

· 药理 ·

温阳解毒颗粒通过抑制 AT1 细胞干扰素应答与凋亡信号通路 减轻流感病毒性肺炎的单细胞转录组学

辛竞妍^{1,2}, 秦圣乐¹, 陈韬宇¹, 刘云涛^{1,3}, 王晓璐¹, 梁朝峰¹, 张忠德^{1,2,3*}

(1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510120;

2. 中国中医科学院中医临床基础医学研究所, 北京 100010;

3. 中医证候全国重点实验室, 广州中医药大学第二附属医院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 基于单细胞转录组测序技术, 探究温阳解毒颗粒(WYJD)减轻甲型流感病毒所致肺炎的分子机制。方法: 30只BALB/c雌性小鼠随机分为空白组、IAV组及WYJD低、中、高剂量组(WYJD-L、WYJD-M、WYJD-H剂量分别为2.925、5.85、11.7 g·kg⁻¹, n=6)。除空白组外, 其余各组经鼻接种甲型H1N1流感病毒(H1N1)病毒(A/PR/8/34)建立感染模型。造模2h后开始给药, 连续干预5d, 每日监测小鼠体质量及状态; 第6天处死小鼠并取材, 计算肺指数, 进行肺组织病理学观察。同时对空白组、IAV组及WYJD高剂量组肺组织进行单细胞转录组测序(n=3), 聚焦肺泡I型上皮细胞(AT1), 分析其基因表达与信号通路变化。最后通过蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白的表达变化, 以验证单细胞测序结果。结果: 与空白组比较, IAV组小鼠体质量明显下降(P<0.05), 肺指数明显升高(P<0.05); 与IAV组比较, WYJD各剂量组小鼠体质量显著回升(P<0.01), 肺指数显著降低(P<0.01)。单细胞测序分析表明, WYJD抑制IAV感染后AT1细胞中的γ干扰素应答、α干扰素应答、肿瘤坏死因子-α/核转录因子-κB(TNF-α/NF-κB)及白细胞介素-6/Janus激酶/信号转导及转录激活因子3(IL-6/JAK/STAT3)等干扰素及炎症信号通路的过度激活。与空白组比较, IAV组AT1细胞数量呈减少趋势; 与IAV组比较, WYJD-H组AT1细胞数量呈增高趋势, 但差异均无统计学意义。进一步分析AT1细胞亚群基因表达特征发现, 与空白组比较, IAV组的促凋亡基因FAS细胞表面死亡受体(FAS)、周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A(CDKN1A)表达呈升高趋势, 肿瘤蛋白p53(Tp53)表达明显升高(P<0.05), AT1细胞标志基因晚期糖基化终末产物受体(AGER)及膜结构关键基因小窝蛋白1(CAV1)表达明显降低(P<0.05, P<0.01); 与IAV组比较, WYJD-H组FAS、CDKN1A、Tp53表达明显降低(P<0.05, P<0.01), AGER与CAV1表达明显升高(P<0.05, P<0.01)。在干扰素应答相关基因中, 与空白组比较, IAV组干扰素刺激基因15(ISG15)、干扰素诱导蛋白3(IFIT3)、信号转导及转录激活因子2(STAT2)、骨髓基质细胞抗原2(BST2)、C-X-C基序趋化因子配体10(CXCL10)表达呈升高趋势, 2', 5'-寡核苷酸合成酶样蛋白1(OASL1)表达明显升高(P<0.05); 与IAV组比较, ISG15、STAT2、OASL1、CXCL10基因表达量明显降低(P<0.05, P<0.01), IFIT3、BST2显著升高(P<0.01)。在炎症相关基因中, 与空白组比较, IAV组细胞间黏附分子1(ICAM1)、TNF-α诱导蛋白3(TNFAIP3)、角蛋白8(KRT8)、TNF受体超家族成员1A(TNFRSF1A)、TNF受体超家族成员1B(TNFRSF1B)表达均显著升高(P<0.01), 负向调控NF-κB的NFKBIA表达明显升高(P<0.05); 与IAV组比较, WYJD-H组KRT8、TNFRSF1B表达明显降低(P<0.05), 而ICAM1、NFKBIA、TNFAIP3、TNFRSF1A的表达呈降低趋势, 差异无统计学意义。蛋白水平验证结果显示, 与空白组比较, IAV组的肺组织中ISG15、FAS、p53及p65亚基磷酸化(p-p65)蛋白表达水平均明显升高(P<0.05, P<0.01); 与IAV组比较, WYJD-H组上述蛋白表达水平均明显降低(P<0.05, P<0.01)。结论: WYJD可能通过靶向调控AT1细胞的基因表达, 抑制IAV感染后过度激活的干扰素反应与炎症信号通路, 并下调促凋亡信号, 从而减轻肺泡上皮损伤, 发挥缓解病毒性肺炎的作用。

[关键词] 单细胞转录组; I型肺泡上皮细胞; 干扰素; 炎症; 病毒性肺炎

[中图分类号] R256; R285; R563 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)13-0076-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20261223

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20260422.1306.005>

[网络出版日期] 2026-04-22 14:13:07 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>



[收稿日期] 2026-03-03

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82374392); 中医药广东省实验室科技研发培植项目(HQL2024PZ022); 广东省中医药局流感临床研究项目(20255002)

[第一作者] 辛竞妍, 博士, 从事中医药治疗呼吸系统疾病的研究, E-mail: xjy19980124@163.com

[通信作者] * 张忠德, 硕士, 主任医师, 从事中医药治疗呼吸系统疾病的研究, E-mail: doctorzzd99@163.com

A Single-cell Transcriptomic Study of Wenyang Jiedu Granules in Alleviating Influenza Virus Pneumonia by Suppressing Interferon Responses and Apoptotic Pathways in AT1 Cells

XIN Jingyan^{1,2}, QIN Shengle¹, CHEN Taoyu¹, LIU Yuntao^{1,3}, WANG Xiaolu¹,
LIANG Chaofeng¹, ZHANG Zhongde^{1,2,3*}

(1. *The Second Clinical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China;*
2. *Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100010, China;* 3. *State Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Syndrome, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China*)

