

• XXXX •

基于GRP78/ATF6/CHOP通路探讨升降平喘止咳丸调控内质网应激介导的细胞凋亡改善支气管哮喘的作用机制

吴桐¹, 张安妮², 李乐¹, 张常喜^{1,3*}

(1. 宁夏医科大学中医学学院, 银川 750004; 2. 首都医科大学附属友谊医院, 北京 100050;
3. 宁夏回族自治区中医医院/宁夏回族自治区中医研究院, 银川 750021)

[摘要] 目的: 基于转录组学探讨升降平喘止咳丸(SPZP)调控内质网应激介导的细胞凋亡改善支气管哮喘(AS)的作用机制并进行实验验证。方法: 将60只SD大鼠随机分为空白组、模型组、阳性药组(地塞米松注射液, 0.125 mg·kg⁻¹)及SPZP低、中、高剂量组(540、1 080、2 160 mg·kg⁻¹), 每组10只。采用卵清蛋白+氢氧化铝混合液腹腔注射联合雾化激发构建AS模型, 造模成功后干预21 d取材。通过苏木素-伊红(HE)染色观察肺组织病理变化; 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠血清免疫球蛋白E(IgE)水平; 透射电镜(TEM)观察内质网与凋亡超微结构; 对大鼠肺组织进行转录组(RNA-seq)分析, 深入探究SPZP干预AS的分子机制; 原位末端标记法(TUNEL)染色检测细胞凋亡率; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肺组织C/EBP同源蛋白(CHOP)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax)、Bcl-2蛋白表达水平。采用脂多糖诱导人支气管上皮细胞(BEAS-2B)建立损伤模型, 分为空白组、模型组、SPZP低、中、高剂量含药血清组。通过细胞成像显微镜观察细胞形态; TEM观察内质网超微结构; 流式细胞术检测细胞凋亡率; 免疫荧光(IF)观察CHOP蛋白的细胞核内聚集情况; 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测细胞中内质网相关葡萄糖调节蛋白78(GRP78)、激活转录因子6(ATF6)、Bax、Bcl-2 mRNA表达; Western blot检测细胞中GRP78、CHOP、ATF6、Bax、Bcl-2、剪切的胱天蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)蛋白表达。结果: 动物实验结果显示, 与空白组比较, 模型组大鼠出现频繁喘息伴随哮鸣音, 咳嗽, 活动度减少, 呼吸频次急促等症状, 肺组织病理中大鼠气道上皮脱落、炎症细胞浸润、气道壁增厚, 超微结构中内质网扩张、染色质凝集、细胞核固缩, 血清IgE水平升高($P<0.01$), 而SPZP干预组可改善上述结果($P<0.01$); RNA-seq分析显示, 空白组与模型组有515个差异基因, 模型组与高剂量组共有1 852个差异基因, 74个差异交集基因显著富集于哮喘、细胞凋亡及内质网蛋白加工通路。TUNEL染色与Western blot显示, 与空白组比较, 模型组大鼠肺组织细胞凋亡率显著上升($P<0.01$), CHOP、Bax蛋白表达显著上调($P<0.01$), Bcl-2蛋白显著下调($P<0.01$), 而SPZP干预组显著改善上述检测指标($P<0.01$)。细胞实验显示, SPZP含药血清呈剂量依赖性地提高BEAS-2B细胞存活率($P<0.01$), 改善细胞形态紊乱、染色质凝集, 内质网肿胀断裂的现象, 流式细胞术结果凋亡率显著下降($P<0.01$); GRP78、ATF6、Bax mRNA及GRP78、CHOP、ATF6、Bax、cleaved Caspase-3蛋白表达下调($P<0.05$, $P<0.01$), Bcl-2 mRNA及Bcl-2蛋白上调($P<0.05$, $P<0.01$)。结论: 体内外实验证实, SPZP干预AS可能与调控GRP78/ATF6/CHOP通路过度激活, 减轻内质网应激介导的上皮细胞凋亡有关。

[关键词] 支气管哮喘; 升降平喘止咳丸; 转录组学; 内质网应激; 上皮细胞凋亡

[中图分类号] R242; R256; R563 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(XXXX)XX-0001-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260466

[网络出版地址]

[网络出版日期] XXXX-XX-XX **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Mechanism of Shengjiang Pingchuan Zhike Pill in Improving Bronchial Asthma via Regulating Apoptosis Mediated by Endoplasmic Reticulum Stress Based on GRP78/ATF6/CHOP Pathway

WU Tong¹, ZHANG Anni², LI Le¹, ZHANG Changxi^{1,3*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ningxia Medical University, Yinchuan 750004,

[收稿日期] 2026-01-21

[基金项目] 宁夏回族自治区重点研发计划项目(2024BEG02023); 宁夏回族自治区科技领军人才培养项目(2023GKLRX18); 宁夏自然科学基金项目(2024AAC02082)

[第一作者] 吴桐, 在读硕士, 从事中医药治疗呼吸系统疾病基础与临床研究, E-mail: WuT610240@163.com

[通信作者] * 张常喜, 主任医师, 博士生导师, 从事中医药治疗呼吸系统疾病基础与临床研究, E-mail: zhangchangxizcx@163.com

China; 2. Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China;
3. Ningxia Hui Autonomous Region Hospital of TCM/Ningxia Hui Autonomous Region Academy of TCM,
Yinchuan 750021, China)

[Abstract] **Objective:** This paper aims to explore the mechanism of action of Shengjiang Pingchuan Zhike Pill (SPZP) in improving bronchial asthma (AS) via regulating apoptosis mediated by endoplasmic reticulum stress based on transcriptomics and conduct experimental verification. **Methods:** Sixty SD rats were randomly divided into a blank group, a model group, a positive drug group (dexamethasone injection, $0.125 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and low-, medium-, and high-dose SPZP groups ($540, 1\ 080, 2\ 160 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), with 10 rats in each group. An AS model was established by intraperitoneally injecting the mixed solution of ovalbumin and aluminum hydroxide combined with nebulization challenge. After successful modeling, the rats were intervened for 21 days and then sacrificed for sample collection. The pathological changes of lung tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The serum immunoglobulin E (IgE) levels of rats were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The ultrastructure of endoplasmic reticulum and apoptosis was observed by transmission electron microscope (TEM). The molecular mechanism of SPZP intervention in AS was explored by RNA-sequencing (RNA-seq) analysis of rats' lung tissue. The apoptosis rate was detected by in situ terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) staining. The protein expression levels of C/EBP homologous protein (CHOP), B-cell lymphoma-2 associated X protein (Bax), and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) in lung tissue were detected by Western blot. Human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) were induced by lipopolysaccharide to establish injury models, which were divided into a blank group, a model group, and low-, medium-, and high-dose SPZP-containing serum groups. The cell morphology was observed by cell imaging microscope. The ultrastructure of endoplasmic reticulum was observed by TEM. The apoptosis rate was detected by flow cytometry, and the nuclear aggregation of CHOP protein was observed by immunofluorescence (IF). The mRNA expression of endoplasmic reticulum-related glucose-regulated protein 78 (GRP78), activating transcription factor 6 (ATF6), Bax, and Bcl-2 in cells was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). The protein expression of GRP78, CHOP, ATF6, Bax, Bcl-2, and cleaved caspase-3 in cells was detected by Western blot. **Results:** Animal experiments show that compared with those in the blank group, the rats in the model group present frequent wheezing with stridor, coughing, reduced activity, rapid breathing frequency, and other symptoms. In the lung tissue pathology, the airway epithelium of the rats in the model group was shed, and inflammatory cells were infiltrated. The airway wall was thickened. In the ultrastructure, the endoplasmic reticulum was dilated, and chromatin was condensed. The cell nucleus was pyknotic. The serum IgE level was increased ($P<0.01$), while the SPZP intervention group could improve the above results ($P<0.01$). RNA-seq analysis shows that there are 515 differentially expressed genes in the blank group and the model group and 1 852 differentially expressed genes in the model group and the high-dose group. 74 differentially expressed intersection genes were significantly enriched in asthma, apoptosis, and endoplasmic reticulum protein processing pathways. TUNEL staining and Western blot shows that compared with the blank group, the apoptosis rate of lung tissue cells is significantly increased ($P<0.01$), the protein expression of CHOP and Bax is significantly upregulated ($P<0.01$), while Bcl-2 is significantly downregulated ($P<0.01$) in the model group. The SPZP intervention group significantly improved the above detected indicators ($P<0.01$). Cell experiments results show that SPZP-containing serum dose-dependently increases the survival rate of BEAS-2B cells ($P<0.01$) and improves the disorder of cell morphology, chromatin condensation, and endoplasmic reticulum swelling and rupture. The apoptosis rate was significantly decreased as shown by flow cytometry ($P<0.01$). The expression of GRP78, ATF6, and Bax mRNA, as well as that of GRP78, CHOP, ATF6, Bax, and cleaved caspase-3 proteins were downregulated ($P<0.05, P<0.01$), while the expression of Bcl-2 mRNA and Bcl-2 protein was upregulated ($P<0.05, P<0.01$). **Conclusion:** *In vivo* and *in vitro* experiments confirm that the intervention of SPZP in AS may be related to the regulation of the excessive activation of the GRP78/ATF6/CHOP pathway and the alleviation of epithelial cell apoptosis mediated by endoplasmic reticulum stress.

