

基于整合药理学模式探究小青龙汤防治高原肺水肿的作用机制

王蓉蓉¹, 王楚楚¹, 徐琦¹, 简芹², 林俊芝², 李如利^{2,3*}, 郑川^{2,4*}

(1. 成都中医药大学基础医学院, 成都 611137;

2. 成都中医药大学附属医院, 代谢与慢病中医药防治四川省重点实验室, 成都 610072;

3. 成都中医药大学附属医院中西医结合高原医学中心, 成都 610072;

4. 成都中医药大学天府中医药创新港, 四川省天然小分子
药物工程技术研究中心, 成都 611930)

[摘要] **目的:**利用网络药理学、分子对接和分子动力学模拟来探究小青龙汤(XQL)防治高原肺水肿(HAPE)的潜在作用机制,并通过体内动物模型进行实验验证。**方法:**该研究首先从BATMAN-TCM、GeneCards和在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)收集XQL的活性成分、药物靶点及HAPE相关靶点。利用交集靶点构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,并借助Cytoscape软件对核心靶点进行筛选和可视化展示。通过基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)功能富集对交集靶点进行功能注释和通路分析。采用AutoDock和GROMACS软件评估活性成分与关键靶点的结合能力。在实验验证部分,建立低压低氧(模拟6 000 m海拔,持续48 h)诱导小鼠HAPE模型。通过以下方法评估防治效果:苏木素-伊红(HE)染色、肺组织含水量、肺组织湿/干质量比、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测基因表达水平,以及免疫组化和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测关键蛋白表达情况。**结果:**网络药理学分析共获得XQL活性成分355个,作用靶点2 142个,HAPE相关靶点716个,二者交集靶点236个,筛选出白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子(TNF)、蛋白激酶B1(Akt1)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)等关键核心靶点。共同靶点的GO分析结果共涉及生物过程(BP)738种,细胞组成(CC)72种,分子功能(MF)135种,KEGG分析有效地富集到磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/Akt和HIF-1 α 2条重要信号通路。分子对接和分子动力学模拟结果表明,筛选的活性成分与关键靶点结合力较好。在低压低氧(6 000 m, 48 h)诱导的HAPE模型中,模型组小鼠肺含水量、肺组织湿/干质量比及病理损伤评分显著升高($P<0.01$),肺泡内和肺泡间质可见大量红细胞渗出,炎性细胞显著增加,肺泡间隔明显增宽,肺泡之间相互融合。XQL给药组显著改善上述病理变化($P<0.01$)。炎症因子表达结果表明,相比正常组,模型组小鼠肺部组织中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 表达均显著上调($P<0.01$);而与模型组比较,XQL给药组中的炎症因子的表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。关键通路的相关基因PI3K、Akt1、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、HIF-1 α 的mRNA表达在模型组显著增加($P<0.01$),XQL给药后呈浓度依赖性降低($P<0.05$, $P<0.01$)。免疫组化和Western blot分析肺部组织中关键蛋白PI3K、磷酸化(p)-PI3K、Akt1、p-Akt1、mTOR、p-mTOR、HIF-1 α 的表达水平,与正常组比较,模型组中关键蛋白表达明显增加($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,XQL给药组中关键蛋白的表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论:**小青龙汤能够减轻肺部炎症并改善高原肺水肿,其机制可能与调控PI3K/Akt/mTOR和HIF-1 α 通路的表达有关,该研究为中医药XQL治疗HAPE提供了新的思路和理论依据。

[关键词] 小青龙汤; 高原肺水肿; 磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR); 缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α); 整合药理学; 中医药

[中图分类号] R256.1;R285;R289 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2026)08-0137-12

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251119

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20250928.1532.002>

[网络出版日期] 2025-09-29 10:45:07 [增强出版附件] 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>



[收稿日期] 2025-07-08

[基金项目] 国家资助博士后研究人员计划项目(GZC20252624);中国博士后科学基金项目(2025MD774042);四川省博士后特别资助项目(TB2024084);成都中医药大学附属医院院基金项目(2025NSFCPY003, 2025NSFCPY051);四川省中医药管理局科研专项(25MSZX099)

[第一作者] 王蓉蓉, 硕士, 从事中医药防治高原性疾病的研究, E-mail: wangrongrong@stu.edutcm.edu.cn

[通信作者] * 郑川, 博士, 教授, 从事中医药防治高原性疾病的研究, E-mail: zhengchuan@edutcm.edu.cn;

* 李如利, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 从事中医药防治高原性疾病的研究, E-mail: 408760989@qq.com

Exploring Mechanism of Xiaoqinglongtang Against High Altitude Pulmonary Edema Based on Integrative Pharmacology Model

WANG Rongrong¹, WANG Chuchu¹, XU Qi¹, JIAN Qin², LIN Junzhi², LI Ruli^{2,3*}, ZHENG Chuan^{2,4*}

(1. School of Basic Medicine Sciences, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China; 2. TCM Prevention and Treatment of Metabolic and Chronic Diseases Key Laboratory of Sichuan Province, Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China;

