

COPD患者免疫细胞亚群特征及六味补气胶囊干预的分子机制

王小乐¹, 朱洁^{2,4,5}, 高雅婷¹, 吴凡¹, 杨勤军¹, 童佳兵³⁻⁵, 张星星³⁻⁵, 王传博⁴⁻⁶, 吴迪¹, 李泽庚³⁻⁵

安徽中医药大学¹研究生院,²中西医结合学院, 安徽 合肥 230012; ³第一附属医院, 安徽 合肥 230031; ⁴安徽省中医药科学院中医呼吸病防治研究所, 安徽 合肥 230031; ⁵安徽省教育厅重点实验室中医药防治肺系重大疾病重点实验室, 安徽 合肥 230031; ⁶安徽医科大学第二附属医院中医科, 安徽 合肥 230601

摘要:目的 探讨慢性阻塞性肺疾病(COPD)肺组织免疫细胞亚群特征及六味补气胶囊改善其免疫炎症失衡的机制。方法 基于基因表达汇编(GEO)数据库, 下载COPD相关研究的单细胞测序数据, 使用R软件中Seurat包分析获取COPD免疫细胞亚群特征, 以构建COPD的各免疫细胞亚群的“免疫细胞亚群-差异基因”关系; 通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)平台获取六味补气胶囊的主要活性成分及靶基因, 将靶基因映射到COPD各免疫细胞亚群的差异基因, 构建“六味补气胶囊-免疫细胞亚群-靶基因”网络, 通过京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析, 研究该网络中靶基因的显著富集的通路, 并获取显著富集通路间关联的靶基因。经六味补气胶囊干预COPD大鼠模型实验研究, 分析其对COPD大鼠的肺功能和肺组织病理改变, 血清IL1B、NF- κ B、TNF- α 的表达情况, 及肺组织IKB α 、JNK、c-JUN、c-FOS的蛋白表达。结果 COPD和正常对照中均存在巨噬细胞、肺泡巨噬细胞等18种免疫相关细胞亚群。与正常对照相比, COPD患者肺组织中巨噬细胞、cDC1、pDC、肥大细胞、T细胞、成熟树突状细胞占总细胞数比的差异均具有统计学意义($P<0.05$)。六味补气胶囊靶向多个免疫细胞亚群, 且靶基因主要富集于脂质和动脉粥样硬化、IL-17信号通路、Toll样受体信号通路、TNF信号通路等免疫炎症相关信号通路, 其中CXCL8、IL1B、JUN、NFKBIA、MAPK8、FOS等可能是显著富集通路间的关联基因, 动物实验研究表明六味补气胶囊可有效改善COPD大鼠肺功能和肺组织病理改变, 并降低COPD大鼠血清IL1B、TNF- α 、NF- κ B($P<0.05$)和肺组织肺组织JNK、c-JUN、c-FOS($P<0.01$)蛋白的表达, 升高肺组织IKB α 蛋白表达($P<0.01$)。结论 六味补气胶囊可能通过靶向COPD患者肺组织中多种免疫细胞亚群发挥免疫调节作用。

关键词:慢性阻塞性肺疾病; 六味补气胶囊; 免疫炎症; 单细胞转录组测序

Liuwei Buqi capsule modulates immune function by targeting multiple immune cell subsets in lung tissue of patients with COPD

WANG Xiaole¹, ZHU Jie^{2,4,5}, GAO Yating¹, WU Fan¹, YANG Qinjun¹, TONG Jiabing³⁻⁵, ZHANG Xingxing³⁻⁵, WANG Chuanbo⁴⁻⁶, WU Di¹, LI Zegeng³⁻⁵

¹Graduate School, ²College of Integrated Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; ³First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China; ⁴Institute of Medicine for Respiratory Disease, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230031, China; ⁵Key Laboratory of Chinese Medicine for Prevention and Control of Major Diseases in Pulmonary System, Key Laboratory of Anhui Provincial Education Department, Hefei 230031, China; ⁶Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, China

Abstract: Objective To investigate the characteristics of immune cell subsets in the lung tissues of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and the mechanism of Liuwei Buqi capsule in modulating immune and inflammatory imbalance in COPD. **Methods** We downloaded COPD-related single-cell RNA sequencing data from Gene Expression Omnibus (GEO) and identified COPD immune cell subsets using the Seurat package in the R software to construct an immune cell subsets-differential genes network. The target genes and active ingredients of Liuwei Buqi capsule were obtained from the Chinese Medicine System Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), and the Liuwei Buqi capsule-immune cell subsets-target genes network was constructed by mapping the target genes to the differentially expressed genes in each immune cell subset. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis was performed to analyze significantly enriched pathways of the target genes, and the key genes involved in the top 20 pathways were identified. In a rat model of COPD, we investigated the effects of Liuwei Buqi capsule on pulmonary function, lung tissue pathology, serum levels of IL-1 β , NF- κ B, and TNF- α , and expressions of IKB α , JNK, c-JUN, and c-FOS proteins in the lung tissue. **Results** A total

of 18 immune-related cell subsets, including macrophages and alveolar macrophages, were identified in both COPD patients and healthy control subjects, and the patients with COPD showed significant changes the percentages of macrophages, cDC1, pDC, mast cells, T cells, and mature dendritic cells ($P<0.05$). Liuwei Buqi capsules targeted multiple immune cell subsets, and the identified target genes were enriched mostly in such immune and inflammation-related signaling pathways as lipids and atherosclerosis, IL-17 signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, and TNF signaling

收稿日期: 2021-07-08

基金项目: 国家自然科学基金区域创新发展联合基金重点支持项目(U20A20398); 国家自然科学基金(81974569); 2021年安徽省重点研究与开发计划(202104j07020013); 中国博士后基金面上资助项目(2018M640345); 安徽高校协同创新项目(GXXT-2020-025); 安徽省科技重大专项(201903a07020015)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81974569).

作者简介: 王小乐, 在读博士研究生, E-mail: Jony_wang@live.com

通信作者: 李泽庚, 教授, 博士生导师, E-mail: li6609@126.com

pathway; the genes CXCL8, IL1B, JUN, NFKBIA, MAPK8, and FOS were the key genes involved in the significantly enriched pathways. In the rat models of COPD, treatment with *Liawei Buqi* capsule significantly improved pulmonary function, alleviated lung pathologies, reduced serum levels of IL-1 β , TNF- α , and NF- κ B ($P<0.05$) and pulmonary expressions of JNK, c-JUN, and c-FOS ($P<0.01$) protein, and increased pulmonary expression of IkB α ($P<0.01$). **Conclusion** *Liawei Buqi* capsule may play an immunomodulatory role by targeting multiple immune cell subsets in the lung tissue of COPD patients.

