i> 、 <i>Gstm5</i> 、 <i>Abl1</i> 、 <i>Tgfb1</i> 、 <i>Adcy2</i> 、 <i>Stat5a</i>

此,本研究探究 XFHZP 对 DH 的作用,并初步阐释其可能的机制。

目前,DH 动物病证结合模型没有公认的方法,多以模拟机体患病过程达到相应的临床表现。邪气自口鼻而入,侵袭上焦,模型多采用人工气候箱诱导^[18,20];饮食不当,阻至中焦,损伤脾胃,模型多以药物灌胃诱导^[37-38];邪气从上焦或中焦向下蔓延,停滞下焦,亦可由环境因素直接侵袭下焦,模型可采用多因素联合诱导^[39]。因此,本研究使用人工气候箱模拟湿热之邪,使邪气侵袭上焦入肺,并给予感染因子的方法建立病证结合模型。中医诊察和收集疾病有关资料的基本方法是“四诊”,即:望、闻、问、切。DH 多因外感湿热之邪,或久居湿地、嗜食肥甘厚腻,湿热内生,蕴结于肺。其主要临床表现为发热汗出不解,胸闷脘痞,咳嗽痰黄黏稠,苔黄腻,脉滑数等。湿热胶着,如油入面,难解难分,使得病情缠绵难愈。热邪灼伤肺津,导致肺失濡润,宣发肃降失司;湿邪困阻气机,阻碍肺气的宣畅,进一步加重肺部的病理变化,形成恶性循环^[40-43]。本研究结果显示,与 CON 组相比,DH 组大鼠全身表现烦躁、分散爬卧;局部表现耳背色红、血管充盈、爪

甲偏红;舌象表现为舌色红、舌面湿润多津;尿液色黄短赤;粪便粘腻、腊肠样。基于以上症状,中医辨证为“湿热证”^[21-23]。肺炎的西医诊断主要根据患者病史、症状和体征及辅助检查(X 线、痰培养、血液学检查)。本研究中,与 CON 组相比,DH 组大鼠肺指数均升高,提示肺组织可能存在炎症或水肿;肺功能检测结果表明 DH 组大鼠肺功能受损,确定以上病变导致肺部损伤;HE 染色观察到 DH 组大鼠肺组织有明显的炎症表现,进一步 ELISA 检测炎性因子均升高。基于以上检测结果,说明 DH 组大鼠肺组织均出现肺炎的表现。血常规显示,DH 组大鼠 WBC 均升高,表明大鼠肺部炎症引起全身性免疫反应。综上,本实验成功建立了病证结合大鼠模型。

宣肺化浊方是“甘肃方剂”系列方之一,由蜜麻黄、麸炒苍术、广藿香、羌活、陈皮、法半夏、前胡、黄芩、连翘以及酒大黄组成^[12],XFHZP 是经过提取与浓缩工艺精制而成的丸剂。在此方剂中,蜜麻黄为君药,宣通肺气,平喘止咳。苍术、广藿香与羌活作为臣药,起协同作用,既能健脾和胃,恢复其升降功能,消除湿浊,又能辅助肺气宣发与肃降,调和内外。陈皮、法半夏、前胡、黄芩与

连翘共同构成佐药,燥湿化痰,透散热邪,有效预防外邪入侵体内后转化为热邪的隐患。而酒大黄则作为使药,以促进肠道通畅,进而宣通肺气,实现上下气机调和。全方共奏清热化湿、宣肺化痰之效。本研究发现,XFHZP 可以恢复 DH 大鼠的一般表现、体质量及体温,并能改善肺指数及肺组织病理表现,并且可降低大鼠肺组织炎症因子(IL-6 及 TNF- α)的含量。这些结果与 LHQWG 治疗肺炎的结果相一致^[44-45]。血液学指标通常反应全身情况,WBC 等指标除了可以提示炎症之外,有研究表明肺炎患者热证程度与外周血 WBC 和 Gran 呈正相关^[27],Mon 趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)可作为热证的生物标记物^[28],血热证患者中 MPV 较健康组升高^[29],本实验研究结果表明 XFHZP 治疗 DH 大鼠的 WBC、Gran、Mon、MPV 恢复程度显著。