[Abstract] Objective: To investigate the molecular mechanisms by which Wenyang Jiedu granules (WYJD) alleviate influenza A virus (IAV)-induced pneumonia based on single-cell transcriptome sequencing. **Methods:** Thirty female BALB/c mice were randomly divided into a blank control group (Control), IAV group, and WYJD low-, medium-, and high-dose groups (WYJD-L, WYJD-M, WYJD-H; 2.925, 5.85, 11.7 g·kg⁻¹, n=6). Except for the Control group, all other groups were intranasally inoculated with IAV subtype H1N1 (A/PR/8/34) to establish an infection model. Two hours after modeling, drug administration was initiated and continued for 5 consecutive days, with daily monitoring of body weight and general condition. On day 6, mice were sacrificed and samples were collected. Lung index was calculated, and histopathological examination of lung tissue was performed. Lung tissues from the Control, IAV, and WYJD-H groups were subjected to single-cell transcriptome sequencing (n=3), focusing on type I alveolar epithelial cells (AT1) to analyze changes in gene expression and signaling pathways. Western blot was used to detect the expression changes of relevant proteins to validate the single-cell sequencing results. **Results:** Compared with the Control group, the IAV group exhibited significantly decreased body weight ($P<0.05$) and significantly increased lung index ($P<0.05$). Compared with the IAV group, all WYJD-treated groups exhibited significantly increased body weight ($P<0.01$) and significantly decreased lung index ($P<0.01$). Single-cell sequencing analysis revealed that WYJD inhibited overactivation of interferon and inflammatory signaling pathways in AT1 cells after IAV infection, including interferon- γ response, interferon- α response, tumor necrosis factor- α /nuclear factor- κ B (TNF- α /NF- κ B), and interleukin-6/Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 (IL-6/JAK/STAT3) pathways. Compared with the Control group, the number of AT1 cells in the IAV group showed a decreasing trend. Compared with the IAV group, the WYJD-H group showed an increasing trend, although neither difference was statistically significant. Further analysis of AT1 cell subpopulation gene expression showed that, compared with the Control group, the IAV group exhibited increased expression of pro-apoptotic genes FAS cell surface death receptor (FAS) and cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A), a significant increase in tumor protein p53 (Tp53) expression ($P<0.05$), and significant decreases in expression of the AT1 marker gene advanced glycosylation end-product-specific receptor (AGER) and membrane structural gene caveolin1 (CAV1) ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the IAV group, the WYJD-H group showed significantly decreased expression of FAS, CDKN1A, and Tp53 ($P<0.05$, $P<0.01$), and significantly increased expression of AGER and CAV1 ($P<0.05$, $P<0.01$). Regarding interferon response-related genes, compared with the Control group, the IAV group showed increased expression of interferon-stimulated gene 15 (ISG15), interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (IFIT3), signal transducer and activator of transcription 2 (STAT2), bone marrow stromal cell antigen 2 (BST2), and C-X-C motif chemokine ligand 10 (CXCL10), with a significant increase in 2', 5'-oligoadenylate synthetase-like protein 1 (OASL1) ($P<0.05$). Compared with the IAV group, the WYJD-H group showed significantly decreased expression of all the above genes, with highly significant differences for ISG15, IFIT3, STAT2, BST2, and OASL1 ($P<0.01$), and a significant difference for CXCL10 ($P<0.05$). Among inflammation-related genes, compared with the Control group, the IAV group showed significantly increased expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1), tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3), keratin 8 (KRT8), tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A (TNFRSF1A), and TNFRSF1B ($P<0.01$), and increased expression of NFKBIA, a negative regulator of NF- κ B ($P<0.05$). Compared with the IAV group, the WYJD-H group showed significantly decreased expression of KRT8 and TNFRSF1B ($P<0.05$), while ICAM1, NFKBIA, TNFAIP3, and TNFRSF1A showed decreasing trends without statistical significance. Western blot validation showed that, compared with the Control group, protein expression levels of ISG15, FAS, p53, and phosphorylated p65 (p-p65) in lung tissue of the IAV group were significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the IAV group, the WYJD-H group showed significantly decreased expression of these proteins ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** WYJD may alleviate viral pneumonia by targeting gene expression in AT1 cells, inhibiting overactivated interferon and inflammatory signaling pathways after IAV infection, and downregulating pro-apoptotic signaling, thereby reducing alveolar epithelial injury.

[Keywords] single-cell transcriptomics; type I alveolar epithelial cell; interferon; inflammation; viral pneumonia

流感病毒性肺炎是流感病毒自上呼吸道向下蔓延引起的肺部急性炎症,重症可迅速出现低氧血症、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)甚至死亡^[1]。全球每年约10亿流感病例,重症300万~500万,死亡29万~65万^[2]。目前主要依靠疫苗接种和抗病毒药物,但病毒变异快、耐药问题突出,亟需新靶点药物^[3]。中医药多成分、多靶点具有独特优势^[4-5],如莲花清瘟胶囊已显示广谱抗病毒及抗炎免疫调节作用^[6]。温阳解毒颗粒(WYJD)由《四逆汤》和《透脓散》化裁而成,前期临床证实其对SARS-CoV-2感染(阳气虚衰、邪毒侵肺证)有效^[7-8],亦用于同证型流感病毒性肺炎。基础实验发现WYJD可减轻流感病毒诱导的肺损伤,机制可能与调控白细胞介素-17、Toll样受体7(TLR7)/髓样分化因子88(MyD88)/丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)/激活蛋白-1(AP-1)及凋亡信号通路有关^[9]。但既往研究多基于全组织分析,难以揭示药物作用的细胞特异性靶标。单细胞转录组测序(scRNA-seq)能在细胞异质性水平解析疾病机制。肺泡上皮细胞是流感病毒的主要靶细胞,其中肺泡II型上皮细胞(AT2)在感染后的损伤与再生已有较多研究^[10-11],而覆盖约95%肺泡表面积、执行气体交换功能的肺泡I型上皮细胞(AT1),其感染后转录组动态变化鲜有解析。流感病毒可直接诱导AT1细胞坏死与凋亡,破坏肺泡结构及气体交换功能^[12]。故深入解析AT1细胞对阐明肺损伤及药物保护机制至关重要。

因此,拟采用scRNA-seq技术,系统描绘WYJD干预前后AT1细胞亚群的转录组图谱,解析其凋亡及干扰素应答通路的调控网络。提出假说:WYJD可能抑制AT1细胞的干扰素应答过度激活与凋亡信号,保护肺泡上皮屏障,减轻流感肺损伤。旨在从单细胞层面揭示WYJD的细胞特异性作用机制,为其治疗流感病毒性肺炎提供新的理论依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级BALB/c雌性小鼠(6~8周龄)48只,体质量16~20g,购于广东维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产合格证号SCXK(粤)2022-0063。饲养于中国广州分析测试中心中山开发区实验室,实验期间自由饮水摄食,相对湿度40%~70%,标准温度20~25℃,通风良好,每12h循环光照/黑暗,常规普通饲料喂养。A/PR/8/34(H1N1)流感病毒由呼吸疾病国家重点实验室惠赠。