3. High-altitude Medicine Center of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China;

4. Sichuan Provincial Engineering Technology Research Center of Natural Small Molecule Drug, Tianfu TCM Innovation Harbour, Chengdu University of TCM, Chengdu 611930, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the potential mechanism of Xiaoqinglongtang(XQL) in the prevention and treatment of high altitude pulmonary edema(HAPE) by network pharmacology, molecular docking, and molecular dynamics simulation, and to verify it by *in vivo* animal model. **Methods:** In this study, the active ingredients, drug targets, and HAPE-related targets of XQL were collected from BATMAN-TCM, GeneCards, and Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) databases. The protein-protein interaction(PPI) network was constructed by using intersection targets, and the core targets were screened and visualized by Cytoscape software. Functional annotation and pathway analysis of the intersection targets were performed by gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) functional enrichment. AutoDock and GROMACS were used to evaluate the binding ability of active ingredients to key targets. In the experimental verification part, a mouse model of HAPE induced by hypobaric hypoxia(simulated 6 000 m altitude for 48 h) was established. The control effect was evaluated by hematoxylin-eosin (HE) staining, lung tissue water content, lung tissue wet/dry weight ratio, real-time quantitative polymerase chain reaction(Real-time PCR) detection of gene expression levels, and immunohistochemistry and Western blot detection of key protein expression. **Results:** A total of 355 active ingredients of XQL, 2 142 targets, 716 HAPE-related targets, and 236 intersection targets were obtained by network pharmacology analysis. Key core targets such as interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF), protein kinase B1 (Akt1), and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) were screened. The results of GO analysis of common targets involved 738 biological processes (BP), 72 cellular components (CC), and 135 molecular functions (MF). KEGG analysis effectively enriched two important signaling pathways: Phosphoinositol 3-kinase (PI3K)/Akt and HIF-1 α . The results of molecular docking and molecular dynamics simulation showed that the screened active ingredients had good binding ability with key targets. In the HAPE model induced by hypobaric hypoxia(6 000 m, 48 h), the lung tissue water content, lung tissue wet/dry weight ratio, and pathological injury score of the model group were significantly increased ($P<0.01$), accompanied by exudation of a large number of red blood cells in the alveoli and alveolar interstitium, a significant increase in inflammatory cells, a significant widening of the alveolar septum, and mutual fusion between the alveoli. The XQL administration group significantly improved the above pathological changes($P<0.01$). The results of inflammatory factor expression showed that compared with the control group, the model group showed significantly up-regulated expression of TNF- α , IL-6, and IL-1 β in the lung tissue($P<0.01$). Compared with the model group, the XQL administration group had significantly decreased expression of inflammatory factors($P<0.05$, $P<0.01$). The mRNA expression of key pathway related genes PI3K, Akt1, mammalian target of rapamycin(mTOR), and HIF-1 α was significantly increased in the model group ($P<0.01$), and decreased in a concentration-dependent manner after XQL administration($P<0.05$, $P<0.01$). The expression levels of key proteins PI3K, phosphorylation(p)-PI3K, Akt1, p-Akt1, mTOR, p-mTOR, and HIF-1 α in lung tissue were analyzed by immunohistochemistry and Western blot. Compared with the blank group, the model group showed increased expression of key proteins ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, the XQL administration group exhibited decreased expression of key proteins ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** XQL can reduce lung inflammation and improve HAPE. The mechanism may be related to the regulation of PI3K/Akt/mTOR and HIF-1 α pathways. This study provides a new idea and a theoretical basis for the treatment of HAPE with XQL.

[Keywords] Xiaoqinglongtang; high altitude pulmonary edema; phosphoinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin(mTOR); hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α); integrative pharmacology; traditional Chinese medicine

高原肺水肿(HAPE)是一种急性高原反应,多发生于快速进入海拔2 500 m以上地区后的24~72 h

内。初期活动时呼吸困难加重、运动能力下降、干咳,晚期轻微活动或休息时伴紫绀、咳粉红色泡沫样痰,呼吸窘迫^[1]。流行病学研究表明,HAPE发病率与海拔显著相关(2 500 m:0.01%;3 600 m:1.9%;4 500 m:2.5%~5%)^[2]。HAPE发病快、死亡率高,未及时治疗死亡率达50%^[3],2 d内快速升至4 500 m以上人群复发率达60%^[4-5]。西南地区以四川盆地为中心,海拔落差大,且随着西部大开发战略和“一带一路”倡议的深入推进,越来越多的平原居民在短时间内进入高海拔地区旅游、工作,HAPE已成为人民健康的突出问题。目前对于HAPE的发病原因难以用单一机制解释,尚无规范的治疗方案,根据临床症状常选择氧疗、硝苯地平、氨茶碱、地塞米松等方法来缓解症状^[6],但存在不良反应明显、半衰期短和不易长期使用等局限性^[7]。因此,迫切需要研发新的药物。

HAPE虽无中医古籍直接记载,但其临床表现与“痰饮”“喘促”等病证高度相似。中医认为,HAPE多由清气不足、宗气匮乏,或外寒侵袭、阳气损伤,导致肺脾气虚、水液代谢失常所致,治疗多应用具有辛温散寒、温化水饮等功效的中药^[8]。小青龙汤(XQL)来源于《伤寒论》,由麻黄、白芍、细辛、干姜、桂枝、半夏、五味子、炙甘草8味中药组成,具有解表散寒、温肺化饮之功效。现代研究表明,炎症反应是高原缺氧导致肺损伤的关键机制之一^[9-10]。高原急性暴露人群的血浆学检测显示,促炎因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6等水平显著升高,而抗炎因子IL-10则明显降低^[11]。多项研究证实,XQL能显著降低TNF- α 、IL-6等炎症因子水平,改善肺组织炎性浸润^[12-13]。临床研究显示,XQL加减防治高原反应及高原肺水肿的120例患者中,疗效差异具有显著性^[14]。同时,本研究采用预防性给药方案,与中医学治未病思想中“未病先防”的医学理念高度契合。综上所述,现有研究虽然初步表明XQL对HAPE具有潜在防治价值,但其具体的作用靶点和分子机制,特别是对相关信号通路的调控作用,仍有待通过系统的实验研究加以阐明。

网络药理学作为一门新兴交叉学科,为传统中医药的现代研究提供了创新思路。该学科采用系统生物学方法,通过建立“成分-靶点-通路”的相互作用网络,系统揭示药物对疾病网络的整体调控机制,这与中医药整体调节的理念相吻合。借助计算机模拟技术,能够精确预测有效成分与生物分子的

相互作用模式,从而为阐明中药的作用机制提供分子水平的科学依据^[15-16]。

本研究采用整合药理学模式,结合网络药理学、分子对接、分子动力学模拟和动物实验验证,系统探究XQL防治HAPE的作用机制。通过筛选关键靶点和信号通路,旨在阐明其分子作用机制,为HAPE的中医药防治提供新的理论依据。

1 材料

1.1 动物 6~8周龄SPF级雄性C57BL/6小鼠24只,体质量(18 \pm 2)g,购自成都药康生物科技有限公司,合格证号SCXK(川)2020-034。动物实验开展场所为成都中医药大学实验动物中心,屏障环境,实验室温度20~26℃,相对湿度40%~70%,12 h明暗光照,自由进食饮水。

1.2 伦理 本研究遵循《实验动物的护理和使用指南》,并按照《国际实验动物伦理使用指南》进行。实验动物的使用已获成都中医药大学伦理委员会批准(批准号2025030)。

