

杨宗统,徐东川,刘瑾,等. 基于非靶向代谢组学和肠道菌群探究经典名方泻白散对过敏性哮喘大鼠的保护作用[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(2): 177-189.

YANG Z T, XU D C, LIU J, et al. Protective effect of Xiebaisan on allergic asthma in rats based on non-targeted metabolomics and intestinal bacterial flora [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(2): 177-189.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.02.005

基于非靶向代谢组学和肠道菌群探究经典名方 泻白散对过敏性哮喘大鼠的保护作用

杨宗统^{1,2}, 徐东川², 刘瑾², 李晓晶², 张会敏², 王雯慧^{1*}, 隋在云^{2*}

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070; 2. 山东省中医药研究院中药药理研究所, 济南 250014)

【摘要】 目的 本研究拟从宿主-肠道菌群-代谢的角度探讨泻白散保护过敏性哮喘大鼠可能的微观机制。**方法** 将 SPF 级 SD 大鼠分为正常对照组(NC 组)、过敏性哮喘模型组(M 组)和泻白散组(Xiebaisan 组)。通过卵清白蛋白(OVA)诱导建立大鼠过敏性哮喘模型;HE 染色观察大鼠肺组织病理学变化;取结肠内容物进行 16S rDNA 高通量测序,观察肠道菌群结构与功能的变化;采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱法(UHPLC-Q-TOF/MS)分别进行血清样本和肺组织样本非靶向代谢组学检测。**结果** HE 染色显示:与 NC 组相比,Xiebaisan 组可以在一定程度上改善哮喘大鼠肺部组织形态结构;16S rDNA 高通量测序结果显示:M 组肠道菌群多样性降低,与 M 组相比,Xiebaisan 组肠道菌群多样性增加,肠道微生态得以改善;血清非靶向代谢组学检测结果显示:Xiebaisan 组能够调节氨基酸代谢、mTOR 等通路,且部分回调 M 组引起的差异代谢物表达;肺组织样本非靶向代谢组学检测结果显示,Xiebaisan 组能够调节碳代谢、血管平滑肌收缩信号通路和 cAMP 等信号通路,且部分回调 M 组引起的差异代谢物表达。**结论** 泻白散可能通过改善肺组织形态结构、肠道菌群的多样性以及调控 mTOR 通路、血管平滑肌收缩信号通路和 cAMP 等信号通路影响氨基酸代谢、碳代谢等途径发挥对过敏性哮喘大鼠的保护作用。

【关键词】 泻白散;过敏性哮喘;肠道菌群;非靶向代谢组学;保护机制

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 02-0177-13

Protective effect of Xiebaisan on allergic asthma in rats based on non-targeted metabolomics and intestinal bacterial flora

YANG Zongtong^{1,2}, XU Dongchuan², LIU Jin², LI Xiaojing², ZHANG Huimin², WANG Wenhui^{1*}, SUI Zaiyun^{2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. Institute of Pharmacology of Traditional Chinese Medicine, Shandong Academy of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

Corresponding author: WANG Wenhui. E-mail: wwh777@126.com; SUI Zaiyun. E-mail: zy_505@163.com

【基金项目】 山东省重大科技创新工程项目(2018CXGC1301),山东省中医药科技项目(2021Q126),山东省重点研发计划(2016GSF202013),齐鲁医派中医学学术流派传承项目。

Funded by the Major Science and Technology Innovation Project in Shandong Province (2018CXGC1301), Shandong Province Traditional Chinese Medicine Technology Project (2021Q126), Key R&D Plan of Shandong Province (2016GSF202013), Qilu School of Traditional Chinese Medicine Academic School Inheritance Project.

【作者简介】 杨宗统,男,在读博士研究生,助理研究员,研究方向:中药免疫药理及药效学研究。Email:YangZT2021@163.com

【通信作者】 王雯慧,教授,博士生导师,研究方向:动物黏膜免疫学、黏膜免疫病理学与动物疾病病理学。

Email:wwh777@126.com;

隋在云,研究员,硕士生导师,研究方向:中药及其有效成分作用机制及安全性评价研究。

Email:zy_505@163.com。

* 共同通信作者

[Abstract] Objective To explore the possible mechanism of Xiebaian in protecting against allergic asthma in rats from the perspective of host intestinal flora metabolism. **Methods** SPF SD rats were divided into normal group (NC group), model group (M group), and Xiebaian group. The allergic asthma rat model was established by ovalbumin. Changes in lung histopathology were observed by HE staining. Colon contents were harvested for 16S rDNA high-throughput sequencing to assess changes in the intestinal flora structure and function. Serum and lung tissue samples were collected for non-targeted metabolomics by Ultra-high performance liquid-time-of-flight mass spectrometer. **Results** HE staining showed some improvement of lung histomorphology in asthmatic rats in the Xiebaian group compared with that in the M group. 16S rDNA high-throughput sequencing showed that the diversity of intestinal flora was decreased in the M group and increased in the Xiebaian group compared with the M group, the microecosystem of intestinal was improved. Non-targeted metabolomics of serum showed regulation of amino acid metabolism and the mTOR pathway in the Xiebaian group, and partially reversed differential metabolite expression in the M group. Non-targeted metabonomics of lung tissue samples showed regulation of carbon metabolism, vascular smooth muscle and cAMP signaling pathways in the Xiebaian group, and partially reversed differential metabolite expression in the M group. **Conclusions** The protective effects of Xiebaian on allergic asthma in rats may be related to improvement of the morphological structure of lung tissue, the diversity of intestinal flora, and regulation of mTOR, vascular smooth muscle contraction, and cAMP pathways, which affect amino acid and carbon metabolism.

[Keywords] Xiebaian; allergic asthma; intestinal bacterial flora; non-targeted metabolomics; protective mechanisms

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

当前社会随着人们生活质量的改善,环境的清洁程度也有了大幅度的提升,过于清洁的环境,导致人们的免疫能力得不到应有的锻炼,因此过敏性疾病的发病率也随之提高,过敏性哮喘尤为明显。过敏性哮喘是哮喘中最常见的一种类型,是由 Th2 淋巴细胞和固有淋巴样细胞介导的慢性气道炎症,机体发病时产生 IL-4、IL-5 和 IL-13 等 II 型细胞因子^[1-2],是典型的 II 型炎症反应,主要特征为气道高反应性、气道重塑、大量嗜酸性粒细胞浸润和杯状细胞粘液分泌增加^[3-4]。

泻白散出自于宋代名医钱乙所著的《小儿药证直诀》,组方为:桑白皮、地骨皮、甘草、粳米,煎七分,食前服;据原书记载,既可治疗肺实热证,也可治疗肺虚热证;2018 年国家中医药管理局公布了中药经典名方目录,泻白散名列其中^[5-7]。泻白散在临床诊疗中常用于感染性咳嗽、哮喘等气道疾病,目前在过敏性哮喘治疗中也常有使用,但其具体的保护作用机制并不清楚。

肠道菌群是定植于人体肠道的正常微生物,与机体具有共生关系,种类丰富、数量多。有证据表明,超过 50 种疾病与肠道菌群失调有关,例如许多传染病、过敏性疾病、胃肠道恶性肿瘤、肝病和代谢紊乱等^[8]。传统中药由于给药方式多为口服,因此其发挥作用是否与调节肠道菌群相关,也是目前中药研究讨论的热点^[9]。代谢组学是新兴的组学技

术之一,对于已定性、定量的代谢物通过生物信息学分析可得出显著差异性代谢产物及其参与的生物学过程,这对疾病的发生发展机制的探究以及药物的作用机制阐述奠定了坚实基础。本研究应用非靶向代谢组学和肠道菌群分析从宿主-肠道菌群-代谢的角度探究泻白散对过敏性哮喘大鼠模型的保护作用机制,为泻白散治疗哮喘的临床应用提供实验数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

30 只 6 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,160 ~ 200 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】。饲养期间各组大鼠自由饮食饮水,每 12 h 明暗交替,湿度控制在 40% ~ 70%,温度控制在 22 ~ 25 ℃,饲养于山东省食品药品检验研究院动物实验室【SYXK(鲁)2018-0013】。所有涉及动物的实验程序均经山东省中医药研究院实验动物福利与伦理委员会批准(SDZYY20181201005)。