Keyword: chronic obstructive pulmonary disease; *Liawei Buqi* capsule; immune and inflammation; single-cell RNA sequencing

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种常见慢性炎症持续存在的呼吸系统疾病,归属中医“肺胀”、“喘证”等范畴,我国成人发病率高达8.6%,在疾病致死率中排第4位^[1,2]。长期吸烟、空气污染等是导致COPD发生和持续进展的重要危险因素,可引起肺部巨噬细胞、中性粒细胞等的免疫相关细胞的异常活化,白介素-1 β (IL-1 β)、IL-8、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等炎症因子的大量释放,终致肺部反复的损伤与修复、肺泡结构破坏、气道和肺血管重构等改变^[3,4]。因此,探究COPD肺部免疫细胞特征及其涉及的分子机制,对研究药物调控COPD免疫失衡机制具有指导作用。

中医认为肺气虚是COPD发病的根本所在^[5,6],基于新安医学“固本培元”理论,创制的六味补气胶囊可有效改善COPD患者肺功能,减少COPD的急性发作次数^[7,8],调节Th1/Th2平衡,提高血清Treg和IL-4表达,降低IFN- γ 和IL-17水平,改善COPD的免疫紊乱和炎症状态^[9]。实验研究表明,六味补气胶囊能显著降低COPD大鼠IL-1 β 、IL-10、TIMP1、MMP9等蛋白的表达,改善大鼠肺功能及肺部炎症反应^[10,11],但其对COPD相关的其它炎症免疫细胞调控机制有待探明。为此,本次研究通过挖掘COPD的单细胞转录组数据联合网络药理学方法,研究COPD肺组织免疫细胞群特征及六味补气胶囊干预COPD免疫失衡的可能分子机制,为进一步揭示六味补气胶囊对COPD炎症免疫调控机制提供基础。

1 资料和方法

1.1 数据库与软件

研究通过检索基因表达汇编(GEO)数据库获取COPD相关的单细胞转录组测序研究;中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)获取六味补气胶囊的主要活性成分及其靶向的基因;Rstudio加载R软件的Seurat包(版本:4.0.2)、clusterProfiler包(版本:3.16.1)、ggplot2(版本:3.3.3)包进行数据分析和可视化。

1.2 六味补气胶囊活性成分及其靶点获取

通过TCMSP数据库检索并下载六味补气胶囊的组成方药(人参、黄芪、益智、玉竹、陈皮、肉桂)的主要成分及靶基因表。将获取的主要成分和靶基因表导入Rstudio中,通过设置口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 筛选后续研究所需的药物成分及其靶基因。

1.3 COPD的“免疫细胞亚群—差异基因”关系构建

检索并下载GEO数据库中COPD相关的单细胞转录组测序研究的临床样本信息和RawCounts稀疏矩阵,并加载到Rstudio软件中。制定研究个体纳入排除标准:(1)纳入的研究个体涉及正常对照或COPD;(2)去除与COPD个体年龄相差极大的正常对照样本。使用R软件从正常对照和COPD中各随机选取6个个体进行数据分析,使用R软件中Seurat包将数据转换为Seurat对象后,计算线粒体基因占比,以获取线粒体基因占比小于20%且转录本数大于1000且的细胞。对过滤后的数据进行整合、标准化、降维、聚类处理后,绘制正常对照和COPD的特征细胞图。下载研究中所有COPD与正常对照比较的各免疫细胞的差异表达基因矩阵,构建COPD的“免疫细胞亚群—差异基因”关系网络,用于后续构建“六味补气胶囊—免疫细胞亚群—靶基因”网络。

1.4 “六味补气胶囊—免疫细胞亚群—靶基因”网络构建

将COPD“免疫细胞亚群—差异基因”关系网络和六味补气胶囊的“活性成分—靶基因”网络导入R软件中,通过差异基因和靶基因的映射,构建“六味补气胶囊—免疫细胞亚群—靶基因”网络,分析六味补气胶囊中主要的活性成分所靶向的免疫细胞群和基因。

1.5 六味补气胶囊靶向免疫细胞亚群的机制预测

为研究六味补气胶囊靶向免疫细胞亚群的可能机制,首先提取“六味补气胶囊—免疫细胞亚群—靶基因”网络中的靶基因,使用R软件clusterProfiler包进行KEGG富集分析,获取靶基因富集的信号通路,以此推断六味补气胶囊调控免疫细胞的潜在分子机制,并使用ggplot2包对基因显著富集的前20条通路进行可视化,使用d3Network包绘制显著富集的前20信号通路及其富集的具体基因,寻找信号通路关联的主要基因。

1.6 COPD大鼠模型构建及六味补气胶囊干预实验

参考宋一平等复制COPD大鼠模型方法^[12],采用香烟烟熏联合脂多糖(LPS)气管滴注法构建COPD大鼠模型,造模及给药周期为28 d。清洁级SD大鼠(200 $\pm$ 20 g)购自安徽医科大学动物实验中心,合格证号:SCXK(皖)2017-001。大鼠经1周适应性喂养后,随机分为正常组($n=6$)、COPD组($n=6$)、六味补气胶囊组($n=6$)。其中COPD组和六味补气胶囊组于第1、14天行气道滴注200 μ L LPS(1 mg/mL),且当天不给与烟熏,正常组给予等体积的生理盐水气道滴注,其余时间按1次/d烟

熏,烟熏 30 min/次。造模第3周开始,六味补气胶囊组按人临床等效剂量给与六味补气胶囊混悬液灌胃(0.5 g/kg),其余各组给与等体积生理盐水灌胃,连续灌胃2周至造模结束。

1.7 大鼠肺功能和肺组织形态学评估

造模和给药结束后,大鼠经3%戊巴比妥钠麻醉,采用AniRes2005动物肺功能分析系统检测各组大鼠的FEV0.3、FVC、FEV0.3/FVC值,以分析大鼠的肺功能;取大鼠肺组织,并经4%多聚甲醛固定后,随后脱水、包埋、切片等,HE染色法观察COPD大鼠肺组织的病理变化,并计算肺泡平均线性截距(AMLI),以评估肺泡结构改变。

1.8 血清ELISA及肺组织免疫组化检测

经腹主动脉取血,3000 r/min离心10 min后取上层血清,ELISA法检测血清中IL1B、TNF- α 、NF- κ B表达;取大鼠肺组织,并经4%多聚甲醛固定,随后经脱水、包埋、切片等,免疫组化法检测大鼠肺组织IkB α (Bioss, bs-1287R;稀释比:1:300)、JNK(proteintech, 66210-1-Ig;稀释比:1:1000)、c-JUN(Bioss, bs-0670R;稀释比:1:300)、c-FOS(Bioss, bs-0469R;稀释比:1:300)蛋白表达,验证六味补气胶囊对靶基因的影响。