1.3 药物 XQL由麻黄9 g、白芍9 g、细辛3 g、干姜6 g、桂枝9 g、法半夏9 g、五味子9 g、炙甘草6 g组成(产地分别为内蒙古、安徽、辽宁、四川、广西、甘肃、黑龙江、甘肃,批号分别为240601、2407116、240419、2407162、240701、2406097、240501、240402),均购自成都中医药大学附属医院中药房,经成都中医药大学林俊芝副教授鉴定,均符合2020年版《中华人民共和国药典》的相关项下要求。XQL剂量参考《方剂学》第十版现代用量。

1.4 试剂 SteadyPure快速RNA提取试剂盒、EvoM-MLV反转录预混型试剂盒、SYBR Green Pro Taq HS预混型qPCR试剂盒(艾科瑞生物,货号分别为AG21023、AG11728、AG11718);磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)抗体(美国Affinity生物公司,货号AF6242);蛋白激酶B1(Akt1)抗体(爱博泰克生物科技有限公司,货号A18675);磷酸化(p)-PI3K抗体、p-Akt1抗体、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)抗体、p-mTOR抗体、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)抗体(艾比玛特医药科技有限公司,货号分别为T40116F、T40067、T55306、T56571、TA1009);内参 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号81115-1-RR);封闭山羊血清(北京索莱宝科技有限公司,货号SL038);聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)快速制备试剂盒(7.5%,上海雅酶生物医药科技有限公司,货号PG111);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔二抗、蛋白定量法(BCA)蛋白

浓度测定试剂盒(增强型)(上海碧云天生物技术有限公司,货号分别为A0208、P0010);4%多聚甲醛(通用型组织固定液)(安徽白鲨生物科技有限公司,货号BL539A),伊红染液(武汉博美生物技术有限公司,货号YE2080),苏木素染液(武汉赛维尔生物技术有限公司,货号G1004)。

1.5 仪器 FLYDW C50-II C型低压低氧动物试验舱(贵州风雷航空军械有限责任公司);FD-250201GX1型冷冻干燥机(杭州富睿捷科技有限公司);DW-86L416G型-80℃超低温冰箱(中国青岛海尔股份公司);HP300型自动组织脱水机(深圳市达科为生物技术股份有限公司);CR-603型切片机(金华克拉泰仪器有限公司);BM450型包埋机(常州派斯杰医疗设备有限公司);RM 2135型石蜡切片机(德国Leica公司);JY-BMB型石蜡包埋机(湖北锦源医疗科技有限公司);Dako CoverStainer型组织染色机(丹麦丹科私人有限公司);SQS-12P型玻片扫描影像系统(深圳市生强科技有限公司);K5800C型超微量分光光度仪(北京凯奥科技发展有限公司);FDQ-96A型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(杭州博日科技股份有限公司);TGL-1850型高速冷冻离心机(四川蜀科仪器有限公司);Mini PROTEANWTetra Cell型电泳仪和转膜仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 XQL活性成分筛选及作用靶点预测 研究采用BATMAN-TCM数据库,以“MA HUANG、BAI SHAO、XI XIN、GAN JIANG、GUI ZHI、BAN XIA、WU WEI ZI、GAN CAO”为关键词输入,设置“药物-靶标”间相似性得分Score cutoff \geq 20, $P < 0.05$,以获得XQL的活性成分和靶点信息^[17]。任何重复的目标都被移除,最后得到所有的药物作用靶点。

2.2 HAPE疾病靶点的获取 以“High Altitude Pulmonary Edema”为关键词,在在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)和GeneCards中进行检索,获取与HAPE相关的靶点。对2个数据库获得的靶点进行合并,删除重复值,得到HAPE的疾病靶点。

2.3 XQL防治HAPE潜在靶点的获取 运用Venny 2.1.0在线分析平台对XQL的药物作用靶点与HAPE的疾病靶点进行交集靶点分析,作为XQL防治HAPE的潜在关键靶点。

2.4 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建及核心靶点分析 将药物-疾病潜在靶点信息上传至STRING数据库,将研究物种限定为“Homo

sapiens”,并设置置信度为“medium confidence (0.400)”,删除游离靶点,获得PPI网络图。将蛋白互作网络文件TSV导入Cytoscape 3.9.1软件筛选关键靶点并进行可视化处理。利用Cytoscape软件中的插件CentiScape 2.2构建了无向网络,用于分析介数、紧密度和中心度值(Degree)的拓扑参数^[18]。该插件自动生成3个参数的阈值,筛选同时满足介数、紧密度、中心度大于分析阈值的靶点,再按Degree值降序排列,选取前10个作为本研究的核心靶点^[19]。

2.5 中药-活性成分-靶点网络的构建 将中药及其对应的活性成分和交集靶点导入Cytoscape 3.9.1中,出现2次或以上的活性成分单独列出,构建中药-活性成分-靶点网络。根据Degree值筛选出前10的活性成分,作为XQL的关键成分。

2.6 基因本体(GO)富集和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 将XQL防治HAPE的潜在靶点导入DAVID数据库,进行GO功能注释和KEGG通路富集分析,物种设置为“Homo sapiens”,以 $P < 0.05$ 为筛选条件,根据富集通路所涉及的基因个数(count)进行排序。

2.7 “关键成分-靶点-通路”的构建 将筛选获取的XQL的关键成分、交集靶点及KEGG富集通路分析排名前10的通路等数据导入Cytoscape 3.9.1软件构建“关键成分-靶点-通路”网络。

2.8 分子对接 本研究采用AutoDock Vina 1.2.3进行蛋白-小分子盲对接^[20-24]。选取结合自由能绝对值最高的最佳构象,通过PyMOL 2.5可视化:加载复合物结构后生成静电势表面,测量配体与关键残基的氢键(距离阈值3.5 Å)及疏水相互作用。

2.9 分子动力学模拟 本研究中,采用了GROMACS 2022.4软件对分子对接得到的蛋白-配体复合物进行了全原子分子动力学模拟分析^[24]。

2.10 药物制备 XQL包括麻黄、桂枝、细辛、干姜、半夏、五味子、白芍、炙甘草,上述药物全部按照质量比3:3:1:2:3:3:3:2进行精准称量,共计60 g,加入上述中药混合后质量和10倍质量纯水,浸泡1 h后,煮沸40 min,过滤得到滤液和药渣。再向药渣中加入所有中药混合质量和6倍质量的纯水,直接煮沸40 min,过滤得到2次滤液和滤渣。然后将上述步骤制得的2种滤液合并,浓缩至生药量0.2 g·mL⁻¹的药物水煎液。将水煎液分装至5 mL离心管中,放置在-80℃下冷冻24 h,放于冻干机中72 h后拿出,冻干粉密封后放至常温中保存。