1.1.2 药物

泻白散药物:桑白皮购自亳州京皖饮片有限公司,产品批号:190901,产自亳州;地骨皮购自浙江中医药大学饮片厂,产品批号:191101,产自甘肃;甘草

购自四川中药饮片厂,产品批号:190704,产自新疆。所需药材均由山东省中医药研究院林慧彬研究员鉴定为正品。

1.1.3 主要试剂与仪器

氢氧化铝凝胶(40 mg/mL)购自美国 Thermo 公司,批号:UJ289214;卵清白蛋白购自美国 Sigma 公司,批号:1003004472。BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Sparkjade, EC0001);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(Sparkjade, EE0012);Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer (New England Biolabs, M0531S);Phusion[®] High-Fidelity DNA polymerase(New England Biolabs, M0530S);DNA 纯化回收试剂盒(TianGen, DP214);建库试剂盒(Illumina, E7370L);乙腈(Fisher Chemical, 4L A955-4);乙酸铵(Fluka, 17836-50G);甲醇(Fisher Chemical, 4L A452-4);氨水(Sigma, 221228-500ML)。

高速冷冻离心机(VELOCITY 18R;Dynamica, 德国);微孔板分光光度计(EPOCH;BioTek, 美国);电子天平(BSA224S-C;W Sartorius, 德国);封闭式自动组织脱水机(Excelsior AS;ThermoFisher Scientific, 美国);组织包埋机(HistoStar;ThermoFisher Scientific, 美国);轮转式切片机(531CM-Y43;Leica, 德国);Bio-rad T100 梯度 PCR 仪(T100;Bio-Rad, 美国);基因测序仪(Novaseq 6000;Illumina, 美国);液-质联用仪 Agilent 1290 Infinity LC/AB Triple TOF 6600;Agilent/AB SCIEX, 美国);色谱柱(ACQUITY UPLC BEH Amide 1.7 μm ; Waters, 美国) 2.1 mm $\times$ 100 mm。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备及给药

30 只雄性 SD 大鼠适应性饲养 1 周之后,按体重随机均等分为正常对照组(NC 组)、过敏性哮喘(Bronchial asthma)模型组(M 组)和泻白散组(Xiebaisan 组)。M 组和 Xiebaisan 组大鼠在适应性饲养 1 周后于第 7 天和第 14 天均腹腔注射药液 1 mL(OVA 1 mg + 氢氧化铝凝胶 10 mg),NC 组注射生理盐水。从第 21 天开始每天喷雾 1% OVA,连续喷雾激发 2 周,每次 30 min,NC 组喷雾生理盐水。从雾化期开始时(第 21 天)给药,参考本课题组前期实验,泻白散用药剂量为 11.3 g/kg。雾化前 30 min, Xiebaisan 组大鼠灌胃给予泻白散,NC 组和 M 组灌胃给予生理盐水。

1.2.2 泻白散水提物的制备

称取泻白散各单味药饮片:炒桑白皮(30 g)、地骨皮(30 g)、炒甘草(3 g),加入 10 倍量水,浸泡 1 h,加热回流提取 1 h,滤过,再加 8 倍量水加热回流提取 1 h,滤过,合并两次滤液,浓缩至 2 g/mL(1 mL 含 2 g 原药材)。

1.2.3 样本采集及处理

所有大鼠在第 36 天取材,麻醉前 12 h 禁食不禁水,腹腔注射 1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,麻醉后剖开腹部,充分暴露腹主动脉,取血 5 mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机中 3000 r/min 离心 10 min,取上清液置于液氮中保存。取左肺上叶置于 4%的多聚甲醛中固定,右肺上叶置冻存管中冻存于液氮中,备用。取肠道内容物:用无菌解剖刀,在无菌状态下取出整个肠道;在无菌操作台内切取结肠部位,用无菌手术刀挖取内容物,立即放在冰上进行分装并标记;分装好后立即进行液氮速冻,置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.4 肺组织形态学观察

将固定充分的左肺上叶进行常规脱水、包埋、切片,HE 染色后于显微镜下观察。

1.2.5 肠道内容物 16S rDNA 扩增子测序

采用 CTAB 方法从结肠内容物中提取总 DNA,并对 DNA 的纯度和浓度进行检测。通过 16S rDNA 扩增子测序(16S rDNA amplicon sequencing)方法,检测各组大鼠肠道菌群变化情况,实验方法参考前期研究基础处理^[10]。

1.2.6 UHPLC-Q-TOF/MS 血清和肺组织样本非靶向代谢组学分析

采用 UHPLC-Q-TOF/MS 技术对血清和肺组织样本分别进行代谢物提取、质谱分析和数据处理,实验方法参考前期研究基础处理^[10]。

1.3 统计学分析

所有数据以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 21.0 和 GraphPad Prism 9.0 进行数据分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析;以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组别大鼠肺组织病理变化

各组大鼠肺组织 HE 染色结果如图 1 所示,NC 组大鼠支气管及肺泡结构完整,肺内支气管为单层纤毛柱状上皮结构,肺泡腔呈空泡状薄壁结构,肺泡间隔正常,炎症细胞浸润少见;M 组大鼠可见明

显的肺泡塌陷,间隔增宽,部分肺泡扩张,肺泡间实变区较正常肺泡间隔面积明显扩大,支气管腔狭窄,粘膜上皮中杯状细胞增多,且支气管周围出现大量的炎性细胞浸润;与 M 组相比,Xiebaisan 组大鼠支气管有少量炎症细胞浸润,管腔内分泌物很少,肺泡间隔较 M 组明显减小。说明 Xiebaisan 组可以在一定程度改善哮喘大鼠肺部组织形态结构。

2.2 不同组别大鼠肠道菌群多样性分析

通过 16S rDNA 测序方法对各个组别收获的肠道内容物进行菌群多样性分析。本次实验各组间 PcoA 分析(图 2A)显示 M 组与 NC 组和 Xiebaisan 组在主坐标 1(PC1)上相距较远(图 2B),说明 M 组与 NC 组和 Xiebaisan 组间菌群组成有较大差异。另外对各组数据进行 Alpha 多样性分析,绘制大鼠肠道菌群的 Shannon 指数(图 2C)和 Chao1 指数(图 2D)箱线图,显示出 M 组 Shannon 指数和 Chao1 指数均显著降低($P < 0.001$),且 Xiebaisan 组与 M 组相比,菌群多样性指标 Shannon 指数和 Chao1 指数均有所回调,表明 M 组降低肠道菌群多样性,泻白散能改善 M 组肠道菌群多样性。属水平菌群 STAMP 差异分析(图 2E,2F)表明 M 组增加了 *g_Romboutsia* 和 *g_Candidatus Saccharimonas* 丰度,降低了 *g_Hgcclade* 菌、*g_Peptococcus*、*g_Achromobacter*

的丰度,Xiebaisan 组能够显著降低 *g_Romboutsia* 丰度,上调 *g_Collinsella*、*g_Jeotgalicoccus*、*g_Altererythrobacter*、*g_Spirochaeta2* 等的丰度。

2.3 不同组别大鼠血清样本非靶向代谢组学分析

本次实验 UHPLC-Q-TOF/MS 的 QC 样本相关性(皮尔森)均高于 0.9(图 3A,3B)。质量控制实验表明,本次实验的仪器分析系统稳定性较好,可用于后续分析。

本次大鼠血清样本非靶向代谢组学正离子(Pos)模式下鉴定出代谢物 609 种,负离子(Neg)模式下鉴定出代谢物 384 种。本次实验 PCA 分析结果(图 3C,3D)表明正、负离子模式下,NC 组、M 组和 Xiebaisan 组代谢特征是能够进行区分,且各自组内样本无明显离散点,组内平行性好。对 M 组与 NC 组正、负离子模式下检出的代谢物分别进行 OPLS-DA 分析(图 3E,3F),模型评价指标 Q^2 分别为 0.894 和 0.827;对 Xiebaisan 组与 M 组正、负离子模式下检出的代谢物分别进行 OPLS-DA 分析(图 3G,3H),模型评价指标 Q^2 分别为 0.883 和 0.894,表明 OPLS-DA 分析模型较好,可用于后续分析。结合统计学 T-Test 筛选的 P 值和多维统计学 OPLS-DA 分析得到的 VIP 值,以 $P < 0.05$,VIP > 1 作为显著性差异代谢物筛选的标准。M 组与 NC 组显著差异代谢物共有 175 种(Pos 150 种,Neg 25 种),