1.9 统计学处理

采用IBM SPSS Statistics 23.0进行统计学分析,两

组间细胞占比差异分析采用Wilcoxon秩和检验,正态分布数据用均数 $\pm$ 标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 定义差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 六味补气胶囊的活性成分及靶基因

通过在TCMSP中检索并筛选到六味补气胶囊中各药物的181个主要活性成分及342个靶基因,其中人参、黄芪、益智、玉竹、陈皮、肉桂各药的主要成分及靶基因数如表1。

2.2 COPD单细胞测序研究

本次研究纳入的COPD相关的单细胞转录组测序研究(GSE136831)包含28个正常对照、18个COPD,筛选后共纳入16个正常对照和18个COPD个体数据进行分析,各组男女性别各占一半。

2.3 COPD的“免疫细胞群—差异基因”关系网络

对正常对照和COPD患者个体的肺组织免疫细胞特征分析,结果发现两组个体肺组织中均检测到B细胞、T细胞、巨噬细胞,肺泡巨噬细胞等18个免疫相关细胞亚群(图1)。对各免疫细胞亚群占总细胞数比分析发现,与正常对照相比,COPD组巨噬细胞、cDC1、pDC、肥大细胞、T细胞、成熟树突状细胞占总细胞比差异均具有统计学意义($P<0.05$,图2)。

表1 六味补气胶囊各药物活性成分及靶基因数

Tab.1 Active ingredients and their target genes in *Liawei Buqi* capsule

Herb (Latin name)	Number of molecules	Number of target genes
Citrus Reticulata	32	113
Hedysarum Multijugum Maxim	35	252
Cinnamomi Cortex	47	148
Panax Ginseng C. A. Mey	49	143
Polygonati Odorati Rhizoma	19	62
Alpiniae Oxyphyllae Fructus	20	67

2.4 六味补气胶囊调控COPD的“六味补气胶囊—免疫细胞亚群—靶基因”网络

六味补气胶囊中各药物组成靶向至少11种免疫细胞亚群的多个靶点,其中人参和黄芪所靶向的免疫细胞和靶基因排前2(表2)。

2.5 六味补气胶囊调控免疫细胞群的功能

通过KEGG富集分析探究六味补气胶囊靶向免疫细胞群的作用机制,结果发现其靶向的基因主要富集于脂质和动脉粥样硬化、IL-17信号通路、Toll样受体信号通路、TNF信号通路等信号通路等信号通路(图3),通过分析前20条通路的共有基因发现,其中CXCL8、IL1B、JUN、NFKB1A、MAPK8、FOS等多个基因富集于多条通路(图4)。

2.5 六味补气胶囊对COPD大鼠肺功能及肺病理的影响

观察各组大鼠肺组织病理,结果发现,COPD组大鼠肺泡壁变薄、断裂、且炎性细胞浸润;六味补气胶囊组大鼠肺泡结构、炎性细胞浸润等均有所改善,且AMLI显著降低(图5)。与正常组大鼠肺功能比较,COPD组大鼠肺功能显著降低($P<0.05$);与COPD组大鼠肺功能比较,六味补气胶囊组大鼠肺功能有所降低,且差异具有统计学意义(图6)。

2.6 六味补气胶囊对COPD大鼠血清IL1B、TNF- α 、NF- κ B表达的影响

与正常组大鼠比较,COPD组大鼠血清IL1B、TNF- α 、NF- κ B水平显著升高;与COPD组相比,六味补气胶囊组大鼠血清中IL1B、TNF- α 、NF- κ B表达降低,且差异具

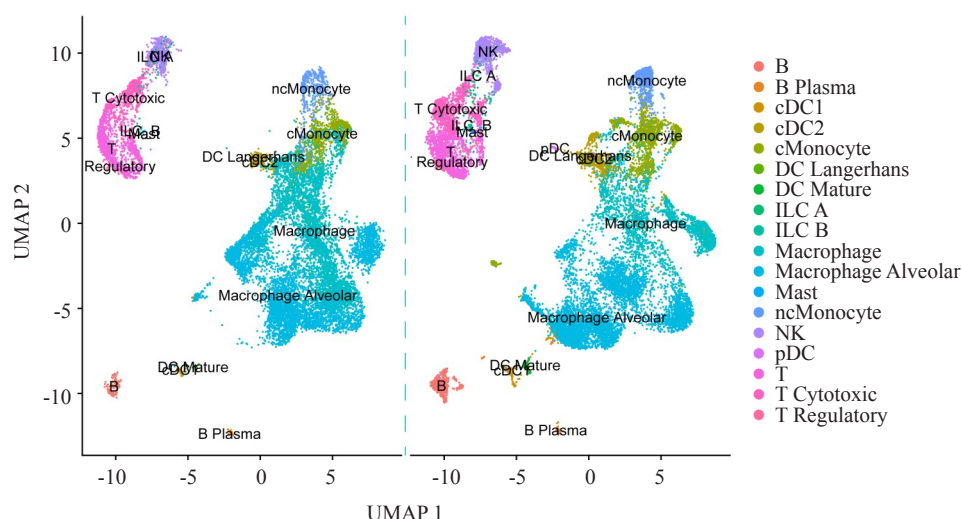


图1 肺组织中免疫细胞亚群特征

Fig.1 Characteristics of immune cell subsets in the lung tissue of COPD patients.

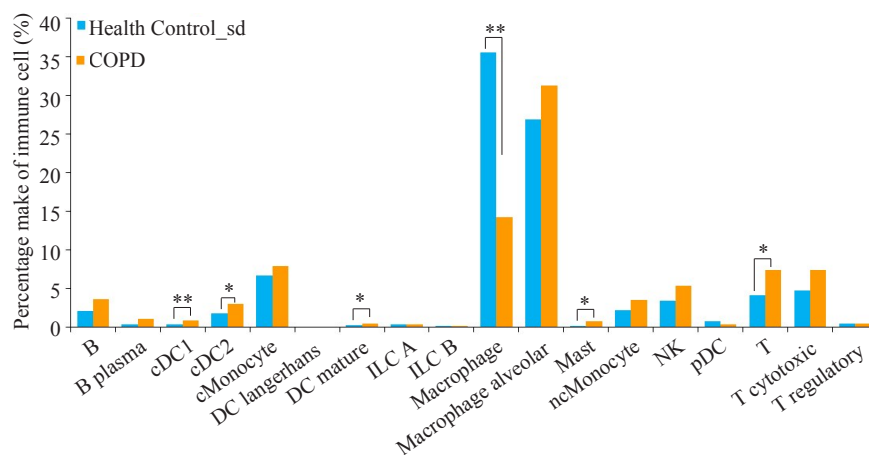


图2 肺组织中免疫细胞亚群占总细胞数量比

Fig.2 Percentages of the immune cell subsets in the total cells. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