2.11 动物分组和造模给药 基于课题组前期实验研究,发现按人等效剂量0.5倍设置的XQL浓度对HAPE疗效不显著,故本次实验取消该剂量组。前期实验表明,C57BL/6小鼠在低压低氧舱(模拟海拔6 000 m)中暴露24、48 h时,48 h的建模成功率最高,因此本研究选择48 h作为建模时长。实验前,所有小鼠在成都地区(平均海拔500 m)适应性喂养5 d。将24只C57BL/6小鼠随机分为正常组,模型组(0.9%氯化钠注射液),XQL低(7.8 g·kg⁻¹)、高剂量组(15.6 g·kg⁻¹)。剂量设置依据体表面积换算的人鼠等效剂量(7.8 g·kg⁻¹)为低剂量,高剂量设为2倍等效剂量^[25]。20 g小鼠的每日灌胃量为0.2 mL。除正常组外,其余各组提前5 d灌胃给药,末次给药1 h后将小鼠置于低氧舱,以20 m·s⁻¹速率梯度上升至3 000 m和4 500 m后(在这2个海拔各维持30 min),最终到达6 000 m(氧分压9.6 kPa,湿度60%,温度20 °C)并维持48 h。实验结束后,使用0.5%戊巴比妥钠麻醉小鼠,收集标本,后采用颈椎脱臼法处死。由于HAPE是一种复杂的多因素疾病,其发病机制涉及多种病理生理过程,临床治疗多采用综合对症治疗^[26],尚无单一药物被确立为标准阳性对照,为避免阳性药选择的片面性,本研究优先聚焦于XQL本身防治HAPE的药效学评价,故未设置阳性药。

2.12 肺组织病理学检查和损伤评分 取小鼠左侧肺叶组织,在4%多聚甲醛固定液中固定48 h,随后经流水充分冲洗,依次进行乙醇梯度脱水、石蜡包埋处理,制备成厚度为5 μm的石蜡切片。切片经苏木素-伊红(HE)染色后,以中性树胶封片,置于光学显微镜下观察肺组织病理结构变化。采用5分制评分标准评估炎症细胞浸润程度:浸润面积为0,0分;0<浸润面积<12.5%,1分;12.5%≤浸润面积<25%,2分;25%≤浸润面积<50%,3分;50%≤浸润面积<75%,4分;浸润面积>75%,5分^[27]。每张切片随机选取5个视野进行评分,最终取平均值作为该样本的病理评分结果。

2.13 小鼠肺含水量和肺组织湿/干重比 剪取小鼠右肺上叶组织,用滤纸小心吸除其表面附着的水分,随后置于精密分析天平上称量,记录所得质量为肺组织湿质量(标记为W);将称量后的肺组织转移至60 °C恒温干燥箱中,持续烘烤至质量恒定,再次使用分析天平称取干燥后组织质量,记录为干肺质量(标记为D),小鼠肺含水量和肺组织湿/干质量比 $Q=(W-D)/W\times 100\%$ 。

2.14 Real-time PCR分析肺部组织中炎症因子TNF-α、IL-6和IL-1β和通路靶点PI3K、Akt1、mTOR、HIF-1α的mRNA表达 使用SteadyPure快速RNA提取试剂盒按照说明书提取总RNA。提取过程中,首先称取肺部组织20 mg,加入Buffer QLS 350 μL,使用组织消融仪裂解3~5 s,使其完全澄清。然后通过离心、加入无水乙醇、无酶水等步骤纯化RNA。提取后的RNA样品用NanoDrop分光光度计测定浓度和纯度,确保A₂₆₀/A₂₈₀值在1.8~2.0。将提取的总RNA进行逆转录反应,使用Evo M-MLV反转录预混型试剂盒生成cDNA。使用SYBR Green Pro Taq HS预混型qPCR试剂盒进行Real-time PCR。所有用于PCR扩增的引物均采用NCBI引物设计,购自北京擎科生物科技股份有限公司。引物序列见表1。反应体系为SybrGreen qPCR Master Mix 10 μL,dH₂O 5 μL,cDNA 4 μL,上下游引物各0.5 μL。反应条件为95 °C预变性3 min;95 °C 5 s,60 °C 30 s,循环40次。同时测定甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因的表达作为内参对照。采用2^{-ΔΔC_t}法测定相对基因表达量。所有样本重复运行3次。经Real-time PCR扩增后,通过计算机分析(NCBI引物BLAST)和熔融曲线分析,验证了各引物对的特异性。

2.15 免疫组化检测肺部组织中相关通路蛋白的表

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
IL-1β	上游 AGTTGACGGACCCAAAAGAT	100
	下游 GTTGATGTGCTGCTGCGAGA	
IL-6	上游 TGGGACTGATGCTGGTGACAAC	117
	下游 AGCCTCCGACTTGTGAAGTGGT	
TNF-α	上游 TGGAAGTGGCAGAAGAGGCACT	78
	下游 AGAGGCTGAGACATAGGCACCG	
PI3K	上游 ACACCACGGTTTGGACTATGG	140
	下游 GGCTACAGTAGTGGGCTTGG	
Akt1	上游 ATGAACGACGTAGCCATTGTG	116
	下游 TTGTAGCCAATAAAGGTGCCAT	
mTOR	上游 ACCGGCACACATTTGAAGAAG	110
	下游 CTCGTTGAGGATCAGCAAGG	
HIF-1α	上游 ACCTTCATCGAAACTCCAAAG	228
	下游 CTGTTAGGCTGGGAAAAGTTAGG	
GAPDH	上游 AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	123
	下游 TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	

