

# 连翘-金银花药对调控血清外泌体 miRNA 对急性肺损伤的改善作用及机制研究<sup>Δ</sup>

陈朝华<sup>1\*</sup>, 谢淑敏<sup>1</sup>, 常万顺<sup>1</sup>, 韩雨晴<sup>1</sup>, 陈艳雯<sup>1</sup>, 朱艳慧<sup>1</sup>, 曹明卓<sup>2</sup>, 黄海英<sup>1#</sup> (1. 河南中医药大学药学院, 郑州 450046; 2. 河南中医药大学中医药科学院, 郑州 450046)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)03-0305-06  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.03.06



**摘要** 目的 基于血清外泌体微RNA(miRNA),研究连翘-金银花药对对急性肺损伤(ALI)的改善作用及机制。方法 将大鼠分为空白组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、连翘-金银花药对组(2.55 g/kg),每组10只。除空白组外,其余各组大鼠均通过气管滴注5 mg/mL 脂多糖复制ALI模型。造模后,各组大鼠灌胃相应药液/生理盐水,每天1次,连续3 d。末次给药后,观察大鼠肺组织病理学形态;测定肺组织湿干重比和支气管肺泡灌洗液(BALF)中白细胞数量;检测BALF中炎症因子[肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、IL-10]水平;提取大鼠血清外泌体,利用高通量测序技术筛选外泌体中差异表达miRNA,并进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析。基于筛选的差异表达miRNA和富集的KEGG通路,通过体外细胞实验进行机制验证。结果 动物实验结果显示,经连翘-金银花药对干预后,ALI大鼠湿干重比以及BALF中白细胞数量和TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平均显著降低/减少( $P<0.01$ ),IL-10水平显著升高( $P<0.01$ )。高通量测序实验结果显示,连翘-金银花药对可显著上调外泌体中miR-345-3p、miR-194-5p、miR-653-5p等的表达,其中差异表达miRNA的靶基因涉及的KEGG通路包括缺氧诱导因子1(HIF-1)信号通路等。细胞验证实验结果显示,过表达的miR-345-3p可显著升高细胞上清液中IL-10水平( $P<0.01$ ),显著降低细胞上清液中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平以及细胞中蛋白激酶B1、磷脂酰肌醇3-激酶、HIF-1 $\alpha$ 的mRNA及其蛋白表达水平( $P<0.01$ )。结论 连翘-金银花药对可通过上调血清外泌体中miR-345-3p表达,抑制HIF-1信号通路活性,从而减轻炎症反应,进而发挥改善ALI的作用。  
**关键词** 连翘-金银花药对;急性肺损伤;外泌体;miR-345-3p;HIF-1信号通路;高通量测序技术

## Ameliorative effect and mechanism of *Forsythia suspensa-Lonicera japonica* herb pair on acute lung injury via regulating serum exosomal miRNA

CHEN Zhaohua<sup>1</sup>, XIE Shumin<sup>1</sup>, CHANG Wanshun<sup>1</sup>, HAN Yuqing<sup>1</sup>, CHEN Yanwen<sup>1</sup>, ZHU Yanhui<sup>1</sup>, CAO Mingzhuo<sup>2</sup>, HUANG Haiying<sup>1</sup> (1. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Academy of Traditional Chinese Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To study the ameliorative effect and mechanism of *Forsythia suspensa-Lonicera japonica* herb pair on acute lung injury (ALI) based on serum exosomal microRNA (miRNA). **METHODS** The rats were randomly divided into a blank group (normal saline), model group (normal saline), and *F. suspensa-L. japonica* herb pair group (2.55 g/kg), with 10 rats in each group. Except for the blank group, the other groups were used to establish an ALI model by intratracheal dripping of 5 mg/mL lipopolysaccharides. After modeling, each group was given relevant medicine/normal saline intragastrically, once a day, for 3 consecutive days. After the last medication, the pathological status of lung tissue was observed; lung wet-to-dry weight ratio and leukocyte counts in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were determined. The levels of inflammatory factors [tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-10] in BALF were determined. Exosomes were isolated from rat serum, and high-throughput sequencing technology was employed to screen differentially expressed miRNA within the exosomes, followed by Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis. Based on the screened differentially expressed miRNA and the enriched KEGG pathways, *in vitro* cellular experiments were conducted for validation. **RESULTS** The animal experimental results demonstrated that after intervention with the *F. suspensa-L. japonica* herb pair, the wet-to-dry weight ratio, the number of leukocytes in BALF, as well as the levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in BALF of ALI rats were all significantly reduced ( $P<0.01$ ), while the level of IL-10 was significantly increased ( $P<0.01$ ). The results of high-throughput sequencing experiments revealed that