基于以上结果,本研究进一步采用蛋白质组学技术深入探讨 XFHZP 对 DH 大鼠的作用机制,提出 XFHZP 治疗 DH 的作用机制可能是通过 ROCK1 调控 cGMP-PKG 信号通路,以及通过 MKNK1 调控胰岛素信号通路来实现的。在临床研究中,ROCK1 抑制剂可以改善 COVID-19 相关肺炎患者的肺功能,减轻炎症反应^[46]。此外,ROCK1 的信号通路也被认为是治疗其他类型肺炎的潜在靶点^[47]。抑制 ROCK1 可以显著降低 MLC2 的磷酸化水平,从而减弱气道平滑肌的收缩反应^[32]。在病毒感染(如呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV))引起的肺炎中,MKNK1 的激活可以增强 eIF4E 的功能,从而促进与病毒相关蛋白质的合成,可能导致肺炎的加重^[48]。eIF4E 的表达水平与肺炎的严重程度呈正相关^[49]。MKNK1/2 的激活使 eIF4E 磷酸化水平升高可能与炎症有关^[50]。本研究通过免疫组化和 Western Blot 实验验证了 XFHZP 可通过抑制 ROCK1/MLC2 通路靶向 ROCK1,降低 MLC2 的磷酸化水平,从而减弱气道平滑肌的收缩反应;抑制 MKNK1/eIF4E 通路靶向 MKNK1,降低 eIF4E 的磷酸化水平,从而减少炎症因子的释放。结合 XFHZP 可缓解 DH 大鼠的 MV 水平,降低肺组织 IL-6 和 TNF- α ,说明 XFHZP 可能通过 ROCK1/MLC2 通路和 MKNK1/eIF4E 通路发挥“宣肺化浊”的功效。

综上所述,本研究证实了 XFHZP 对 DH 大鼠模型具有显著的治疗作用,其机制可能与 XFHZP 抑制 ROCK1/MLC2 通路以减少气道平滑肌收缩、抑制 MKNK1/eIF4E 以降低炎症因子水平有关。然而,本研究仍存在一定的局限性,仅从体内实验探究 XFHZP 对 DH 的作用机制,未开展体外细胞实验研究以验证,有待日后进一步开展相关实验研究以加强科学数据支撑。

参 考 文 献(References)

- [1] SUN Y, LI H, PEI Z, et al. Incidence of community-acquired pneumonia in urban China: a national population-based study [J]. *Vaccine*, 2020, 38(52): 8362-8370.
- [2] ALIBERTI S, DELA CRUZ C S, AMATI F, et al. Community-acquired pneumonia [J]. *Lancet*, 2021, 398(10303): 906-919.
- [3] WALKER C L F, RUDAN I, LIU L, et al. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea [J]. *Lancet*, 2013, 381(9875): 1405-1416.
- [4] BARREIRO C, BARREDO J L. Worldwide clinical demand for antibiotics: is it a real countdown? [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2296: 3-15.
- [5] 余学庆, 谢洋, 李建生. 社区获得性肺炎中医诊疗指南(2018 修订版)[J]. *中医杂志*, 2019, 60(4): 350-360.
YU X Q, XIE Y, LI J S. Guidelines for the diagnosis and treatment of community-acquired pneumonia (2018 revision) [J]. *J Tradit Chin Med*, 2019, 60(4): 350-360.
- [6] 林佳, 靳晓杰, 李程豪, 等. 敦煌医方大泻肺汤对肺炎的体外活性及其作用机制的化学生物信息学分析 [J]. *中国现代应用药学*, 2024, 41(7): 871-886.
LIN J, JIN X J, LI C H, et al. Analysis of *in vitro* activity and mechanism of Dunhuang yifang daxiefei decoction on pneumonia based on chemical bioinformatics [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2024, 41(7): 871-886.
- [7] World Health Organization. Ten health issues WHO will tackle this year [EB/OL]. [2019-01-16]. <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>.
- [8] HUANG M, LIU Y Y, XIONG K, et al. The role and advantage of traditional Chinese medicine in the prevention and treatment of COVID-19 [J]. *J Integr Med*, 2023, 21(5): 407-412.
- [9] 高国财, 葛国岚, 潘丹萍, 等. 肺宁排毒汤联合常规治疗对肺炎支原体大叶性肺炎患者的临床疗效 [J]. *中成药*, 2024, 46(1): 112-116.
GAO G C, GE G L, PAN D P, et al. Clinical effects of Feining Paidu Decoction combined with conventional treatment on patients with *Mycoplasma pneumoniae* lobar