有统计学意义(图7)。

2.7 六味补气胶囊对COPD大鼠肺组织IkB α 、JNK、c-JUN、c-FOS蛋白表达的影响

免疫组化结果显示,与正常组大鼠比较,COPD组大鼠肺组织JNK、c-JUN、c-FOS蛋白表达显著升高($P < 0.01$),IkB α 表达显著降低;与COPD组大鼠比较,六味补气胶囊组大鼠肺组织IkB α 表达显著升高,JNK、c-JUN、c-FOS蛋白表达显著降低(图7)。

3 讨论

既往研究表明,六味补气胶囊通过调控JAKs/STATs通路相关蛋白的水平、调节Th1/Th2细胞平衡等,改善COPD的炎症免疫异常^[9, 10, 13]。此外,六味补气胶囊干预COPD的血浆和尿液代谢组研究发现,其可影响蛋白质、脂类等多种代谢物水平^[14-16],提示六味补气胶囊的多靶点特征。本次研究发现六味补气胶囊中各药物均有多活性成分和靶基因。为此,进一步挖掘COPD

单细胞测序相关数据,以探究六味补气胶囊调控COPD炎症免疫细胞亚群可能的机制。

通过分析COPD相关免疫细胞亚群,结果发现巨噬细胞、T细胞等共18种免疫相关细胞。与正常对照相比,COPD中巨噬细胞、肥大细胞(Mast)、T细胞、树突状细胞(DC)等占比具有显著改变。研究表明,吸烟可激活巨噬细胞和肺泡巨噬细胞分泌TNF- α 、CXCL1等炎症分子,但这些激活的细胞对细菌和凋亡细胞的吞噬作用却降低^[4],提示免疫功能异常可能是COPD慢性炎症持续存在的重要机制。我们前期对COPD和正常人群的肺泡巨噬细胞差异基因研究发现,巨噬细胞的差异基因主要富集于细胞因子受体的相互作用、趋化因子信号通路等,参与COPD的炎症免疫机制^[17],靶向肺巨噬细胞的相关通路可能是药物防治COPD的潜在策略^[18]。GR等^[19]研究发现,DC细胞可激活巨噬细胞、T细胞、B细胞等多种免疫炎症细胞,与COPD的严重程度相关。我们研究发现相同免疫细胞具有大量的差异表达基因,为

表2 六味补气胶囊靶向的免疫细胞亚群和靶基因
Tab.2 Target immune cell subsets and genes of *Liawei Buqi* capsule

Herb (Latin Name)	Number of target cell	Immune cell subsets	Number of target gene	Target gene symbol
Panax Ginseng C. A. Mey.	14	Mast/cMonocyte/ncMonocyte/Macrophage /Macrophage Alveolar/cDC1/B Plasma/B/ T_Cytotoxic/T/DC Mature/NK/T Regulatory/cDC2	14	ALOX5/HMOX1/HSP90AA1/IL1B/INSR /JUN/LYZ/MAP2K4/MAPK8/NFKBIA/PDE4D /PPARG/PTPN1/TGFB1
Hedysarum multijugum maxim	13	cDC2/Mast/DC Mature/ncMonocyte /cMonocyte/Macrophage Alveolar /Macrophage/cDC1/B Plasma/B/T Cytotoxic/T/NK	26	ACTB/ALOX5/BCL2L1/CDKN1A/CXCL2 /CXCL8/FOS/HIF1A/HMOX1/HSP90AA1 /IL1B/INSR/JUN/LYZ/MAPK8/MT-ND6/ NFKBIA/OLR1/PPARD/PPARG /PTEN/PTPN1/RASA1/RUNX2/TGFB1/TOPI
Cinnanmomi cortex	11	Mast/DC Mature/cDC1/Macrophage Alveolar/B Plasma /B/T Cytotoxic/T/cMonocyte/ Macrophage/NK	9	ALOX5/CD86/HSP90AA1/JUN/LYZ/NFKBIA /PPARD/PPARG/PTPN1
Citrus reticulata	11	T/cDC1/Macrophage Alveolar/B Plasma /B/T Cytotoxic/cMonocyte/DC Mature /Macrophage/NK/Mast	8	ABCC1/HSP90AA1/JUN /LYZ/MAPK8/PPARG/PTPN1/TIMP1
Alpiniae oxyphyllae fructus	11	cDC2/cDC1/Macrophage Alveolar/B Plasma/B/T Cytotoxic/T/ cMonocyte/DC Mature /Macrophage/NK	4	ACTB/HSP90AA1/LYZ/PTPN1
Polygonati odorati rhizoma	11	Mast/cDC1/Macrophage Alveolar/B Plasma/B/T Cytotoxic/T/cMonocyte/ DC Mature/Macrophage/NK	5	ALOX5/HSP90AA1/JUN/LYZ/PTPN1

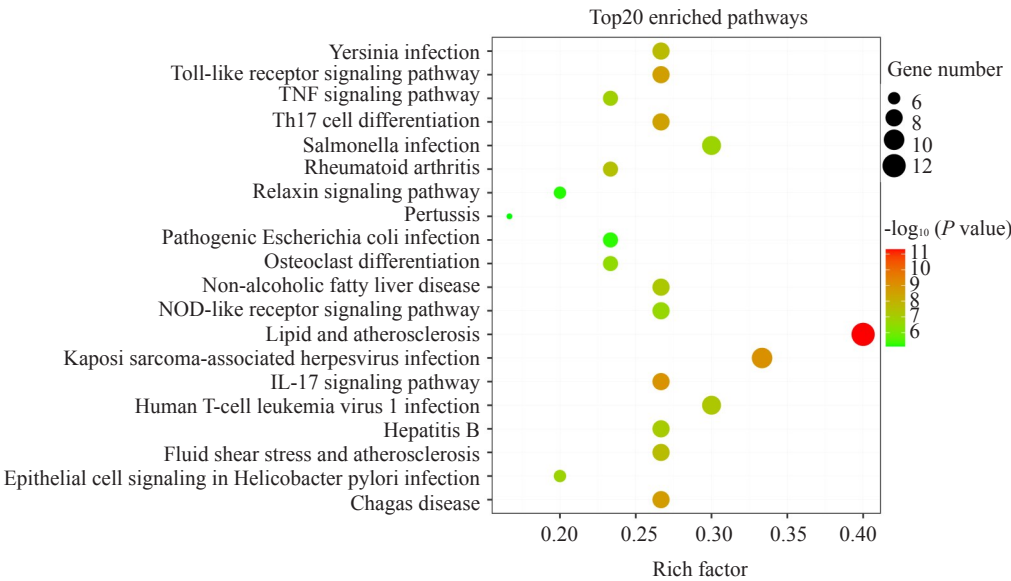


图3 六味补气胶囊靶向免疫细胞亚群相关基因的KEGG通路富集分析
Fig.3 KEGG enrichment analysis of targeted immune related gene of *Liawei Buqi* capsule.