1.2 伦理 本实验经广东省科学院实验动物管理与使用委员会(中国广州分析测试中心)批准,符合

动物伦理相关要求(动物伦理许可证号W240001),并严格遵守国际实验动物评估和认可管理委员会的指导原则,在生物安全二级(BSL-2)实验室条件下进行。

1.3 药物 实验所用温阳解毒配方颗粒购自江苏康缘药业股份有限公司(批号230601),15g/剂(相当于原方生药100g),以60℃超纯水配制成0.5g·mL⁻¹溶液,现配现用。WYJD颗粒剂的质量控制(包括定性鉴别与定量分析)均严格遵循国家药品标准执行。

1.4 试剂 异氟烷(中国深圳瑞沃德生命科技有限公司,货号R510-22);4%多聚甲醛固定液、磷酸盐缓冲液(PBS)(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号分别为G1101、G4207-500ML);苏木素-伊红(HE)染液套装、5×蛋白上样缓冲液(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为G1100-500ml、P1040);FAS细胞表面死亡受体(FAS)抗体、p53抗体、干扰素刺激基因15(ISG15)抗体(上海拜力生物科技有限公司,货号分别为AF5342、AF0879、DF6316);磷酸化(p)-p65抗体[赛信通(上海)生物试剂有限公司,货号3033];甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G二抗、HRP标记的山羊抗小鼠IgG二抗(美国Cell Signaling Technology公司,货号分别为2118、7074S、7076S);Western一抗稀释液、Western二抗稀释液、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物、放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液、蛋白定量法(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物科技有限公司,货号分别为P0023A-500ml、P0023D-500ml、P1045、P0013B、P0012S);细胞核分离试剂盒(上海伯豪生物技术有限公司,批号52009-10);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(0.22μm)(美国Millipore公司,货号ISEQ00010);预染蛋白Marker 10-180kDa(美国赛默飞公司,货号26616);增强化学发光法(ECL)超敏发光试剂盒(中国赛默飞世尔科技公司,批号S1257444);40μm细胞过滤器(西格玛公司,批号BAH136800040);吖啶橙(AO)/碘化丙锭(PI)染液、SeekOne® DD单细胞3'文库制备试剂盒(北京寻因生物科技有限公司,货号分别为K01701、K00202);0.4%台盼蓝染液(上海生工生物工程股份有限公司,批号E607320-0001)。

1.5 仪器 Airstream® Class II型二级生物安全柜(益世科生物公司);BX61型正置显微镜(日本尼康公司);RM2235型石蜡切片机(德国徕卡公司);Histocentre 3型组织包埋机、Q33226型Qubit荧光计

(美国赛默飞世尔科技公司); SYNERGY H1型多功能酶标仪(美国BioTek公司); SCIENTZ-48L型冷冻型高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司); PowerPac Basic型电泳仪电源、Mini-PROTEAN Tetra型小型垂直电泳槽、Mini Trans-Blot型电泳转印仪(伯乐生命医学产品有限公司); Tanon-5200型天能化学发光图像分析系统(上海兰科仪器有限公司); M002C型SeekMate Tinitan荧光细胞计数仪(北京寻因生物科技有限公司); XD-202型40倍显微镜(江南永新光学公司); Qsep400型Bio-Fragment Analyzer片段分析仪(光鼎生物科技股份有限公司); NovaSeq X Plus型测序仪(因美纳公司)。

2 方法

2.1 实验动物造模与药物干预 在生物安全柜中,使用异氟烷麻醉小鼠后,经鼻滴注含甲型流感病毒(IAV)的PBS进行感染,小鼠经鼻滴注感染剂量约为 $1 \times LD_{50}$ 的IAV(A/PR/8/34),滴注体积为 $50 \mu\text{L}$,以肺指数升高、肺部出现明显炎症病变作为造模成功的判断标准。将30只小鼠随机分为以下5组:空白组、模型组(IAV组)、WYJD低剂量组(WYJD-L)、WYJD中剂量组(WYJD-M)及WYJD高剂量组(WYJD-H),每组6只。造模后2 h开始灌胃,空白组和IAV组小鼠予生理盐水灌胃,WYJD-L、WYJD-M和WYJD-H组依据人和动物间体表面积折算等效剂量^[13],分别按成人临床给药剂量的0.5、1、2倍予WYJD 2.925 、 5.85 、 $11.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃,连续5 d。于感染后第6天麻醉并处死小鼠,采集组织样本。

2.2 体质量等一般指标检测 每天测量一次小鼠体质量,观察记录小鼠行为状态。

2.3 肺指数测定 测定各组小鼠全肺质量和体质量,肺指数=小鼠全肺质量/体质量 $\times 100\%$ 。

2.4 肺部形态观察 肺称质量后置于标记有刻度的板子进行拍照记录。

2.5 肺部病理变化观察 将小鼠的左肺组织用4%的多聚甲醛固定24 h后取出,用乙醇和二甲苯脱水,浸入石蜡,选 $3 \mu\text{m}$ 厚度切片后脱蜡至水,进行HE染色以制作病理切片,在光学显微镜下观察每只小鼠肺组织中炎症细胞的浸润等肺损伤的病理表现。

2.6 单细胞转录组测序 解离后的肺组织细胞悬液,使用SeekOne® DD单细胞3'文库制备试剂盒构建单细胞RNA-Seq文库。简要流程:将细胞与反转录试剂混合后加至芯片,与条形码水凝胶微珠及分

区油共同生成乳滴,经 $42 \text{ }^\circ\text{C}$ 反转录 90 min 、 $85 \text{ }^\circ\text{C}$ 灭活 5 min 。纯化cDNA后进行聚合酶链式反应(PCR)扩增,产物经片段化、末端修复、加接头及索引PCR,构建包含细胞条形码与UMI的测序文库。纯化后文库经质量检测,在Illumina NovaSeq X Plus平台上进行PE150测序。该测序分析过程由北京寻因生物科技有限公司依托其分析平台完成。

2.7 均匀流形逼近与投影(UMAP)降维分析 对AT1细胞的基因表达矩阵进行标准化与归一化预处理后,采用主成分分析提取主要变异成分,并基于此进行UMAP非线性降维,将细胞映射至二维空间可视化。通过UMAP图可直观观察不同处理条件下细胞的聚类分布,并进一步采用Louvain算法识别细胞亚群,为后续功能分析提供依据。

2.8 相关性分析 基于组间差异表达基因,采用Spearman等级相关分析评估基因表达模式的相关性,以揭示代谢与炎症等信号通路间的潜在联系。使用Matplotlib绘制相关性热图,直观展示基因间的协同变化关系。