[Keywords] bronchial asthma; Shengjiang Pingchuan Zhike pill; transcriptomics; endoplasmic reticulum stress; epithelial cell apoptosis

近年来,受环境变迁及社会发展等因素影响,以支气管哮喘(AS)、特应性鼻炎及特应性皮炎为代表的过敏性疾病患病率呈上升趋势^[1]。其中,AS全球患病率达4.3%,已被世界卫生组织列为21世纪重点研究与防控的三大疾病之一^[2]。AS作为一种慢性气道炎症性疾病,其发病机制复杂,与100余个遗传位点及复杂环境因素的交互作用密切相关^[3],目前

尚未有令人满意的根治策略。国内外学者围绕AS发病机制与干预开展了大量研究:于彩霞等^[4]发现积雪草苷可通过激活环磷酸腺苷(cAMP)/蛋白激酶A(PKA)信号抑制气道炎症及肺组织损伤,改善肺功能;LIU等^[5]则聚焦免疫微环境失衡,证实重建1型辅助性T细胞(Th1)/Th2和调节性T细胞(Treg)/Th17平衡可改善气道阻力与炎症浸润,也有大量研

究证明抗气道重塑是控制AS的关键^[6-7]。尽管上述研究从抗炎、免疫调节、抗气道重塑等角度为AS防治提供了一定思路,仍不能解决临床病情反复、控制不佳等问题。

传统中医因其有效、低成本且安全的特点备受关注,其核心在于整体观念与辨证论治。在哮喘病症中,肺主气司呼吸,肾主纳气,二者相互协同维系机体气机升降;若哮喘病程日久,常累及肺肾二脏,导致肺失宣降、肾不纳气。基于上述中医理论,张常喜主任研发了升降平喘止咳丸(SPZP),该方剂精准契合肺肾同治整体观念,且已成功申请国家发明专利(专利号ZL202210416245.7)。前期临床与基础研究初步证实,SPZP对AS的干预作用可能与调控细胞凋亡相关^[8],内质网应激过度激活是近年AS迁延难愈的关键机制^[9],而SPZP能否通过调控内质网应激通路发挥作用,目前有待进一步研究。因此,本研究拟基于RNA-seq结果,通过体内、体外实验验证,围绕内质网应激通路展开深入探究,旨在揭示SPZP干预AS的深层作用机制,为该方剂的临床应用提供更充分的理论支撑。

1 材料

1.1 细胞株 人支气管上皮细胞系(BEAS-2B),货号C1114,购自上海美湾生物科技有限公司,传至第5代用于细胞实验。

1.2 动物 选取60只SPF级SD雄性大鼠,体质量(180±20)g,由宁夏医科大学动物中心提供,饲养在宁夏医科大学SPF级动物房,温度(22±3)℃,湿度(50±10)%,实验动物合格证号SCXK(宁)2020-0001。

1.3 伦理 本课题动物实验由宁夏医科大学实验动物伦理委员会审查通过,伦理号IACUC-NYLAC-2024-139。

1.4 药物与试剂 B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax)、Bcl-2、剪切的胱天蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)、内质网相关葡萄糖调节蛋白78(GRP78)抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司,货号分别为AF0120、AF6139、AF7022、AF0729),C/EBP同源蛋白(CHOP)、转录因子6(ATF6)抗体(杭州华安生物技术有限公司,货号分别为ET1703-05、HA601321), β -肌动蛋白(β -actin)抗体、青链霉素混合液、通用型组织固定液、胰酶细胞消化液、电镜固定液(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号分别为GB15003-100、G4003-100mL、G1101-500mL、G4021-100mL、G1102),山羊抗小鼠免疫球蛋白

(Ig)G(H+L)594、荧光封片剂[含4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)]、山羊血清封闭液(山东思科捷生物技术有限公司,货号分别为ZF-0516、EE0015、EE0008),全蛋白提取试剂盒、膜联蛋白V-融合增强型绿色荧光蛋白(Annexin V-EGFP)/碘化丙锭(PI)双染细胞凋亡检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,货号分别为KGB5303-50、KGA1101-10),聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)凝胶快速制备试剂盒、改良型促凝剂、Omni-Easy™即用型蛋白定量法(BCA)蛋白定量试剂盒、无蛋白快速封闭液(上海雅酶生物医药科技有限公司,货号分别为PG112、PG610、ZJ102、PS108),超敏增强化学发光法(ECL)化学发光试剂盒、细胞/组织总RNA快速提取试剂盒、细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒苏州新赛美生物科技有限公司,货号分别为C6005、P10100、M5105),脂多糖、二甲基亚砷(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为L8880、D8371),TB Green® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)[宝日医生物技术(北京)有限公司,货号分别为RR820A、RR047A]。

1.5 仪器 JXFSTPRP-CL型冷冻研磨机(上海净信实业发展有限公司),LDZ5-2型离心机(北京时代北利离心机有限公司),Multiskan Go型酶标仪、StepOnePlus型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪、EVOS xl core型细胞成像系统倒置生物显微镜(美国赛默飞世尔科技公司),Imager 680RGB型超灵敏多功能成像仪(美国Cytiva公司),TP1020型全自动组织脱水机、RM2255型全自动轮转式石蜡切片机、HI1220型摊片机(德国徕卡公司),BX43型荧光显微镜(日本奥林巴斯公司),80241ES05型四块胶迷你垂直电泳转印槽[翌圣生物科技(上海)股份有限公司],BVT-4型转印电泳仪(武汉赛维尔生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组、给药及造模 适应性饲养7d,第7、14、21天腹腔注射10%卵清蛋白(OVA)和氢氧化铝混合溶液1mL致敏,观察大鼠一般状态,第28天将大鼠放置在39cm×29cm×23cm的雾化箱中,每天用2%OVA和氢氧化铝混合溶液雾化激发30min,观察到大鼠出现咳嗽、喘息、喉部哮鸣音、烦躁、呼吸急促、流鼻涕、搔抓等症状为激发成功^[10]。将模型构建成功的大鼠随机分为模型组,阳性药组,SPZP低、中、高剂量组,每组10只。第35天除空白