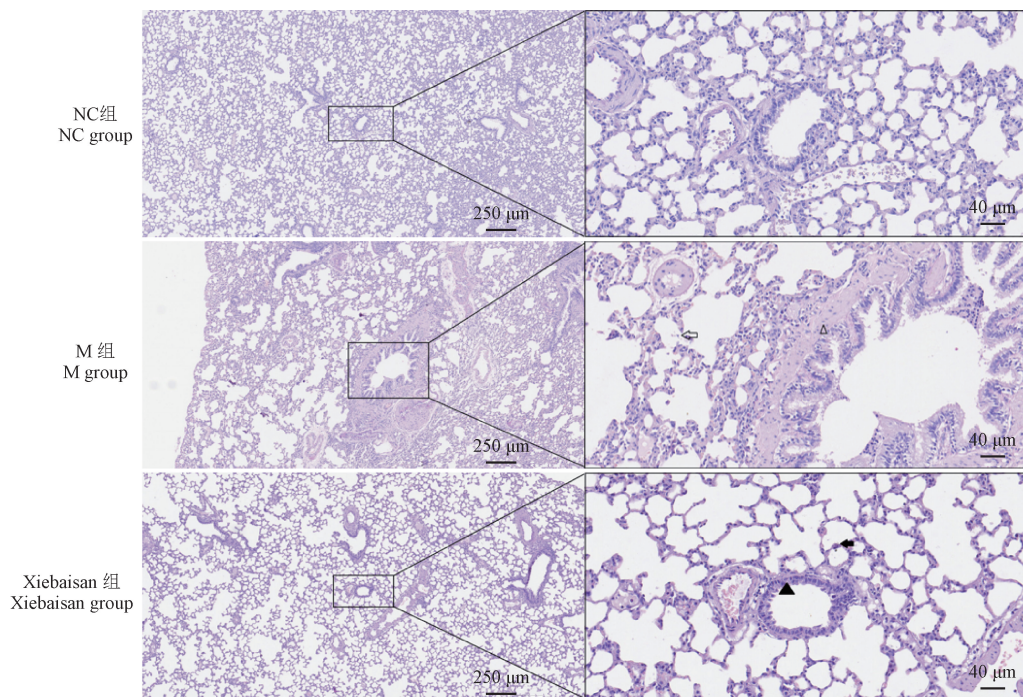
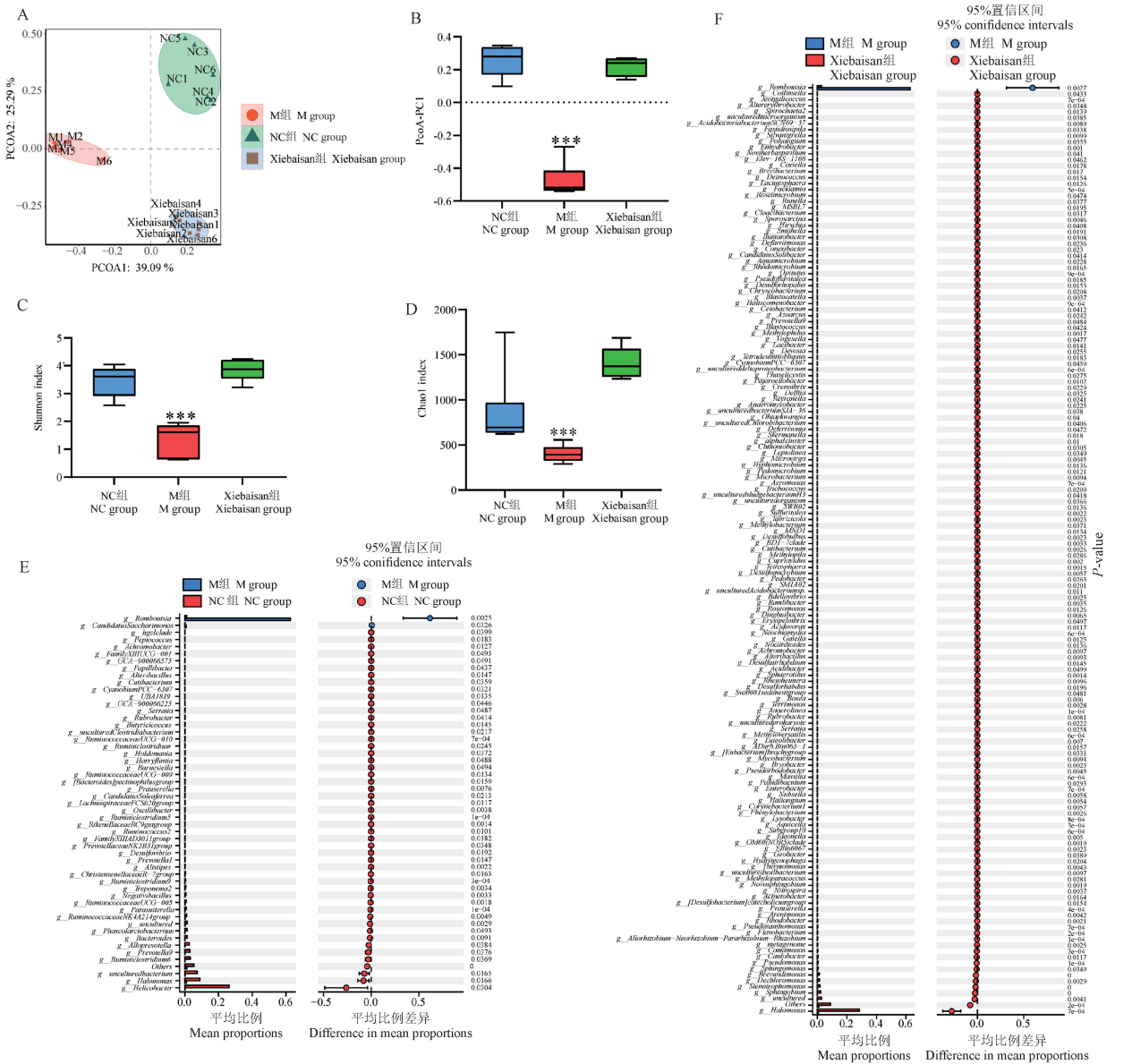


图 1 不同组大鼠肺组织病理学

Figure 1 Pathology of lung tissue of rats in different groups



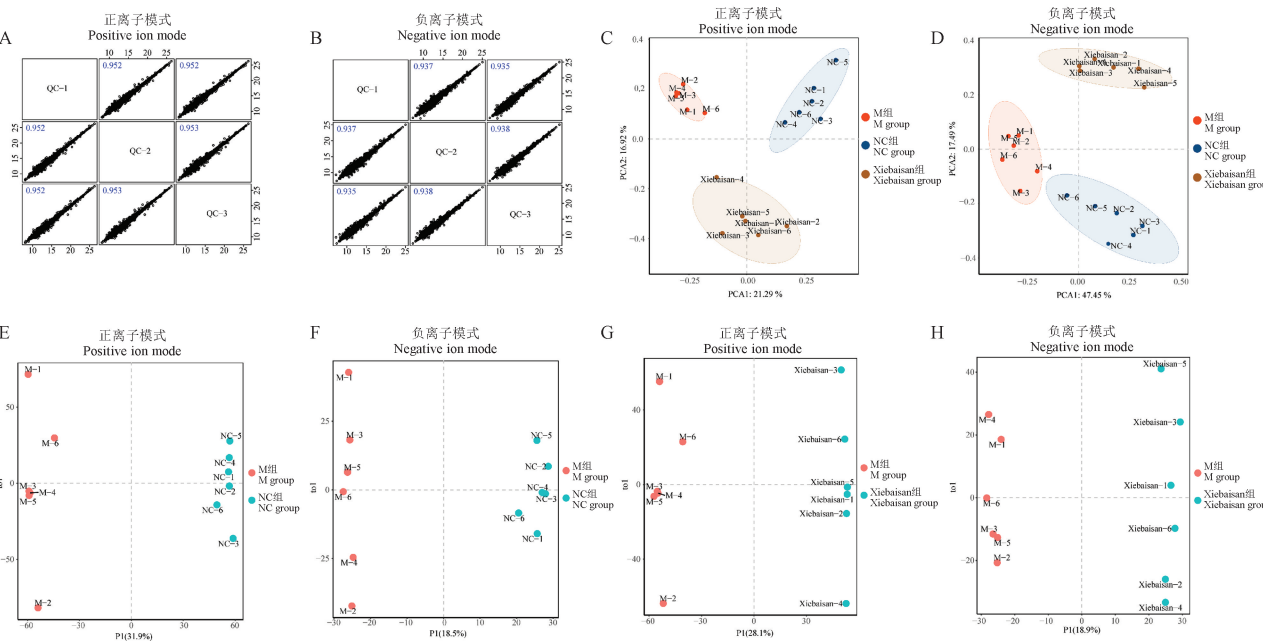
注:A:每组样本的PcoA分析;B:PcoA中的PC1分析;C:Shannon指数分析;D:Chao1指数分析;E:M组与NC组STAMP差异分析;F:Xiebaisan组与M组STAMP差异分析;与M组相比,***P<0.001。

图2 大鼠肠道菌群的多样性($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Note. A. PcoA analysis of samples in each group. B. PC1 analysis in PcoA. C. Shannon index analysis. D. Chao1 index analysis. E. Analysis of STAMP difference between M group and NC group. F. Analysis of STAMP difference between Xiebaisan group and M group. Compared with M group, *** P < 0.001.