<sup>Δ</sup> 基金项目 国家自然科学基金青年基金项目(No.81904021);河南省省级科技研发计划联合基金项目(No.222301420090);河南省教育科学规划2023年度重点课题(No.2023JKZD16)

\* 第一作者 硕士研究生。研究方向:药理学、药理学。E-mail: 18336509612@163.com

# 通信作者 博士生导师,教授。研究方向:药理学、药理学。E-mail: huang.haiying@126.com

the *F. suspensa-L. japonica* herb pair could significantly up-regulate the expressions of miR-345-3p, miR-194-5p, miR-653-5p, and others in exosomes. Among them, the KEGG pathways involved in the target genes of differentially expressed miRNA included the hypoxia-inducible factor-1(HIF-1) signaling pathway, among others. The results of cellular validation experiments showed that overexpressed miR-345-3p

could significantly elevate the level of IL-10 in the cell supernatant ( $P<0.01$ ), while significantly reducing the levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the cell supernatant, as well as the mRNA and protein expression levels of protein kinase B1, phosphatidylinositol 3-kinase, and HIF-1 $\alpha$  ( $P<0.01$ ). **CONCLUSIONS** *F. suspensa*-*L. japonica* herb pair can alleviate inflammatory responses and thereby exert a therapeutic effect in improving ALI by up-regulating the expression of miR-345-3p in serum exosomes and inhibiting the activity of the HIF-1 signaling pathway.

**KEYWORDS** *Forsythia suspensa*-*Lonicera japonica* herb pair; acute lung injury; exosomes; miR-345-3p; HIF-1 signaling pathway; high-throughput sequencing technology

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是由多种致病因素引发的弥漫性肺实质损害,以肺泡上皮细胞与血管内皮细胞结构性损伤为主要病理特征,常伴随急性、低氧性呼吸衰竭及失控性炎症反应<sup>[1-2]</sup>。目前,临床针对ALI常采用糖皮质激素、抗炎药物等进行治疗,但这些药物存在副作用大、疗效单一等不足。因此,研发新的治疗ALI的药物具有重要意义。

连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 和金银花 *Lonicera japonica* Thunb. 均具有清热解毒、疏风散热的功效<sup>[3]</sup>,临床上常将两者配伍,用于治疗ALI等肺部疾病<sup>[4-5]</sup>。然而,连翘-金银花药对改善ALI等肺部疾病的具体作用机制尚不明确。外泌体是活细胞分泌的一种膜性囊泡,其含有的微RNA(microRNA, miRNA)可通过调控靶基因表达参与炎症、氧化应激及免疫应答<sup>[6-8]</sup>。研究表明,ALI患者支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)和血浆中外泌体水平均显著高于正常人,且外泌体水平与患者肺损伤的严重程度密切相关<sup>[9]</sup>。此外,外泌体可通过传递miRNA等信号分子调节炎症反应和细胞凋亡,从而改善脓毒症相关ALI<sup>[10]</sup>。由此可知,外泌体在ALI病理进程中具有重要作用,可能是改善ALI的关键靶标。基于此,本研究拟采用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)构建大鼠ALI模型,利用高通量测序技术获得连翘-金银花药对干预后ALI大鼠血清外泌体中差异表达的miRNA,并进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)富集分析,以预测相关信号通路并进行验证,以期连翘-金银花药对临床治疗ALI提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有Multiskan GO型全波长酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)、JEM-1400型透射电子显微镜(日本电子株式会社)、SLAN-96P型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(上海宏石医疗科技有限公司)、CytoFLEX型流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司)、NovaSeq型高通量基因测序仪(美国Illumina公司)、ICX41型生物显微镜(宁波舜宇仪器有限公司)。

### 1.2 主要药品与试剂

连翘(批号23040201,产地为山西临汾)、金银花(批号23030101,产地为河南封丘)药材均购自郑州瑞龙国药医药股份有限公司,经河南中医药大学药学院董诚明

教授鉴定均为真品。大鼠血清肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、IL-10酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒和 人源细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-10 ELISA 试剂盒(货号分别为 YJ002859、YJ003057、YJ002813、YJ077385、YJ05805、YJ064299)均购自上海源桔生物科技公司;兔源分化抗原簇 81(cluster of differentiation 81, CD81)、CD63、缺氧诱导因子1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )、凋亡链接基因2相互作用蛋白X(apoptosis-linked gene 2-interacting protein X, Alix)抗体(货号分别为27855-1-AP、25682-1-AP、12422-1-AP、80933)均购自武汉三鹰生物科技有限公司;兔源磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、蛋白激酶B1(protein kinase B1, Akt1)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(货号分别为4257s、2938s、2118s)均购自美国CST公司;Lipo8000转染试剂(货号C0511)购自上海碧云天生物技术有限公司;外泌体RNA提取试剂盒(货号4478545)购自美国Invitrogen公司;逆转录试剂盒、SYBR预混液(货号分别为K1622、A25742)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;miR345-3p模拟物试剂盒(货号112841965,该试剂盒中包括miR345-3p阴性试剂)购自湖州河马生物科技有限公司。