组,各组用2%OVA雾化,根据大鼠与人的体表面积换算^[11],空白组和模型组给予生理盐水灌胃,阳性药组给予地塞米松注射液 $0.125\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,SPZP不同剂量组给予 540 、 $1\ 080$ 、 $2\ 160\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 连续干预3周,如当天需要雾化,则雾化前 0.5 h 灌胃治疗。

2.2 样本采集 腹腔注射3%戊巴比妥钠溶液麻醉大鼠,腹主动脉取血,静置 1 h ,设置在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心($3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min ,离心半径 10 cm),分装到 2 mL 的冻存管中置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。将新鲜取下的左肺组织切割成 $1\text{ mm}\times 2\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ 的薄块放入电镜固定液,其余左肺用多聚甲醛固定制备石蜡切片,右肺组织冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

2.3 苏木素-伊红(HE)染色观察肺组织病理学变化 将肺组织从多聚甲醛中取出,脱水,石蜡包埋,切片机制备 $4\sim 6\ \mu\text{m}$ 厚石蜡切片,烤片 4 h ,依次进行二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水、HE染色,中性树胶封片,切片扫描仪观察结构及图片保存。

2.4 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠血清IgE水平 从冰箱取出冷冻血清样本,室温缓慢复温;同时取出酶标板条及配套试剂。在酶标板上分别设置标准孔、空白孔与样本孔,依次加入梯度标准品、空白试剂及复温血清,加样严格按照试剂盒操作流程。设置酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔吸光度 A ,实验重复检测3次,取平均值用于后续浓度计算与分析。

2.5 转录组学分析 从空白组、模型组和SPZP高剂量大鼠肺组织中提取总RNA。测定提取的RNA的浓度和质量。样本检测合格后,用带有Oligo(dT)的磁珠富集真核生物的mRNA,加入fragmentation buffer将mRNA进行随机打断。以mRNA为模板,用六碱基随机引物(random hexamers)合成cDNA第一链,然后加入缓冲液、dNTPs和DNA polymerase I合成cDNA第二链,随后利用AMPure XP beads纯化双链cDNA。纯化的双链cDNA再进行末端修复、加A尾并连接测序接头,然后用AMPure XP beads进行片段大小选择,最后进行PCR富集得到最终的cDNA文库,对文库的插入片段长度(insert size)和有效浓度进行检测,上机测序。原始数据经质控过滤得到有效序列,经比对定量得到基因表达矩阵,使用R语言DESeq2包(v1.38.3)筛选差异表达基因,以 $|\log_2\text{差异倍数(FC)}|> 1.5$ 且 $P<0.05$ 为阈值,将差异基因导入DAVID数据库(<https://davidbioinformatics.nih.gov/>)进行基因本体(GO)功能富集分析与京都基因与基因组百科全书

(KEGG)通路富集分析,并通过微生信平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)进行可视化处理。

2.6 透射电镜(TEM)观察肺组织超微结构 将新鲜取下的左肺组织放入电镜固定液,用手术刀在培养皿中切割成 $1\text{ mm}\times 2\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ 的薄块,依次经固定、洗涤、脱水、包埋处理,制成超薄切片,经醋酸铀-柠檬酸铅双重染色后,置于TEM下观察内质网与细胞凋亡超微结构。

2.7 原位末端标记法(TUNEL)染色观察肺组织细胞凋亡率 先制备 $5\ \mu\text{m}$ 厚的肺组织石蜡切片并烤片 4 h ,随后进行脱蜡复水,向切片加入TUNEL反应混合液,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 湿盒中避光孵育 1 h ,之后用磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗3次,每次 5 min ;再滴加DAPI染色液,避光室温孵育 20 min ,同样用PBS漂洗3次、每次 5 min ;最后以水溶性封片剂封片,通过荧光显微镜观察结果。

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肺组织CHOP、Bax、Bcl-2蛋白表达水平 称取冻存的肺组织,加入 1 mL 预冷的细胞裂解液,同时加入磷酸酶抑制剂 $10\ \mu\text{L}$ 、蛋白酶抑制剂 $1\ \mu\text{L}$ 及苯甲基磺酰氟(PMSF) $10\ \mu\text{L}$ 混匀,冰上保存待用,冷冻研磨机研磨,BCA定量,制备凝胶,电泳,转膜,CHOP(1:5 000),Bax、Bcl-2(1:1 000)一抗 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,二抗(1:50 000)常温摇床孵育 1.5 h ,TBST洗膜3次,每次 10 min ,显影液按说明书1:1混匀后滴加于膜上,用Image J软件分析。

2.9 SPZP含药血清的制备 选取SPF级雄性SD大鼠12只,体质量(180 ± 20)g,随机分为空白组和SPZP组,饲养1周。SPZP组给予SPZP($2.16\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)灌胃,空白组给予等剂量的生理盐水灌胃。每日给药3次,连用 7 d ^[12]。末次处理 1 h 后,腹主动脉穿刺采集血样。设置在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心($3\ 600\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 15 min ,离心半径 10 cm)以获得血清。经 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅灭活 30 min ,用 $0.22\ \mu\text{m}$ 无菌滤膜过滤,得到空白血清和含SPZP血清,血清样品保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2.10 细胞培养 复苏BEAS-2B细胞,采用含10%胎牛血清(FBS)及1%双抗的RPMI 1640完全培养基,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中常规培养,观察细胞增长状态,待细胞生长融合度达到80%以上时,加入胰酶进行消化处理,随后进行细胞传代、冻存,用于后续相关实验。

2.11 CCK-8法检测BEAS-2B细胞活力 将对数生长的BEAS-2B细胞以 8×10^3 个/孔接种至96孔板,分为空白组,模型组,SPZP低、中、高剂量含药血清

组,每组设5个复孔,空白组给予空白血清培养,模型组在空白组的基础上给予脂多糖 10 mg·L⁻¹刺激 24 h造模^[13],SPZP低、中、高剂量含药血清组,造模后分别用终体积分数为5%、10%、15%含药血清干预,孵育 24 h,向每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL,培养箱内孵育 1 h,用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

2.12 TEM 观察 BEAS-2B 细胞内质网损伤结构
实验操作同 2.6 项下方法。

2.13 流式细胞术检测 BEAS-2B 细胞的凋亡率
用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞,用 PBS 洗涤细胞 2 次,加入 Binding Buffer 500 μL 轻轻吹匀成单细胞悬液,加入 Annexin V-EGFP 5 μL 和 Propidium Iodide 5 μL,轻轻混匀,室温、避光条件下,反应 5~10 min,上机检测。

2.14 免疫荧光(IF)检测 BEAS-2B 细胞 CHOP 蛋白核转移
BEAS-2B 细胞接种于爬片后经相应处理,4% 多聚甲醛固定 15 min,0.1% Triton X-100 通透 10 min,5% 牛血清白蛋白(BSA)封闭 30 min;加入一抗 CHOP (1: 100) 4 °C 孵育过夜,荧光二抗 (1: 300)室温孵育 1 h,DAPI 染核 5 min;荧光显微镜下观察分析。

2.15 Real-time PCR 检测 BEAS-2B 细胞 GRP78、ATF6、Bax、Bcl-2 mRNA 表达
在各组细胞沉淀中加入裂解液 RLT Lysis Buffer 350 μL,室温静置充分裂解后,严格按照试剂盒说明书提取总 RNA,测量 RNA 浓度,经逆转录得到 cDNA,再进行上机扩增,反应程序为 95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 30 s,40 个循环。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,采用 2^{-ΔΔC_t}法计算 mRNA 相对表达量,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司代合成,引物序列见表 1。