2.9 Hallmark通路富集分析及基因集富集分析(GSEA)分析 通路富集分析以Molecular Signatures Database(MSigDB)中的50个Hallmark基因集(Hallmark gene sets)为背景进行,富集显著性以错误发现率(FDR) < 0.25 为判定标准。为直观呈现,最终绘制了富集分析气泡图以展示显著富集的通路。此外,进行GSEA以进一步评估通路富集情况。

2.10 基因差异表达分析 基于前述已注释的AT1细胞亚群,差异表达分析采用Seurat的FindMarkers函数或Presto方法进行,使用Wilcoxon秩和检验,并通过Bonferroni校正进行多重检验校正。差异表达基因的筛选标准如下:校正后 $P < 0.05$,最小对数倍数变化 > 0.25 ,且至少在10%的细胞中表达。

2.11 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白表达 取适量小鼠肺组织,按重量体积比1:10加入预冷RIPA裂解液[含 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯甲基磺酰氟(PMSF)],冰上研磨。匀浆液于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min (离心半径 8.5 cm),取上清,采用BCA法测定并统一蛋白浓度。加入 $5 \times$ 上样缓冲液, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 煮沸 10 min 使蛋白变性。使用制胶试剂盒制备10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶。上样总蛋白 $30 \mu\text{g}$, 80 V 电泳 30 min 后转为 120 V 电泳 45 min 。电泳后,切取目的蛋白区域,采用湿转法在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 350 mA 条件下转印至PVDF膜 $45 \sim 60 \text{ min}$ 。用5%脱脂牛奶(TBST配制)室温封闭

1 h。随后与一抗(p-p65、p53、FAS、ISG15、GAPDH, 稀释比例1:1 000)4 °C孵育过夜。TBST洗涤后,与HRP标记山羊抗兔二抗(1:5 000)室温孵育1 h。ECL发光显影。

2.12 统计学分析 采用GraphPad Prism 10.2.0软件进行统计分析。对各组实验数据进行正态性分布性检验和方差齐性检验,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不满足正态分布的数据采用 $M(P_{75}, P_{25})$ 进行描述,组间比较采用Kruskal-Wallis秩和检验。多组间的比较采用单因素方差分析(ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 WYJD对IAV小鼠体质量、肺指数、肺组织病理损伤的保护作用 各组小鼠在病毒感染后的表现存在明显差异。空白组小鼠在整个观察期内精神状态良好,呼吸平稳,毛色顺亮,体质量呈平稳增长趋势。与空白组比较,IAV组小鼠在感染后第2天即出现食欲减退、呼吸急促及活动减少;第3天症状进一步加重,表现为嗜卧少动、弓背蜷缩;自第4天起,上述症状持续恶化,体质量持续下降,并出现毛色枯槁、被毛蓬乱等表现。而WYJD干预组小鼠的症状总体较IAV模型组轻,表现为体质量下降、精神萎靡、活动减少及体态异常的程度均有所缓和。感染后第6天,与空白组比较,IAV组小鼠的体质量明显下降($P < 0.05$),肺指数明显升高($P < 0.05$);与IAV组比较,WYJD各剂量组小鼠的体质量显著上升($P < 0.01$),肺指数显著降低($P < 0.01$)。见表1、表2。

进一步对感染后第6天的小鼠肺组织进行病理学评估。与空白组比较,IAV模型组小鼠全肺体积显著增大,表面可见明显瘀血。经WYJD干预后,小鼠肺的肿胀程度及表面瘀血均有不同程度的减轻,其中,WYJD-H组的改善效果最为明显。见图1。

表1 WYJD对IAV小鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of WYJD on body weight change rate in mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	感染后第6天体质量/g
空白组		17.12±0.18
IAV组		15.65±1.10 ¹⁾
WYJD-L组	2.925	17.87±0.73 ⁴⁾
WYJD-M组	5.85	17.90±0.79 ⁴⁾
WYJD-H组	11.7	18.25±0.76 ⁴⁾

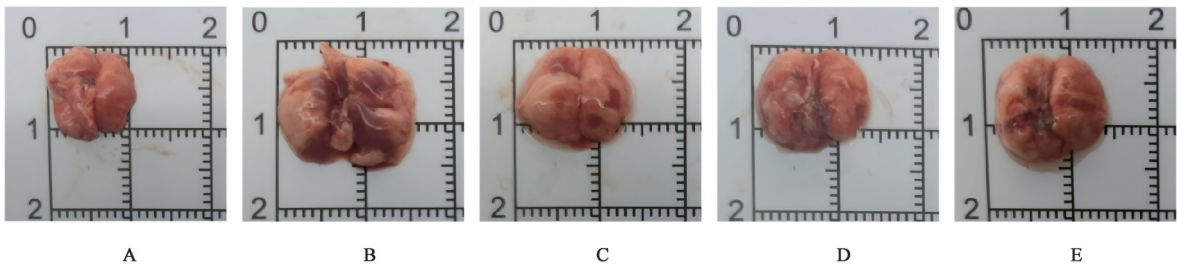
注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与IAV组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表2、表4-表7同)

表2 WYJD对IAV感染小鼠肺指数的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of WYJD on lung index in IAV-infected mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肺指数/%
空白组		0.555±0.033
IAV组		1.055±0.098 ¹⁾
WYJD-L组	2.925	0.817±0.122 ⁴⁾
WYJD-M组	5.85	0.754±0.113 ⁴⁾
WYJD-H组	11.7	0.760±0.027 ⁴⁾

空白组小鼠肺组织结构正常,肺泡形态完整、间隔清晰,肺泡腔内及肺间质均未见明显炎症细胞浸润或渗出。相比之下,IAV组小鼠肺组织呈现典型病毒感染后间质性肺炎病理特征,表现为肺泡间隔显著增厚、毛细血管扩张充血;支气管壁上皮细胞破坏;肺间质及细支气管周围有大量以淋巴细胞为主的单个核炎症细胞浸润;部分细支气管腔内可见炎性分泌物阻塞,伴上皮细胞脱落。与模型组比较,WYJD各剂量组的肺组织病理损伤均有不同程度改善,主要表现为肺泡间隔增厚、炎性细胞浸润、充血水肿及细支气管阻塞等病理改变的程度和范围显著减轻。其中,WYJD-H组的改善效果最为明显。见图2。



注:A.空白组;B.IAV组;C.WYJD-L组;D.WYJD-M组;E.WYJD-H组(图2同)