### 1.3 细胞株及动物

人肺上皮BEAS-2B细胞(货号QS-H066)购自旗赛生物科技(武汉)有限公司。SPF级SD雄性大鼠(体重180~200 g)购自山东济南朋悦实验动物繁育有限公司,动物生产许可证号为SCXK(鲁)2022-0006。购入后,大鼠饲养于温度、湿度可控,12 h明/12 h暗交替的环境中,饲养期间自由饮水、摄食。本动物实验已获河南中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准编号为DWLLGZR202202204。

## 2 方法与结果

### 2.1 体内药效学实验

#### 2.1.1 药材提取

研究表明,连翘、金银花以1:1(质量比)配伍时抗炎效果最佳<sup>[11]</sup>。因此,本研究将连翘、金银花药材以质量比1:1配伍,经打粉、过筛后,加入10倍量蒸馏水,加热回流提取1 h;过滤,药渣再次加入8倍量蒸馏水,加热回流提取1 h;合并2次滤液,浓缩成稠浸膏,冻干,即得连翘-金银花药对冻干粉(得率为33%)。

### 2.1.2 分组、造模与给药

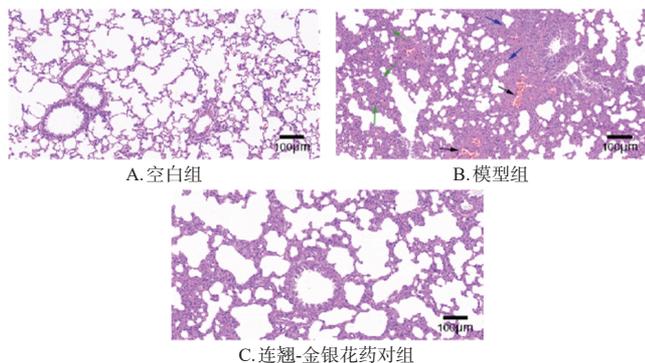
将大鼠随机分为空白组、模型组、连翘-金银花药对组，每组10只。除空白组外，其余各组大鼠均通过气管滴注5 mg/mL LPS复制ALI模型<sup>[12]</sup>。造模后，连翘-金银花药对组大鼠灌胃2.55 g/kg连翘-金银花药对冻干粉(用生理盐水溶解，剂量根据临床等效剂量换算<sup>[13]</sup>)，空白组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水，每天1次，连续3 d。

### 2.1.3 样本采集

末次给药0.5 h后，麻醉大鼠，腹主动脉取血，将血样在室温下静置2 h后，以3 000 r/min离心10 min，收集上层血清，用于后续外泌体的提取。腹主动脉取血后，结扎大鼠右肺，左肺用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)灌洗3次；收集PBS灌洗液，以300 r/min离心15 min，取上清液，即得BALF。将BALF置于-80 °C冰箱中保存，备用。

### 2.1.4 大鼠肺组织病理学形态观察

取“2.1.3”项下结扎的大鼠右肺(每组取4只大鼠的样本)，置于4%多聚甲醛中固定24 h，经包埋、切片后进行脱蜡复水、苏木素-伊红(HE)染色，然后采用显微镜观察大鼠肺组织病理学形态。结果(图1)显示，与空白组比较，模型组大鼠肺泡壁与支气管壁增厚，肺泡腔破损、充血，肺泡间隙与支气管管腔中出现大量炎症细胞浸润；与模型组比较，连翘-金银花药对组大鼠肺组织充血程度减轻，肺部损伤明显改善。



注：绿色箭头所指为炎症细胞浸润；黑色箭头所指为肺泡腔充血；蓝色箭头所指为肺泡壁增厚。

图1 各组大鼠肺组织病理学形态观察的显微图(HE染色)

### 2.1.5 大鼠肺组织湿干重比与BALF中白细胞数量测定

取“2.1.3”项下结扎的大鼠右肺(每组取6只大鼠的样本)，称定湿重(记为W)，然后将其置于50 °C条件下烘干至恒重(记为D)，计算肺组织湿干重比(即W/D比值)。各组取6只大鼠的BALF适量，离心后取沉淀重悬于PBS中，再置于显微镜下观察并进行白细胞计数。采用GraphPad Prism 8.0软件对数据进行统计分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步组间两两比较使用Tukey's多重检验；检验水准 $\alpha=0.05$ (下同)。结果(表1)显示，与空白组比较，模型组大鼠W/D比值、BALF中白细胞数量均显著升高/增多( $P<0.01$ )；与模型组比较，连翘-金银花药对组大鼠W/D比