2.16 Western blot 检测 BEAS-2B 细胞 GRP78、CHOP、ATF6、Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3 蛋白表达
将处理好的各组细胞胰酶消化 3 min 后根据全蛋白提取试剂盒说明提取细胞蛋白,BCA 定量浓度,制备凝胶,电泳,转膜,一抗 GRP78 (1: 800)、ATF6 (1: 500)、Bax (1: 1 000)、Bcl-2 (1: 1 000)、cleaved Caspase-3 (1: 1 000)、β-actin (1: 3 000) 4 °C 孵育过夜,次日 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,二抗 (1: 50 000) 常温孵育 1.5 h,显影液按说明书 1:1 混匀后滴加于膜上进行曝光,用 Image J 软件分析。

2.17 统计学分析
使用 GraphPad Prism 9.5.1 进行统计分析,进行 Shapiro-Wilk 正态性检验与 Levene 方差齐性检验;多组间比较采用单因素方差分析,

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GRP78	上游 GACAAGAAGGAGGACGTGGG	173
	下游 GCATCGCCAATCAGACGTTT	
ATF6	上游 CAGCAGGAAGCTCAGGGAGTG	96
	下游 AATGTGTCTCCCCTTCTGCG	
Bax	上游 AAGGTGCCGGAAGTATCAG	81
	下游 GTCTTGGATCCAGCCCAACA	
Bcl-2	上游 GAACTGGGGGAGGATTGTGG	164
	下游 CATCCAGCTCCGTTATCC	
GAPDH	上游 CAGGAGGCATTGCTGATGAT	138
	下游 GAAGGCTGGGGCTCATT	

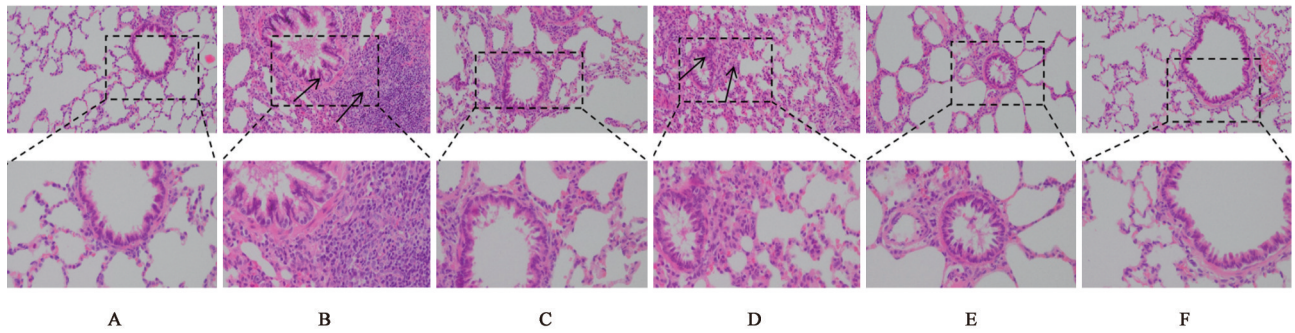
组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 AS 大鼠一般状态及肺组织病理改变的影响
空白组大鼠无喘息、咳嗽症状,HE 染色支气管黏膜上皮完整、管壁薄,×400 放大后可见支气管周围炎症细胞极少,肺泡形态规则,无充血、水肿等病理改变,呈现正常肺组织形态;与空白组比较,模型组大鼠频繁喘息、咳嗽伴哮鸣音,出现鼻翼扇动,精神萎靡,活动量显著减少,有搔抓口鼻现象,HE 染色支气管管壁明显增厚,周围组织充血,可观察到支气管黏膜损伤,且管壁及周围聚集大量紫蓝色炎症细胞;与模型组比较,SPZP 低、中剂量组大鼠呼吸急促程度减轻,但仍有喘息,HE 染色支气管管壁仍有轻度增厚,可见支气管周围存在少量炎症细胞,但浸润程度较模型组减轻;阳性药组和 SPZP 高剂量组大鼠精神状态明显改善,呼吸平稳、喘息基本消失,HE 染色支气管结构接近正常,支气管黏膜上皮完整、管壁薄,周围炎症细胞极少,肺泡形态规则。见图 1。

3.2 对 AS 大鼠血清 IgE 水平的影响
与空白组比较,模型组大鼠血清 IgE 表达水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各干预组大鼠血清 IgE 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。见表 2。

3.3 转录组学分析
为了明确 SPZP 作用于 AS 的机制,对空白组、模型组、SPZP 高剂量组进行 RNA-seq 测序分析,空白组与模型组有 515 个差异基因,其中上调基因 370 个,下调基因 145 个;模型组与 SPZP 高剂量组共有 1 852 个差异基因,其中上调基因 403 个,下调基因 1 649 个;3 组取交集共有 74 个



注: A.空白组; B.模型组; C.阳性药组; D.SPZP低剂量组; E.SPZP中剂量组; F.SPZP高剂量组(图2-图4同)

图1 SPZP对AS大鼠肺组织病理改变的影响(HE, ×200, ×400)

Fig. 1 Effect of SPZP on pathological changes of lung tissue in AS rats (HE, ×200, ×400)

表2 SPZP对AS大鼠血清IgE的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of SPZP on serum IgE in AS rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	IgE/ng·L ⁻¹
空白组		91.97±5.78
模型组		543.37±7.81 ¹⁾
阳性药组	0.125	167.50±8.90 ²⁾
SPZP低剂量组	540	427.68±9.60 ²⁾
SPZP中剂量组	1 080	356.33±8.27 ²⁾
SPZP高剂量组	2 160	273.03±10.03 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.01(表3和表4同)

差异基因,对其进行富集分析,GO功能富集结果显示,生物过程(BP)主要与细胞吞噬、免疫反应、细胞凋亡等相关,细胞组分(CC)主要与细胞膜、离子通道复合物、细胞外区域等相关,分子功能(MF)主要与受体结合、酶活性、DNA结合、通道活性等相关。KEGG富集分析显示,差异基因与Th1/Th2细胞分化、凋亡、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B

(Akt)信号通路、哮喘、内质网通路密切相关,课题组前期研究已证实SPZP作用于Th1/Th2细胞分化、PI3K/Akt信号通路的机制^[14]。本研究着重探讨SPZP调控内质网应激介导的细胞凋亡对AS的影响。见增强出版附加材料。

3.4 对AS大鼠肺组织超微结构及细胞凋亡的影响 空白组肺组织超微结构状态良好,内质网膜连续、无扩张及空泡化,呈规则管状排列,同时细胞核完整、染色质分布均匀;TUNEL染色可见,空白组的凋亡信号极少,肺组织凋亡率处于低水平。与空白组比较,模型组的超微结构损伤显著:内质网出现肿胀并形成大量融合性空泡,细胞核染色质凝聚、边缘化,细胞器排列紊乱,部分区域还可见凋亡小体形成;肺组织凋亡率显著升高(P<0.01)。与模型组比较,各治疗组的损伤呈剂量依赖性缓解:内质网的肿胀、扩张程度减轻,染色质凝集现象减少;同时各治疗组的TUNEL绿色凋亡信号均减少,肺组织凋亡率显著下降(P<0.01)。见图2、图3、表3。