图1 WYJD对小鼠肺脏形态的影响

Fig. 1 Effect of WYJD on lung morphology in mice

3.2 基于单细胞测序的基因差异表达结果

3.2.1 细胞的身份识别及UMAP特征分布 为深

入解析WYJD改善流感肺炎的分子机制,对肺组织单细胞转录组数据进行了系统分析。首先对原始

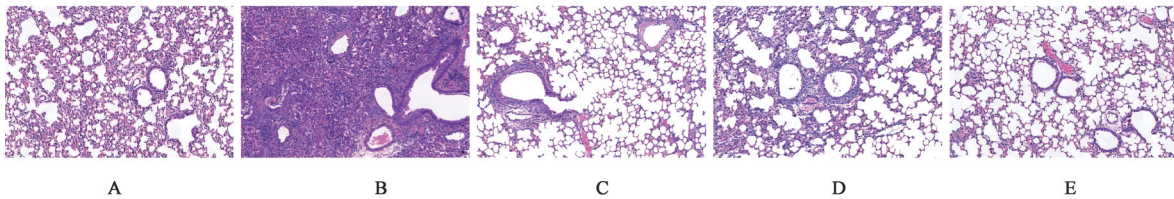


图2 WYJD对小鼠肺脏病理形态的影响(HE, ×200)

Fig. 2 Effect of WYJD on lung histopathology in mice (HE, ×200)

表达矩阵进行了标准化预处理,随后,采用UMAP算法进行非线性降维,将高维数据投影至二维空间,以便直观评估整体细胞群的质量与分布状态。如图所示,不同类型的细胞在UMAP图上形成了彼此分离、边界清晰的聚类(增强出版附加材料)。依据已知的细胞类型特异性标志基因表达谱,对每个聚类进行了系统性的注释,共鉴定出15种细胞群(增强出版附加材料): Adventitial细胞标志物为三磷酸鸟苷(GTP)酶调节相互作用蛋白1(GRIP1)、硫酸酯酶1(SULF1); B Cell细胞标志物为B细胞支架蛋白与锚蛋白重复序列1(BANK1)、B淋巴细胞特异性激活蛋白(PAX5); Ciliated Columnar Cell细胞标志物为动力蛋白轴丝重链2(DNAH2)、鞭毛相关蛋白299(CFAP299); Dendritic Cell细胞标志物为WD重复和FYVE结构域蛋白4(WDFY4)、SLIT-ROBO Rho GTP酶激活蛋白3(SRGAP3); Endothelial Cell细胞标志物为血管性血友病因子(Vwf)、发动蛋白3(DNM3); Fibroblast细胞标志物为硫酸肝素6-O-磺基转移酶3(HS6ST3)、整合素 α 8(ITGA8); Macrophage细胞标志物为钾电压门控通道相互作用蛋白4(KCNIP4)、ATP酶H⁺转运V0亚基D2(ATP6V0D2); Monocyte细胞标志物为schlafen家族成员4(SLFN4)、组织蛋白酶S(CTSS); Neuroendocrine细胞标志物为神经调节蛋白1(NRG1)、神经连接蛋白1(NRXN1); NK Cell细胞标志物为颗粒酶A(GZMA),及假基因/未特征转录本Gm2682; Pericyte细胞标志物为钾电压门控通道亚家族Q成员5(KCNQ5)、瞬时受体电位阳离子通道亚家族C成员6(TRPC6); Smooth Muscle Cell细胞标志物为降钙素受体样受体(CALCRL)、卷曲螺旋结构域蛋白85A(CCDC85A); T Cell细胞标志物为淋巴样增强因子1(LEF1)、Rho GTP酶激活蛋白15(ARHGAP15); Type I Alveolar Cell细胞标志物为胶原蛋白IV型 α 4链(COL4A4)、胶原蛋白IV型 α 3链(COL4A3)、HOP同源框蛋白(HOPX)、晚期糖基化终末产物特异性受体(AGER); Type II Alveolar Cell细胞标志物为锚蛋白3(ANK3)、肺表

面活性蛋白B(SFTPb)、肺表面活性蛋白C(SFTPC)、肺表面活性蛋白A1(SFTPA1)。研究表明,流感病毒感染诱导的AT1细胞过度凋亡与坏死是导致肺泡屏障功能障碍及急性肺损伤的关键病理环节^[12]。因此,将AT1细胞作为探讨WYJD减轻流感病毒性肺炎作用机制的分析焦点。

3.2.2 WYJD调控AT1细胞异常修复与炎症信号通路的单细胞转录组分析 基于上述鉴定结果,进一步分析AT1细胞亚群的差异基因表达谱及富集通路,以揭示其在肺组织损伤修复中的潜在作用。WYJD干预可显著上调IAV感染后AT1细胞中SFTPb、SFTPC、小窝蛋白1(CAV1)和HOP同源框蛋白(HOPX)等基因的表达,推测WYJD可能通过调控上述基因的表达,在维持肺泡上皮细胞的类型特异性与分化稳态中发挥作用(见增强出版附加材料)。进一步阐释上述差异基因的生物功能,进行Hallmark富集分析。结果显示,IAV感染后,WYJD干预能有效抑制AT1细胞中 γ 干扰素应答、 α 干扰素应答、肿瘤坏死因子- α /核转录因子- κ B(TNF- α /NF- κ B)、白细胞介素-6/Janus激酶-信号转导及转录激活因子3(IL-6-JAK-STAT3)信号通路的过度激活。采用GSEA对上述4条信号通路进行验证(见增强出版附加材料),结果与Hallmark分析高度一致,共同证实了WYJD可能通过调控AT1细胞异常免疫炎症应答缓解IAV。WYJD调控AT1细胞异常修复与炎症信号通路差异表达基因火山图、Hallmark信号通路富集分析、GSEA显示4条关键信号通路的变化、IL-6/JAK-STAT3信号通路见增强出版附加材料。

3.2.3 基于单细胞转录组学解析WYJD抑制IAV感染下AT1细胞凋亡的作用 与空白组比较,IAV组AT1细胞数量有减少趋势,差异无统计学意义;与IAV组比较,WYJD-H组AT1细胞数量有增高趋势,差异无统计学意义。AT1细胞亚群的数量及差异代谢物见增强出版附加材料,表3。

进一步分析AT1细胞亚群的基因表达特征发现,与空白组比较,IAV组中细胞周期蛋白依赖性激酶抑

表3 WYJD对I型肺泡上皮细胞数量的影响 [$M(P_{75}, P_{25}), n=10$]
Table 3 Effect of WYJD on number of type I alveolar epithelial cells [$M(P_{75}, P_{25}), n=10$]

组别	剂量/g·kg ⁻¹	上皮细胞的数量/个
空白组		1 759(1 127, 5 887)
IAV组		1 262(1 207, 1 326)
WYJD-H组	11.7	1 626(1 109, 2 127)

