DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.03.026

负载连翘酯苷A的HucMSC外泌体制备及其对急性肺损伤的作用机制

郭淑杰[1],谢淑敏[1],余海艳[2],陈朝华[1],常万顺[1],朱艳慧[1],吴灿[1],黄海英[1]
(1. 河南中医药大学药学院,河南 郑州 450046;2. 河南省儿童医院郑州儿童医院,河南 郑州 450018)

摘要:目的 制备负载连翘酯苷A(Forsythiaside A,FTA)的人脐带间充质干细胞(Human umbilical cord mesenchymal stem cells,HucMSC)外泌体(Exosomes,Exos),并基于鞘氨醇-1-磷酸(Sphingosine-1-phosphate,S1P)/磷脂酰肌醇3-激酶(Phosphatidylinositol 3-kinase,PI3K)/蛋白激酶B1(Protein kinase B1,AKT1)信号通路研究其对急性肺损伤(Acute lung injury,ALI)的作用机制。方法 提取HucMSC-Exos,制备FTA-Exos,并通过马尔文粒度分析仪、透射电子显微镜和蛋白质印迹(Western blot,WB)实验对其表征,高效液相色谱法测定FTA-Exos的载药量。通过脂多糖(Lipopolysaccharide,LPS)刺激人支气管上皮细胞(Human bronchial epithelioid cells,BEAS-2B)构建ALI细胞模型,将其分为对照组、模型组、FTA组和FTA-Exos组。激光共聚焦显微镜观察BEAS-2B对FTA-Exos的摄取效果。流式细胞术检测各组细胞中活性氧(Reactive oxygen species,ROS)水平。WB实验检测各组细胞中S1P、PI3K、AKT1蛋白表达水平。结果 HucMSC-Exos和FTA-Exos的粒径和形态均符合外泌体的生物学特征,且阳性表达标志蛋白热休克蛋白70(Heat shock protein 70,HSP70)、肿瘤易感基因101(Tumor susceptibility gene 101,TSG101)和白细胞分化抗原81(Cluster of differentiation 81,CD81),FTA-Exos载药量为(8.11±0.36)%。FTA-Exos可被BEAS-2B有效摄取,且荧光强度在4 h时显著增强。与对照组比较,ALI细胞模型组ROS水平和S1P、PI3K、AKT1蛋白表达水平均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,FTA组和FTA-Exos组ROS水平和S1P、PI3K、AKT1蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$,$P<0.01$)。结论 研究成功制备了FTA-Exos,并证明其可以通过影响ROS水平及S1P/PI3K/AKT1信号通路对ALI细胞模型起到调节作用,为FTA治疗ALI方向的开发应用提供了新思路。

关键词:连翘酯苷A;人脐带间充质干细胞外泌体;急性肺损伤;活性氧;S1P/PI3K/AKT1信号通路
中图分类号:R285.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)03-0144-09

Preparation of Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Loaded with Forsythoside A and Their Mechanism of Action in Acute Lung Injury

GUO Shujie[1],XIE Shumin[1],YU Haiyan[2],CHEN Zhaohua[1],CHANG Wanshun[1],ZHU Yanhui[1],WU Can[1],HUANG Haiying[1]
(1. School of Pharmacy,Henan University of Traditional Chinese Medicine,Zhengzhou 450046,Henna,China;
2. Henan Children's Hospital,Zhengzhou Children's Hospital,Zhengzhou 450018,Henna,China)

Abstract:*Objective* To prepare exosomes(Exos) derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells(HucMSC) loaded with Forsythoside A(FTA), and investigate their mechanism of action on acute lung injury(ALI) based on the sphingosine-1-phosphate(S1P)/phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)/protein kinase B1(AKT1) signaling pathway. *Method* HucMSC-Exos were extracted,FTA-Exos were prepared,and characterized through Malvern particle size analyzer,transmission electron microscope and Western blot(WB) experiments. The drug loading of FTA-Exos was determined by high-performance liquid chromatography. An ALI cell model was constructed by stimulating human bronchial epithelial cells(BEAS-2B) with lipopolysaccharide(LPS),and the cells were divided into a control group,a model group,an FTA group and an FTA-Exos group. The uptake effect of FTA-Exos by BEAS-2B cells was observed using laser confocal microscopy. Flow cytometry was used to detect the level of reactive oxygen species(ROS) in cells from each group. WB experiments were performed to detect the expression levels of S1P,PI3K and AKT1 proteins in cells of each group. *Results* The particle size and morphology of HucMSC-Exos and FTA-Exos both conformed to the biological characteristics of exosomes,and they positively expressed the marker proteins heat shock protein 70(HSP70),tumor susceptibility gene 101(TSG101) and cluster of differentiation 81

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81904021,82204736,82404876);河南省省级科技研发计划项目联合基金项目(222301420090);河南省"十四五"规划重点项目(2023JKZD16);河南中医药大学研究生科研创新能力提升计划项目(2023KYCX067)
作者简介:郭淑杰(1999-),女,河南新乡人,硕士在读,研究方向:中药新剂型的开发与应用。
通讯作者:黄海英(1979-),女,河南三门峡人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:中药新剂型的开发与应用。E-mail:huang.haiying@126.com。

(CD81). The drug loading of FTA – Exos was (8.11 ± 0.36)%. FTA – Exos could be effectively taken up by BEAS – 2B cells, and the fluorescence intensity was significantly enhanced at 4 hours. Compared with those in the control group, the levels of ROS and the expressions of S1P, PI3K and AKT1 proteins were significantly increased in the ALI cell model group ($P < 0.01$). In comparison with those in the model group, the levels of ROS and the expressions of S1P, PI3K and AKt1 proteins were significantly decreased in both the FTA group and the FTA – Exos group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). *Conclusion* The study successfully prepared FTA – Exos and demonstrated that they can regulate ALI cell models by affecting ROS levels and the S1P/PI3K/AKT1 signaling pathway, providing new ideas for the development and application of FTA in the treatment of ALI.

Keywords: Forsythiaside A; HucMSC – Exos; ALI; reactive oxygen species; S1P/PI3K/AKT1 signaling pathway

急性肺损伤(Acute lung injury, ALI)是一种临床常见的呼吸系统疾病,主要特征是肺顺应性降低、严重低氧血症和进行性缺氧性呼吸衰竭,创伤、感染和脓毒血症等多种病因均可导致ALI。目前临床治疗ALI以肺保护性通气为主,以肺血管扩张剂、糖皮质激素等药物治疗为辅[1-3]。尽管上述治疗方法能够对ALI起到一定治疗效果,但存在不同程度的毒副作用和局限性[4-5],因此迫切需要探寻安全高效治疗ALI的新方法。

连翘酯苷A(Forsythiaside A, FTA)是连翘的主要药效成分之一,具有抗炎、抗病毒、抗氧化及抑菌等多种药理活性[6-7]。多项研究表明,FTA具有抗炎和保护肺上皮屏障的作用,可通过调节PPAR – γ/RXR – α、STAT3等多种信号通路,对ALI起到治疗作用[8-10]。但药动学研究显示FTA在体内的消除速度较快,且FTA的低渗透性可能导致其口服生物利用度低,极大限制了其临床应用[11-12]。