值、BALF中白细胞数量均显著降低/减少( $P<0.01$ )。

表1 各组大鼠W/D比值和BALF中白细胞数量比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	W/D比值	BALF中白细胞数量( $\times 10^6 L^{-1}$ )
空白组	4.86 ± 0.14	73.67 ± 3.20
模型组	7.51 ± 0.61 <sup>a</sup>	194.33 ± 4.72 <sup>a</sup>
连翘-金银花药对组	5.12 ± 0.18 <sup>b</sup>	78.5 ± 6.66 <sup>b</sup>

a: 与空白组比较,  $P<0.01$ ; b: 与模型组比较,  $P<0.01$ 。

### 2.1.6 大鼠BALF中炎症因子水平检测

取“2.1.3”项下各组大鼠BALF(每组取6只大鼠样本)适量，根据ELISA试剂盒说明书方法操作，检测大鼠BALF中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-10水平。结果(表2)显示，与空白组比较，模型组大鼠BALF中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平均显著升高( $P<0.01$ )，IL-10水平显著降低( $P<0.01$ )；与模型组比较，连翘-金银花药对组大鼠BALF中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平均显著降低( $P<0.01$ )，IL-10水平显著升高( $P<0.01$ )。

表2 各组大鼠BALF中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-10水平比较( $\bar{x} \pm s, n=6, pg/mL$ )

组别	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-10
空白组	109.46 ± 7.08	64.66 ± 4.79	126.22 ± 6.44
模型组	162.73 ± 6.53 <sup>a</sup>	119.92 ± 7.99 <sup>a</sup>	104.26 ± 2.51 <sup>a</sup>
连翘-金银花药对组	136.09 ± 3.04 <sup>b</sup>	83.63 ± 3.84 <sup>b</sup>	119.56 ± 3.39 <sup>b</sup>

a: 与空白组比较,  $P<0.01$ ; b: 与模型组比较,  $P<0.01$ 。

## 2.2 大鼠血清外泌体高通量测序实验

### 2.2.1 大鼠血清外泌体的提取与表征

取“2.1.3”项下各组大鼠血清样品，采用差速离心法<sup>[14]</sup>提取外泌体，将富含外泌体的沉淀重悬于PBS中，采用动态光散射技术和透射电镜对外泌体的大小和形态进行表征，并利用Western blot法对外泌体特异性蛋白(Alix、CD63和CD81)进行表征。结果(图2)显示，血清外泌体呈茶托样双层膜结构，其粒径为(92.07 ± 0.43) nm，多分散系数为0.29 ± 0.01，特异性蛋白Alix、CD63和CD81均存在表达。

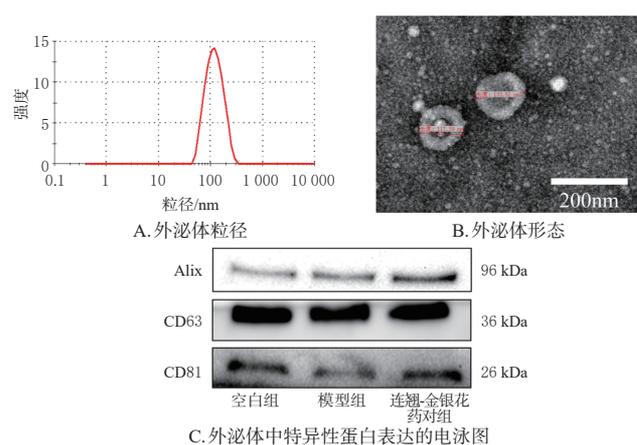


图2 血清外泌体的表征结果

### 2.2.2 外泌体中差异表达miRNA的筛选

取“2.1.3”项下各组大鼠血清样品，按外泌体RNA提取试剂盒说明书操作，提取血清外泌体中总RNA，利

用NovaSeq型高通量基因测序仪基于双端测序策略进行测序。将各组血清外泌体的miRNA进行两两比较,再利用差异表达倍数(fold change, FC)和差异显著性P值( $|\log_2 FC| > 1, P < 0.05$ )筛选差异表达miRNA。结果(图3)显示,与空白组比较,模型组大鼠血清外泌体中差异表达miRNA共53个(43个上调、10个下调);与模型组比较,连翘-金银花药对组大鼠血清外泌体中差异表达miRNA共55个(20个上调、35个下调)。其中,31个miRNA在造模后出现表达差异,而在连翘-金银花药对干预后又出现反向表达趋势,提示这31个miRNA可能为连翘-金银花药对干预ALI的潜在靶点。进一步对这31个miRNA进行分析发现,连翘-金银花药对干预后,大鼠血清外泌体中显著上调的miRNA有miR-345-3p、miR-194-5p、miR-653-5p等(具体信息可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附表1)。结合相关研究<sup>[15-16]</sup>发现,miR-345-3p与炎症反应密切相关,提示其可能是连翘-金银花药对干预ALI的重要靶点。