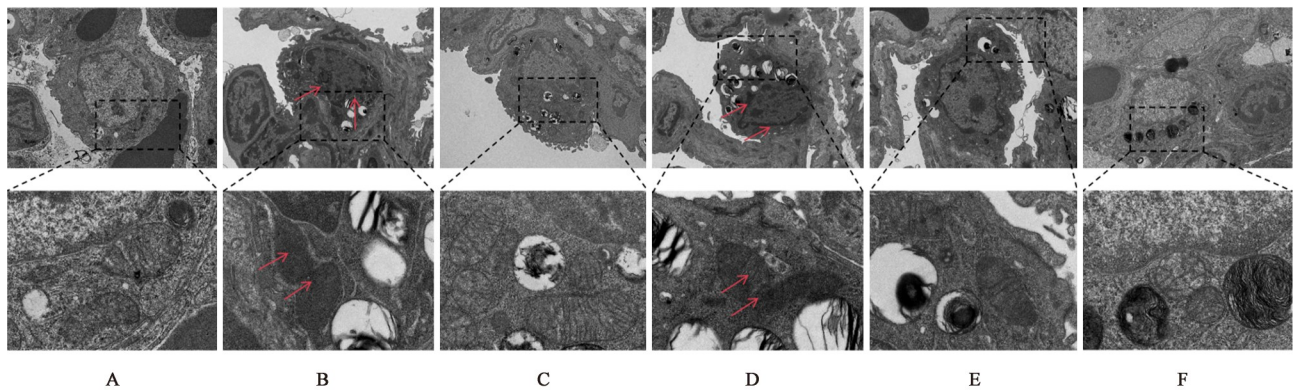


图2 SPZP对AS大鼠肺组织超微结构的影响(TEM, ×2 000, ×12 000)

Fig. 2 Effect of SPZP on ultrastructure of lung tissue in AS rats (TEM, ×2 000, ×12 000)

3.5 对AS大鼠肺组织Bax、Bcl-2、CHOP蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组Bax与CHOP蛋白

表达显著上调(P<0.01),而Bcl-2显著下调(P<0.01);与模型组比较,各治疗组的Bax与CHOP

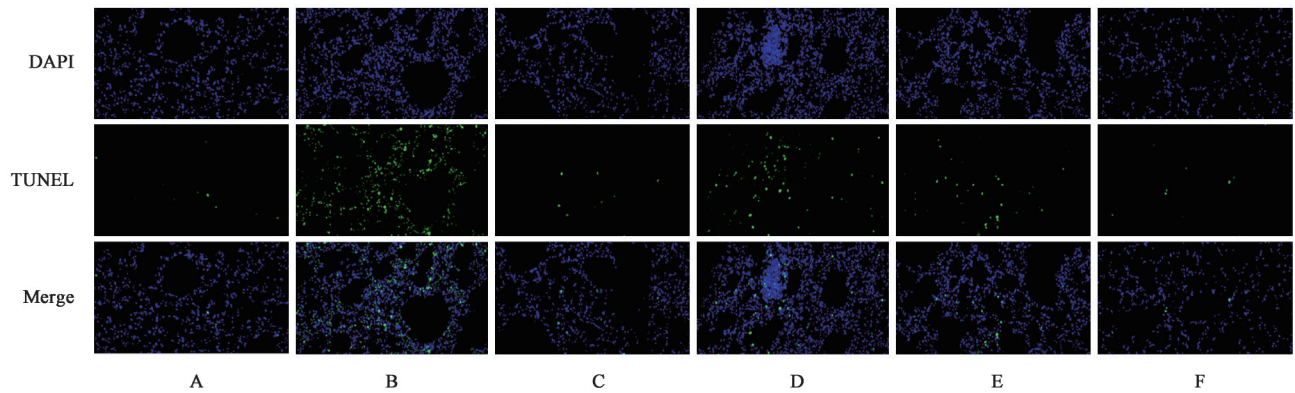


图3 SPZP对AS大鼠肺组织细胞凋亡的影响(TUNEL, ×200)

Fig. 3 Effect of SPZP on apoptosis of lung tissue cells in AS rats (TUNEL, ×200)

表3 SPZP对AS大鼠肺组织细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of SPZP on apoptosis rate of lung tissue cells in AS rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	凋亡率/%
空白组		1.86±0.47
模型组		27.26±1.52 ¹⁾
阳性药组	0.125	2.21±0.40 ²⁾
SPZP低剂量组	540	13.40±2.37 ²⁾
SPZP中剂量组	1 080	6.10±0.91 ²⁾
SPZP高剂量组	2 160	2.50±0.95 ²⁾

蛋白表达显著下调($P<0.01$), Bcl-2显著上调($P<0.01$)。见图4、表4。

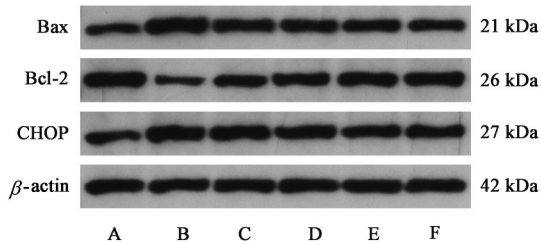


图4 AS大鼠肺组织Bax、Bcl-2、CHOP蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of expression of Bax, Bcl-2 and CHOP proteins in lung tissue of AS rats

表4 SPZP对AS大鼠肺组织Bax、Bcl-2、CHOP蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of SPZP on expression of Bax, Bcl-2 and CHOP proteins in lung tissue of AS rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	CHOP/ β -actin
空白组		0.65±0.03	1.14±0.01	0.67±0.02
模型组		1.27±0.02 ¹⁾	0.46±0.01 ¹⁾	1.08±0.02 ¹⁾
阳性药组	0.125	0.81±0.02 ²⁾	0.8±0.01 ²⁾	0.84±0.02 ²⁾
SPZP低剂量组	540	0.89±0.05 ²⁾	0.84±0.01 ²⁾	0.91±0.02 ²⁾
SPZP中剂量组	1 080	0.87±0.01 ²⁾	0.96±0.02 ²⁾	0.84±0.02 ²⁾
SPZP高剂量组	2 160	0.74±0.05 ²⁾	0.97±0.01 ²⁾	0.83±0.03 ²⁾

3.6 对BEAS-2B细胞存活率的影响 与空白组比较,模型组细胞存活率显著下降($P<0.01$)。与模型组比较,SPZP各剂量含药血清组细胞存活率显著升高($P<0.01$),同时给予不同浓度的SPZP含药血清干预后,细胞存活率呈浓度依赖性升高。见表5。

表5 SPZP含药血清对BEAS-2B细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

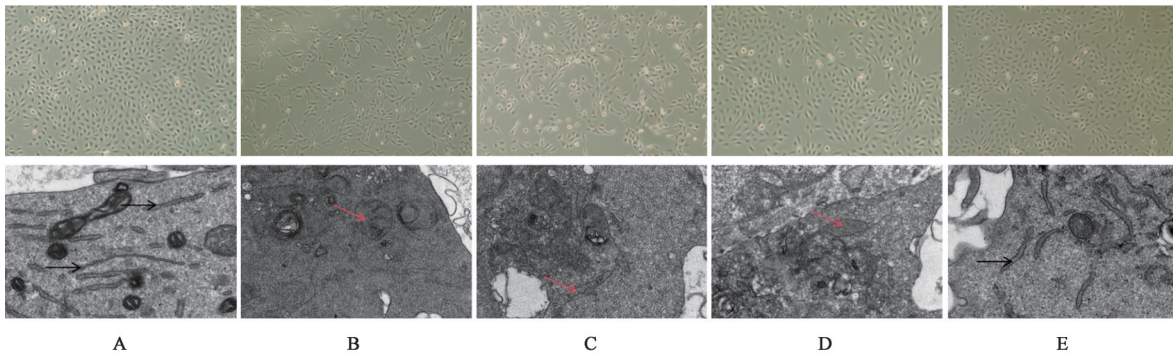
Table 5 Effect of SPZP-containing serum on survival rate of BEAS-2B cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	体积分数/%	存活率/%
空白组		99.20±0.84
模型组		63.20±0.54 ¹⁾
SPZP低剂量含药血清组	5	78.40±3.58 ³⁾
SPZP中剂量含药血清组	10	86.80±2.17 ³⁾
SPZP高剂量含药血清组	15	92.80±1.79 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表6-表8同)