外泌体(Exosomes, Exos)是一类具有磷脂双层膜结构,直径大小在30~150 nm的细胞外囊泡,能够介导细胞间信号传递和长距离的物质运输,可作为天然的药物载体[13-14]。LIN Q等[15]通过外泌体成功递送了西贝母碱,极大地增强了其抗肿瘤作用。另外,外泌体作为一种内源性物质,是细胞间通讯的重要载体,可参与调控机体多种生理病理过程,有着巨大的治疗潜力[16]。WILLIS G R等[17]研究表明人脐带间充质干细胞外泌体(Human umbilical cord mesenchymal stem cell – derived exosomes, HucMSC – Exos)能够促进改善肺纤维化、缓解肺血管重构,从而对肺损伤起到治疗作用。并且HucMSC因具有低免疫原性、低致瘤性、易获取性等优势可以作为外泌体的主要来源[18]。

鞘氨醇 – 1 – 磷酸(Sphingosine – 1 – phosphate, S1P)是脂质代谢的关键调节因子,参与调控细胞增殖与迁移、炎症反应和血管内皮屏障功能等多种细胞过程,已被证明与包括ALI在内的多种肺部疾病的发病机制有关[19-22]。近年来以S1P信号通路为靶点治疗肺部病变日益受到关注。磷脂酰肌醇3 – 激酶(Phosphatidylinositol 3 – kinase, PI3K)/蛋白激酶B1(Protein kinase B1, AKT1)信号通路是S1P信号转导的下游通路,有研究表明其通过抑制炎症和控制细胞凋亡,支持了细胞的存活和增殖[23]。并且PI3K/AKT1信号通路作为ALI的新型治疗靶点,具有广阔研究前景。

因此本研究采用HucMSC – Exos为载体,制备负载FTA的外泌体(Forsythiaside A – loaded exosomes, FTA – Exos),基于S1P/PI3K/AKT1信号通路探讨其治疗ALI的作用机制。

1 材料

1.1 细胞

HucMSC购自厦门逸漠生物科技有限公司,人支气管上皮细胞(Human bronchial epithelioid cells, BEAS – 2B)购自中国科学院细胞库。

1.2 主要试剂

FTA(成都普菲德生物技术有限公司,纯度≥98%,批号19011704),脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS,美国Sigma公司,批号L2880),CCK – 8试剂盒(美国GlpBio公司,批号GK10001),活性氧(Reactive oxygen species, ROS)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司,批号E – BC – K138 – F),热休克蛋白70(Heat shock protein 70, HSP70)、肿瘤易感基因101(Tumor susceptibility gene 101, TSG101)、白细胞分化抗原81(Cluster of differentiation 81, CD81)、GAPDH、HRP标记的羊抗兔IgG抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为10995 – 1 – AP、28283 – 1 – AP、27855 – 1 – AP、10494 – 1 – AP、PR30011),S1P抗体(英国Abcam公司,批号ab140592),PI3K、AKT1抗体(CST公司,批号分别为#4257、#2938)。

1.3 仪器

CP 80MX型超高速离心机(日本日立公司),Nano – ZS90型马尔文纳米粒度分析仪(英国马尔文仪器公司),JEM – 1400型透射电子显微镜(日本电子株式会社),C6型流式细胞仪(美国BD公司),LSM700型激光共聚焦显微镜(德国卡尔·蔡司股份有限公司),Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司)。

2 方法

2.1 HucMSC – Exos的提取

HucMSC采用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基进行常规培养,待细胞生长密度达到90%左右,更换为10%不含外泌体血清的DMEM/F12培养基继续培养,48 h后收集细胞上清液,4 ℃保存备用,用于提取HucMSC – Exos。

通过超高速离心结合超滤管法提取外泌体:将细胞上清液在4 ℃、300 × g条件下离心10 min,以除去细胞沉淀;于4 ℃、3000 × g条件下再次离心15 min,除去细胞碎片等微小颗粒沉淀;使用100 KD超滤管浓缩上清液,在4 ℃、2 000 × g条件下将上清液富集15~20倍;于4 ℃、15 000 × g条件下再次离心30 min,除去细胞大囊泡和蛋白,上清液过0.22 μm微孔滤膜;以4 ℃、120 000 × g条件离心70 min,PBS重悬,再次离心,所得沉淀即为纯化的外泌体,用PBS 200 μL重悬,于 – 80 ℃冰箱保存备用。

2.2 FTA – Exos的制备

超声孵育法制备FTA – Exos,取外泌体200 μg·mL^{-1}与FTA溶液200 μg·mL^{-1}混合冰浴超声,超声条件:功率50 W,超声时间5 s,间隙时间5 s,全程1 min循环,共循环6次,每次循环间隔2 min。超声后于37 ℃恒温培养箱中恢复1 h,4 ℃、120 000 × g离心70 min,去除上清中游离的FTA,用PBS 10 mL重悬,再次离心,PBS重悬即得。

2.3 外泌体的表征

2.3.1 动态光散射测定粒径 分别取 HucMSC - Exos 与 FTA - Exos 悬液 100 μL,超纯水稀释 10 倍,室温平衡 2 min 后,用马尔文激光纳米粒度仪检测其粒径,重复 3 次。

2.3.2 透射电子显微镜观察形态 取 HucMSC - Exos 与 FTA - Exos 悬液各 20 μL 滴加于铜网上,静置 2 min,1% 磷钨酸溶液负染 5 min,晾干后于透射电子显微镜下拍照记录其形态大小。

2.3.3 蛋白质印迹(Western blot,WB)实验检测外泌体标志蛋白 取 HucMSC、HucMSC - Exos 和 FTA - Exos 样本适量,加入 RIPA 裂解液,4 ℃、12 000 × g 条件下离心 10 min,提取蛋白,二奎琳甲酸(Bicinchoninic acid,BCA)法进行蛋白定量。加入蛋白样品上样缓冲液,于 100 ℃金属浴加热 10 min 变性。取 20 μg 蛋白样品,进行电泳、转膜、洗涤封闭,分别结合一抗(HSP70、TSG101、CD81 和 GAPDH 稀释倍数均为 1∶2000)于 4 ℃冰箱过夜,洗涤,室温下结合二抗(稀释倍数为 1∶5000)孵育 2 h 后,洗涤,ECL 显影液显影,用化学发光成像仪拍照记录蛋白条带。

2.4 FTA - Exos 中 FTA 的含量测定

2.4.1 色谱条件 YMC - triart C_{18} 色谱柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm),流动相:A(甲醇) - B(0.1% 磷酸水),等度洗脱:0 ~ 14 min,A∶B = 43∶57,流速 0.8 mL · min^{-1},柱温 30 ℃,进样量 10 μL,检测波长 230 nm。

2.4.2 标准品溶液的制备 精密称定 FTA 标准品 5 mg 于 5 mL 容量瓶中,甲醇溶解定容,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得 1 mg · mL^{-1} 的 FTA 标准品母液,4 ℃冰箱保存备用。