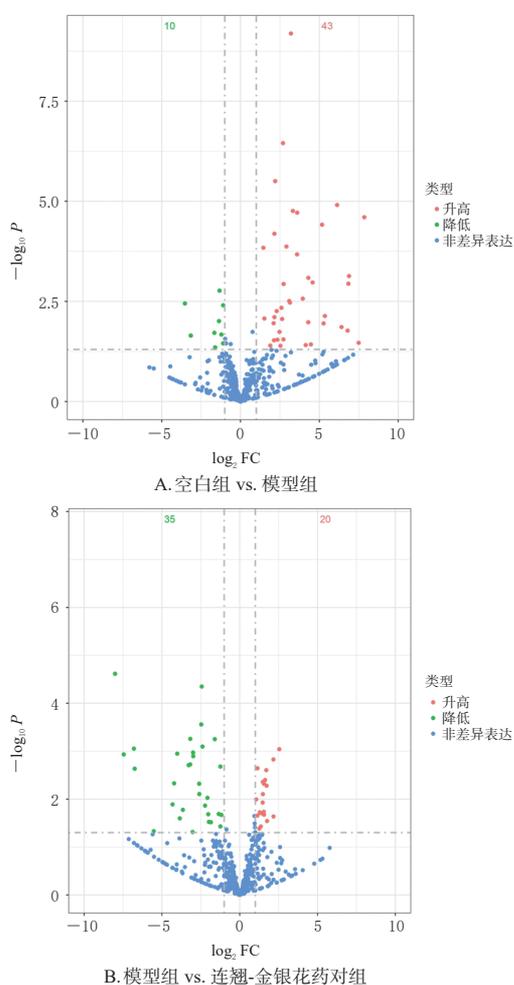


图3 各组大鼠血清外泌体中差异表达miRNA的火山图

### 2.2.3 富集分析

采用miRanda数据库([https://www.bioinformatics.com.cn/local\\_miranda\\_miRNA\\_target\\_prediction\\_120](https://www.bioinformatics.com.cn/local_miranda_miRNA_target_prediction_120))和RNAhybrid数据库(<https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid>)对外泌体中差异表达的miRNA进行靶基因预测,然后将2个数据库预测结果取交集,即得差异表达miRNA的靶基因;利用DAVID数据库对靶基因进行KEGG富集分析,再利用超几何分布算法<sup>[17]</sup>分析具有显著性( $P < 0.05$ )的通路,并将排名前10位的通路进行可视化展示。结果(图4)显示,差异表达miRNA的靶基因涉及的KEGG通路包括轴突导向(axon guidance)信号通路、钙信号通路(calcium signaling pathway)和HIF-1信号通路(HIF-1 signaling pathway)等。基于相关研究报道<sup>[18]</sup>和KEGG富集分析结果,本研究选择HIF-1信号通路进行后续验证。

结果(图4)显示,差异表达miRNA的靶基因涉及的KEGG通路包括轴突导向(axon guidance)信号通路、钙信号通路(calcium signaling pathway)和HIF-1信号通路(HIF-1 signaling pathway)等。基于相关研究报道<sup>[18]</sup>和KEGG富集分析结果,本研究选择HIF-1信号通路进行后续验证。

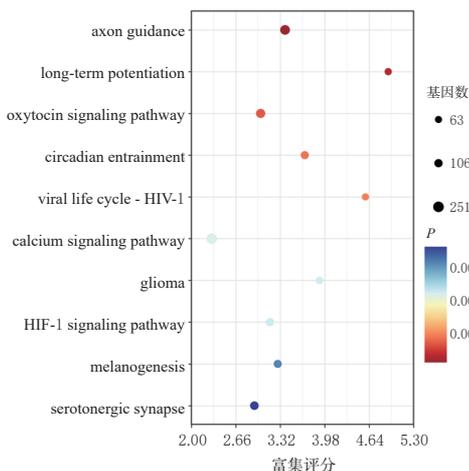


图4 差异表达miRNA的靶基因涉及的KEGG通路

## 2.3 体外机制验证实验

### 2.3.1 细胞分组与处理

将BEAS-2B细胞接种于含10%胎牛血清和抗生素的DMEM培养基中,培养至对数生长期时进行后续实验。取对数生长期的BEAS-2B细胞,按 $2 \times 10^5$ 个/孔接种于6孔板中,然后随机分为对照组、LPS组、miR-345-3p阴性对照组、miR-345-3p模拟物组。miR-345-3p阴性对照组和miR-345-3p模拟物组细胞分别转染100 pmol的miR345-3p阴性试剂与miR-345-3p模拟物(对照组和LPS组以等体积培养基代替);培养24 h后,除对照组外,其余各组均加入10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的LPS<sup>[9]</sup>培养6 h,以复制ALI细胞模型。