此,进一步将六味补气胶囊的靶基因和COPD各免疫细胞的差异基因进行映射,以探究六味补气胶囊调控COPD炎症免疫反应的可能分子作用机制。

通过六味补气胶囊的靶基因和各免疫细胞差异基因的映射,结果发现六味补气胶囊的各药物均能靶向多个免疫细胞群的多个靶基因,靶基因显著富集于脂质和动脉粥样硬化、IL-17信号通路、Toll样受体信号通路、TNF信号通路等COPD密切关联的信号通路。其中,脂

质和动脉粥样硬化是靶基因最为显著富集的信号通路。研究表明,全身性的炎症是引起血脂异常的潜在机制之一,在COPD血脂的异常发挥着重要的角色,亦有许多研究证实COPD是动脉粥样硬化的独立预测因子^[20, 21]。因此,六味补气胶囊靶向免疫细胞亚群差异基因富集的脂质和动脉粥样硬化,提示其可能通过调控免疫炎症状态,延缓COPD的进一步进展。此外,显著富集的IL-17信号通路、Toll样受体信号通路、TNF信号通

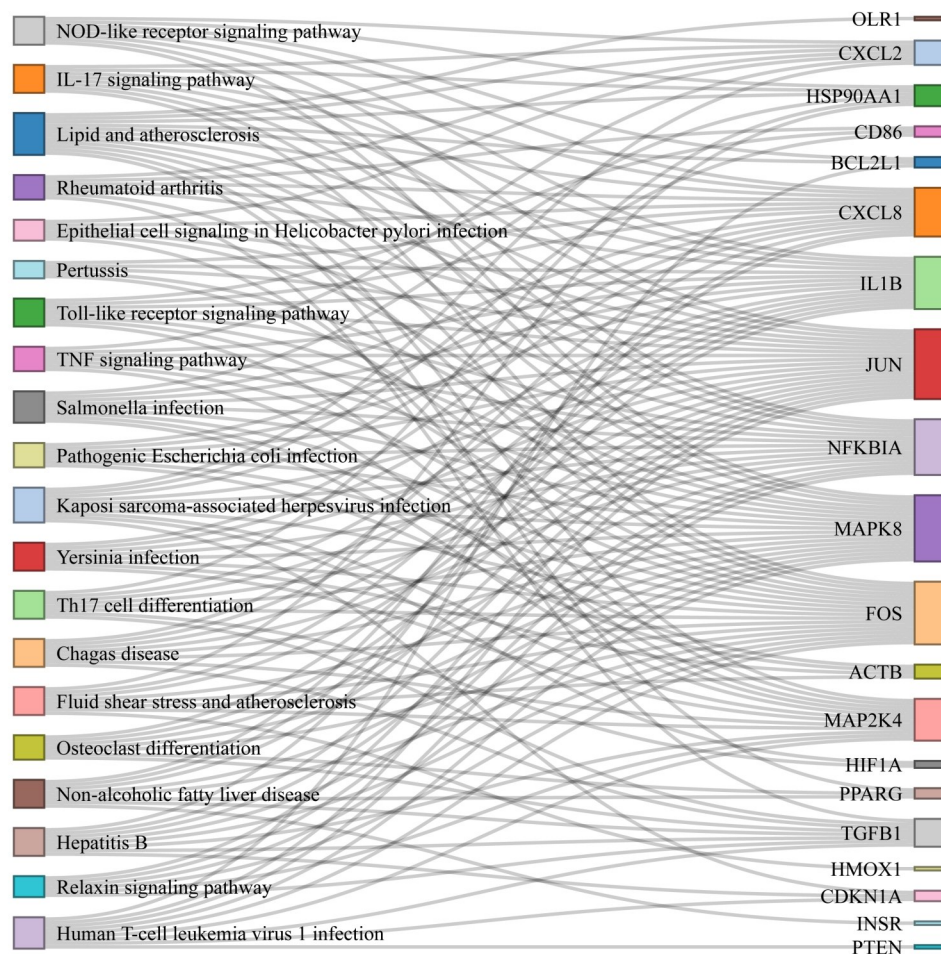


图4 富集于前20条通路及其靶基因

Fig.4 Top 20 enriched KEGG pathways and their target genes.

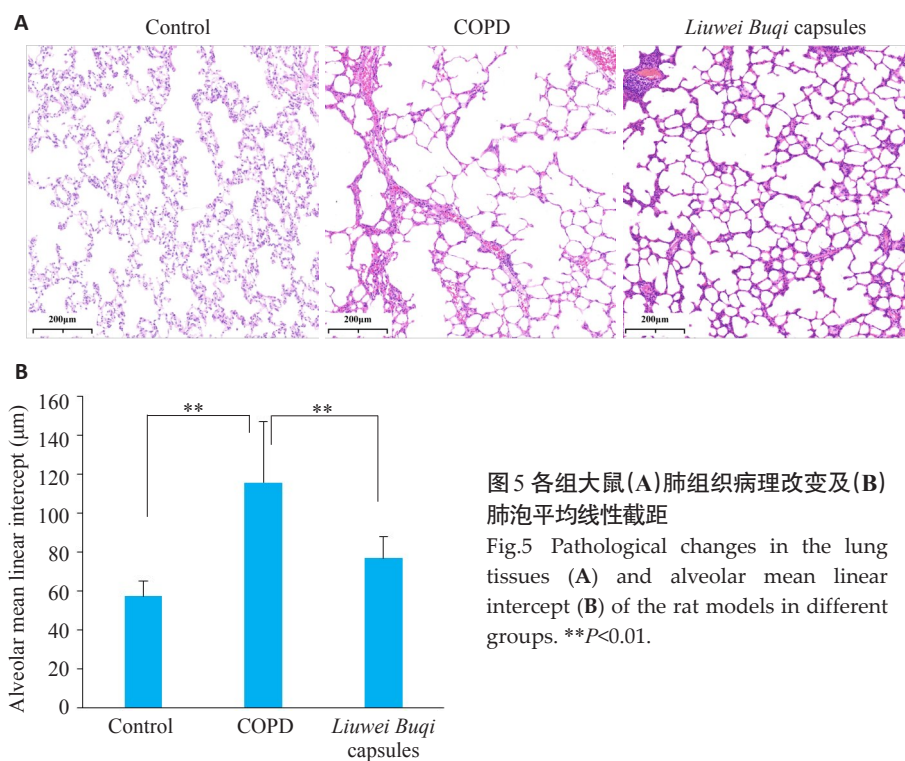


图5 各组大鼠(A)肺组织病理改变及(B)肺泡平均线性截距

Fig.5 Pathological changes in the lung tissues (A) and alveolar mean linear intercept (B) of the rat models in different groups. ** $P < 0.01$.