2.4.3 供试品溶液的制备 分别取 HucMSC - Exos 与 FTA - Exos 悬液 100 μL,4 ℃、120 000 × g 条件下离心 70 min,去除上清,加入等体积甲醇破乳,再次离心 10 min,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.4.4 专属性考察 精密吸取 FTA 标准品溶液、HucMSC - Exos 及 FTA - Exos 供试品溶液各 10 μL,进样检测。

2.4.5 FTA - Exos 载药量的测定 取“2.4.2”项下 FTA 标准品母液,分别配制浓度为 8、16、32、64、128 和 256 μg · mL^{-1} 的 FTA 标准品溶液,进样检测,绘制标准曲线。取 FTA - Exos 供试品溶液 100 μL,进样检测 FTA 含量,计算载药量。载药量(%) = $W_1/W_2 \times 100\%$,其中,W_1 为包封的 FTA 总质量;W_2 为 FTA - Exos 的蛋白总质量。

2.4.6 稳定性考察 将 FTA - Exos 分别置于 4 ℃和 37 ℃环境下,测定其粒径变化,连续测定 7 d。

2.5 体外细胞摄取实验

将 BEAS - 2B 以 5×10^4 细胞/孔的密度接种于 24 孔板中,待细胞贴壁后,加入 PKH67 标记的 FTA - Exos 共孵育 2、4、6 h,孵育完成后用 4% 多聚甲醛固定 10 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。每孔加入 DAPI 染色液 300 μL 孵育 10 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。滴加抗荧光淬灭封片液 1 μL 封片,使用激光共聚焦显微镜观察。

2.6 CCK - 8 法检测细胞活力

将 BEAS - 2B 以 5×10^4 细胞/孔的密度接种于 96 孔板中,分别与质量浓度分别为 0、50、100、150、200 μg · mL^{-1} 的 HucMSC - Exos 溶液及质量浓度分别为 0、5、10、20、50、100、200 μmol/L 的 FTA 溶液,于 37 ℃,5% CO_2 恒温培养箱中共孵育 24 h,按照 CCK - 8 试剂盒说明书检测 HucMSC - Exos 和 FTA 的细胞毒性,并分别计算 HucMSC - Exos 和 FTA 各浓度下 BEAS - 2B 的细胞活力。

2.7 流式细胞术检测细胞 ROS 水平

将 BEAS - 2B 分为对照组、模型组、FTA 组和 FTA - Exos 组,以 3.75×10^5 细胞/孔的密度种于 6 孔板中。待细胞贴壁后,模型组用 LPS 10 μg · mL^{-1} 处理 12 h 后[14],采用 DCFH - DA 探针避光孵育 30 min;给药组用 LPS 处理 6 h 后分别加入 FTA 和 FTA - Exos,6 h 后采用 DCFH - DA 探针避光孵育 30 min,孵育完成后,1000 × g 离心 5 min 收集细胞,用 PBS 洗涤 3 次,去除游离的 DCFH - DA 探针,再次离心,PBS 重悬,检测细胞 ROS 水平。

2.8 WB 实验检测 S1P/PI3K/AKT1 信号通路相关蛋白表达

将 BEAS - 2B 分为对照组、模型组、FTA 组、FTA - Exos 组及 FTY720 组(Fingolimod hydrochloride,S1P 抑制剂,作为本研究的阳性对照)。以 3.75×10^5 细胞/孔的密度种于 6 孔板中,待细胞贴壁后加药处理,6 h 后提取总蛋白,同“2.3.3”项下操作步骤。S1P、PI3K、AKT1 和 GAPDH 蛋白稀释倍数均为 1∶2000,二抗稀释倍数为 1∶5000。

2.9 统计学方法

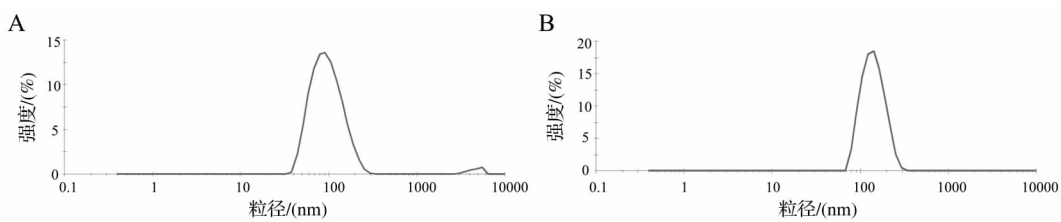
使用 GraphPad Prism 8.0 软件对实验结果进行单因素方差分析(One - way ANOVA),计量数据采用平均值 ± 标准偏差($\bar{x} \pm s$)表示,$P < 0.05$ 表明具有统计学意义。

3 结果

3.1 外泌体的表征

3.1.1 粒径分布 采用马尔文激光纳米粒度仪检测 HucMSC - Exos 和 FTA - Exos 的粒径,结果(图 1)显示,HucMSC - Exos 粒径为(87.99 ± 1.33)nm,且粒径分布呈单峰正态分布,PDI 为 0.209 ± 0.003,外泌体分散性良好;FTA - Exos 在载药后粒径略有增大,粒径为(123.10 ± 1.91)nm,PDI 为 0.243 ± 0.016,符合外泌体生物学特征。

3.1.2 形态结构 透射电子显微镜结果(插页XLⅦ图 2)显示,HucMSC - Exos 和 FTA - Exos 粒径大小均在 30 ~ 150 nm 范围内,具有明显的茶托样双层膜结构。



注:A. HucMSC - Exos;B. FTA - Exos。

图 1 HucMSC - Exos 和 FTA - Exos 的粒径

3.1.3 标志蛋白表达 WB 实验结果(图 3)显示,HucMSC - Exos 和 FTA - Exos 均阳性表达标志蛋白 HSP70、TSG101 和 CD81,且表达量明显高于细胞,载药对外泌体标志蛋白表达无影响。

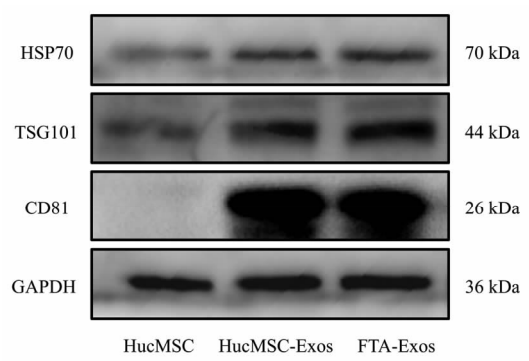
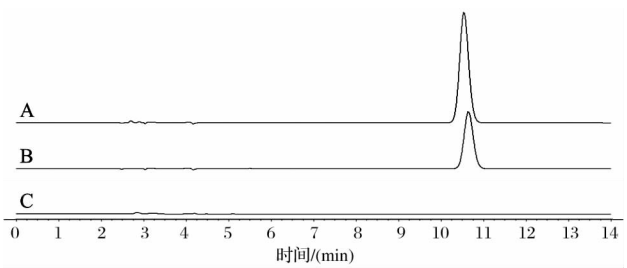