- pneumonia[J]. Chin Tradit Pat Med, 2024, 46(1): 112-116.
- [10] 郭海, 赵晓峰, 皇玲玲, 等. 吴鞠通寒湿理论在呼吸系统疾病运用探析[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(9): 1355-1358.
- GUO H, ZHAO X F, HUANG L L, et al. Study on the application of WU Ju-Tong's cold and dampness theory in respiratory disease [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2021, 27(9): 1355-1358.
- [11] 宋忠阳, 雍文兴, 李娟, 等. 甘肃地区 60 例普通型新型冠状病毒肺炎患者中医证候规律分析[J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(7): 29-33.
- SONG Z Y, YONG W X, LI J, et al. Analysis on TCM syndrome rules of 60 cases of novel coronavirus pneumonia in Gansu area [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2020, 27(7): 29-33.
- [12] 史桐凡, 周谷城, 张利英, 等. 宣肺化浊加减方治疗新型冠状病毒肺炎 40 例临床疗效观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(16): 26-31.
- SHI T F, ZHOU G C, ZHANG L Y, et al. Clinical efficacy of Xuanfei Huazhuo prescription on 40 cases of COVID-19 [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2020, 26(16): 26-31.
- [13] 谢莹莹, 岳红梅, 王嘉琪, 等. 宣肺化浊加减方治疗甘肃省 223 例 *Omicron* 新冠感染的临床疗效[J]. 中华医院感染学杂志, 2023, 33(13): 1976-1980.
- XIE Y Y, YUE H M, WANG J Q, et al. Clinical efficacy of Xuanfei Huazhuo prescription in treatment of 223 patients with *Omicron* COVID-19 in Gansu Province [J]. Chin J Nosocomiology, 2023, 33(13): 1976-1980.
- [14] WANG P, CHEN Z. Traditional Chinese medicine ZHENG and Omics convergence: a systems approach to post-genomics medicine in a global world [J]. OMICS, 2013, 17(9): 451-459.
- [15] ABU-ASAB M S, CHAOUCHI M, ALESCI S, et al. Biomarkers in the age of omics: time for a systems biology approach [J]. OMICS, 2011, 15(3): 105-112.
- [16] 陆思丞, 程海波, 余成涛, 等. 基于蛋白质组学探讨仙连解毒方干预小鼠结直肠癌湿热瘀毒证模型的作用靶点及信号通路研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(8): 3067-3076.
- LU S C, CHENG H B, YU C T, et al. Study on the target and signaling pathway of Xian-Lian-Jie-du decoction in mouse model of colorectal cancer with damp-heat and stagnant toxin syndrome based on proteomics [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2022, 24(8): 3067-3076.
- [17] 陈奇. 中药药理研究方法学(第 2 版)[M]. 北京: 人民卫生出版社; 2006.