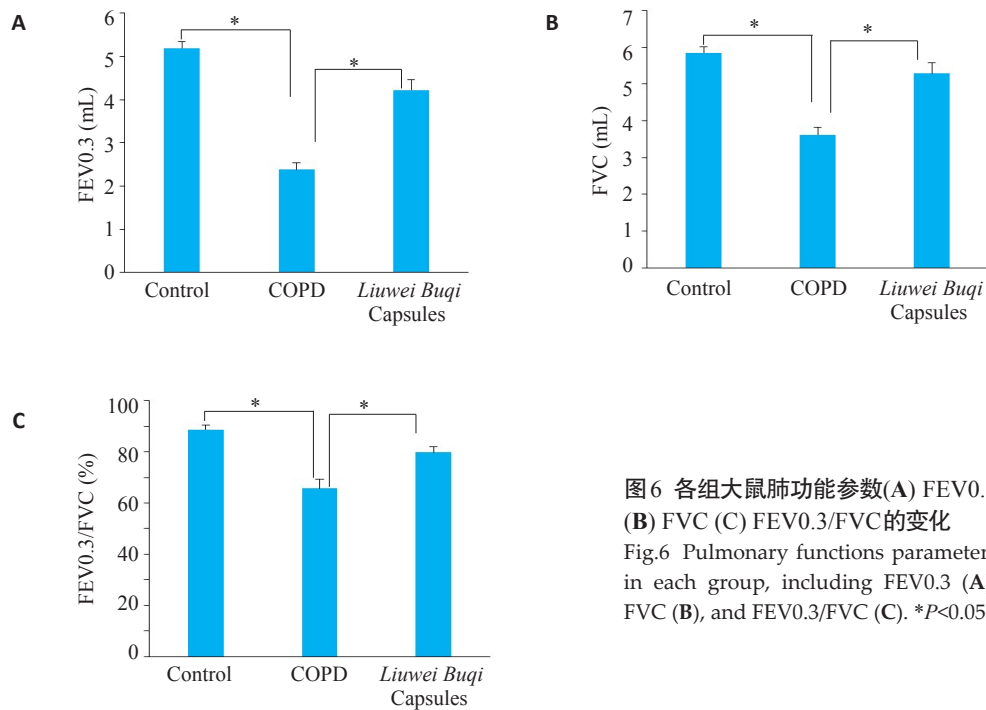


图6 各组大鼠肺功能参数(A) FEV_{0.3} (B) FVC (C) FEV_{0.3}/FVC的变化
Fig.6 Pulmonary functions parameters in each group, including FEV_{0.3} (A), FVC (B), and FEV_{0.3}/FVC (C). **P*<0.05.

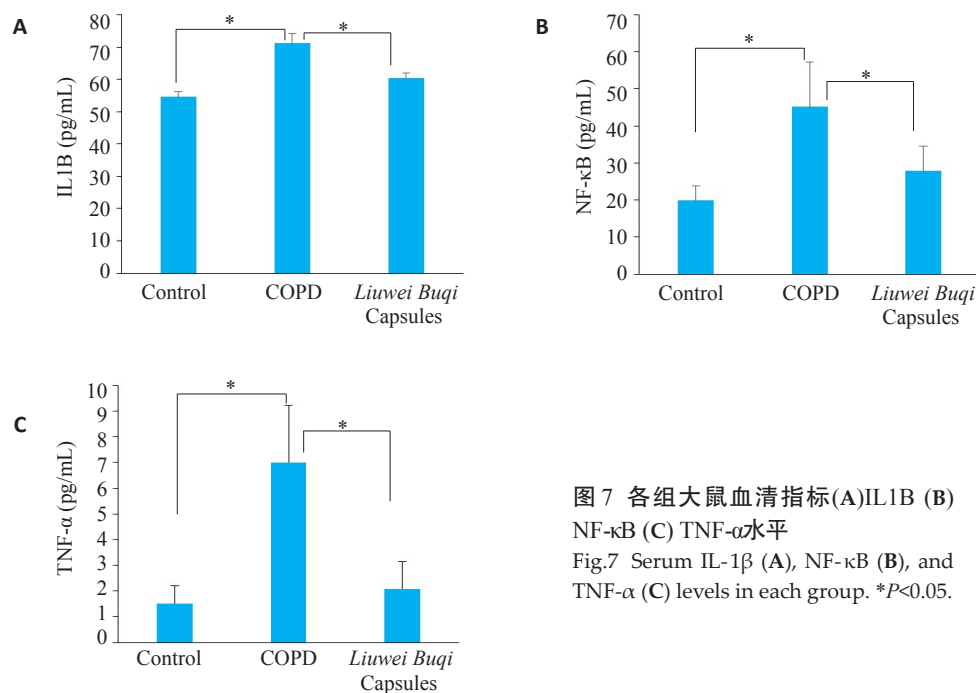


图7 各组大鼠血清指标(A)IL-1β (B) NF-κB (C) TNF-α水平
Fig.7 Serum IL-1β (A), NF-κB (B), and TNF-α (C) levels in each group. **P*<0.05.

路与COPD炎症免疫均有相关性,Dhamodharan等^[22]通过分析7个COPD相关的基因芯片研究发现差异基因亦显著富集于免疫炎症反应相关,其中Toll样受体信号通路与COPD的发病机制密切相关,且富集于该通路的CXCL9、CXCL10等差异基因可能是潜在的生物标记基因。IL-17通过与其受体结合,可激活NF-κB、PI3K-Akt等多条信号通路^[23],参与低氧性肺动脉高压的病理机制^[24],它与TNF-α均为促炎因子,它们的高表达与COPD的支气管损伤受损相关^[25]。六味补气胶囊靶向免疫细胞群的相关差异基因与炎症免疫反应导致的气

道重构、肺动脉高压、动脉粥样硬化等相关,表明其可能通过改善COPD的炎症免疫,干预疾病的进展,从而发挥防治作用。

通过寻找关联富集通路间的靶基因,发现CXCL8、IL1B、JUN、FOS、NFKBIA、MAPK8是多条信号通路共有基因。CXCL8常被称为IL-8,研究表明吸烟可以诱导巨噬细胞、树突状细胞、气道上皮细胞等分泌IL-8,而IL-8可招募中性粒细胞到达气道上皮细胞,促进MUC5AC和MUC5B的转录表达,参与COPD的进展^[26]。IL1B是一个重要的促炎因子,由巨噬细胞、单核细胞等