图 3 外泌体标志蛋白 HSP70、TSG101 和 CD81 的表达情况

3.2 FTA - Exos 中 FTA 的含量测定

3.2.1 FTA - Exos 的专属性 高效液相色谱(High performance liquid chromatography,HPLC)结果(图 4)显示,HucMSC - Exos 在 FTA 和 FTA - Exos 的色谱峰保留时间点无色谱峰信号,表明 HucMSC - Exos 对 FTA 的测定无干扰,样品专属性良好。



注:A. FTA;B. FTA - Exos;C. HucMSC - Exos。

图 4 FTA、FTA - Exos 和 HucMSC - Exos 的色谱图

3.2.2 FTA - Exos 的载药量 FTA 标准曲线的线性回归方程为 $Y = 18.079X - 37.037$($R^2 = 0.9996$),且 FTA 浓度在 8 ~ 256 μg·mL^{-1}范围内与峰面积线性关系良好。通过计算得到 FTA - Exos 溶液中 FTA 的质量为(16.226 ± 1.074)μg,载药量为(8.11 ± 0.36)%。

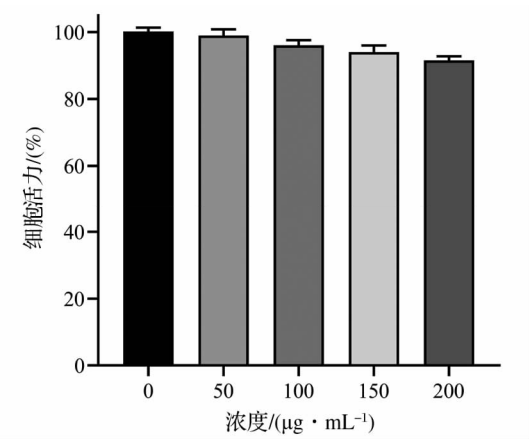
3.2.3 FTA - Exos 的稳定性 稳定性结果(插页Ⅻ图 5)显示,一周内 FTA - Exos 在 4 ℃和 37 ℃条件下的粒径仍在外泌体定义范围内,表明 FTA - Exos 稳定性良好。

3.3 BEAS - 2B 对外泌体的摄取

激光共聚焦观察结果(插页Ⅻ图 6)显示,DAPI 标记的细胞核呈蓝色,PKH67 标记的 FTA - Exos 的绿色荧光清晰可见,Merge 图中绿色荧光的 FTA - Exos 均匀分布在蓝色的细胞核周围。由图可知,BEAS - 2B 摄取荧光强度在 4 h 时显著增强,表明 FTA - Exos 可以被 BEAS - 2B 有效摄取,且在 4 ~ 6 h 能在细胞内稳定维持。

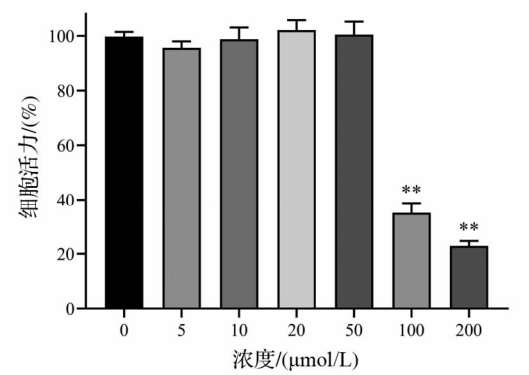
3.4 HucMSC - Exos 和 FTA 对 BEAS - 2B 细胞活力的影响

采用 CCK - 8 法检测 HucMSC - Exos 和 FTA 对 BEAS - 2B 的细胞毒性,结果(图 7、图 8)显示,HucMSC - Exos 浓度在 50 ~ 200 μg·mL^{-1}范围内,BEAS - 2B 细胞活力均大于 90%,表明 HucMSC - Exos 对细胞无明显毒性作用。FTA 浓度在 0 ~ 50 μmol/L 范围内,BEAS - 2B 细胞活力无明显变化。与对照组比较,浓度为 100 μmol/L 和 200 μmol/L 时,BEAS - 2B 细胞活力显著降低($P < 0.01$),细胞状态发生改变。综合考虑,选择 50 μmol/L 作为 FTA 给药浓度进行后续实验。



注:HucMSC - Exos 0 μg·mL^{-1}为对照组。

图 7 不同浓度 HucMSC - Exos 对 BEAS - 2B 细胞活力的影响($n = 4$, $\bar{x} \pm s$)



注:FTA 0 μmol/L 为对照组。**与对照组比较,$P < 0.01$。

图 8 不同浓度 FTA 对 BEAS - 2B 细胞活力的影响($n = 4$, $\bar{x} \pm s$)

3.5 FTA 和 FTA - Exos 对 LPS 诱导的 BEAS - 2B 中 ROS 水平的影响

ROS 水平测定结果(图 9)显示,与对照组比较,模型组 ROS 水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,FTA 组和 FTA - Exos 组 ROS 水平显著降低($P < 0.01$),趋于正常水平。

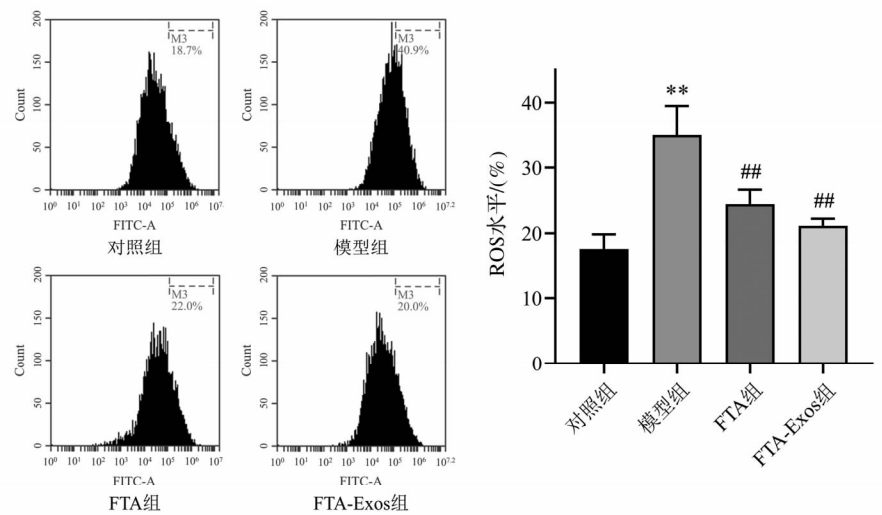
3.6 FTA 和 FTA - Exos 对 S1P/PI3K/AKT1 信号通路相关蛋白表达的影响

WB 实验结果(图 10)显示,与对照组比较,模型组的 S1P、PI3K 及 AKT1 蛋白表达水平均显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,FTA 组和 FTA - Exos 组 S1P、PI3K 及 AKT1 蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),有恢复到对照组水平的趋势。