### 2.3.2 细胞上清液中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-10水平检测

取对数生长期的BEAS-2B细胞,按“2.3.1”项下方法分组、处理后(每组设6个复孔),收集各组细胞上清液。根据试剂盒说明书方法操作,检测细胞上清液中炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-10水平。结果(表3)显示,与对照组比较,LPS组、miR-345-3p阴性对照组细胞上清液中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平均显著升高( $P < 0.01$ ),IL-10水平均显著降低( $P < 0.01$ );与LPS组比较,miR-345-3p模拟物组细胞上清液中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平均显著降低( $P < 0.01$ ),IL-10水平显著升高( $P < 0.01$ )。

**表3 各组细胞上清液中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-10水平比较**  
( $\bar{x} \pm s, n=6, \text{pg/mL}$ )

组别	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-10
对照组	67.55 $\pm$ 20.58	51.68 $\pm$ 7.16	102.54 $\pm$ 10.77
LPS组	156.96 $\pm$ 11.66 <sup>a</sup>	99.10 $\pm$ 11.55 <sup>a</sup>	76.18 $\pm$ 8.90 <sup>a</sup>
miR-345-3p阴性对照组	156.92 $\pm$ 13.45 <sup>a</sup>	97.23 $\pm$ 10.40 <sup>a</sup>	78.63 $\pm$ 12.43 <sup>a</sup>
miR-345-3p模拟物组	80.40 $\pm$ 12.53 <sup>b</sup>	63.45 $\pm$ 10.13 <sup>b</sup>	117.14 $\pm$ 7.44 <sup>b</sup>

a: 与对照组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与LPS组比较,  $P < 0.01$ 。

### 2.3.3 细胞中Akt1、PI3K、HIF-1 $\alpha$ 的mRNA表达检测

取对数生长期的BEAS-2B细胞,按“2.3.1”项下方法分组、处理后(每组设3个复孔),收集各组细胞,提取细胞中总RNA,将RNA逆转录成cDNA。以cDNA为模板进行PCR扩增,扩增条件为:90 $^{\circ}\text{C}$ 预变性20 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性15 s,55~60 $^{\circ}\text{C}$ 退火15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min,共40个循环。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法<sup>[20]</sup>计算Akt1、PI3K、HIF-1 $\alpha$ 的mRNA表达水平。PCR引物由生物工程(上海)股份有限公司设计并合成,具体引物序列及扩增产物长度见表4。结果(表5)显示,与对照组比较,LPS组、miR-345-3p阴性对照组细胞中Akt1、PI3K、HIF-1 $\alpha$ 的mRNA表达水平均显著升高( $P < 0.01$ );与LPS组比较,miR-345-3p模拟物组细胞中Akt1、PI3K、HIF-1 $\alpha$ 的mRNA表达水平均显著降低( $P < 0.01$ )。

**表4 PCR引物序列及扩增产物长度**

基因	引物序列(5'-3')	扩增产物长度/bp
GAPDH	上游:ACACCCACTCCTCCACCTTTG	112
	下游:TCCACCACCTGTGCTGTAG	
Akt1	上游:CACTGTCATCGAAGCACCCTTC	116
	下游:AGTCCATCTCCTCCTCCTCTG	
HIF-1 $\alpha$	上游:GTTCCGCAAGCCCTGAAAGC	113
	下游:TCATCAGTGGTGGCAGTGGTAG	
PI3K	上游:CGGTGACTGTGTGGGACTTATTGAG	111
	下游:TGTAGTGTGTGGCTGTGAAGCTGC	

**表5 各组细胞中Akt1、PI3K、HIF-1 $\alpha$ 的mRNA表达水平比较**( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

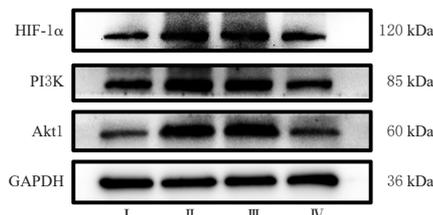
组别	Akt1	PI3K	HIF-1 $\alpha$
对照组	1.00 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.08
LPS组	7.15 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	1.78 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	1.72 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>
miR-345-3p阴性对照组	6.18 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup>	1.77 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	1.89 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>
miR-345-3p模拟物组	0.77 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	1.16 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	1.01 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>

a: 与对照组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与LPS组比较,  $P < 0.01$ 。