- CHEN Q. Methodology of pharmacological research of traditional Chinese medicine (2nd Edition) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House; 2006.
- [18] 赵荣华, 郭姗姗, 耿子涵, 等. 柴银颗粒对人冠状病毒肺炎湿热疫毒袭肺小鼠病证结合模型治疗及作用机制研究[J]. 中国药物警戒, 2021, 18(12): 1123-1128, 1154.
- ZHAO R H, GUO S S, GENG Z H, et al. Effects of Chai Yin Granules on the mouse model of the disease and syndrome of human coronavirus pneumonia caused by lung-attacking damp-heat epidemic virus [J]. Chin J Pharmacovigil, 2021, 18(12): 1123-1128, 1154.
- [19] 国家中医药管理局. 中医临床诊疗术语: 中医临床诊疗术语 第 2 部分: 证候 GB/T 16751.2-2021 [S]. 2021.
- National Administration of Traditional Chinese Medicine. Clinic terminology of traditional Chinese medical diagnosis and treatment—Part 2: syndromes/patterns GB/T 16751.2-2021 [S]. 2021.
- [20] 耿子涵, 鲍岩岩, 包蕾, 等. 葛根汤颗粒对人冠状病毒 229E 寒湿疫毒袭肺证病证结合小鼠肺炎模型的治疗作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(19): 34-41.
- GENG Z H, BAO Y Y, BAO L, et al. Therapeutic effect of gegentang granules on mouse model with hCoV-229E pneumonia and Hanshi Yidu xifei syndrome [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(19): 34-41.
- [21] 李威莹, 吴威, 孟岩, 等. 湿热证动物模型造模方法及评价研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(12): 4441-4451.
- LI W Y, WU W, MENG Y, et al. Study on modeling method and evaluation of animal model of damp-heat syndrome [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med, 2021, 23(12): 4441-4451.
- [22] 毕倩宇, 张桂菊, 崔有利, 等. 甘露消毒丹对湿热证型病毒性肺炎小鼠模型的多靶点干预作用[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(8): 1840-1844.
- BI Q Y, ZHANG G J, CUI Y L, et al. Multi-target intervention effect of Ganlu Xiaodu Dan on mouse model of viral pneumonia with damp-heat syndrome [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2019, 30(8): 1840-1844.
- [23] JIAO J, CHENG C S, XU P, et al. A mouse model of damp-heat syndrome in traditional Chinese medicine and its impact on pancreatic tumor growth [J]. Front Oncol, 2022, 12: 947238.
- [24] 孟岩, 李威莹, 吴威, 等. 寒湿证动物模型的研究现状与评述[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(7): 2579-2587.
- MENG Y, LI W Y, WU W, et al. Research status and review of animal models of cold-dampness syndrome [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med, 2022, 24(7): 2579-2587.