4 讨论

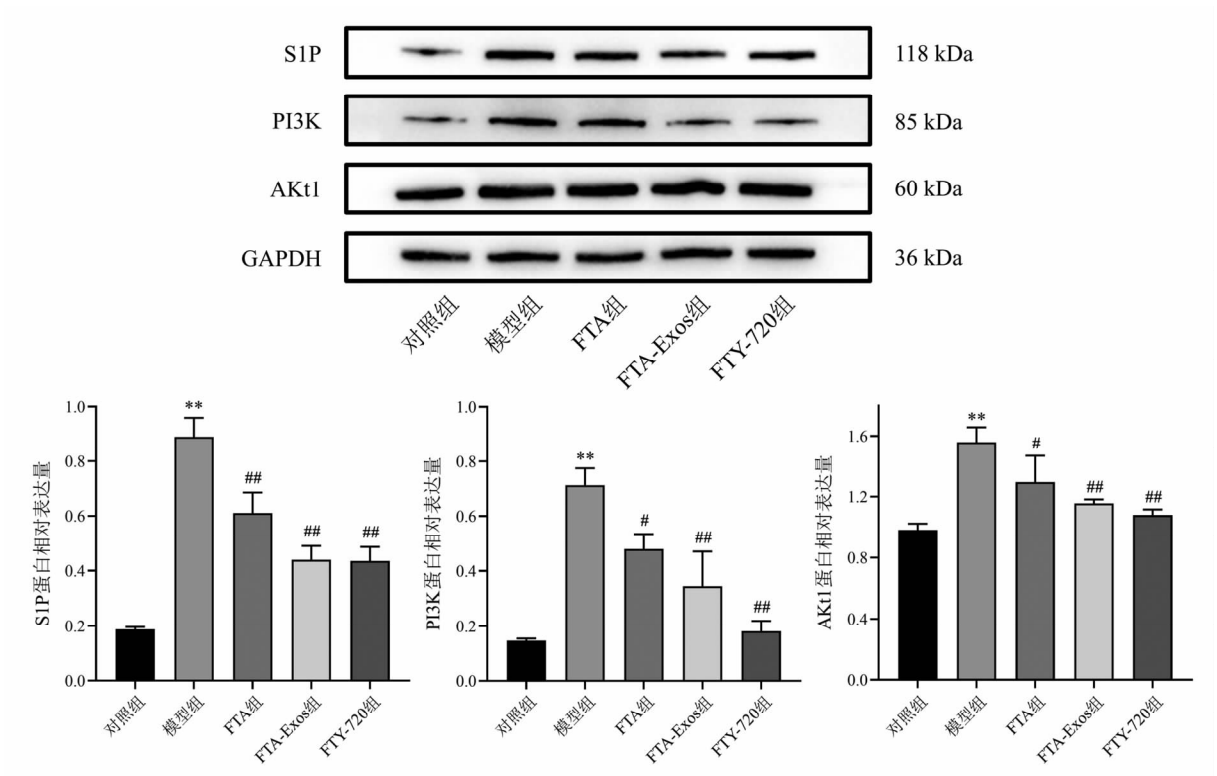
ALI 是以肺泡上皮细胞及血管内皮细胞损伤、肺水肿为主要病理表现的一种疾病,其病理机制复杂且临床治疗手段有限,因此寻找针对 ALI 的有效药物和治疗方法尤为重要。

连翘清热解毒,常用于治疗肺系疾病,对 ALI 具有良好的治疗效果[5,24]。FTA 作为连翘的主要活性成分之一,可通过调节多种信号通路对ALI起到治疗作用,WANG J等[25]的研究



注：**与对照组比较，$P<0.01$；##与模型组比较，$P<0.01$。

图9 流式细胞术检测各组BEAS-2B中ROS表达情况（$n=4$，$\bar{x}\pm s$）



注：**与对照组比较，$P<0.01$；#与模型组比较，$P<0.05$；##与模型组比较，$P<0.01$。

图10 各组BEAS-2B中S1P、PI3K及AKT1蛋白表达水平（$n=4$，$\bar{x}\pm s$）

发现，RNF99是ALI的重要生物标志物，FTA可通过调节RNF99/TRAF6/NF-κB信号通路明显改善ALI。但FTA具有较高的脂溶性，在机体内稳定性较差，极大地影响了其吸收效率，进而限制了FTA在临床应用中的潜力[26]。此外，外泌体作为一种内源性的纳米载体，因其良好的生物相容性、可修饰性以及能够跨越生物膜屏障的能力，被广泛应用于药物递送和基因治疗等前沿领域[27-28]。基于此，本研究将FTA与外泌体相结合，制备FTA-Exos，并对其进行表征，考察FTA-Exos在细胞模型中的吸收效果，旨在为ALI的治疗开辟新思路。

鞘磷脂（Sphingomyelin，SM）是生物膜组成中重要成分之一，与多种肺部疾病密切相关，SIP是SM的关键代谢产物，其在高浓度时，能够促进IL-6、TNF-α等炎症因子的释放，从而加剧炎症反应；而低浓度时，则会导致肺毛细血管壁通透性增加，进而引发肺水肿等症状[29-30]。多项研究表明，S1P与IL-6表达上调之间存在显著关联，并且S1P可通过与S1PR2结合并激活S1P信号下游的PI3K/AKT1通路，从而缓解TNF-α诱导的炎症反应[31-32]。本课题组前期对连翘抗炎活性研究发现，连翘可通过影响ALI模型大鼠SM代谢水平治疗ALI[33]，因此，我们推测FTA-Exos有可能通过SIP/PI3K/AKT1通路来对ALI产生影响，所以本实验以SIP/PI3K/AKT1

通路为靶点,研究 FTA – Exos 治疗 ALI 的药效机制。

本研究通过超高速离心结合超滤管法提取 HucMSC – Exos,低温超声孵育制备 FTA – Exos。表征结果显示,HucMSC – Exos 和 FTA – Exos 均符合外泌体的结构和生物学特征。HPLC 测得 FTA – Exos 载药量为(8.11 ± 0.36)%,且在一周内稳定性良好。激光共聚焦结果表明,FTA – Exos 可以被 BEAS – 2B 有效摄取,表明外泌体可以作为药物载体将 FTA 有效递送至细胞内。过度的氧化应激会导致 ROS 生成增多,是 ALI 的重要特征[34]。本研究采用流式细胞仪检测不同组细胞的 ROS 水平,结果显示,与模型组比较,FTA 组和 FTA – Exos 组 ROS 水平显著降低($P < 0.01$),趋于正常水平。进一步对比 FTA 组与 FTA – Exos 组发现,FTA – Exos 组的 ROS 水平更加接近正常组,表明 FTA – Exos 在调节氧化应激方面具有更优的性能。有研究表明,ROS 能直接介导氧化应激,导致肺部氧化损伤进而引起脂质损伤[35]。S1P 作为一种多效应脂质介质,其水平与肺部的氧化应激和炎症水平呈正相关[36]。因此,我们推测 FTA – Exos 可能通过 S1P/PI3K/AKT1 信号通路缓解 ALI 导致的过度氧化应激。WB 实验结果显示,FTA 和 FTA – Exos 给药后,S1P、PI3K 及 AKT1 蛋白表达水平均有恢复到对照组水平的趋势,表明 FTA 和 FTA – Exos 可通过 S1P/PI3K/AKT1 信号通路对 ALI 起到治疗作用。这与本团队前期研究结果“连翘可通过脂质代谢调节 ALI 导致的炎症反应”相契合[30]。此外,相较于 FTA 组,FTA – Exos 组 SIP、PI3K 及 AKT1 蛋白表达恢复到对照组水平的趋势更为显著。综合 WB 实验结果与 ROS 水平测定结果,我们推测将 FTA 转化为 FTA – Exos 后,其生物活性和吸收效果得到了显著增强,从而提高了其治疗效果。