达水平 石蜡包埋的组织切片在60℃下烘烤,脱蜡并重新水化。使用pH 6.0的柠檬酸缓冲液,在95℃下进行20 min的抗原修复。随后,用3%的过氧化氢阻断内源性过氧化物酶活性。抗原修复再次使用pH 6.0的柠檬酸缓冲液,在95℃下进行20 min,之后进行阻断处理。用10%的山羊血清封闭非特异性结合位点后,切片在4℃下与p-PI3K、PI3K、p-Akt1、Akt1、p-mTOR、mTOR、HIF-1 α (1:200)孵育过夜。次日,加入HRP标记的二抗(1:500),并在37℃下孵育1 h。免疫反应通过二氨基联苯胺(DAB)显色,细胞核则用苏木素复染。最后,切片经过脱水、透明化处理,并用中性树胶封片。图像通过玻片扫描影像系统获得,Image J软件测定积分光密度(IOD)与阳性表达面积(Area),计算平均光密度值(MOD):MOD=IOD/Area。

2.16 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肺部组织中相关通路蛋白表达水平 称取小鼠肺部组织20 mg,加入放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液(含蛋白酶/磷酸酶抑制剂)冰上匀浆裂解,4℃12 000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径8.6 cm)后取上清,BCA法测定蛋白浓度。按每孔35 μ g蛋白量加入上样缓冲液,100℃变性10 min后上样。配制7.5%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶,上样蛋白经电泳分离,随后湿转法将蛋白转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。5%脱脂牛奶室温封闭1 h,加入p-PI3K、PI3K、p-Akt1、Akt1、p-mTOR、mTOR、HIF-1 α (1:1 000)及 β -actin(1:10 000)作为一抗,4℃孵育过夜,TBST洗膜3次后加入对应HRP标记二抗(1:5 000),室温孵育1 h,再次洗涤后增强化学发光法(ECL)化学发光显影,Image J软件分析条带灰度值,以 β -actin为内参计算目标蛋白相对表达量。

2.17 统计学方法 实验数据采用GraphPad Prism 9.5.0进行分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析(One-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 XQL的药物活性成分及作用靶点 通过BATMAN-TCM数据库检索,去除无结构的化合物信息后,XQL 8味药获得的活性成分为麻黄105个、白芍18个、细辛64个、干姜38个、桂枝15个、半夏25个、五味子69个和甘草75个,活性成分和所对应的靶点去除重复项后,共获得355个活性成分和2 142个作用靶点。

3.2 HAPE的疾病靶点 以“High Altitude Pulmonary Edema”为关键词,在OMIM数据库获得242个HAPE相关靶点,在GeneCards数据库获得622个疾病靶点,对2个数据合并,删除重复值,共得到716个与HAPE相关的疾病靶点。

3.3 XLQ防治HAPE的潜在靶点 运用Venny 2.1.0在线分析平台对XQL的2 142个药物作用靶点与HAPE的716个疾病相关靶点进行交集分析,共获得236个共同作用靶点,为XQL防治HAPE的潜在关键靶点。

3.4 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建及筛选核心靶点 将236个共同靶点导入STING数据库,构建PPI网络。将结果导入Cytoscape 3.9.1,删除游离靶点后,该PPI网络包含232个节点和5 360条边,按照Degree值进行排序。运用CentiScape 2.2插件,根据介数 $>227.146 5$ 、紧密度 $>0.002 2$ 和Degree >46.207 ,得到55个核心靶点,并且按照Degree进行排序,选取Degree值前10的靶点:IL-6、ALB、TNF、GAPDH、INS、Akt1、IL-1 β 、TP53、HIF-1 α 和STAT3,作为本研究的核心靶点。见增强出版附加材料。

3.5 中药-活性成分-靶点网络的构建 整理中药-活性成分-靶点数据,将其导入Cytoscape 3.9.1中,构建中药-活性成分-靶点网络。根据Degree值筛选出前10的活性成分为(E)-9-异丙基-6-甲基-5,9-癸二烯-2-酮、麻黄碱、十六烷酸、十五烷酸、 α -柠檬烯、D-柠檬烯、 β -二氢紫罗兰酮、胡椒酮、(S)-(+)-香芹酮、L-香芹酮,作为XQL的关键成分。见增强出版附加材料。

3.6 GO富集和KEGG通路富集分析 将236个交集靶点导入DAVID数据库,进行GO和KEGG生物信息学分析。结果显示,经过GO分析,共富集到生物过程(BP)738种,细胞组成(CC)72种,分子功能(MF)135种,其中BP主要包括RNA聚合酶II对转录的正调控作用、基因表达的正调控、信号转导、炎症反应、正向调控DNA引导的转录、RNA聚合酶II对转录的负调控、细胞群体增殖的正向调控、缺氧反应、基因表达的负调控、凋亡过程的负调控。CC主要包括质膜、细胞质、细胞溶质、胞外区、细胞外空间、核质、细胞外分泌体、线粒体、细胞表面、含蛋白质的复合物。MF主要包括蛋白质结合、相同的蛋白质结合、金属离子结合、蛋白质同源二聚化活性、DNA结合、酶结合、信号受体结合、细胞因子活性、DNA结合转录因子活性、血红素结合。见增强

出版附加材料。

KEGG 通路富集分析共富集到 172 条通路, 排名前 10 的通路为癌症通路、代谢途径、流体剪切力与动脉粥样硬化、化学致癌-受体激活、HIF-1 信号通路、脂质和动脉粥样硬化、激素信号传导、PI3K/Akt 通路、神经退行性变的通路-多种疾病、糖尿病心脏病, 提示 XQL 防治 HAPE 的潜在通路与 HIF-1 信号通路、PI3K/Akt 信号通路、血脂、肿瘤途径密切相关。见增强出版附加材料。

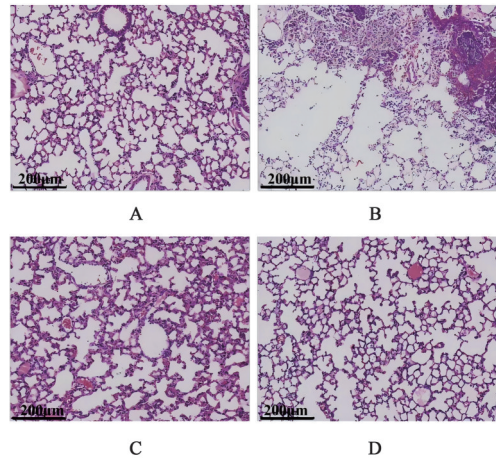
3.7 “关键成分-靶点-通路”的构建 将 XQL 的关键成分、交集靶点及 KEGG 富集通路分析排名前 10 的通路等数据导入 Cytoscape 3.9.1 软件构建“药物-成分-靶点-通路-疾病”网络。见增强出版附加材料。