制剂1A(CDKN1A)及FAS均有升高趋势,但差异无

统计学意义;Tp53表达升高($P<0.05$)。AGER、CAV1表达量明显降低($P<0.05, P<0.01$);与IAV组比较, WYJD-H组CDKN1A、FAS和Tp53表达量明显降低($P<0.05, P<0.01$), AGER与CAV1表达量明显升高($P<0.05, P<0.01$)(表4、增强出版附加材料)。综合分析表明, WYJD可能通过重塑AT1细胞的转录组特征, 抑制促凋亡基因的过度表达, 并改善细胞结构基因的表达紊乱, 从而发挥维持肺泡结构与功能的作用。

表4 WYJD对I型肺泡上皮细胞亚群中CDKN1A、FAS、Tp53、AGER、CAV1基因表达量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of WYJD on gene expression levels of CDKN1A, FAS, Tp53, AGER, CAV1 in AT1 cells subsets ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CDKN1A基因表达量	FAS基因表达量	Tp53基因表达量	AGER基因表达量	CAV1基因表达量
空白组		-0.15±0.01	-0.09±0.05	-0.11±0.01	-0.17±0.01	0.09±0.26
IAV组		0.23±0.05	0.12±0.04	0.22±0.05 ¹⁾	-0.27±0.19 ¹⁾	-0.42±0.13 ¹⁾
WYJD-H组	11.7	0.10±0.18 ³⁾	0.05±0.05 ⁴⁾	0.03±0.12 ⁴⁾	0.75±0.35 ⁴⁾	0.29±0.31 ³⁾

3.2.4 WYJD对单细胞转录组中AT1细胞亚群干扰素相关基因的影响 与空白组比较, IAV组中ISG15、干扰素诱导的四肽重复蛋白3(IFIT3)、信号转导与转录激活因子2(STAT2), 以及骨髓基质细胞抗原2(BST2)和C-X-C基序趋化因子配体10(CXCL10)表达均有升高趋势, 但差异无统计学意义; 2'-5'-寡腺苷酸合成酶样蛋白1(OASL1)表达明

显升高($P<0.05$)。与IAV组比较, WYJD-H组ISG15、STAT2、OASL1、CXCL10基因表达量明显降低($P<0.05, P<0.01$), IFIT3、BST2显著升高($P<0.01$), 见表5、增强出版附加材料。推测WYJD可能通过抑制AT1细胞中过度激活的干扰素刺激反应, 从而减轻由持续抗病毒免疫反应导致的肺泡上皮细胞损伤。

表5 WYJD对I型肺泡上皮细胞亚群中ISG15、IFIT3、STAT2、BST2、OASL1、CXCL10基因表达量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of WYJD on gene expression levels of ISG15, IFIT3, STAT2, BST2, OASL1, and CXCL10 in AT1 cells subsets ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ISG15基因表达量	IFIT3基因表达量	STAT2基因表达量	BST2基因表达量	OASL1基因表达量	CXCL10基因表达量
空白组		-0.54±0.01	-0.45±0.03	-0.46±0.01	-0.42±0.01	-0.28±0.01	-0.28±0.01
IAV组		0.59±0.06	0.41±0.02	0.61±0.12	0.41±0.13	0.60±0.09 ¹⁾	0.50±0.08
WYJD-H组	11.7	0.52±0.32 ⁴⁾	0.48±0.21 ⁴⁾	0.37±0.23 ⁴⁾	0.45±0.18 ⁴⁾	0.06±0.32 ⁴⁾	0.17±0.37 ³⁾

3.2.5 WYJD对单细胞转录组中AT1细胞亚群炎症相关基因的影响 与空白组比较, IAV组中介导白细胞黏附与迁移的细胞间黏附分子1(ICAM1)、与TNF- α 诱导蛋白3(TNFAIP3)、细胞应激标志物角蛋白8(KRT8)及TNF受体超家族成员(TNFRSF)1A与TNFRSF1B表达均显著升高($P<0.01$), 负向调控NF- κ B信号通路的NF- κ B抑制蛋白 α (NFKBIA)

表达升高($P<0.05$)。与IAV组比较, WYJD-H组上述基因表达量均降低, 其中ICAM1、NFKBIA、TNFIP3和TNFRSF1A有降低趋势, 差异无统计学意义, KRT8和TNFRSF1B明显降低($P<0.05$)。见表6、增强出版附加材料。因此, WYJD可能通过靶向抑制NF- κ B等经典炎症信号通路的关键节点, 遏制AT1细胞的炎症级联反应。

表6 WYJD对I型肺泡上皮细胞亚群中ICAM1、NFKBIA、TNFIP3、KRT8、TNFRSF1A与TNFRSF1B基因表达量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of WYJD on gene expression levels of ICAM1, NFKBIA, TNFIP3, KRT8, TNFRSF1A, and TNFRSF1B in AT1 cells subsets ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ICAM1	NFKBIA	TNFIP3	KRT8	TNFRSF1A	TNFRSF1B
空白组		-0.31±0.07	-0.17±0.09	-0.17±0.02	-0.10±0.04	-0.06±0.03	-0.11±0.02
IAV组		0.31±0.12 ²⁾	0.26±0.07 ¹⁾	0.32±0.07 ²⁾	0.21±0.03 ²⁾	0.07±0.02 ²⁾	0.25±0.03 ²⁾
WYJD-H组	11.7	0.33±0.14	0.18±0.23	0.09±0.18	0.06±0.08 ³⁾	0.02±0.03	0.00±0.13 ³⁾

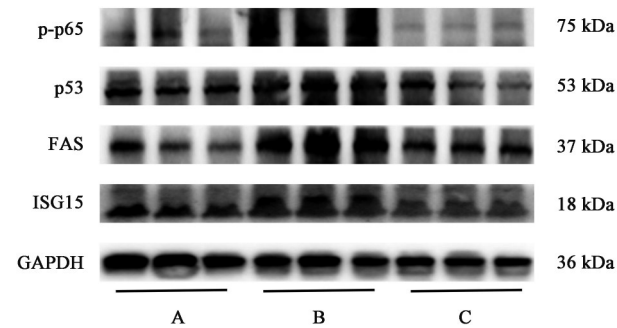
3.2.6 基于 Western blot 验证 WYJD 对肺组织凋亡及炎症相关蛋白表达的调控 与空白组比较, IAV 组中 ISG15、FAS、p53、p-p65 的表达水平明显增加

($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 IAV 组比较, WYJD-H 组 ISG15、FAS、p53、p-p65 蛋白的表达均明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 7、图 3。