- [25] WU Y, DENG N, LIU J, et al. Alterations in intestinal microbiota and enzyme activities under cold-humid stress: implications for diarrhea in cold-dampness trapped spleen syndrome [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1288430.
- [26] 吴柏合, 于芳春, 谢桂元, 等. 六味补气方对慢性阻塞性肺疾病细胞焦亡的干预作用及机制研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2024, 44(5): 583-591.
- WU B H, YU F C, XIE G Y, et al. Effect and mechanism of Liuwei buqi formula on pyroptosis in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2024, 44(5): 583-591.
- [27] 张元兵, 刘良待, 李映霞, 等. 不同人群肺炎患者肺热证程度与外周血白细胞水平相关性的临床研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2008, 23(12): 1076-1078.
- ZHANG Y B, LIU L D, LI Y X, et al. Clinical study on correlation of leucocyte level of peripheral blood with degree of pyretic pulmonary syndrome in different bacterial pneumonia patients [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2008, 23(12): 1076-1078.
- [28] 陶嘉磊, 袁斌, 汪受传. 中医证候学研究的技术方法及其运用现状 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(7): 2982-2985.
- TAO J L, YUAN B, WANG S C. Technical methods and application status of traditional Chinese medicine syndrome research [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2018, 33(7): 2982-2985.
- [29] 王姗姗, 张晴, 杨素清, 等. 蜈蚣败毒饮对不同证型银屑病血小板参数影响相关性研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2020, 22(7): 86-89.
- WANG S S, ZHANG Q, YANG S Q, et al. Correlation study of Wugong Baidu Yin on platelet parameters of different syndrome types of psoriasis [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2020, 22(7): 86-89.
- [30] LIU D, XU W, TANG Y, et al. Nebulization of risedronate alleviates airway obstruction and inflammation of chronic obstructive pulmonary diseases via suppressing prenylation-dependent RAS/ERK/NF- κ B and RhoA/ROCK1/MLCP signaling [J]. *Respir Res*, 2022, 23(1): 380.
- [31] GAO J, TENG L, YANG S, et al. MNK as a potential pharmacological target for suppressing LPS-induced acute lung injury in mice [J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 186: 114499.
- [32] LU R A, ZEKI A A, RAM-MOHAN S, et al. Inhibiting airway smooth muscle contraction using pitavastatin: a role for the mevalonate pathway in regulating cytoskeletal proteins [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 469.
- [33] MATSUI Y, YASUMATSU I, YOSHIDA K I, et al. A novel inhibitor stabilizes the inactive conformation of MAPK-interacting kinase 1 [J]. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 2018, 74(3): 156-160.
- [34] World Health Organization. The top 10 causes of death [EB/OL]. [2024-08-07]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- [35] 余学庆, 李建生, 王至婉, 等. 中医药治疗肺炎临床随机对照试验的文献系统评价 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2009, 15(3): 229-233.
- YU X Q, LI J S, WANG Z W, et al. Quality assessment for randomized controlled trails of traditional Chinese medicinal herbs in the treatment of pneumonia [J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med*, 2009, 15(3): 229-233.
- [36] 刘东玲, 王浩嘉, 任伟钰, 等. 宣肺化浊方治疗新型冠状病毒感染肺炎的网络药理学分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(16): 40-49.
- LIU D L, WANG H J, REN W Y, et al. Pharmacological analysis of Xuanfei Huazhuo prescription in treatment of coronavirus disease-2019 [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2020, 26(16): 40-49.
- [37] 宋鹏程, 赵卫国, 王明丽, 等. 黄连胃舒汤对幽门螺杆菌相关性胃炎脾虚湿热证模型小鼠 mTOR 信号通路的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(19): 4818-4823.
- SONG P C, ZHAO W G, WANG M L, et al. Effect of Huanglian Weishu Decoction on mTOR signaling pathway in mice with *Helicobacter pylori*-associated gastritis with spleen deficiency and damp-heat syndrome [J]. *Chin J Gerontol*, 2023, 43(19): 4818-4823.
- [38] 张海凤, 吴水生. 小鼠寒证、热证模型建立的方法初探 [J]. *福建中医药*, 2023, 54(4): 42-44.
- ZHANG H F, WU S S. Preliminary study on the method of establishing the model of cold syndrome and heat syndrome in mice [J]. *Fujian J Tradit Chin Med*, 2023, 54(4): 42-44.
- [39] 黄灿灿, 毛海燕, 吉秀家, 等. 基于 TLR2/MyD88/NF- κ B 信号通路探讨加味少腹逐瘀汤对寒湿瘀结证子宫内膜异位症痛经小鼠腹腔炎症微环境干预作用 [J]. *中国药理学通报*, 2024, 40(4): 784-791.
- HUANG C C, MAO H Y, JI X J, et al. The intervention effect of Jiawei Shaofu Zhuyu decoction on peritoneal inflammatory microenvironment of dysmenorrhea mice with endometriosis of cold dampness and stasis syndrome based on TLR2/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2024, 40(4): 784-791.
- [40] 张子平, 臧国栋, 张才擎. 从湿热论治肺系疾病 [J]. *中医临床研究*, 2022, 14(29): 65-67.
- ZHANG Z P, ZANG G D, ZHANG C Q. Treating pulmonary disease from the aspect of damp-heat [J]. *Clin J Chin Med*, 2022, 14(29): 65-67.
- [41] 孙丹, 李新民, 韩耀巍, 等. 从湿热论治小儿肺炎喘嗽 [J]. *中医杂志*, 2017, 58(22): 1965-1967.