3.8 中药活性成分与核心靶点的结合作用 将 Akt1 (PDB: 3QKL)、PI3K (PDB: 4JPS)、HIF-1 α (PDB: 6GFX)、mTOR (PDB: 7PED) 作为对接靶点, 选取活性成分进行分子对接, 得到靶点与成分的结合能。一般认为, 结合能在 $-5.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($1 \text{ cal}\approx 4.186 \text{ J}$) 以下的区域被视为潜在靶点, 表明成分与靶点具有良好的结合活性^[28-29]。结果表明, 10 个关键成分与 4 个靶点结合良好, 其中 Akt1 与 β -二氢紫罗兰酮和 (S)-(+)-香芹酮的结合能最低, PI3K 与 (S)-(+)-香芹酮、L-香芹酮结合能最低, HIF-1 α 与 (E)-9-异丙基-6-甲基-5, 9-癸二烯-2-酮和 β -二氢紫罗兰酮结合能最低, mTOR 和 (S)-(+)-香芹酮、L-香芹酮的结合能最低, 对上述结果进行可视化。见增强出版附加材料。

通过 GROMACS 软件对 8 种复合物体系进行了 100 ns 的分子动力学模拟, 以探究其结构稳定性与动态特性, 并对前期分子对接结果进行验证。模拟结果显示, 所有复合物的 RMSD 在模拟时间内波动幅度较小, 表明其整体构象保持稳定。RMSF 分析进一步揭示关键功能区域的波动较小, 提示这些区域具有较高的结构刚性。Rg 分析表明各复合物在模拟过程中保持高度紧凑的空间构象, 证实了体系内部存在较强的分子间相互作用。SASA 分析显示各复合物的疏水核心区保持稳定, 同时 Hnum 分析证实了稳定的分子内氢键网络的形成。综合这些动力学参数, 本研究证实 8 种复合物体系均表现出优异的动力学稳定性, 为分子对接预测结果提供了可靠的依据。见增强出版附加材料。

3.9 XQL 对 HAPE 小鼠肺组织病理学变化的影响 正常组小鼠肺组织结构形态完整清晰, 肺泡间隔厚度正常, 肺泡间质未见炎性细胞浸润和充血; 模型

组小鼠肺组织结构明显受损, 出现大面积肺泡融合现象, 肺泡间隔明显增宽, 伴大量中性粒细胞和淋巴细胞浸润, 部分肺泡腔内可见中性粒细胞聚集和红细胞浸润; 与模型组比较, 各给药组小鼠肺组织损伤程度均有所减轻, 具体表现为肺泡间隔融合减少、炎性细胞浸润减轻或消失, 且肺泡腔内红细胞数量减少, 见图 1。进一步量化分析表明, 模型组小鼠肺损伤评分较正常组显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组小鼠肺损伤评分显著降低 ($P<0.01$)。见表 2。



注: A. 正常组; B. 模型组; C, D. XQL 低、高剂量组 (图 2、图 3 同)
图 1 XQL 对 HAPE 小鼠肺组织病理学变化的影响 (HE, $\times 100$)

Fig. 1 Effect of XQL on pathological changes of lung tissue in HAPE mice (HE, $\times 100$)

表 2 XQL 对 HAPE 小鼠肺损伤病理评分的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of XQL on pathological score of lung injury in HAPE mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	病理评分/分
正常组		0.00 \pm 0.00
模型组		4.29 \pm 0.16 ²⁾
XQL 低剂量组	7.8	3.66 \pm 0.04 ⁴⁾
XQL 高剂量组	15.6	3.28 \pm 0.07 ⁴⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与模型组比较³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ (表 3-表 6 同)

3.10 XQL 对 HAPE 小鼠模型的肺含水量和肺组织湿/干质量比 (W/D) 的影响 与正常组比较, 模型组小鼠的肺含水量及肺组织湿/干质量比显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, XQL 低、高剂量组小鼠肺含水量和肺组织湿/干质量比显著降低 ($P<0.01$)。见表 3。

3.11 XQL 对 HAPE 小鼠模型肺部组织中炎症因子及通路靶点 mRNA 表达的影响 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 是筛选的核心靶点, 也是 HAPE 发生发展过程中关键的炎症因子。结果显示, 与正常组比较, 模

表3 XQL对HAPE小鼠模型的肺含水量和肺组织湿/干质量比(W/D)的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of XQL on lung water content(Q) and lung wet/dry weight ratio(W/D) in HAPE mouse model ($\bar{x}\pm s, n=6$) %

组别	剂量/g·kg ⁻¹	含水量	W/D
正常组		71.39±1.45	3.50±0.16
模型组		78.74±2.06 ²⁾	4.74±0.49 ²⁾
XQL低剂量组	7.8	72.88±1.69 ⁴⁾	3.70±0.23 ⁴⁾
XQL高剂量组	15.6	72.20±1.76 ⁴⁾	3.60±0.22 ⁴⁾

型组小鼠IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、HIF-1 α 、PI3K、Akt1、mTOR显著增加($P<0.01$);与模型组比较,XQL低、高剂量组小鼠IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、HIF-1 α 、PI3K、Akt1、mTOR明显下降($P<0.05, P<0.01$)。见表4。XQL高剂量组治疗效果更佳。

3.12 XQL对HAPE小鼠模型肺部组织中关键蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组中PI3K、p-PI3K、Akt1、p-Akt1、mTOR、p-mTOR、HIF-1 α 的蛋

白表达量均显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,XQL低、高剂量组PI3K、p-PI3K、Akt1、p-Akt1、mTOR、p-mTOR、HIF-1 α 的蛋白表达量均明显降低($P<0.05, P<0.01$)。根据蛋白表达结果可知,XQL高剂量组效果更佳。见表5、图2。

3.13 XQL对HAPE小鼠模型肺部组织中关键蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组中PI3K、p-PI3K、Akt1、p-Akt1、mTOR、p-mTOR、HIF-1 α 的蛋白表达量均明显升高($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,XQL低剂量组Akt1、p-Akt1、mTOR、p-mTOR的表达明显降低,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$),PI3K、p-PI3K、HIF-1 α 的蛋白表达量有下降趋势,但差异无统计学意义;XQL高剂量组上述所有蛋白表达均明显降低,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。综上所述,其中XQL高剂量组效果更佳,其抗炎及减轻水肿的作用可能具有剂量依赖性。见表6、图3。