综上所述,本研究成功制备了 FTA – Exos,并发现其可以通过影响 BEAS – 2B 内的 ROS 水平及 S1P/PI3K/AKT1 信号通路对 LPS 诱导的 ALI 起到调节作用。本研究将外泌体与连翘活性成分 FTA 结合以改善应用,为外泌体在药物递送系统方面的应用提供了参考,也为 FTA 治疗 ALI 方向的开发应用提供了新思路。但由于受到外泌体提取量的限制,本研究只进行到体外部分,未能考察 FTA – Exos 药物递送系统在体内的作用,后续需要进一步深入研究。

参考文献

[1] LIU C, XIAO K, XIE L X. Advances in the regulation of macrophage polarization by mesenchymal stem cells and implications for ALI/ARDS treatment[J]. Front Immunol, 2022, 13: 928134.
[2] TOMAZINI B M, MAIA I S, CAVALCANTI A B, et al. Effect of dexamethasone on days alive and ventilator – free in patients with moderate or severe acute respiratory distress syndrome and COVID – 19: the CoDEX randomized clinical trial [J]. Jama, 2020, 324 (13): 1307.
[3] LIU C, XIAO K, XIE L X. Advances in the use of exosomes for the treatment of ALI/ARDS[J]. Front Immunol, 2022, 13: 971189.
[4] KLOMPAS M. Ventilator – associated events: what they are and what they are not[J]. Respir Care, 2019, 64(8): 953 – 961.
[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] 王越欣,王梅,李宁,等. 连翘抗炎活性成分及作用机制研究进展[J]. 中华中医药学刊,2022,40(1):115 – 120.
[7] GONG L H, WANG C, ZHOU H L, et al. A review of pharmacological and pharmacokinetic properties of Forsythiaside A[J]. Pharmacol Res, 2021, 169: 105690.
[8] WANG J, LUO L, ZHAO X T, et al. Forsythiae Fructuse extracts alleviates LPS – induced acute lung injury in mice by regulating PPAR – γ/RXR – α in lungs and colons[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 293: 115322.
[9] LU Z B, YANG H Y, CAO H H, et al. Forsythoside A protects against lipopolysaccharide – induced acute lung injury through up – regulating microRNA – 124[J]. Clin Sci, 2020, 134(19): 2549 – 2563.
[10] LU Z B, LIU S H, OU J Y, et al. Forsythoside A inhibits adhesion and migration of monocytes to type Ⅱ alveolar epithelial cells in lipopolysaccharide – induced acute lung injury through upregulating miR – 124[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2020, 407: 115252.
[11] WANG G N, PAN R L, LIAO Y H, et al. An LC – MS/MS method for determination of forsythiaside in rat plasma and application to a pharmacokinetic study [J]. J Chromatogr B, 2010, 878 (1): 102 – 106.
[12] ZHOU W, DI L Q, WANG J, et al. Intestinal absorption of forsythoside A in *in situ* single – pass intestinal perfusion and *in vitro* Caco – 2 cell models[J]. Acta Pharmacol Sin, 2012, 33 (8): 1069 – 1079.
[13] LIU W Z, MA Z J, LI J R, et al. Mesenchymal stem cell – derived exosomes: therapeutic opportunities and challenges for spinal cord injury[J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 102.
[14] SUN M, ZHANG H, LIU J Y, et al. Extracellular vesicles: a new star for gene drug delivery [J]. Int J Nanomed, 2024, 19: 2241 – 2264.
[15] LIN Q, QU M K, ZHOU B J, et al. Exosome – like nanoplatform modified with targeting ligand improves anti – cancer and anti – inflammation effects of imperialine[J]. J Control Release, 2019, 311 – 312: 104 – 116.
[16] CHEN Y X, DENG Z H, GAO X, et al. Exosomes derived from mesenchymal stromal cells exert a therapeutic effect on hypoxia – induced pulmonary hypertension by modulating the YAP1/SPP1 signaling pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 168: 115816.
[17] WILLIS G R, REIS M, GHEINANI A H, et al. Extracellular vesicles protect the neonatal lung from hyperoxic injury through the epigenetic and transcriptomic reprogramming of myeloid cells[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2021, 204(12): 1418 – 1432.
[18] ALI PATEL A, MOHAMED A H, RIZAEV J, et al. Application of mesenchymal stem cells derived from the umbilical cord or Wharton's jelly and their extracellular vesicles in the treatment of various diseases[J]. Tissue Cell, 2024, 89: 102415.
[19] EBENEZER D L, FU P F, NATARAJAN V. Targeting sphingosine – 1 – phosphate signaling in lung diseases[J]. Pharmacol Ther, 2016, 168: 143 – 157.
[20] NATARAJAN V, DUDEK S M, JACOBSON J R, et al. Sphingosine – 1 – phosphate, FTY720, and sphingosine – 1 – phosphate receptors in the pathobiology of acute lung injury[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013, 49(1): 6 – 17.
[21] HUANG L S, SUDHADEVI T, FU P F, et al. Sphingosine kinase 1/S1P signaling contributes to pulmonary fibrosis by activating hippo/YAP pathway and mitochondrial reactive oxygen species in lung fibroblasts[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(6): 2064.
[22] KHAN S A, GOLIWAS K F, DESHANE J S. Sphingolipids in lung pathology in the coronavirus disease era: a review of sphingolipid involvement in the pathogenesis of lung damage[J]. Front Physiol, 2021, 12: 760638.

DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.03.027

定喘汤对小儿咳嗽变异性哮喘(风热袭肺证)中医证候积分、气道功能的影响

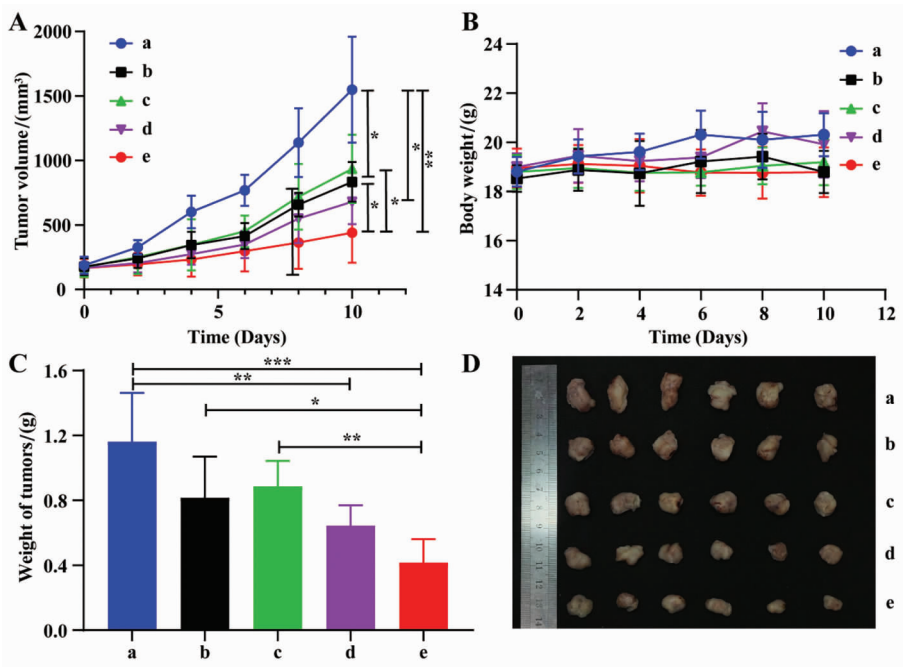
陈允[1],高国鹏[2],邱立志[3],王锦[1]
(1.南阳医学高等专科学校第一附属医院,河南 南阳 473000;2.厦门市湖里区妇幼保健院,福建 厦门 361000;
3.广东省人民医院珠海医院,广东 珠海 519090)