表1为筛选出的大鼠血清样本M组与NC组显著差异代谢物排名前10的代谢物列表。Xiebaisan组与M组显著差异代谢物共有180种(Pos有154种,Neg有26种),表2为大鼠血清样本Xiebaisan组与M组显著差异代谢物排名前10的代谢物。

对鉴定到的代谢物进行KEGG通路富集分析,结果显示:M组与NC组显著差异代谢物KEGG功能富集主要在蛋白质消化与吸收、碳代谢、氨基酸的生物合成、氨酰基转运RNA生物合成、ABC转运体等信号通路(图4A)。Xiebaisan组与M组显著差异代谢物KEGG功能富集主要在蛋白质消化与吸收、ABC转运体、氨基酸的生物合成、氨酰基转运RNA生物合成、矿物质吸收等信号通路(图4B)。其中在蛋白质消化与吸收通路中,发现两个比较组在该通路共有8个显著差异代谢物,对这8个代谢的表达量分析(图4C),结果显示泻白散能够逆转



注:A,B:正、负离子模式下血清 QC 样品的相关性分析;C,D:正、负离子模式下血清样品 PCA 分析;E,F:正、负离子模式下 M 组和 NC 组血清样品的 OPLS-DA 分析;G,H:正、负离子模式下 M 组和 Xiebai 组血清样本的 OPLS-DA 分析。

图 3 血清样品的非靶向代谢组学

Note. A, B. Correlation analysis of serum QC samples in positive and negative ion mode. C, D. PCA analysis of all serum samples in positive and negative ion mode. E, F. OPLS-DA analysis of serum samples in M group and NC group in positive and negative ion mode. G, H. OPLS-DA analysis of serum samples in M group and Xiebai group in positive and negative ion mode.

Figure 3 Non targeted metabolomics of serum samples

表 1 M 组与 NC 组血清样本中差异显著的代谢物 (Top10)

Table 1 Metabolites with significant difference in serum samples from M group and NC group (Top10)

序号 Serial No	名称 Name	变量投影 重要度 VIP	差异倍数 Fold change	P 值 P value	质荷比 m/z	保留时间/s RT/s	代谢物编号 KEGG ID	加合物 Adduct
1	L-赖氨酸 L-lysine	1.544	7.904	0.004	147.113	433.004	C00047	[M + H] ⁺
2	氨基丁酸 Aminobutyric acid	9.783	7.163	0.008	104.071	393.451	C00334	[M + H] ⁺
3	磷酸肌酸 Phosphocreatine	1.347	5.589	0.010	212.043	394.914	C02305	[M + H] ⁺
4	O-琥珀酰-L-高丝氨酸 O-succinyl-L-homoserine	1.625	3.199	0.000	202.086	279.567	C01118	[M + H-H ₂ O] ⁺
5	琥珀酰胆碱 Succinylcholine	2.384	2.823	0.001	144.982	191.255	C07546	[M] ⁺
6	DL-苯丙氨酸 DL-phenylalanine	1.953	0.233	0.048	166.086	291.596	C00079	[M + H] ⁺
7	菲啶 Phenanthridine	1.826	0.290	0.000	180.099	337.572	C06975	[M + H] ⁺
8	高水苏碱 Homostachydrine	12.526	0.313	0.000	158.118	337.606	C08283	[M + H] ⁺
9	葫芦巴碱 Trigonelline	11.883	0.402	0.000	138.055	350.976	C01004	[M + H] ⁺
10	亚胺唑 Imibenconazole	4.744	0.418	0.002	125.000	264.829	C18468	[M + H-C ₁₀ H ₈ C ₁₂ N ₄ S] ⁺

注:倍数变化:代谢物的变化次数,大于 1 表示上调,小于 1 表示下调;P 值:代谢产物的统计分析值, $P < 0.05$ 为显著差异代谢产物。(下表同)
Note. Fold change. Change times of metabolites in comparison group, more than 1 indicates up regulation, less than 1 indicates down regulation. P value. Statistical analysis value of metabolites in comparison group, $P < 0.05$ is a significant difference metabolite. (The same in the following tables)

表 2 Xiebaisan 组与 M 组血清样本差异显著的代谢物 (Top10)

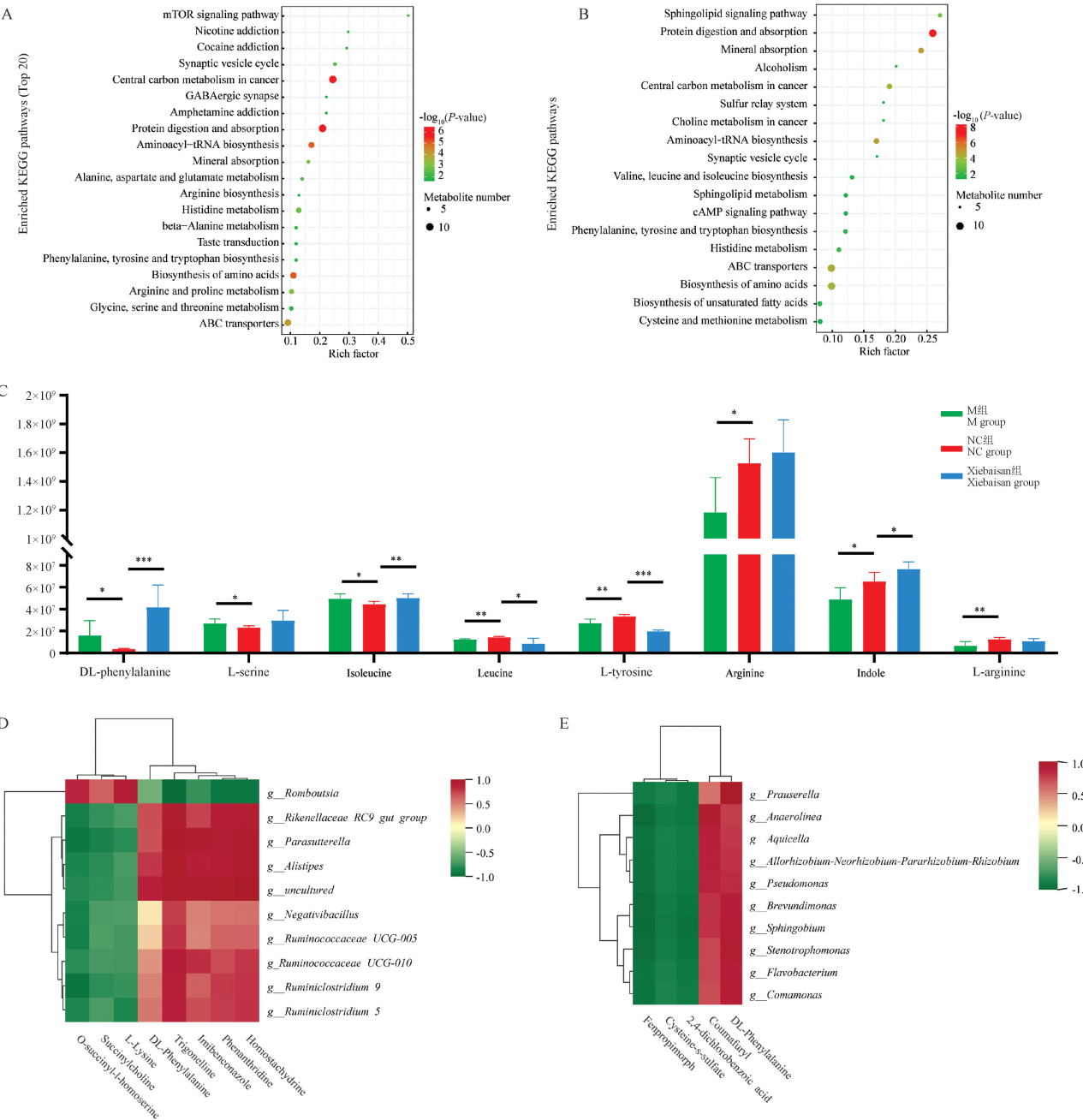
Table 2 Metabolite with significant difference in serum samples between Xiebaisan group and M group (Top10)								
序号 Serial No	名称 Name	变量投影 重要度 VIP	差异倍数 Fold change	P 值 P value	质荷比 m/z	保留时间/s RT/s	代谢物 编号 KEGG ID	加合物 Adduct
1	DL-苯丙氨酸 DL-phenylalanine	4.319	11.171	0.001	166.086	291.596	C00079	[M + H] +
2	托品碱 Tropine	1.280	5.186	0.002	142.123	486.404	C00729	[M + H] +
3	异戊乙净 Dimethametryn	1.902	4.581	0.026	256.170	57.118	C18537	[M + H] +
4	克鼠灵 Coumafuryl	1.639	3.821	0.021	137.071	166.796	C18599	[M + H - C ₉ H ₆ O ₃] +
5	顺-4-羟基-D-脯氨酸 Cis-4-hydroxy-D-proline	1.477	3.670	0.026	114.055	376.091	C03440	[M + H - H ₂ O] +
6	L-赖氨酸 L-lysine	1.706	0.094	0.003	147.113	433.004	C00047	[] M + H] +
7	半胱氨酸-S-硫酸盐 Cysteine-S-sulfate	1.601	0.111	0.000	199.977	41.640	C05824	[M-H] -
8	右泛醇 Dexpanthenol	1.203	0.217	0.002	206.139	162.209	C05944	[M + H] +
9	丁苯吗啉 Fenpropimorph	1.679	0.244	0.000	304.284	236.319	C18787	[M + H] +
10	2,4-二氯苯甲酸 2,4-dichlorobenzoic acid	1.487	0.245	0.000	188.950	57.874	C06670	[M-H] -