表4 XQL对HAPE小鼠肺部组织中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、PI3K、Akt1、mTOR、HIF-1 α 的mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of XQL on TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、PI3K、Akt1、mTOR、and HIF-1 α mRNA expression in lung tissues in HAPE mouse model ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF- α	IL-6	IL-1 β	PI3K	Akt1	mTOR	HIF-1 α
正常组		1.00±0.19	1.00±0.20	1.00±0.28	1.00±0.41	1.00±0.11	1.00±0.22	1.00±0.24
模型组		3.37±0.60 ²⁾	4.09±0.67 ²⁾	11.53±3.52 ²⁾	2.56±1.02 ²⁾	4.78±1.42 ²⁾	4.59±1.38 ²⁾	2.72±0.92 ²⁾
XQL低剂量组	7.8	2.10±0.52 ⁴⁾	2.31±1.05 ⁴⁾	7.01±3.55 ³⁾	1.30±0.48 ³⁾	3.13±0.69 ³⁾	2.83±0.95 ³⁾	1.74±0.33 ³⁾
XQL高剂量组	15.6	1.84±0.38 ⁴⁾	2.06±0.89 ⁴⁾	4.21±1.96 ⁴⁾	1.08±0.44 ⁴⁾	2.25±0.93 ⁴⁾	2.49±0.74 ⁴⁾	1.32±0.18 ⁴⁾

表5 XQL对HAPE小鼠模型肺部组织中关键蛋白表达的平均光密度值的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of XQL on average optical density of key protein expression in lung tissue of HAPE mouse model ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PI3K	p-PI3K	Akt1	p-Akt1	mTOR	p-mTOR	HIF-1 α
正常组		0.29±0.01	0.37±0.03	0.39±0.04	0.35±0.05	0.35±0.03	0.38±0.01	0.42±0.03
模型组		0.65±0.04 ²⁾	0.61±0.03 ²⁾	0.63±0.03 ²⁾	0.52±0.04 ²⁾	0.50±0.02 ²⁾	0.54±0.03 ²⁾	0.56±0.03 ²⁾
XQL低剂量组	7.8	0.50±0.02 ⁴⁾	0.48±0.04 ⁴⁾	0.51±0.04 ⁴⁾	0.45±0.04 ³⁾	0.45±0.01 ⁴⁾	0.45±0.04 ⁴⁾	0.49±0.02 ⁴⁾
XQL高剂量组	15.6	0.43±0.05 ⁴⁾	0.40±0.06 ⁴⁾	0.46±0.03 ⁴⁾	0.41±0.01 ⁴⁾	0.43±0.01 ⁴⁾	0.42±0.02 ⁴⁾	0.43±0.03 ⁴⁾

4 讨论

高原低压缺氧会引发肺血管收缩、微血管通透性增加及气血屏障破坏,导致毛细血管液体渗出形成高渗性肺水肿,其中炎症反应是HAPE发生的关键环节^[30]。大量炎性渗出导致肺泡内充满高蛋白质液体,严重损害肺泡气体交换功能。同时,肺表面活性物质的合成与代谢障碍进一步加剧呼吸功能损伤。过度的炎症反应打破了肺组织氧化-抗氧化系统的动态平衡,促使氧化应激损伤的恶性循环,从而加重肺组织病理损伤进程^[31]。在缺氧条件下,

HIF-1的 α 亚基稳定性显著增强,研究表明血液中HIF-1 α 水平升高是HAPE的重要生物标志物(AUC=0.87),当阈值为86.45 ng·L⁻¹时,其诊断敏感性和特异性分别达80%和81.45%^[32]。持续激活的HIF-1 α 通过双重途径驱动HAPE病理进程:一方面直接促进炎症因子释放,动物实验表明,7 620 m低压舱模拟环境会激活HIF-1 α 信号通路,促进IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和血管内皮生长因子(VEGF)等促炎细胞因子释放,进而增加肺血管通透性,最终诱发并加重HAPE^[33]。另一方面,体外实验表明,低氧

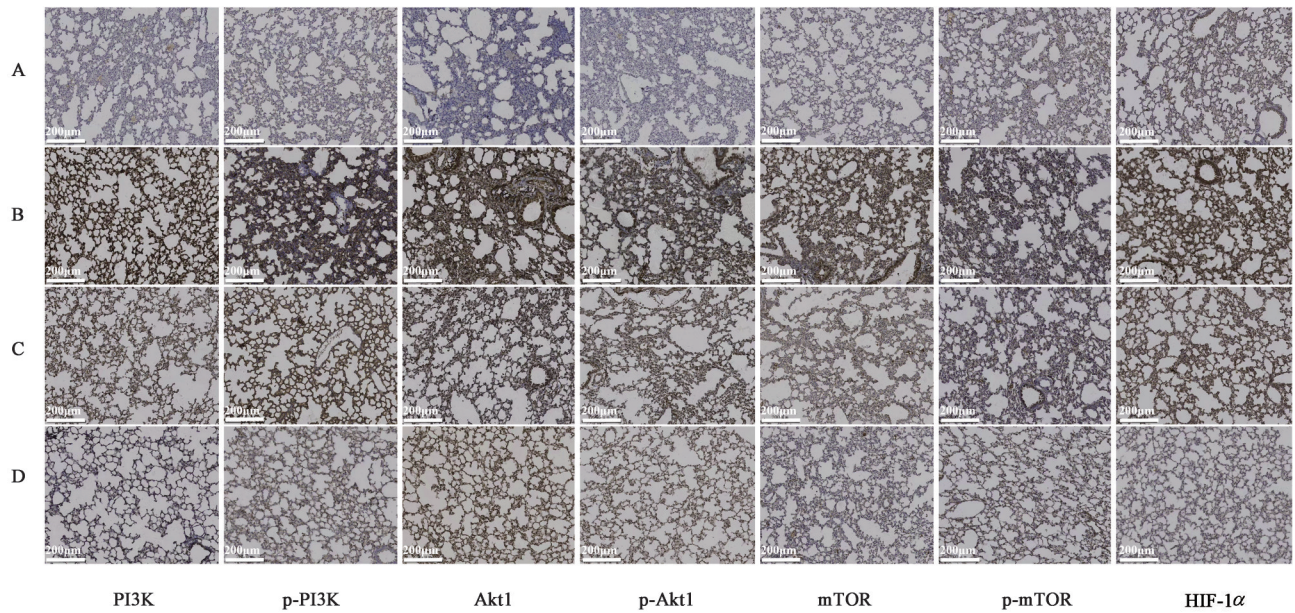


图2 XQL对HAPE小鼠模型肺部组织中关键蛋白表达的影响(免疫组化, ×100)