### 2.3.4 细胞中Akt1、PI3K、HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达检测

取对数生长期的BEAS-2B细胞,按“2.3.1”项下方法分组、处理后(每组设3个复孔),收集各组细胞,加入RIPA裂解液裂解30 min,离心取上清液;经BCA法测定蛋白浓度后,将蛋白进行变性处理。取变性蛋白上样进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳;经转膜、封闭后,加入GAPDH、Akt1、PI3K、HIF-1 $\alpha$ 一抗(稀释度分别为1:4 000、1:4 000、1:2 000、1:3 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;洗膜,加入二抗(稀释度为1:5 000),室温孵育1 h;经显影处理后,利用Image J软件分析蛋白条带灰度值,以目的蛋白与内参(GAPDH)蛋白条带的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。结果(图5、表6)显示,与对照组比

较,LPS组、miR-345-3p阴性对照组细胞中Akt1、PI3K、HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达水平均显著升高( $P < 0.01$ );与LPS组比较,miR-345-3p模拟物组细胞中Akt1、PI3K、HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达水平均显著降低( $P < 0.01$ )。



I: 对照组; II: LPS组; III: miR-345-3p阴性对照组; IV: miR-345-3p模拟物组。

**图5 各组细胞中Akt1、PI3K、HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达的电泳图**

**表6 各组细胞中Akt1、PI3K、HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达水平比较**( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	Akt1	PI3K	HIF-1 $\alpha$
对照组	0.50 $\pm$ 0.09	0.65 $\pm$ 0.08	0.48 $\pm$ 0.13
LPS组	1.08 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	1.09 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.99 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
miR-345-3p阴性对照组	1.11 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	1.00 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	1.01 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
miR-345-3p模拟物组	0.65 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	0.65 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.54 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>

a: 与对照组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与LPS组比较,  $P < 0.01$ 。

## 3 讨论

研究发现,肺部疾病患者血清中外泌体总体水平发生改变<sup>[9]</sup>,外泌体携带的miRNA也被证实在肺部疾病的发生发展过程中发挥重要作用<sup>[21]</sup>。连翘和金银花配伍具有协同作用,可增强清热解毒的功效和抗炎效能,临床上常将两者配伍用于治疗ALI等肺部疾病<sup>[22]</sup>。然而,连翘-金银花药对是否可通过调控外泌体miRNA表达发挥改善ALI的作用尚不明确。本研究药效学结果显示,经连翘-金银花药对干预后,ALI大鼠BALF中促炎因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平降低,抗炎因子IL-10水平升高。在此药效结果的基础上,为深入揭示其作用机制,本研究采用高通量测序技术筛选了连翘-金银花药对干预后ALI大鼠血清外泌体中差异表达的miRNA,结果显示,miR-345-3p、miR-194-5p、miR-653-5p等在连翘-金银花药对组大鼠血清外泌体中显著上调。结合文献<sup>[15-16]</sup>发现,miR-345-3p与炎症反应密切相关。进一步通过KEGG富集分析发现,差异表达miRNA的靶基因涉及的KEGG通路包括轴突导向信号通路、钙信号通路和HIF-1信号通路。研究发现,HIF- $\alpha$ 作为HIF的核心亚基,能够通过上游分子PI3K和Akt1的信号传导实现HIF-1途径的激活,从而在ALI的发生发展中发挥作用<sup>[23-24]</sup>。由此推测,HIF-1信号通路可能是连翘-金银花药对调控血清外泌体miRNA发挥改善ALI的重要作用通路。

基于此,本研究通过构建ALI细胞模型,并转染miR-345-3p模拟物(模拟miR-345-3p过表达),以验证上述推测。结果发现,与LPS组比较,miR-345-3p模拟物组细胞上清液中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平和细胞中Akt1、

PI3K、HIF-1 $\alpha$ 的mRNA及其蛋白表达水平均显著降低,细胞上清液中IL-10水平显著升高。这提示,连翘-金银花药对减轻ALI引发的炎症反应的作用可能与上调血清外泌体中miR-345-3p表达,抑制HIF-1信号通路活性有关。

综上所述,连翘-金银花药对可通过上调血清外泌体中miR-345-3p表达,抑制HIF-1信号通路活性,从而减轻炎症反应,进而发挥改善ALI的作用。然而,本研究仍存在一定局限性,如未对连翘-金银花药对调控外泌体分泌及体内递送的具体上游机制进行深入探讨,未设置阳性对照药组和单味药对照组进行全面药效评估,未采用HIF-1信号通路抑制剂进行反向验证。后续,本课题组将弥补上述不足,深入考察连翘-金银花药对改善ALI的作用机制。