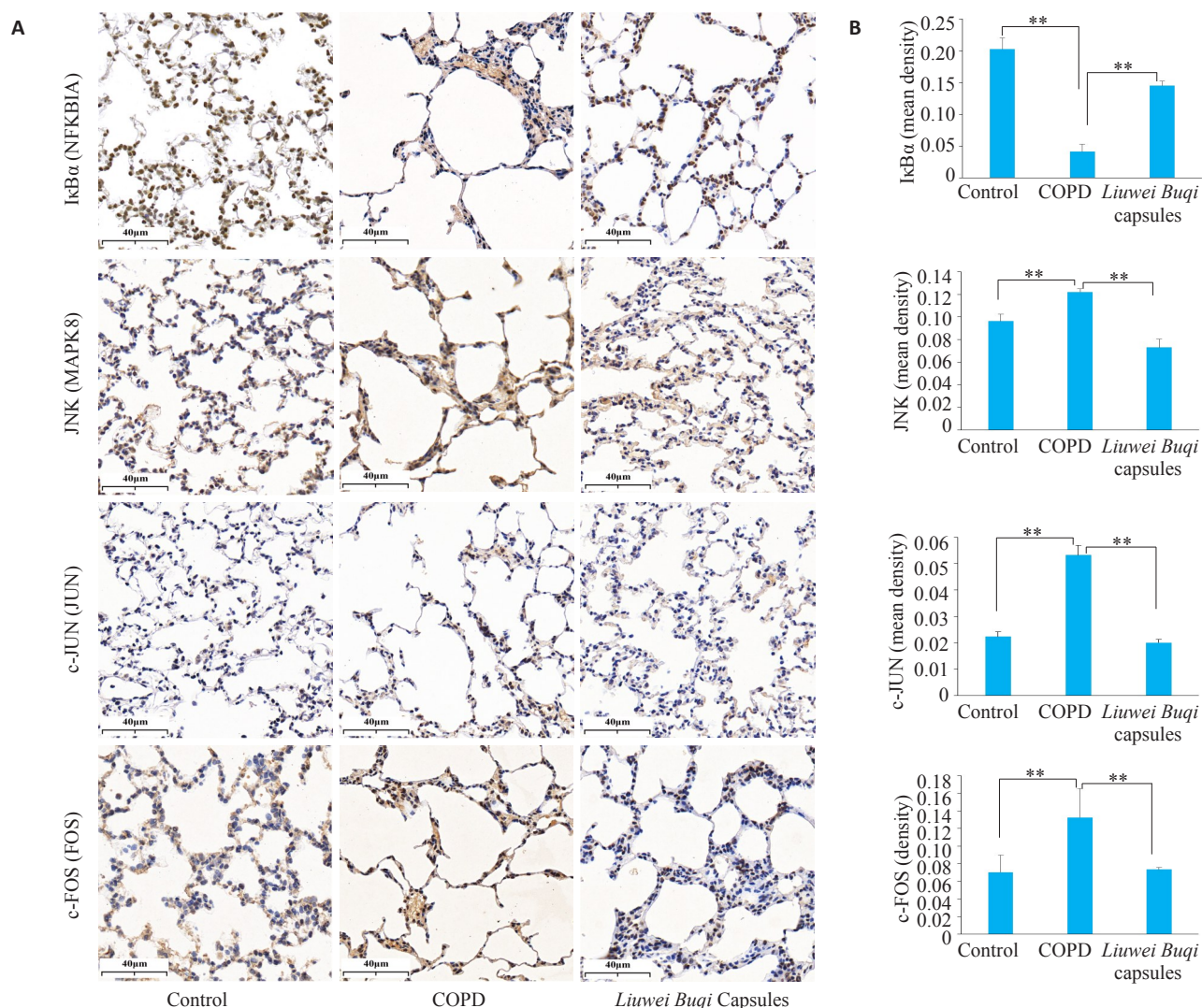


图8 各组大鼠肺组织IκBα、JNK、c-JUN、c-FOS蛋白免疫组化表达情况

Fig.8 Immunohistochemistry expressions of IκBα, JNK, c-JUN, and c-FOS protein in the lung tissue of rats in each group.

** $P < 0.01$.

多种细胞分泌,可加重对慢性疾病的损害^[27],Yi等^[28]研究发现IL1B在气道上皮细胞中表达显著升高。本次研究发现六味补气胶囊可显著降低COPD大鼠血清中IL1B表达,可能是其改善COPD炎症状态的作用机制之一。MAPK8又称为JNK、JNK1等,研究表明ROS通过调节巨噬细胞中MAPK8/9的活性,调节自噬^[29],香烟烟雾提取物可通过激活JNK,引起血管内皮细胞的损伤^[30],我们研究观察到六味补气胶囊可降低COPD大鼠肺组织中JNK的表达。NFKBIA是NF-κB的抑制分子,又名IκBα, Wu等^[31]研究发现,颗粒物(PM)可激活NF-κB的表达,其可能机制与降低NFKBIA的表达相关。氧化应激反应可通过激活IκBα,而激活NF-κB,促进一系列IL1B、IL-8、TNF-α等炎症因子的释放^[32],通过比较血清中NF-κB和肺组织中IκBα的表达,发现与COPD相比,六味补气胶囊可降低血清NFKB表达,且升高COPD大鼠肺组织IκBα表达,提示其对可能通过调节IκBα,影响NF-κB表达,改善COPD的炎症反应。

JUN(又名c-JUN)和c-FOS是炎症转录调节因子AP-1的两个重要亚基。研究表明,吸烟干预小鼠肺组织AP-1的表达升高,香烟烟雾提取物可提高人类支气管上皮细胞中c-JUN和c-FOS的表达,导致c-JUN和c-FOS的细胞核富集,降低AP-1或其二聚体的表达可降低IL-6、IL-8、TNF-α的表达^[33-35]。我们研究发现,六味补气胶囊亦可降低肺组织c-JUN、c-FOS蛋白表达。以上结果提示,六味补气胶囊靶向基因富集的通路的关联分子,可能是六味补气胶囊干预COPD炎症免疫失衡状态的主要靶点。

本次研究挖掘COPD肺组织单细胞转录组测序及六味补气胶囊的潜在靶基因,通过差异基因与靶基因的映射,最终发现六味补气胶囊防治COPD具有多靶点和多基因的特征,其可能通过干预COPD的多个免疫细胞亚群及相关靶基因发挥免疫炎症调控作用,并通过体内实验证实六味补气胶囊对IL1B、JUN、FOS、NFKBIA、MAPK8具有调控作用,但其主要调控的免疫细胞及作用机制有待深入的体外实验探索。这些潜在的免疫细