6 个显著差异代谢物的表达。

对血液代谢组差异代谢物 (Top10) 和前述差异菌群 (Top10) 做皮尔森相关性分析 (相关性阈值 0.8, $P = 0.05$) 发现, 在 M 组和 NC 组中 (图 4D), *g_Romboutsia* 与血液代谢物 L-赖氨酸、琥珀酰胆碱、O-琥珀酰-L-高丝氨酸呈正相关, 与血液代谢物高水苏碱、菲啶、亚胺唑、葫芦巴碱、DL-苯丙氨酸呈负相关; *g_Rikenellaceae RC9 gut group*、*g_Parasutterella*、*g_Alistipes*、*g_uncultured*、*g_Ruminococcaceae UCG-010*、*g_Ruminiclostridium 9*、*g_Ruminiclostridium5* 与血液代谢物高水苏碱、菲啶、亚胺唑、葫芦巴碱、DL-苯丙氨酸呈正相关, 与血液代谢物 L-赖氨酸、琥珀酰胆碱、O-琥珀酰-L-高丝氨酸呈负相关; *g_Negativibacillus*、*g_Ruminococcaceae UCG-005* 与血液代谢物高水苏碱、菲啶、亚胺唑、葫芦巴碱呈正相关, 与血液代谢物 L-赖氨酸、琥珀酰胆碱、O-琥珀酰-L-高丝氨酸呈负相关。在 Xiebaisan 组和 M 组中 (图 4E), *g_Prauserella*、*g_Anaerolinea*、*g_Aquicella*、*g_Allorhizobium-Neorhizobium-Rhizobium*、*g_Pseudomonas*、*g_Brevundimonas*、*g_Sphingobium*、*g_Stenotrophomonas*、*g_Flavobacterium*、*g_Comamonas* 与血液代谢物 DL-苯丙氨酸、香豆素类呈正相关, 与血液代谢物 2,4-二氯苯甲酸、S-磺基-L-半胱氨酸、丁苯吗啉呈负相关。

2.4 不同组别大鼠肺组织样本非靶向代谢组学分析

同血清样本非靶向代谢分析, 大鼠肺组织样本非靶向代谢组学的 QC 样本相关性 (皮尔森) 均高于 0.9 (图 5A, 5B)。质量控制实验表明, 本次实验的仪器分析系统稳定性较好, 可用于后续分析。肺组织样本非靶向代谢组学正离子 (Pos) 模式下鉴定出代谢物 881 种, 负离子 (Neg) 模式下鉴定出代谢物 872 种。本次实验 PCA 分析结果 (图 5C, 5D) 表明正、负离子模式下, NC 组、M 组和 Xiebaisan 组代谢特征是能够进行区分, 且各自组内样本无明显离散点组内平行性好。对 M 组与 NC 组正、负离子模式下检出的代谢物分别进行 OPLS-DA 分析 (图 5E, 5F), 模型评价指标 Q² 分别为 0.991 和 0.993; 对 Xiebaisan 组与 M 组正、负离子模式下检出的代谢物分别进行 OPLS-DA 分析 (图 5G, 5H), 模型评价指标 Q² 分别为 0.779 和 0.552, 表明 OPLS-DA 分析模型可用于后续分析。同血清样本非靶向代谢组, 以 $P < 0.05$, VIP > 1 作为显著性差异代谢物筛选的标准。M 组与 NC 组显著差异代谢物共有 348 种 (Pos 有 146 种, Neg 有 202 种), 表 3 为大鼠肺组织样本 M 组与 NC 组显著差异代谢物排名前 10 的代谢物列表。Xiebaisan 组与 M 组显著差异代谢物共有 93 种 (Pos 有 49 种, Neg 有 44 种), 表 4 为大鼠肺



注:A,B;M组与NC组、Xiebaian组与M组血清样品差异代谢产物KEGG途径富集分析;C:M组与NC组、Xiebaian组与M组的血清样品在蛋白质消化和吸收途径中相同差异代谢产物表达量分析;D,E:分别为M组与NC组、Xiebaian组与M组差异菌群与血清差异代谢物相关性分析;与M组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。(下同)

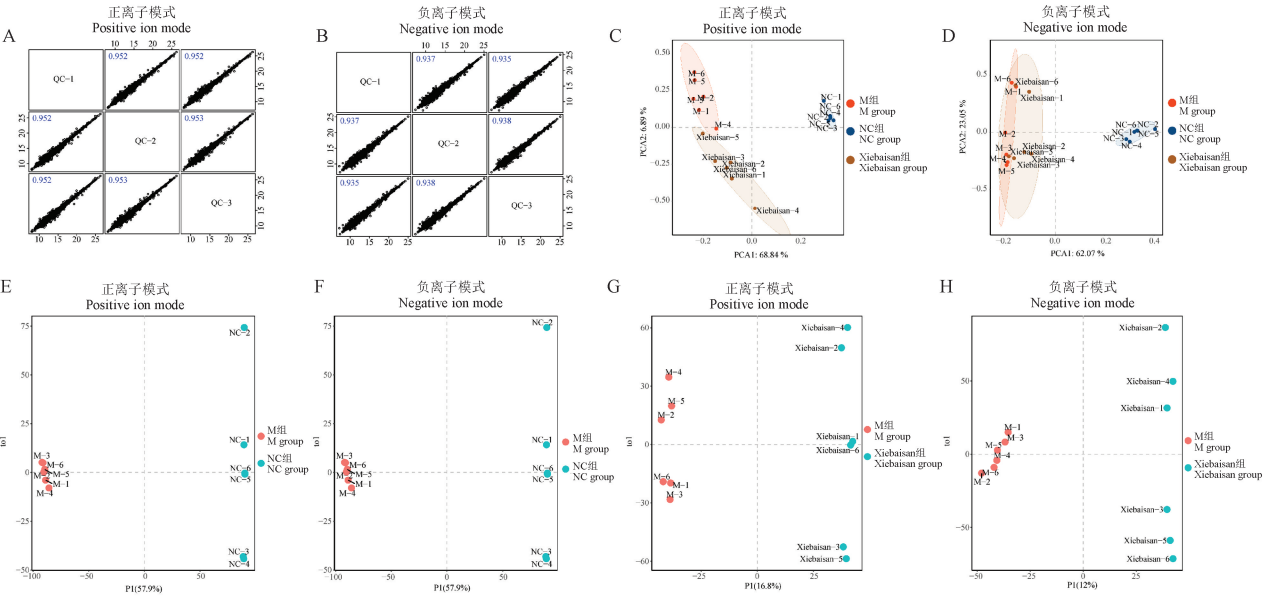
图4 血清样品中非靶向代谢组差异代谢产物的功能富集分析、表达分析、与差异菌群的相关性分析