表 7 WYJD 对 IAV 模型小鼠肺组织中 ISG15、FAS、p53 和 p-p65 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 7 Effect of WYJD on expression of ISG15, FAS, p53, and p-p65 proteins in lung tissues of IAV-infected mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ISG15/GAPDH	FAS/GAPDH	p53/GAPDH	p-p65/GAPDH
空白组		1.000 0±0.039 3	1.000 0±0.147 1	1.000 0±0.107 9	1.000 0±0.136 6
IAV 组		1.243 6±0.084 0 ¹⁾	2.049 2±0.280 4 ¹⁾	1.321 7±0.096 9 ¹⁾	1.968 6±0.211 7 ²⁾
WYJD-H 组	11.7	1.062 6±0.012 5 ³⁾	1.785 5±0.200 1 ³⁾	0.993 2±0.110 7 ³⁾	0.988 0±0.167 1 ⁴⁾



注: A. 空白组; B. IAV 组; C. WYJD-H 组

图 3 IAV 模型小鼠肺组织中 ISG15、FAS、p53 和 p-p65 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of ISG15, FAS, p53, and p-p65 proteins expression in lung tissues of IAV-infected mice

4 讨论

流感病毒性肺炎属于中医学“时行感冒”“温病”范畴,其病机演变遵循“温邪上受,首先犯肺”的规律。病毒作为外感温热邪毒,自口鼻侵入,首先伤及肺卫,致肺气郁闭,宣降失司。若邪气鸱张或正气不足,温热之邪可由卫入气,进而深入营血,终致肺叶焦枯、气血两燔。在这一病理过程中,“热、毒、痰、瘀”贯穿始终,而“热毒炽盛,耗伤气阴”则是病情向危重转归的关键病机。肺为娇脏,主气司呼吸,外合皮毛,开窍于鼻。温热邪毒犯肺,不仅导致肺之气机壅滞,更可直接灼伤肺之形质,致使肺之气血阴阳俱损,清肃之气不行,浊气内留,发为喘脱。因此,治疗当祛邪与扶正并举。WYJD 源自《四逆汤》与《透脓散》,方中淡附片、干姜、炙甘草共奏补气温阳之功;五指毛桃具有补中益气之效;金银花、皂角刺(*Gleditsiae Spina*)清热解毒;陈皮、广藿香祛湿化痰。诸药合用,扶正以固本,解毒以祛邪,祛湿以畅中,共成扶正解毒、祛湿化痰之剂。前期研究已证实 WYJD 对流感病毒性肺炎具有保护作用,但其在细胞层面的作用机制,特别是对 AT1 这一关键效应细胞的作用,尚不明确。应用

scRNA-seq 技术,在单细胞层面上探讨 WYJD 对流感病毒感染小鼠肺组织的保护机制,以期为其临床应用提供实验依据。

干扰素是机体抗病毒免疫的核心效应分子,其信号的持续或过度激活是驱动免疫病理损伤的关键因素^[14]。研究表明,免疫通路的过度激活是驱动流感病毒肺组织病理损伤的关键因素,其中 γ 干扰素可直接诱导肺泡上皮细胞死亡,加剧肺部炎症并破坏屏障完整性^[15];而 I 型和 III 型干扰素的持续或过度激活可通过干扰素诱导的 p53 信号通路抑制上皮细胞增殖与分化,阻碍肺上皮修复,从而加重病毒感染^[16]。ISG15、IFIT3、STAT2、CXCL10、BST2、OASL1 均为 IAV 感染后干扰素信号通路激活的响应基因。其中,ISG15、BST2 和 OASL1 在 IAV 感染后受 I 型干扰素信号驱动而显著上调^[17];STAT2 作为干扰素信号转导的关键节点,其磷酸化激活可独立于经典 I 型干扰素通路,直接调控 IFIT3、CXCL10 等下游 ISGs 的表达^[18];IFIT3 在 IAV 感染中表达上调^[19];而干扰素应答过程中产生的趋化因子 CXCL10 已被证实为病毒性呼吸道感染可靠的鼻咽部生物标志物^[20]。GSEA 证实,IAV 感染后 AT1 细胞中干扰素 α/γ 反应信号通路被异常激活,ISG15、IFIT3、STAT2、CXCL10、BST2、OASL1 等 ISGs 表达显著上调,而这些变化在 WYJD 干预后被有效逆转。WYJD 干预后 IFIT3、STAT2、CXCL10 均显著下调,提示 WYJD 可能通过抑制 STAT2 介导的 ISGs 转录激活,从信号通路上游干预干扰素应答的级联放大效应。

NF- κ B 信号通路是炎症反应的核心枢纽,IAV 感染后可被异常激活,进而促进促炎细胞因子释放,诱导巨噬细胞向促炎 M1 表型极化,加剧肺部免疫病理损伤^[21]。IAV 感染过程中,NFKB1A 的表达呈先降后升的动态特征^[22];在慢性低剂量脂多糖预处理环境中,TNFAIP3 表达升高^[23];ICAM1 在炎症

反应中表达上调,促进白细胞与内皮细胞的黏附与跨内皮迁移^[24];感染/炎症状态下,TNFRSF1A和TNFRSF1B表达亦上调。GSEA证实,IAV感染后AT1细胞中TNF- α /NF- κ B信号通路被异常激活,NFKBIA、TNFAIP3、ICAM1、TNFRSF1A和TNFRSF1B等关键调控因子表达上调,WYJD干预后能逆转这一变化,证实WYJD在AT1细胞层面的抗炎效应。

IAV感染后,宿主细胞中FAS表达上调,通过FAS/FASL相互作用激活外源性凋亡通路,诱导肺泡上皮细胞凋亡^[25]。同时,IAV感染可显著增加p53的稳定性与转录活性;p53激活后上调下游促凋亡靶基因CDKN1A,进一步促进细胞凋亡^[26]。此外,IAV感染可诱导NF- κ B p-p65水平升高,促进p-p65核转位,启动IL-6、TNF- α 等促炎因子转录^[27]。ISG15在IAV感染后受I型干扰素信号驱动而显著上调。本研究中IAV感染后AT1细胞中促凋亡基因FAS、Tp53、CDKN1A显著上调,而WYJD干预可有效逆转这一趋势,蛋白水平验证显示肺组织FAS、p53、p-p65及ISG15表达下调。p53及其靶基因CDKN1A的共同下调,提示WYJD可能通过干预p53的转录活性,抑制AT1细胞的过度凋亡,减轻病毒诱导的肺泡结构损伤。CAV1作为AT1细胞的特征性标志基因,通过形成小窝结构参与多种信号通路的调控^[28];AGER在肺组织中特异性高表达于AT1细胞的基底膜侧面,是AT1细胞损伤的标志物及模式识别受体,二者分别从不同层面参与AT1细胞结构与功能的维持。IAV感染导致AT1细胞中CAV1和AGER表达下调,而WYJD可有效逆转这一变化,提示其对AT1细胞固有结构和功能的保护作用。