3.7 对BEAS-2B细胞形态和超微结构的影响 生物显微镜观察,空白组的BEAS-2B细胞呈鹅卵石状、多边形,细胞分布均匀;模型组细胞密度降低,可见形态皱缩的细胞;SPZP含药血清组中皱缩细胞的数量减少,细胞密度有所增加。TEM观察,空白组BEAS-2B细胞超微结构正常,内质网膜连续完整,呈规则管状,无肿胀、空泡化表现,同时细胞核染色质分布均匀;与空白组比较,模型组内质网出现肿胀、膜连续性破坏、结构紊乱的情况,且细胞核染色质聚集,细胞内整体超微结构紊乱;与模型组比较,SPZP低、中剂量含药血清的内质网损伤有所改善,但内质网仍存在肿胀融合的现象;而SPZP高剂量含药血清组中内质网结构形态接近空白组,膜连续、排列相对规整,肿胀、扩张等损伤表现基本消失,细胞超微结构恢复良好。见图5。

3.8 对BEAS-2B细胞凋亡率的影响 与空白组比



注:A.空白组;B.模型组;C.SPZP低剂量含药血清组;D.SPZP中剂量含药血清组;E.SPZP高剂量含药血清组(图6-图7同)

图5 SPZP含药血清对BEAS-2B细胞形态和超微结构的影响(倒置生物显微镜,×10;TEM,×12 000)

Fig. 5 Effect of SPZP-containing serum on morphology and ultrastructure of BEAS-2B cells (inverted biological microscope, ×10; TEM, ×12 000)

较,模型组细胞凋亡率显著升高($P<0.01$);与模型组比较,SPZP不同剂量含药血清组细胞凋亡程度明显降低($P<0.05, P<0.01$),且呈剂量依赖性降低,提示SPZP含药血清可抑制脂多糖诱导的BEAS-2B细胞凋亡。见增强出版附加材料及表6。

3.9 对BEAS-2B细胞CHOP蛋白的影响 与空白组比较,模型组中CHOP红色荧光明显聚集于细胞核区域,且整体荧光强度明显增强,表明脂多糖刺激诱导CHOP向细胞核内聚集;与模型组比较,SPZP含药血清组的核内CHOP荧光占比逐步减少,

表6 SPZP含药血清对BEAS-2B细胞凋亡率的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of SPZP-containing serum on apoptosis rate of BEAS-2B cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	凋亡率/%
空白组		2.71±0.15
模型组		26.16±0.21 ¹⁾
SPZP低剂量含药血清组	5	23.23±0.27 ²⁾
SPZP中剂量含药血清组	10	12.37±0.25 ³⁾
SPZP高剂量含药血清组	15	6.49±0.16 ³⁾

说明SPZP含药血清可抑制脂多糖诱导的BEAS-2B细胞CHOP核内聚集,见图6。

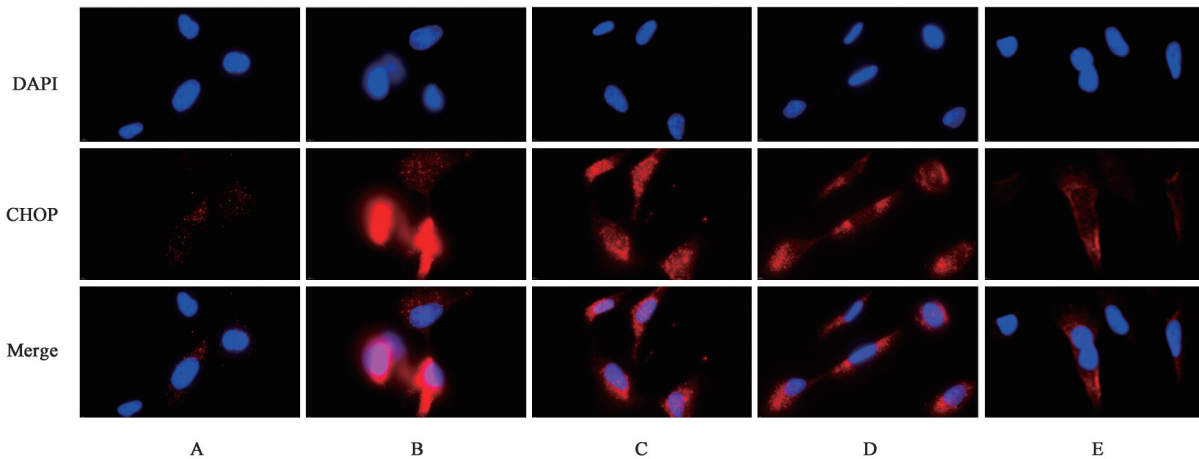


图6 SPZP含药血清对BEAS-2B细胞CHOP蛋白的影响(IF,×400)

Fig. 6 Effect of SPZP-containing serum on CHOP protein of BEAS-2B cells (IF, ×400)

3.10 对BEAS-2B细胞GRP78、ATF6、Bax、Bcl-2 mRNA表达的影响 与空白组比较,模型组中GRP78、ATF6、Bax mRNA表达显著上调($P<0.01$),而Bcl-2 mRNA表达显著下调($P<0.01$);与模型组比较,SPZP各剂量含药血清组的GRP78、ATF6、Bax mRNA表达明显下调($P<0.05, P<0.01$),呈剂量依赖性,而Bcl-2 mRNA表达显著上调($P<0.01$),说明SPZP含药血清可以减轻内质网应激介导的细胞

凋亡程度。见表7。

3.11 对BEAS-2B细胞GRP78/ATF6/CHOP信号通路蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组中GRP78、ATF6、CHOP、Bax、cleaved Caspase-3蛋白表达显著上调($P<0.01$),而Bcl-2蛋白表达显著下调($P<0.01$);与模型组比较,SPZP低剂量含药血清组蛋白表达呈下降趋势,SPZP中、高剂量含药血清组的GRP78、ATF6、CHOP、Bax、cleaved Caspase-3蛋

表7 SPZP含药血清对BEAS-2B细胞GRP78、ATF6、Bax、Bcl-2 mRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of SPZP-containing serum on expression of GRP78, ATF6, Bax and Bcl-2 mRNA in BEAS-2B cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	GRP78	ATF6	Bax	Bcl-2
空白组		1.00±0.07	1.00±0.04	1.00±0.06	1.00±0.05
模型组		2.23±0.09 ¹⁾	2.28±0.12 ¹⁾	4.25±0.02 ¹⁾	0.28±0.02 ¹⁾
SPZP低剂量含药血清组	5	1.71±0.11 ²⁾	2.06±0.15 ²⁾	3.64±0.18 ²⁾	0.43±0.01 ³⁾
SPZP中剂量含药血清组	10	1.43±0.11 ³⁾	1.19±0.02 ³⁾	1.79±0.04 ³⁾	0.49±0.01 ³⁾
SPZP高剂量含药血清组	15	1.07±0.16 ³⁾	1.02±0.01 ³⁾	1.57±0.02 ³⁾	0.55±0.02 ³⁾

白表达明显下调($P<0.05, P<0.01$), Bcl-2蛋白表达

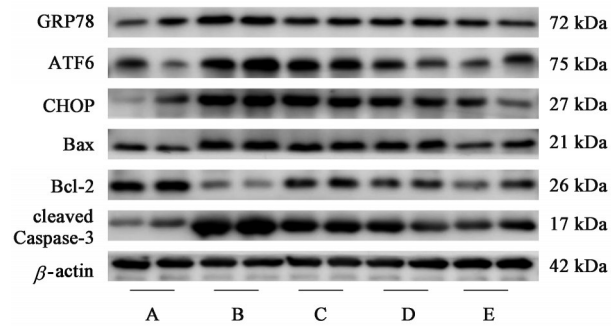


图7 BEAS-2B细胞GRP78/ATF6/CHOP信号通路蛋白表达电泳
Fig. 7 Electrophoresis of protein expression of GRP78/ATF6/CHOP signaling pathway in BEAS-2B cells