摘要:目的 研究定喘汤对小儿咳嗽变异性哮喘(风热袭肺证)患儿中医证候积分、气道功能的影响。方法 选取2023年10月—2024年2月医院治疗的小儿咳嗽变异性哮喘(风热袭肺证)患儿120例,根据随机数表法均分为两组,每组60例,对照组患儿采用孟鲁司特钠治疗,观察组患儿在对照组基础上增加定喘汤治疗,两组疗程均为2个月。比较两组患儿的疗效,中医证候积分、气道功能参数、炎症因子、不良反应发生情况。结果 观察组总有效率98.33%,显著高于对照组的86.67%($P<0.05$)。治疗后,两组主要中医证候喘促气粗、咳嗽咯痰、胸闷烦躁、舌红苔黄积分均显著降低,并且观察组以上各项积分均显著低于对照组[(1.84±0.33)分、(2.01±0.75)分、(1.62±0.28)分、(1.83±0.26)分 vs (2.40±0.56)分、(2.42±0.68)分、(2.05±0.31)分、(2.04±0.39)分]($P<0.05$)。治疗后,第一秒用力呼气量占预计值百分比(percentage of forced expiratory volume in one second,FEV1%)、用力呼出50%肺活量呼气流量(forced expiratory flow at 50% of FVC ex haled,FEF50)、用力呼出75%肺活量呼气流量(forced expiratory flow at 50% of FVC ex haled,FEF75)均显著升高,并且观察组以上各项指标显著高于对照组[(85.24±7.91)%、(1.86±0.46)L/s、(0.91±0.20)L/s vs (82.30±6.55)%、(1.69±0.37)L/s、(0.82±0.15)L/s]($P<0.05$)。治疗后,两组超敏C反应蛋白(hypersensitive C-reactive protein,hs-CRP)、白细胞介素(interleukin,IL)-17、IL-23均显著降低,并且观察组以上各项指标显著低于对照组[(7.08±1.12)mg/L、(67.38±7.89)ng/L、(21.36±2.70)ng/L vs (10.31±1.67)mg/L、(71.41±6.59)ng/L、(26.08±2.59)ng/L]($P<0.05$)。两组均无严重不良反应发生。结论 定喘汤对小儿咳嗽变异性哮喘(风热袭肺证)患儿疗效显著,能够更有效地缓解各种中医证候,并降低气道炎症反应、改善气道功能,安全性良好,值得应用。

关键词:咳嗽变异性哮喘;风热袭肺证;小儿;定喘汤;孟鲁司特钠;气道功能
中图分类号:R256.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-7717(2026)03-0150-04

基金项目:国家中医药管理局中医药行业科研项目(2020567389)
作者简介:陈允(1988-),女,河南南阳人,主治医师,硕士,研究方向:小儿呼吸、消化系统疾病。

[23] LUO X,LIN B,GAO Y G,et al. Genipin attenuates mitochondrial-dependent apoptosis,endoplasmic reticulum stress,and inflammation *via* the PI3K/AKT pathway in acute lung injury[J]. Int Immunopharmacol,2019,76:105842.
[24] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2020:177-178.
[25] WANG J,XIN L Y,WANG H C,et al. Forsythiaside A alleviates acute lung injury *via* the RNF99/TRAF6/NF-κB signaling pathway[J]. Int Immunopharmacol,2024,140:112814.
[26] LI J J,CHEN Z H,LIU C J,et al. The phytochemistry,pharmacology,pharmacokinetics,quality control,and toxicity of Forsythiae Fructus:an updated systematic review[J]. Phytochemistry,2024,222:114096.
[27] KIM H I,PARK J,ZHU Y,et al. Recent advances in extracellular vesicles for therapeutic cargo delivery[J]. Exp Mol Med,2024,56(4):836-849.
[28] WEI B H,HUANG H N,CAO Q,et al. Bibliometric and visualized analysis of the applications of exosomes based drug delivery[J]. Biomed Pharmacother,2024,176:116803.
[29] LIN W C,LIN C F,CHEN C L,et al. Inhibition of neutrophil apoptosis *via* sphingolipid signaling in acute lung injury[J]. J Pharmacol Exp Ther,2011,339(1):45-53.
[30] KARAM M,AUCLAIR C. Sphingosine-1-phosphate as lung and cardiac vasculature protecting agent in SARS-CoV-2 infection[J]. Int J Mol Sci,2023,24(17):13088.
[31] ZHAO S S,ADEBIYI M G,ZHANG Y J,et al. Sphingosine-1-phosphate receptor 1 mediates elevated IL-6 signaling to promote chronic inflammation and multitissue damage in sickle cell disease[J]. FASEB J,2018,32(5):2855-2865.
[32] LIU Y,TIE L. Apolipoprotein M and sphingosine-1-phosphate complex alleviates TNF-α-induced endothelial cell injury and inflammation through PI3K/AKT signaling pathway[J]. BMC Cardiovasc Disord,2019,19(1):279.
[33] 李康,吕田田,崔荣洽,等. 基于血清代谢组学探讨青翘、老翘对急性肺损伤大鼠的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2024,30(18):89-97.
[34] 史梦迪,王超,由亚非,等. 中医药调控线粒体氧化应激治疗肺部炎症性疾病研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2024,30(14):249-258.
[35] 苑萌,董慧文,刘佳丽,等. 麻黄水提物减轻脂多糖诱导急性肺损伤的作用及机制研究[J]. 湖南中医药大学学报,2023,43(12):2185-2190.
[36] CHEN L,LI L L,SONG Y,et al. Blocking SphK1/S1P/S1PR1 signaling pathway alleviates lung injury caused by sepsis in acute ethanol intoxication mice[J]. Inflammation,2021,44(6):2170-2179.