综上所述,本研究从单细胞层面揭示了WYJD对AT1细胞的多靶点保护机制,抑制过度干扰素应答与NF- κ B炎症信号、阻断FAS/p53介导的外源性凋亡、维持细胞身份基因的表达,从而实现肺保护作用,为WYJD的临床应用提供了一定的实验支持。本研究亦存在一定局限性。第一,虽明确了关键基因与信号通路的变化关联,但尚未在AT1细胞中通过基因操控或特异性抑制剂进行因果验证;第二,WYJD复方中具体何种成分作用于何靶点,亦有待后续研究通过体外细胞实验、基因敲除动物模型及代谢组学、空间转录组等多技术联用进行解析。第三,本研究主要关注感染急性期的AT1细胞变化,AT1细胞的长期修复与再生过程及其与AT2细

胞、成纤维细胞等其他细胞类型的交互作用,仍需进一步探索。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] CAVALLAZZI R, RAMIREZ J A. Influenza and viral pneumonia [J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2024, 38 (1): 183-212.
- [2] MOORE K A, OSTROWSKY J T, KRAIGSLY A M, et al. A research and development (R&D) roadmap for influenza vaccines: Looking toward the future [J]. *Vaccine*, 2021, 39 (45):6573-6584.
- [3] BATOOL S, CHOKKAKULA S, SONG M S. Influenza treatment: Limitations of antiviral therapy and advantages of drug combination therapy [J]. *Microorganisms*, 2023, 11 (1):183.
- [4] LIU M, GAO Y, YUAN Y, et al. Efficacy and safety of integrated traditional Chinese and western medicine for corona virus disease 2019 (COVID-19): A systematic review and Meta-analysis [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 158:104896.
- [5] WU L, CHEN Y, MA Y, et al. Clinical practice guideline on treating influenza in adult patients with Chinese patent medicines [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 160:105101.
- [6] 叶祖光,张广平,高云航. 莲花清瘟方药理研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(22): 181-185.
YE Z G, ZHANG G P, GAO Y H. Research progress in pharmacology of Lianhua Qingwen preparation [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2020, 26(22): 181-185.
- [7] HUA Q, ZHENG D, SHUI J, et al. Fuzheng Jiedu granules against disease progression among high-risk adults with non-severe COVID-19: A multicenter retrospective cohort study [J]. *Front Pharmacol*, 2025, 16:1523004.
- [8] SHUI J, XU X, LIU Y, et al. Fuzheng Jiedu granules for high-risk adults with COVID-19: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-centre trial [J]. *Phytomedicine*, 2025, 145:157049.
- [9] QIN S, CHEN T, WANG Y, et al. Integrated network pharmacology, transcriptomics and experimental validation to explore mechanisms of Wenyang Jiedu granule on IAV-induced pneumonia [J]. *Chin Herb Med*, 2026, 18 (2): 241-261.
- [10] ELITZ A, FERNANDES S, COOK K C S, et al. Early cell autonomous and niche-mediated alveolar epithelial response to influenza infection in primary lung organoids [J]. *bioRxiv*, 2025, doi:10.1101/2025.10.24.684481.
- [11] SHANG X, JIA J, YU J, et al. Monocyte-derived macrophages support alveolar regeneration via oncostatin M post-H1N1 infection during the recovery phase [J]. *Respir Res*, 2025, 26(1):285.
- [12] YIN L, ZHENG D, LIMMON G V, et al. Aging exacerbates damage and delays repair of alveolar epithelia following

- influenza viral pneumonia[J]. *Respir Res*, 2014, 15(1):116.
- [13] 魏伟,吴希美,李元建. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:71.
- WEI W, WU X M, LI Y J. *Methodology of Pharmacological Experiments* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House,2010:71.
- [14] SUBRAMANIAM K V, LIM H J, WANG B, et al. Dose-dependent activation of the Hippo pathway by type I and type III interferons suppresses tissue repair by human bronchial epithelial cells [J]. *PLoS Biol*, 2026, 24 (1) : e3003615.
- [15] JARBOE B, SHUBINA M, LANGLOIS R A, et al. Lung cell fates during influenza[J]. *Cell Res*, 2025, 35(10):707-718.
- [16] MAJOR J, CROTTA S, LLORIAN M, et al. Type I and III interferons disrupt lung epithelial repair during recovery from viral infection[J]. *Science*, 2020, 369(6504):712-717.
- [17] WANG A, HU J, ZHANG Q, et al. The antiviral activity of interferon-stimulated genes (ISGs) in influenza A virus infection[J]. *Virology*, 2025, 614:110728.
- [18] LI X, LIU S, RAI K R, et al. Initial activation of STAT2 induced by IAV infection is critical for innate antiviral immunity[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:960544.
- [19] HOU L, LI J, QU H, et al. Inhibition of replication and transcription of WSN influenza a virus by IFIT family genes [J]. *Chin J Biotechnol*, 2015, 31(1):123-134.
- [20] CHEEMARLA N R, HANRON A, FAUVER J R, et al. Nasal host response-based screening for undiagnosed respiratory viruses: A pathogen surveillance and detection study [J]. *Lancet Microbe*, 2023, 4(1):e38-e46.
- [21] MAO Z, LIU C, NI J, et al. Gut derived (S)-equol mitigates influenza viral pneumonia by modulating macrophage polarization via Nrf2 mediated Akt/ERK/NF- κ B signaling pathways[J]. *Free Radic Biol Med*, 2025, 239:457-471.
- [22] WANG K, GONG M, ZHAO S, et al. A novel lncRNA DFRV plays a dual function in influenza A virus infection[J]. *Front Microbiol*, 2023, 14:1171423.
- [23] GU Y, HSU A C, ZUO X, et al. Chronic exposure to low-level lipopolysaccharide dampens influenza-mediated inflammatory response via A20 and PPAR network [J]. *Front Immunol*, 2023, 14:1119473.
- [24] KOZLOVSKI S, REGEV O, SAPOZNIKOV A, et al. ICAMs are dispensable for influenza clearance and anti-viral humoral and cellular immunity [J]. *Front Immunol*, 2023, 13:1041552.
- [25] LUO Y, XIANG L, HE Q, et al. Orchestrating immunopathology: The spectrum of programmed cell death pathways co-opted by influenza a virus in pulmonary immunity[J]. *Front Immunol*, 2026, 17:1705500.
- [26] ENGELAND K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling [J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29(5):946-960.
- [27] GUO Y, TU Y H, WU X, et al. ResolvinD1 protects the airway barrier against injury induced by influenza A virus through the Nrf2 pathway [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 10:616475.
- [28] FAN J, ZHENG S, WANG M, et al. The critical roles of caveolin-1 in lung diseases [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15:1417834.

[责任编辑 张丰丰]