4 讨论

AS属中医“哮喘”“喘证”范畴^[15],病机以本虚标实为核心,病标在肺、根于肾,《类证治裁·喘证》言“肺为气之主,肾为气之根”^[16]。SPZP基于肺肾同治、升降同调理论组方,前期研究已证实可降低气道炎症水平、抑制细胞凋亡,但其深层分子机制尚不明确。本研究通过转录组学发现,差异基因主要富集于哮喘通路、细胞凋亡通路及内质网蛋白质加工通路,提示内质网应激可能是SPZP调控气道上皮凋亡、改善AS的关键靶点。据此,本研究进一步围绕GRP78/ATF6/CHOP信号通路展开机制验证,旨在阐明SPZP防治AS的分子机制。

气道上皮作为机体抵御外界环境刺激的第一道物理屏障,其结构完整性直接影响AS的病情进展^[17-18]。临床研究显示,中重度AS患者的支气

管活检组织中观察到明显的气道上皮损伤、脱落现象^[19]。气道上皮细胞损伤会破坏细胞间紧密连接的完整性,导致黏膜屏障通透性升高,促使过敏原、微生物等侵入气道,诱发并放大局部炎症与应激反应^[20]。气道上皮损伤与内质网稳态失衡密切相关。内质网参与蛋白质折叠、修饰及钙稳态维持,是细胞应激反应的核心细胞器^[21]。当外界刺激导致蛋白折叠障碍,未折叠/错误折叠蛋白大量蓄积时,细胞启动未折叠蛋白反应(UPR)以重建稳态;若应激过强或代偿不足,UPR将由保护性信号转为促凋亡信号,最终启动细胞凋亡程序^[22-23]。越来越多证据表明,内质网应激过度激活是哮喘、慢性阻塞性肺疾病、肺纤维化等多种呼吸系统疾病的共同病理机制^[24-25]。本研究显示,AS大鼠肺组织出现气道结构损伤、炎症浸润,血清IgE显著升高;超微结构可见内质网肿胀空泡化、染色质凝集及凋亡小体形成;脂多糖诱导的BEAS-2B细胞呈现形态异常、内质网断裂、凋亡率显著升高,证明内质网应激介导的气道上皮过度凋亡是AS气道损伤的重要病理环节。

GRP78/ATF6/CHOP通路是调控内质网应激性凋亡的关键信号轴^[26]。GRP78作为内质网稳态的核心分子伴侣,静息状态下与ATF6结合,并将其锚定在内质网膜^[27];当内质网应激发生时,GRP78转而结合错误折叠蛋白,导致ATF6解离并转移至高尔基体剪切激活,其活化片段入核后可显著上调促凋亡转录因子CHOP^[28]。CHOP作为内质网应激诱

表8 SPZP含药血清对BEAS-2B细胞GRP78/ATF6/CHOP信号通路蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 8 Effect of SPZP-containing serum on protein expression of GRP78/ATF6/CHOP signaling pathway in BEAS-2B cells ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	体积分数/%	GRP78/ β -actin	ATF6/ β -actin	CHOP/ β -actin	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	cleaved Caspase-3/ β -actin
空白组		0.51±0.07	0.45±0.12	0.26±0.17	0.58±0.05	1.03±0.11	0.22±0.11
模型组		1.32±0.09 ¹⁾	1.22±0.13 ¹⁾	1.37±0.08 ¹⁾	1.23±0.11 ¹⁾	0.38±0.10 ¹⁾	1.17±0.11 ¹⁾
SPZP低剂量含药血清组	5	1.03±0.10 ³⁾	1.16±0.10	1.14±0.05	1.18±0.08	0.85±0.05 ³⁾	0.92±0.15
SPZP中剂量含药血清组	10	0.88±0.01 ³⁾	0.65±0.18 ³⁾	0.89±0.09 ²⁾	0.91±0.14 ²⁾	0.69±0.07 ³⁾	0.6±0.22 ³⁾
SPZP高剂量含药血清组	15	0.68±0.02 ³⁾	0.57±0.11 ³⁾	0.48±0.07 ³⁾	0.69±0.07 ³⁾	0.68±0.06 ³⁾	0.42±0.11 ³⁾

导凋亡的“执行者”，可通过调控Bcl-2家族蛋白表达平衡，抑制抗凋亡蛋白Bcl-2、上调促凋亡蛋白Bax，进而激活线粒体凋亡途径与Caspase级联反应，最终诱导细胞凋亡^[29]。本研究体内实验结果高度一致：体内实验显示，SPZP可显著降低AS大鼠肺组织凋亡率，下调CHOP、Bax蛋白表达，上调Bcl-2表达，并改善肺组织病理损伤与内质网超微结构异常；体外实验证实，SPZP含药血清可下调GRP78、ATF6、CHOP、Bax及cleaved Caspase-3表达，上调Bcl-2表达，降低气道上皮细胞凋亡率，改善内质网损伤并恢复细胞活力。上述结果提示，SPZP可通过抑制GRP78/ATF6/CHOP通路过度激活，减轻内质网应激介导的气道上皮细胞凋亡，从而发挥抗AS保护作用。既往研究显示，络通纤溶饮、补肺汤等中药复方通过抑制内质网应激减轻肺组织细胞凋亡^[30-31]，与本研究结论相互印证，进一步明确了内质网应激通路在慢性呼吸系统疾病中的关键作用。

综上，本研究初步阐明，SPZP可通过调控GRP78/ATF6/CHOP通路，抑制气道上皮细胞过度凋亡，减轻气道炎症，进而发挥干预AS的作用，为该复方的临床应用提供了实验依据与理论支撑。本研究仍存在一定局限性：其一，仅从分子与细胞层面验证了SPZP对GRP78/ATF6/CHOP通路的调控作用，未采用ERS通路特异性激动剂或抑制剂进行挽救实验，无法进一步明确该通路的靶点特异性；其二，未对SPZP复方进行拆方分析与活性成分筛选，尚未明确调控该通路的核心药效物质；其三，体外实验仅采用单一BEAS-2B细胞株进行研究，无法模拟体内多细胞交互的复杂微环境。后续将针对以上不足，补充ERS通路挽救实验，结合网络药理学、液质联用技术筛选复方核心活性成分，开展体内药效验证与药代动力学研究，进一步完善其作用机制体系，为该复方的研发提供更坚实的理论基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] LU H F, ZHOU Y C, LUO D D, et al. ILC2s: Unraveling the innate immune orchestrators in allergic inflammation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 131: 111899.

[2] ZHOU K, LU D, YOU J, et al. Integrated plasma pharmacology and network pharmacology to explore the mechanism of *Gerberae Piloselloidis Herba* in treatment of allergic asthma[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 298: 115624.

[3] MA J G, WU G J, XIAO H L, et al. Vitamin D has an effect on airway inflammation and Th17/Treg balance in asthmatic mice[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2021, 37(12): 1113-1121.

[4] 于彩霞,王杏敏,张睿云,等. 积雪草苷增强cAMP/PKA信号并缓解支气管哮喘大鼠气道炎症[J]. *中国免疫学杂志*, 2026, 42(2): 322-327, 333.

YU C X, WANG X M, ZHANG Q Y, et al. Asiaticoside enhances cAMP/PKA signaling and alleviates airway inflammation in rats with bronchial asthma[J]. *Chin J Immunol*, 2026, 42(2): 322-327, 333.

[5] LIU Y, LIU H, SHAO Q, et al. Majie cataplasm alleviates asthma by regulating Th1/Th2/Treg/Th17 balance[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2024, 185(9): 900-909.