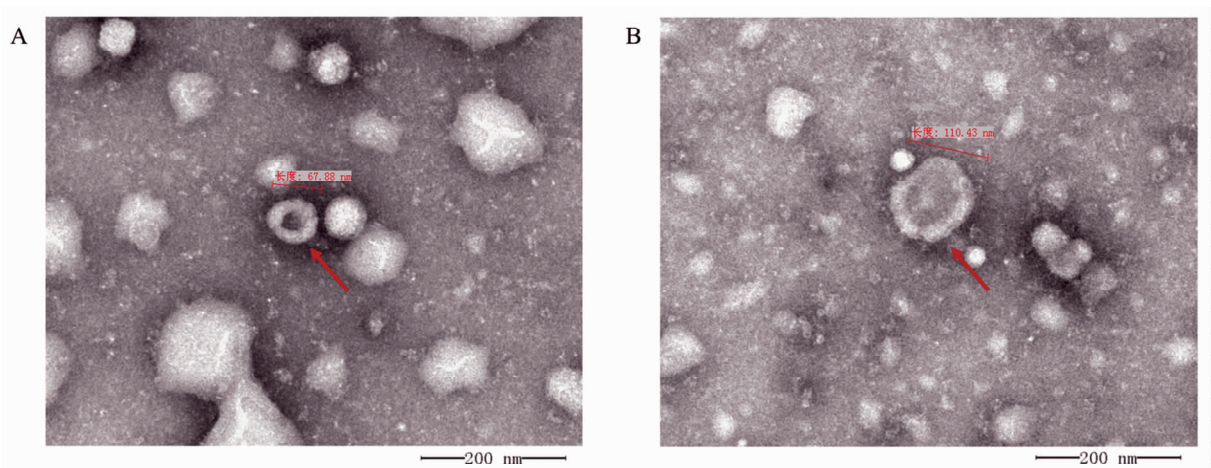


注：(A)4T1 荷瘤小鼠肿瘤体积变化曲线($n=6$)，$*P<0.05$，$**P<0.01$；(B)荷瘤小鼠体质量变化曲线($n=6$)；(C)荷瘤小鼠肿瘤质量测量结果($n=6$)，$*P<0.05$，$**P<0.01$，$***P<0.001$；(D)荷瘤小鼠离体肿瘤实物($n=6$)。实验组别：空白组(a)、姜黄素原料药组(b)、槲皮素原料药组(c)、姜黄素－槲皮素物理混合组(d)、Cur－Que NPs 组(e)

图 6　体内药效学

负载连翘酯苷 A 的 HucMSC 外泌体的制备及其对 ALI 的作用机制

(正文见 144－150 页)



注：A. HucMSC－Exos；B. FTA－Exos。

图 2　HucMSC－Exos 和 FTA－Exos 的形态

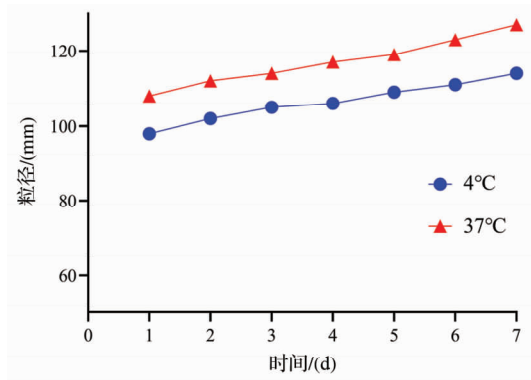


图 5　FTA – Exos 在 4 ℃和 37 ℃条件下随时间的粒径变化

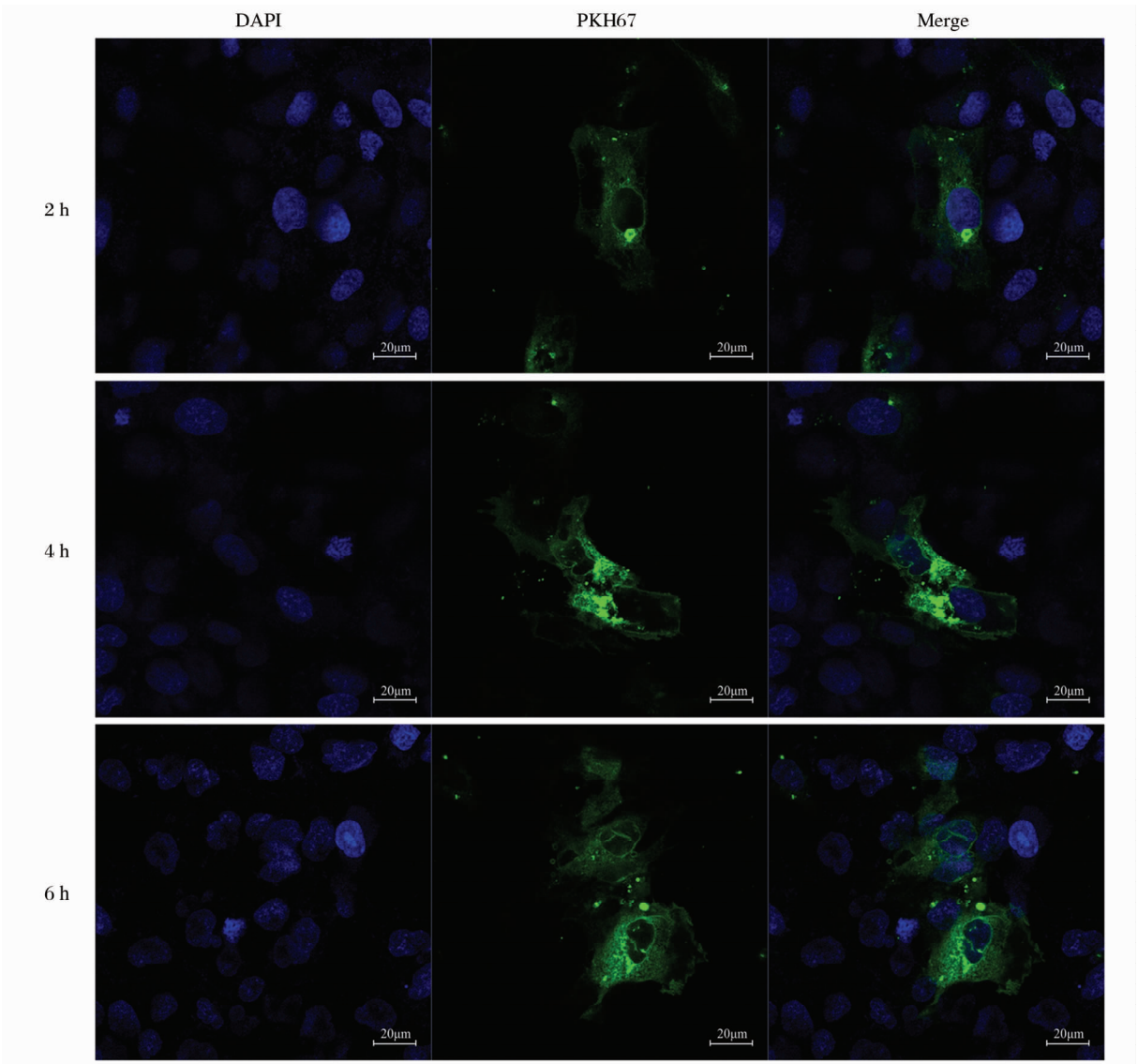


图 6　BEAS – 2B 对 FTA – Exos 的摄取情况(PKH67 染色)