## 参考文献

- [1] LIANG D J, SUN Y, SHEN Y B, et al. Shikonin exerts anti-inflammatory effects in a murine model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting the nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 16(4): 475-480.
- [2] 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.
- [3] 张稚鲲, 王若尧, 陈仁寿. 古今肺系疫病方配伍特点对比研究[J]. *中医药信息*, 2018, 35(4): 73-76.
- [4] WEN X, CHENG M, SONG Z X, et al. Molecular mechanism of honeysuckle + forsythia in treatment of acute lung injury based on network pharmacology[J]. *Biomed Rep*, 2024, 20(2): 32.
- [5] 薛丙权, 朱艳慧, 余海艳, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS和网络药理学研究连翘治疗急性肺损伤的作用机制[J]. *中国医院药学杂志*, 2022, 42(21): 2208-2215.
- [6] ZHOU Y, LI P F, GOODWIN A J, et al. Exosomes from endothelial progenitor cells improve the outcome of a murine model of sepsis[J]. *Mol Ther*, 2018, 26(5): 1375-1384.
- [7] YI X M, WEI X X, LV H J, et al. Exosomes derived from microRNA-30b-3p-overexpressing mesenchymal stem cells protect against lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting SAA3[J]. *Exp Cell Res*, 2019, 383(2): 111454.
- [8] ZHANG D, LEE H, WANG X Y, et al. A potential role of microvesicle-containing miR-223/142 in lung inflammation[J]. *Thorax*, 2019, 74(9): 865-874.
- [9] 黄宁, 胡长平. 外泌体在肺部疾病中的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2023, 39(11): 2006-2011.
- [10] LV K Y, LIANG Q. Macrophages in sepsis-induced acute lung injury: exosomal modulation and therapeutic potential[J]. *Front Immunol*, 2025, 15: 1518008.
- [11] ZHOU W, YIN A L, SHAN J J, et al. Study on the rationality for antiviral activity of Flos Lonicerae Japonicae-  
Fructus Forsythiae herb chito-oligosaccharide via integral pharmacokinetics[J]. *Molecules*, 2017, 22(4): 654.
- [12] 秦丽, 向盈, 李涵, 等. 益气活血方对脂多糖致急性肺损伤大鼠肺气血屏障功能的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2024, 47(12): 1702-1709.
- [13] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [14] 余亚辉, 吕田田, 薛丙权, 等. 外泌体装载连翘酯苷A递药系统的制备及体外评价[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(11): 2824-2829.
- [15] WEI Q, TU Y Z, ZUO L, et al. miR-345-3p attenuates apoptosis and inflammation caused by oxidized low-density lipoprotein by targeting TRAF6 via TAK1/p38/NF- $\kappa$ B signaling in endothelial cells[J]. *Life Sci*, 2020, 241: 117142.
- [16] DAI Y, YI X L, HUANG Y H, et al. miR-345-3p modulates M1/M2 macrophage polarization to inhibit inflammation in bone infection via targeting MAP3K1 and NF- $\kappa$ B pathway[J]. *J Immunol*, 2024, 212(5): 844-854.
- [17] MI H Y, HUANG X S, MURUGANUJAN A, et al. PANTHER version 11: expanded annotation data from gene ontology and reactome pathways, and data analysis tool enhancements[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D183-D189.
- [18] DU N, LIN H M, ZHANG A Q, et al. N-phenethyl-5-phenylpicolinamide alleviates inflammation in acute lung injury by inhibiting HIF-1 $\alpha$ /glycolysis/ASIC1a pathway[J]. *Life Sci*, 2022, 309: 120987.
- [19] QIAN F H, HE S C, YANG X M, et al. Circular RNA DHTKD1 targets miR-338-3p/ETS1 axis to regulate the inflammatory response in human bronchial epithelial cells[J]. *Exp Ther Med*, 2023, 26(1): 316.
- [20] 谢淑敏, 郭淑杰, 薛丙权, 等. 基于树突细胞外泌体miRNA探究人参皂苷Rg<sub>3</sub>改善慢性阻塞性肺疾病的作用机制[J]. *中国医院药学杂志*, 2025, 45(10): 1140-1146.
- [21] ZHANG J H, TIAN W Y, WANG F, et al. Advancements in understanding the role of microRNAs in regulating macrophage polarization during acute lung injury[J]. *Cell Cycle*, 2023, 22(14/15/16): 1694-1712.
- [22] 丁晓彦, 林志军, 王岱. 金银花-连翘药对的成分和药理作用研究进展[J]. *山东科学*, 2019, 32(3): 36-41.
- [23] HUANG J J, XIA J, HUANG L L, et al. HIF-1 $\alpha$  promotes NLRP3 inflammasome activation in bleomycin-induced acute lung injury[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(4): 3424-3432.
- [24] ECKLE T, BRODSKY K, BONNEY M, et al. HIF1A reduces acute lung injury by optimizing carbohydrate metabolism in the alveolar epithelium[J]. *PLoS Biol*, 2013, 11(9): e1001665.

(收稿日期:2025-08-20 修回日期:2026-01-15)

(编辑:唐晓莲)