Note. A, B. Enrichment analysis of KEGG pathway of differential metabolite in serum samples from M group vs NC group, xiebaian group vs M group. C. The serum samples of M group vs NC group and Xiebaian group vs M group have the same differential metabolite expression in protein digestion and absorption pathway. D, E. Correlation analysis between M group vs NC group, Xiebaian group vs M group in differential genera and blood differential metabolite. Compared with M group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 4 Functional enrichment analysis, expression analysis and differential genera of non targeted metabolomic differential metabolites in serum samples

组织样本 Xiebaian 组与 M 组显著差异代谢物排名前 10 的代谢物列表。

对鉴定到的代谢物进行 KEGG 通路富集分析, 结果显示: M 组与 NC 组显著差异代谢物富集



注:A,B:正、负离子模式下肺组织 QC 样品的相关性分析;C,D:正、负离子模式肺组织样品 PCA 分析;E,F:正、负离子模式下 M 组和 NC 组肺组织样品的 OPLS-DA 分析;G,H:正、负离子模式下 M 组和 Xiebaisan 组肺组织样品的 OPLS-DA 分析。

图 5 肺组织样本的非靶向代谢组学

Note. A, B. Correlation analysis of lung tissue QC samples in positive and negative ion mode. C, D. PCA analysis of all lung tissue samples in positive and negative ion mode. E, F. OPLS-DA analysis of lung tissue samples in M group and NC group in positive and negative ion mode. G, H. OPLS-DA analysis of lung tissue samples in M group and Xiebaisan group in positive and negative ion mode.

Figure 5 Non targeted metabolomic analysis of lung tissue samples

表 3 M 组和 NC 组肺组织样本中差异显著的代谢物 (Top10)

Table 3 Metabolites with significant difference in lung tissue samples from M group and NC group (Top10)

序号 Serial No	名称 Name	变量投影 重要度 VIP	差异倍数 Fold change	P 值 P value	质荷比 m/z	保留时间/s RT/s	代谢物 编号 KEGG ID	加合物 Adduct
1	光色素 Lumichrome	7.875	93.810	0.000	241.071	44.924	C01727	[M-H] ⁻
2	二甲基甘氨酸 Dimethylglycine	1.666	5.809	0.000	104.069	216.983	C01026	[M+H] ⁺
3	芦荟素 Aloesin	1.173	3.074	0.000	393.099	381.238	C08994	[M-H] ⁻
4	1-硬脂酰-2-花生酰-SN-甘油 1-Stearoyl-2-arachidonoyl-SN-glycerol	2.994	3.017	0.000	627.531	159.882	C00165	[M+H-H ₂ O] ⁺
5	乙酰肉碱 Acetylcarnitine	19.915	2.564	0.000	204.124	293.970	C02571	[M+H] ⁺
6	鸢尾黄酮 Irisxanthone	10.201	0.000	0.000	435.099	23.390	C10067	[M-H] ⁻
7	诺氟沙星 Norfloxacin	6.701	0.000	0.000	259.099	29.588	C06687	[M-H-C ₂ H ₃ O ₂] ⁻
8	氢溴酸高乌甲素 Lappaconitine	3.373	0.006	0.018	535.262	225.803	C08694	[M+H-CH ₃ O ₂] ⁺
9	蓖麻油酸 Ricinoleic acid	7.048	0.008	0.000	279.231	71.257	C08365	[M-H-H ₂ O] ⁻
10	甘油磷酸 Glycerophosphate	2.544	0.009	0.000	343.019	422.942	C02979	[2M-H] ⁻

表 4 Xiebaisan 组和 M 组肺组织样本差异显著的代谢物 (Top10)

Table 4 Metabolite with significant difference in lung tissue samples between Xiebaisan group and M group (Top10)								
序号 Serial No	名称 Name	变量投影 重要度 VIP	差异倍数 Fold change	P 值 P value	质荷比 m/z	保留时 间/s RT/s	代谢物 编号 KEGG ID	加合物 Adduct
1	D-葡萄糖胺-6-磷酸 D-glucosamine-6-phosphate	1. 792	3. 434	0. 018	260. 052	405. 200	C00352	[M + H] ⁺
2	棕榈酰-L-左旋肉碱 L-palmitoylcarnitine	13. 530	2. 212	0. 000	400. 341	165. 511	C02990	[M + H] ⁺
3	N,N-二甲基-L-精氨酸 N,N-dimethyl-L-argininium	9. 450	2. 203	0. 031	203. 150	527. 838	C03626	[M + H] ⁺
4	2'-脱氧胞苷 2'-deoxycytidine	5. 864	1. 931	0. 019	250. 080	203. 5320	C00881	[M + Na] ⁺
5	肌苷 Inosine	1. 174	1. 929	0. 039	267. 072	207. 859	C00294	[M-H] ⁻
6	氧化谷胱甘肽 Glutathione disulfide	3. 068	0. 203	0. 048	611. 141	537. 339	C00127	[M-H] ⁻
7	异麦芽糖 Isomaltose	1. 308	0. 549	0. 010	221. 065	375. 109	C00252	[M-H-C ₄ H ₈ O ₄] ⁻
8	玄参苷 Harpagoside	2. 810	0. 612	0. 015	529. 155	380. 592	C09783	[M + Cl] ⁻
9	蜜二糖 Melibiose	3. 701	0. 616	0. 0023	365. 104	382. 829	C05402	[M + Na] ⁺
10	1,2-双十六酰基-sn-甘油-3- 磷酸胆碱 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3- phosphocholine	1. 822	0. 627	0. 0258	732. 550	107. 903	C00157	[M-H] ⁻

(图 6A)在碳代谢、蛋白质消化与吸收、氨基酸的生物合成、ABC 转运体、嘌呤代谢等信号通路。Xiebaisan 组与 M 组显著差异代谢物富集(图 6B)在碳代谢、ABC 转运体、氨基酸的生物合成、不饱和脂肪酸生物合成、乙醛酸酯和二羧酸酯代谢途径等信号通路。其中在碳代谢通路中,发现两个比较组在该通路共有 3 个显著差异代谢物,对这 3 个代谢物的表达量分析(图 6C),结果显示泻白散能够逆转 3 个显著差异代谢物的表达。