[6] ZHAO J, WANG Y, WANG H. Amygdalin alleviates airway inflammation and remodeling in asthma mice: Involvement of TGF- β_1 /Smads signaling pathway[J]. *Discov Med*, 2025, 37(197): 1096-1104.

[7] CHEN L, FENG J, WANG G, et al. Therapeutic potential of platycodin D in allergic asthma through anti-inflammatory and anti-remodeling effects[J]. *Phytomedicine*, 2025, 142: 156728.

[8] 吴桐,赵思超,白敏,等. 复方升降平喘止咳丸通过调控PI3K/Akt/NF κ B信号通路抑制BA大鼠细胞凋亡和炎症反应[J]. *海南医科大学学报*, 2026, doi: 10.13210/j.cnki.jhmu.20250916.001.

WU T, ZHAO S C, BAI M, et al. Compound Shengjiang Pingchuan Zhike pill inhibits cell apoptosis and inflammatory response in BA rats by regulating the PI3K/Akt/NF κ B signaling pathway[J]. *J Hainan Med Univ*, 2026, doi: 10.13210/j.cnki.jhmu.20250916.001.

[9] SAAOUD F, LU Y, XU K, et al. Protein-rich foods, sea foods, and gut microbiota amplify immune responses in chronic diseases and cancers-Targeting PERK as a novel therapeutic strategy for chronic inflammatory diseases, neurodegenerative disorders, and cancer[J]. *Pharmacol Ther*, 2024, 255: 108604.

[10] PERIZ M, PERIZ F J, RODRIGUEZ M J, et al. Development and characterization of an allergic asthma rat model for interventional studies[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 3841.

[11] 高庆和,付建华,刘胜京,等. 归黄方调控NLRP3炎症小体介导细胞焦亡治疗慢性前列腺炎的机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2026, 32(2): 108-116.

GAO QH, FU JH, LIU SJ, et al. Mechanism of Guihuang formula in treating chronic prostatitis by regulating NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2026, 32(2): 108-116.

[12] 魏娜,郭崇元,白敏,等. 参芪抑瘤方含药血清对胃癌细胞AGS细胞周期及Wnt/ β -catenin通路的影响[J]. *中医杂志*, 2025, 66(04): 399-406.

WEI N, GUO C Y, BAI M, et al. Effects of serum containing Shenqi Yiliu recipe on cell cycle and Wnt/ β -catenin pathway of gastric cancer AGS cells[J]. *J Tradit Chin Med*, 2025, 66(4): 399-406.

[13] LI W, ZHANG Y, CAO Y, et al. Protective effects and regulatory mechanisms of platycodin D against LPS-induced inflammatory injury in BEAS-2B cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 139: 112782.

- [14] 吴桐,何腾飞,王成娟,等. 基于蛋白质组学探讨升降平喘止咳丸干预OVA诱导支气管哮喘大鼠的作用机制[J]. 中国中药杂志,2025,50(22):6461-6469.
WU T, HE T F, WANG C J, et al. Mechanism of Shengjiang Pingchuan Zhike pill in intervention of OVA-induced bronchial asthma in rats based on proteomics[J]. Chin J Chin Mater Med, 2025, 50(22): 6461-6469.
- [15] 李瑞竹,刘奕萱,黄涛,等. 黄涛教授“胸八针”临床经验撷萃[J]. 时珍国医国药,2026,37(8):1498-1503.
LI R Z, LIU Y X, HUANG T, et al. Clinical experience of professor HUANG Tao's "chest eight acupoints"[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2026, 37(8): 1498-1503.
- [16] 苏小璞,唐薇,叶超,等. 基于TGF- β_1 /Smad3信号通路探讨益气温阳护卫汤防治支气管哮喘的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2024,30(19):98-105.
SU X P, TANG W, YE C, et al. Mechanism of Yiqi Wenyang Huwei decoction in prevention and treatment of bronchial asthma based on TGF- β_1 /Smad3 signaling pathway[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2024, 30(19): 98-105.
- [17] LI Z, YUAN M, ZHANG J, et al. Piezo-electrons induced endoplasmic reticulum protein misfolding to enhance immune checkpoint blockade cancer therapy[J]. Anal Cell Pathol, 2025, 35(38):2424874.
- [18] HAO Y, WANG W, ZHANG L, et al. Pyroptosis in asthma: Inflammatory phenotypes, immune and non-immune cells, and novel treatment approaches[J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1452845.
- [19] LIU L, ZHOU L, WANG L L, et al. Programmed cell death in asthma: Apoptosis, autophagy, pyroptosis, ferroptosis, and necroptosis[J]. J Inflamm Res, 2023:2727-2754.
- [20] SCHILPP C, LOCHBAUM R, BRAUBACH P, et al. TGF- β_1 increases permeability of ciliated airway epithelia via redistribution of claudin 3 from tight junction into cell nuclei[J]. Pflugers Arch, 2021, 473(2):287-311.
- [21] WANG H, ZHANG L, SHANG Y. DEPTOR attenuates asthma progression by suppressing endoplasmic reticulum stress through SOD1[J]. Biol Direct, 2024, 19(1):114.
- [22] SINGH R, KAUR N, CHOUBEY V, et al. Endoplasmic reticulum stress and its role in various neurodegenerative diseases[J]. Brain Res, 2024, 1826:148742.
- [23] HAN M, FU J, SUONAN Z, et al. Ershiwuwei Shanhu pills alleviates cerebral ischemia injury in rats by regulating endoplasmic reticulum stress through GRP78/XBP1/CHOP pathway[J]. Phytomedicine, 2025:156969.
- [24] CHITALE A, VERMA S, MUGALE M N. Autophagy, apoptosis, and inflammatory mechanisms in chronic respiratory diseases: Interplay in special reference to mitochondrial-ER stress axis[J]. Cell Biochem Funct, 2026, 44(4):e70203.
- [25] SUN Z, HE W, MENG H, et al. Endoplasmic reticulum stress in acute lung injury and pulmonary fibrosis[J]. FASEB J, 2024, 38(23):e70232.
- [26] HUANG L, LIU Q, ZHOU T, et al. Deficiency of β -arrestin2 alleviates apoptosis through GRP78/ATF6/CHOP signaling pathway in primary Sjögren's syndrome [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 101:108281.
- [27] SUN J, WEI S, ZHANG Y, et al. Protective effects of astragalus polysaccharide on sepsis-induced acute kidney injury[J]. Anal Cell Pathol, 2021, 2021(1):7178253.
- [28] MARTINOTTI S, RANZATO E, BURLANDO B. (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces GRP78 accumulation in the ER and shifts mesothelioma constitutive UPR into proapoptotic ER stress[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(10):7082-7090.
- [29] HUANG J, WAN L, LU H, et al. High expression of active ATF6 aggravates endoplasmic reticulum stress-induced vascular endothelial cell apoptosis through the mitochondrial apoptotic pathway[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(5):6483-6489.
- [30] 王浩,闫亚男,王杰鹏,等. 络通纤溶饮通过抑制PERK/eIF2 α 介导的内质网应激改善特发性肺纤维化大鼠肺功能[J]. 中国病理生理杂志,2025,41(8):1523-1531.
WANG H, YAN Y N, WANG J P, et al. Luotong Xianrong Yin improves lung function in rats with idiopathic pulmonary fibrosis by inhibiting PERK/eIF2 α -mediated endoplasmic reticulum stress [J]. Chin J Pathophysiol, 2025, 41(8): 1523-1531.
- [31] 何鹏,谭卫,朱妍洁,等. 补肺汤对COPD小鼠肺组织细胞凋亡及炎症因子的影响[J]. 时珍国医国药,2025,36(19):3601-3606.
HE P, TAN W, ZHU Y J, et al. Effects of Bufe decoction on apoptosis and inflammatory factors in lung tissue of COPD mice [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2025, 36(19): 3601-3606.

[责任编辑 王鑫]