胞亚群及靶基因为进一步探讨六味补气胶囊的免疫炎症干预机制研究奠定了基础,也为阐释中医药免疫调控机制研究提供一定的思路。

参考文献:

- [1] 丁焕章, 王成阳, 李泽庚. 补肺法治疗慢性阻塞性肺疾病临床研究[J]. 中医临床杂志, 2018, 30(2): 191-4.
- [2] Wang C, Xu J, Yang L, et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China (the China Pulmonary Health [CPH] study): a national cross-sectional study [J]. *Lancet*, 2018, 391(10131): 1706-17.
- [3] Caramori G, Casolari P, Barczyk A, et al. COPD immunopathology [J]. *Semin Immunopathol*, 2016, 38(4): 497-515.
- [4] Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 138(1): 16-27.
- [5] 王传博, 王婕琼, 李泽庚, 等. 基于肺气虚证分度的慢性阻塞性肺疾病分证诊治思路与方法[J]. 中医杂志, 2013, 54(18): 1550-2.
- [6] 李建生, 张海龙, 王海峰, 等. 慢性阻塞性肺疾病证候演变特点临床调查[J]. 中医杂志, 2017, 58(9): 772-6.
- [7] 童佳兵, 王心恒, 杨程, 等. 基于新安医学固本补气法综合干预COPD稳定期肺肾气虚证的临床观察研究[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(6): 1372-4.
- [8] 刘志刚, 李泽庚, 彭波, 等. 六味补气胶囊对肺气虚型慢性阻塞性肺疾病稳定期患者生活质量和肺功能的影响[J]. 安徽中医学院学报, 2012, 31(1): 6-9.
- [9] 王成阳, 刘向国, 彭青和, 等. 六味补气胶囊对COPD急性加重患者Treg及Th1、Th2、Th17型细胞的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(6): 1978-81.
- [10] 王成阳, 李泽庚. 六味补气胶囊对COPD肺气虚证大鼠JAK/STAT通路、MMPs/TIMP的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(5): 1384-90.
- [11] 吕磊, 王成阳, 刘向国, 等. 六味补气胶囊对肺气虚型慢性阻塞性肺疾病大鼠气道重塑中病理形态和MMP-9、MMP-12表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(24): 6181-4.
- [12] 宋一平, 崔德健, 茅培英, 等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立及药物干预的影响[J]. 中华内科杂志, 2000, (8): 51-2+73-4.
- [13] 吕咪, 姚梦茜, 汤布朗, 等. 六味补气胶囊治疗慢性阻塞性肺疾病研究进展[J]. 河北中医, 2020, 42(7): 1116-20.
- [14] 刘志刚, 李泽庚, 彭波, et al. 肺气虚型慢性阻塞性肺疾病大鼠模型及其中药干预的血浆代谢组学研究[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(3): 793-7, 575.
- [15] 李泽庚, 刘志刚, 徐彬, 等. 慢性阻塞性肺疾病稳定期肺气虚证及其中药干预的尿液代谢组学研究[J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36(2): 138-41.
- [16] 刘志刚, 李泽庚, 彭波, 等. 慢性阻塞性肺疾病稳定期肺气虚证及其中药干预的血浆代谢组学研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(12): 1619-26.
- [17] 王小乐, 朱洁, 童佳兵, 等. 慢性阻塞性肺疾病肺泡巨噬细胞差异表达基因的生物信息学分析[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2020, 36(11): 961-6.
- [18] Yamasaki K, and S.F.V. Eeden. Lung Macrophage Phenotypes and Functional Responses: Role in the Pathogenesis of COPD [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): 1-12.
- [19] Van Pottelberge GR, Bracke KR, Demedts IK, et al. Selective accumulation of Langerhans-type dendritic cells in small airways of patients with COPD [J]. *Respir Res*, 2010, 11: 35.
- [20] Markelić I, Hlapčić I, Rogić D, et al. Lipid profile and atherogenic indices in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2021, 31(1): 153-61.
- [21] Tuleta I, Farrag T, Busse L, et al. High prevalence of COPD in atherosclerosis patients [J]. *Int J Chronic Obstr Pulm Dis*, 2017, 12: 3047-53.
- [22] Dhamodharan P, Arumugam M. Multiple gene expression dataset analysis reveals toll-like receptor signaling pathway is strongly associated with chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis [J]. *COPD*, 2020, 17(6): 684-98.
- [23] Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family [J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(8): 556-67.
- [24] Wang L, Liu J, Wang W, et al. Targeting IL-17 attenuates hypoxia-induced pulmonary hypertension through downregulation of β -catenin [J]. *Thorax*, 2019, 74(6): 564-78.
- [25] Kubysheva N, Boldina M, Eliseeva T, et al. Relationship of serum levels of IL-17, IL-18, TNF- α , and lung function parameters in patients with COPD, asthma-COPD overlap, and bronchial asthma [J]. *Mediat Inflamm*, 2020, 2020: 4652898.
- [26] Zhang X, H. Zheng, H. Zhang, et al. Increased interleukin (IL)-8 and decreased IL-17 production in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) provoked by cigarette smoke [J]. *Cytokine*, 2011, 56(3): 717-25.
- [27] Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2011, 22(4): 189-95.
- [28] Yi G, Liang M, Li M, et al. A large lung gene expression study identifying IL1B as a novel player in airway inflammation in COPD airway epithelial cells [J]. *Inflamm Res*, 2018, 67(6): 539-51.
- [29] Choi SH, Wiesner P, Almazan F, et al. Spleen tyrosine kinase regulates AP-1 dependent transcriptional response to minimally oxidized LDL [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32378.
- [30] Hoshino S, Yoshida M, Inoue K, et al. Cigarette smoke extract induces endothelial cell injury via JNK pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 329(1): 58-63.
- [31] Wu, Y.F., Z.Y. Li, L.L. Dong, et al. Inactivation of MTOR promotes autophagy-mediated epithelial injury in particulate matter-induced airway inflammation [J]. *Autophagy*, 2020, 16(3): 435-50.
- [32] Rahman I, Adcock IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD [J]. *Eur Respir J*, 2006, 28(1): 219-42.
- [33] Bagloli CJ, Sime PJ, Phipps RP. Cigarette smoke-induced expression of heme oxygenase-1 in human lung fibroblasts is regulated by intracellular glutathione [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295(4): L624-36.
- [34] Wang SB, Zhang C, Xu XC, et al. Early growth response factor 1 is essential for cigarette smoke-induced MUC5AC expression in human bronchial epithelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 490(2): 147-54.
- [35] Yeung YT, Aziz F, Guerrero-Castilla A, et al. Signaling pathways in inflammation and anti-inflammatory therapies [J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(14): 1449-84.

(编辑: 经媛)