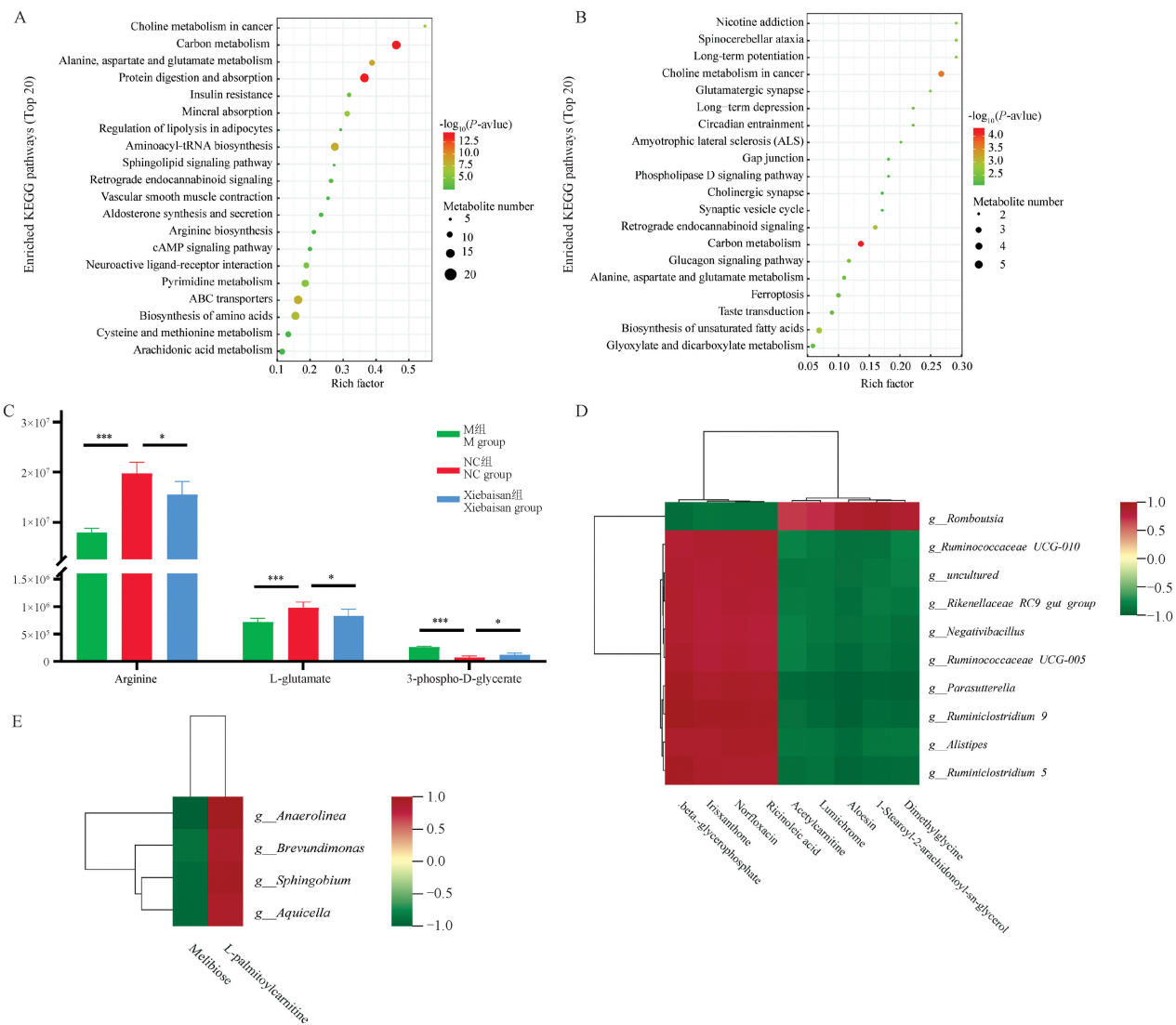
对差异菌群(Top10)和肺组织代谢组差异代谢物(Top10)做皮尔森相关性分析(相关性阈值 0. 8, $P = 0. 05$)发现,在 M 组和 NC 组中(图 6D),*g_ Romboutsia* 与肺组织代谢物维生素 B16,1-硬脂酰-2-花生酰-SN-甘油、芦荟素、光色素、乙酰肉碱呈正相关,与肺组织代谢物蓖麻油酸、诺氟沙星、鸢尾黄酮、 β -甘油磷酸盐呈负相关;*g_ Ruminococcaceae UCG-010*、*g_ uncultured*、*g_ Rikenellaceae RC9 gut group*、*g_ Negativibacillus*、*g_ Ruminococcaceae UCG-005*、*g_ Prauserella*、*g_ Ruminiclostridium 9*、*g_ Alistipes*、*g_ Ruminiclostridium5* 与肺组织代谢物维生素 B₁₆、1-硬脂酰-2-花生酰-SN-甘油、芦荟素、光色素、乙酰肉碱呈负相关,与肺组织代谢物蓖麻油酸、诺氟沙

星、鸢尾黄酮、 β -甘油磷酸盐呈正相关。在 Xiebaisan 组和 M 组中(图 6E),*g_ Anaerolinea*、*g_ Brevundimonas*、*g_ Sphingobium*、*g_ Aquicella* 与肺组织代谢物 L-棕榈酰呈正相关,与肺组织代谢物蜜二糖呈负相关。

3 讨论

目前世界哮喘人口约有 3 亿,最高发病率达到 18%,预计到 2025 年,哮喘患病人数将再增加 1 亿^[11-12]。现代科学研究较为常用的哮喘动物模型有小鼠、豚鼠、大鼠等。其中过敏性哮喘小鼠的炎症介导形式更倾向于过敏性肺炎;豚鼠致敏后,有报道其变态反应主要由 IgG 介导,而大鼠的致敏过程与人类哮喘过程中变态反应进程相似^[13]。本文选用 SD 大鼠,采用卵清白蛋白(OVA) + 氢氧化铝凝胶来建立过敏性哮喘模型,肺组织切片 M 组大鼠可见明显的肺泡塌陷,且支气管周围出现大量的炎性细胞浸润说明模型建立成功,可进行后续实验。

肠道菌群是疾病预防和治疗的重要靶标,参与维持机体健康与疾病^[14]。肠道微生态在机体免疫耐受的形成及维持中发挥着重要作用,并受饮食、感染以及抗生素和药物使用等多种因素的影响。



注:A,B;分别为 M 组与 NC 组、Xiebaisan 组与 M 组肺组织样品差异代谢产物 KEGG 途径富集分析;C:M 组与 NC 组、Xiebaisan 组与 M 组的肺组织样品在蛋白质消化和吸收途径中相同差异代谢产物表达量分析;D,E;分别为 M 组与 NC 组、Xiebaisan 组与 M 组差异菌群与肺组织差异代谢物相关性分析。

图 6 肺组织样本中非靶向代谢组差异代谢产物的功能富集分析、表达分析与差异菌群的相关性分析

Note. A, B. Enrichment analysis of KEGG pathway of differential metabolite in lung tissue samples from M group vs NC group, Xiebaisan group vs M group. C. The lung tissue samples of M group vs NC group and Xiebaisan group vs M group have the differential metabolite expression in the carbon metabolism pathway. D, E. Correlation analysis between M group vs NC group, Xiebaisan group vs M group in differential genera and lung tissue differential metabolite.

Figure 6 Functional enrichment analysis, expression analysis and differential genera of non targeted metabonomic differential metabolites in lung tissue samples

对 NC 组、M 组和 Xiebaisan 组肠道菌群进行分析,发现 M 组的肠道菌群组成及丰度与其他两组差别明显。特别是属水平菌群差异分析,M 组能显著增加 *g_Romboutsia* 丰度。Xiebaisan 组肠道菌群测序结果表明,与 M 组相比,Xiebaisan 组能够显著提高菌群丰度及菌群物种多样性。属水平菌群差异分析也表明,Xiebaisan 组能显著下调 *g_Romboutsia* 丰

度。泻白散组方中有甘草成分,已有研究报道,甘草水提物对肠道菌群有明显影响,可改善小鼠菌群丰度^[15],与本次实验结果相类似。中医理论有“肺与大肠相表里”的说法,现代基础研究也表明肠道和肺之间存在重要的“串扰机制”即“肠肺轴”,二者之间存在相互联系和调控的作用,一方面,呼吸系统疾病会改变肠道菌群的数量和多样性;另一方

面,肠道菌群的变化也会影响肺部疾病的发展过程^[16-18],本实验结果也发现类似情况。

基于液-质联用的非靶向代谢组学是新兴的系统生物学研究工具之一。非靶向代谢组学通过对样本代谢物进行定性、定量分析,刻画样本、疾病或个体的分子表型,进而系统地分析样本特性、疾病机制或个体特征。传统中药认为对于实物的认知要从整体出发,整体观是中医辨证的核心思想,因此代谢组学整体反应性的特点与中药治疗疾病的多环节、多靶点、协同起效的整体观念的研究角度相一致^[19]。血液样本中的代谢成分来源于机体的各个组织及器官,可反映机体的整体状态。M 组与 NC 组相比,血液样本中差异代谢物功能主要集中在氨基酸代谢(蛋白消化与吸收、氨基酸生物合成、半胱氨酸和蛋氨酸代谢等),同时 mTOR 信号通路也有显著富集。蛋白消化与吸收通路曾被报道与哮喘的发生相关^[20]。mTOR 是细胞生长和增殖的重要调节因子也是经典的自噬信号通路,其与哮喘的相关研究也有报道,mTOR 信号通路的上调会导致免疫反应失衡^[21]。

Xiebaisan 组与 M 组相比,血液样本中差异代谢物功能主要集中在氨基酸代谢(蛋白消化与吸收、氨基酸生物合成、半胱氨酸和蛋氨酸代谢等通路)。对 NC 组、M 组和 Xiebaisan 组中涉及蛋白消化与吸收通路的共同差异代谢物进行定量分析后发现,Xiebaisan 组逆转了 8 个共有差异代谢物中的 6 个代谢物的表达,改善共有差异代谢物的表达,使之趋向于正常。同时 Xiebaisan 组与 M 组相比,差异代谢物 KEGG 通路分析未能显著富集到 mTOR 信号通路,说明泻白散也可能通过影响 mTOR 信号通路的表达来改善哮喘。