- SUN D, LI X M, HAN Y W, et al. Treating children's pneumonia and asthma from damp-heat [J]. J Tradit Chin Med, 2017, 58(22): 1965-1967.
- [42] 祝盼盼, 刘英锋. 国医大师伍炳彩教授从肺辨治湿热证临床经验 [J]. 四川中医, 2023, 41(7): 13-15.
- ZHU P P, LIU Y F. Chinese medicine master professor WU Bingcai clinical experience in treating dampness-heat syndrome from lung [J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2023, 41(7): 13-15.
- [43] 徐静. 湿热壅肺的证治探讨 [J]. 南京中医药大学学报, 2012, 28(2): 112-113.
- XU J. Exploration of damp-heat obstructing lung syndrome [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2012, 28(2): 112-113.
- [44] 樊凯芳, 王欢, 王腾岳, 等. 稀莖草水洗脱部位对人冠状病毒 hCoV-229E 感染小鼠的药效作用 [J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(6): 2879-2882.
- FAN K F, WANG H, WANG T Y, et al. Pharmacodynamic effects of *Siegesbeckia* water elution site on mice infected with human Corona virus hCoV-229E [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2024, 39(6): 2879-2882.
- [45] 张明惠, 米尔扎提·麦麦提, 郝梦, 等. 寒喘祖帕颗粒对甲型流感病毒 H1N1/PR8 株感染致小鼠肺炎的作用 [J]. 中成药, 2024, 46(9): 3154-3159.
- ZHANG M H, MIERZHATI M M T, HAO M, et al. Effect of Hanchuan zupa granule on pneumonia in mice infected by influenza a virus H1N1/PR8 strain [J]. Chin Tradit Pat Med, 2024, 46(9): 3154-3159.
- [46] LETIZIA M, WANG Y H, KAUFMANN U, et al. Store-operated calcium entry controls innate and adaptive immune cell function in inflammatory bowel disease [J]. EMBO Mol Med, 2022, 14(9): e15687.
- [47] CHEN Y, YU X, YAN Z, et al. Role of epithelial sodium channel-related inflammation in human diseases [J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1178410.
- [48] MCCALL M N, CHU C Y, WANG L, et al. A systems genomics approach uncovers molecular associates of RSV severity [J]. PLOS Computational Biology, 2021, 17(12): e1009617.
- [49] OSTASZEWSKI M, NIARAKIS A, MAZEIN A, et al. COVID19 disease map, a computational knowledge repository of virus-host interaction mechanisms [J]. Mol Syst Biol, 2021, 17(10): e10387.
- [50] DAVID E T, YOUSUF M S, MEI H R, et al. Ephrin-B2 promotes nociceptive plasticity and hyperalgesic priming through EphB2-MNK-eIF4E signaling in both mice and humans [J]. Pharmacol Res, 2024, 206: 107284.

[收稿日期] 2025-07-16

《中国实验动物学报》稿约

国内刊号 CN 11-2986/Q 国际刊号 ISSN 1005-4847 邮局代号 2-748

一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与动物实验相关的生命科学各分支学科,栏目设置包括研究报告、研究快报和进展与综述。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》(北大核心)等数据库收录。

二、投稿要求及注意事项

文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。文章字数在 6000 字之内。

投稿网址: <http://zgswdw.cnjournals.com/>

期待您的来稿!