肺组织样本的代谢组学则显示出 NC 组、M 组和 Xiebaisan 组中(M 组与 NC 组、Xiebaisan 组与 M 组)差异代谢物均有显著富集在碳代谢相关通路。对此通路共同差异代谢物进行定量分析后,发现 Xiebaisan 组逆转了 3 个共有差异代谢物的表达,使之表达趋向于正常。另外 M 组与 NC 组相比,差异代谢物还富集到血管平滑肌收缩信号通路和 cAMP 信号通路,而这两条通路与哮喘的发生密切相关^[22-23]。同时 Xiebaisan 组未能显著富集到这两条信号通路,表明泻白散也可能通过影响血管平滑肌收缩信号通路和 cAMP 信号通路来改善哮喘。

综上所述,泻白散治疗 OVA 致敏大鼠过敏性哮

喘的作用机制可能为:(1)减少肺组织炎细胞浸润,改善肺组织形态结构;(2)改善肠道菌群丰度及物种多样性,特别是显著降低过敏性哮喘组中 *Romboutsia* 菌丰度,来发挥肠免疫作用;(3)影响氨基酸代谢、碳代谢等代谢途径发挥保护作用;(4)可能通过调控 mTOR 通路、血管平滑肌收缩信号通路和 cAMP 等信号通路发挥对过敏性哮喘大鼠的保护作用。

参 考 文 献(References)

- [1] 郑炜东,曲妮妮. 麻杏石甘汤调控过敏性哮喘中辅助 T 淋巴细胞机制研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(4): 30-35.
ZHENG W D, QU N N. Mechanism research on maxing Shigan Decoction regulation on helper T lymphocytes in allergic asthma[J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2023, 25(4): 30-35.
- [2] 崔晏文,王丽慧,杜春仙,等. 过敏性哮喘急性发作患者血清淀粉样蛋白 A 的表达与影响因素分析[J]. 医学新知, 2022, 32(3): 201-207.
CUI Y W, WANG L H, DU C X, et al. The levels and impacting factors of serum amyloid A in the acute exacerbation of allergic asthma[J]. New Med, 2022, 32(3): 201-207.
- [3] 刘彦邑,孟晓明,胡成穆,等. 酸离子敏感通道 1a 在炎症性疾病中的研究进展[J]. 药学学报, 2020, 55(6): 1119-1124.
LIU Y Y, MENG X M, HU C M, et al. Research progress of ASIC1a in inflammatory diseases[J]. Acta Pharm Sin, 2020, 55(6): 1119-1124.
- [4] 耿胜男,罗鑫,程梦,等. 虎杖苷改善幼鼠过敏性哮喘的作用及机制[J]. 亚太传统医药, 2022, 18(10): 34-38.
GENG S N, LUO X, CHENG M, et al. Study on the effect and mechanism of polydatin in improving allergic asthma in young mice[J]. Asia Pac Tradit Med, 2022, 18(10): 34-38.
- [5] 于澎,熊金璐,宋来辉,等. 泻白散中桑白皮的尊古炮制及现代工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(10): 2383-2386.
YU P, XIONG J L, SONG L H, et al. Study on the ancient processing and modern technology of Sang Bai in Xiebai powder[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2020, 31(10): 2383-2386.
- [6] 李玉丽,蒋屏,孙梦林,等. 经典名方泻白散的古今文献综述[J]. 中医学报, 2019, 47(6): 17-22.
LI Y L, JIANG P, SUN M L, et al. Ancient and modern literature review of Xiebai San[J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2019, 47(6): 17-22.
- [7] 李璐,杨一帆,杨彪,等. 泻白散处方演变历史及方剂开发的研究进展[J]. 中成药, 2019, 41(8): 1920-1926.
LI L, YANG Y F, YANG B, et al. Evolution history of Xiebai Powder prescription and research progress of prescription development[J]. Chin Tradit Pat Med, 2019, 41(8): 1920-1926.

- [8] PICKARD J M, ZENG M Y, CARUSO R, et al. Gut microbiota; role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease [J]. Immunol Rev, 2017, 279(1): 70–89.
- [9] ZHANG B, LIU K, YANG H, et al. Gut microbiota; the potential key target of TCM's therapeutic effect of treating different diseases using the same method-UC and T2DM as examples [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 855075.
- [10] 杨宗统, 孙铁锋, 李晓晶, 等. 基于肠道菌群和短链脂肪酸代谢探讨不同饮食条件下高脂血症大鼠发病机制 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(10): 1314–1323.
- YANG Z T, SUN T F, LI X J, et al. Pathogenesis of hyperlipidemia in rats under various dietary conditions based on intestinal flora and short-chain fatty acid metabolism [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(10): 1314–1323.
- [11] 司秀影, 赵宝珠, 李鹤然, 等. 中医药调控哮喘 Th17/Treg 细胞失衡的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(7): 98–102.
- SI X Y, ZHAO B Z, LI H R, et al. Research progress of traditional Chinese medicine regulating Th17/treg cell imbalance in asthma [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2022, 40(7): 98–102.
- [12] COLLABORATORS G2CRD. 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.
- [13] 吕天宜, 李得民, 杨道文, 等. 卵清蛋白(OVA)致敏联合烟熏法建立咳嗽变异型哮喘豚鼠模型 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(10): 1–7.
- LYU T Y, LI D M, YANG D W, et al. Establishment of a cough variant asthma guinea pig model induced by cigarette smoke exposure and OVA sensitization [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(10): 1–7.
- [14] 沈红, 伍城颖, 龙芳, 等. 从肠道菌群调控角度探讨中药汤剂中多糖组分存在的意义 [J]. 药学报, 2022, 57(12): 3480–3486.
- SHEN H, WU C Y, LONG F, et al. Meanings of polysaccharides in traditional Chinese medicines decoction from the viewpoint of its gut microbiota regulation effects [J]. Acta Pharm Sin, 2022, 57(12): 3480–3486.
- [15] 徐鹏程, 栾英桥, 张丹, 等. 甘草水提物对小鼠肠道菌群的影响 [J]. 广东药科大学学报, 2018, 34(2): 228–232.
- XU P C, LUAN Y Q, ZHANG D, et al. Effect of *Glycyrrhiza uralensis* decoction on intestinal flora in mice [J]. J Guangdong Pharm Univ, 2018, 34(2): 228–232.
- [16] MARSLAND B J, TROMPETTE A, GOLLWITZER E S. The gut-lung axis in respiratory disease [J]. Ann Am Thorac Soc, 2015, 12(2): S150–S156.
- [17] HE Y, WEN Q, YAO F, et al. Gut-lung axis: the microbial contributions and clinical implications [J]. Crit Rev Microbiol, 2017, 43(1): 81–95.
- [18] 费婉婉, 鹿振辉, 黄星, 等. 基于“肺与大肠相表里”探讨肠道菌群与肺结核关系的研究进展 [J]. 中国防痨杂志, 2022, 44(5): 500–504.
- FEI W W, LU Z H, HUANG X, et al. Research progress on the correlation of gut microbiota with and pulmonary tuberculosis based on the theory of exterior and interior of lung and large intestine [J]. Chin J Antituberc, 2022, 44(5): 500–504.
- [19] 张帆, 胡勋秀, 李丁香, 等. 非靶向血液代谢组学研究糖尿病大鼠发生发展及银杏叶提取物干预的作用机制 [J]. 药学报, 2021, 56(4): 1127–1136.
- ZHANG F, HU X X, LI D X, et al. *Ginkgo biloba* extract ameliorates streptozotocin-induced diabetes in rats as measured by non-targeted metabolomics [J]. Acta Pharm Sin, 2021, 56(4): 1127–1136.
- [20] TANG W, DONG M, TENG F, et al. TMT-based quantitative proteomics reveals suppression of SLC3A2 and ATP1A3 expression contributes to the inhibitory role of acupuncture on airway inflammation in an OVA-induced mouse asthma model [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 134: 111001.
- [21] HUANG X, YU H, XIE C, et al. Louki Zupa Decoction attenuates the airway inflammation in acute asthma mice induced by ovalbumin through IL-33/ST2-NF- κ B/GSK3 β /mTOR signalling pathway [J]. Pharm Biol, 2022, 60(1): 1520–1532.
- [22] LIU Y, LIU Z, WANG K. The Ca²⁺-activated chloride channel ANO1/TMEM16A: an emerging therapeutic target for epithelium-originated diseases? [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(6): 1412–1433.
- [23] PACINI E S A, SATORI N A, JACKSON E K, et al. Extracellular cAMP-adenosine pathway signaling: a potential therapeutic target in chronic inflammatory airway diseases [J]. Front Immunol, 2022, 13: 866097.

[收稿日期] 2023-04-17