Fig. 2 Effect of XQL on expression of key proteins in lung tissues of HAPE mouse models (IHC, ×100)

表6 XQL对HAPE小鼠模型肺部组织中关键蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of XQL on expression of key proteins in lung tissues of HAPE mouse models ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PI3K/β-actin	p-PI3K/β-actin	Akt1/β-actin	p-Akt1/β-actin	mTOR/β-actin	p-mTOR/β-actin	HIF-1α/β-actin
正常组		0.53±0.01	0.34±0.07	0.74±0.05	0.28±0.08	0.23±0.02	0.19±0.02	0.54±0.04
模型组		0.61±0.03 ²⁾	0.57±0.10 ¹⁾	0.97±0.05 ²⁾	0.81±0.01 ²⁾	0.40±0.04 ²⁾	0.32±0.03 ²⁾	0.82±0.02 ²⁾
XQL低剂量组	7.8	0.57±0.02	0.44±0.02	0.82±0.01 ³⁾	0.47±0.14 ⁴⁾	0.28±0.02 ⁴⁾	0.20±0.02 ⁴⁾	0.69±0.06
XQL高剂量组	15.6	0.53±0.01 ⁴⁾	0.35±0.06 ³⁾	0.77±0.02 ⁴⁾	0.41±0.08 ⁴⁾	0.26±0.01 ⁴⁾	0.19±0.02 ⁴⁾	0.60±0.07 ⁴⁾

(1.5% O₂)可诱导肺泡上皮细胞(AEC)中HIF-1α表达上调,进而抑制上皮钠通道(ENaC)活性,减少钠离子重吸收,导致肺泡液清除能力下降,加重肺泡水肿并影响气体交换^[34]。动物实验进一步证实,模拟7 620 m海拔低氧环境可激活HIF-1α/VEGF信号通路,同时降低抗氧化酶[谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)]及核转录因子E₂相关因子2(Nrf2)/血红素加氧酶-1(HO-1)表达,引发氧化应激损伤,破坏肺表面活性物质和肺泡结构^[35]。PI3K/Akt信号通路是细胞信号转导的关键通路之一。当细胞内的PI3K受到刺激时会活化,活化的PI3K会促使Akt从细胞质中募集到细胞膜上与其结合,从而发生磷酸化。活化的Akt可继续作用于下游靶蛋白mTOR,参与炎症反应、细胞自噬等多种生物过程。有研究发现,PI3K/Akt信号通路能有效改善急性肺损伤的炎症反应,通过调控PI3K/Akt信号通路能减少LPS诱导的急性肺损伤小鼠模型炎症因子的释放,减轻肺部的病理损伤及水肿^[36]。

XQL作为《伤寒论》中治疗“外寒内饮”证的经典方剂,经现代药理研究证实具有显著的抗炎和抗氧化作用。近年研究发现,XQL在急性肺损伤治疗中展现出多靶点调控优势,XQL加减可以通过调节花生四烯酸代谢和发挥抗凋亡和抗炎作用,减轻脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤^[37]。XQL预保护可以通过上调血管紧张素转换酶II,减轻脂多糖诱导的脓毒性急性肺损伤大鼠炎症和氧化损伤^[38]。同时,XQL对其他肺部疾病同样具有保护效应,XQL通过腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/mTOR通路减轻ER应激,对慢性阻塞性肺疾病急性加重期小鼠的炎症和细胞凋亡具有保护作用^[39]。XQL可以有效改善大鼠肺部的炎症浸润和胶原纤维沉积^[40]。本研究证明XQL通过抑制PI3K/Akt/mTOR、HIF-1α通路的激活,可以减轻HAPE的炎症反应和水肿。

HAPE常发生在迅速上升到海拔2 500 m以上的人群中。该病发病急,进展快,对人体危害极大,是一种严重甚至致命的非心源性肺水肿,是急性高原病的首要致死原因^[41]。其发病机制复杂,涉及低

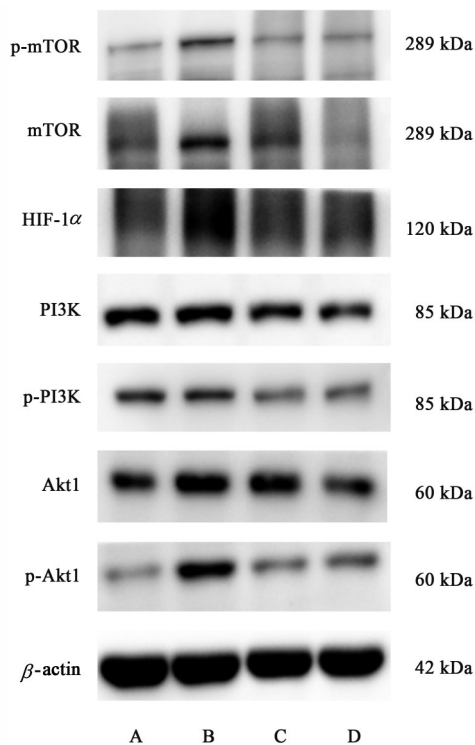


图3 各组小鼠PI3K/Akt/mTOR和HIF-1 α 通路相关蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of PI3K/Akt/mTOR and HIF-1 α pathway related protein expression in each group of mice

氧性肺动脉收缩、炎症反应、氧化应激损伤及血管内皮屏障功能障碍等多重病理环节^[42-43]。目前临床治疗主要采取综合干预策略,进行对症治疗:氧疗作为基础治疗手段,硝苯地平通过选择性扩张肺动脉发挥预防作用,氨茶碱可有效改善通气功能,利尿剂(如呋塞米)用于纠正水钠潴留,乙酰唑胺和地塞米松可作为预防性用药^[44-45]。鉴于HAPE的多因素发病特点,不同药物可能仅针对某一环节(如肺动脉高压或炎症),单一靶点药物难以全面干预其病理过程^[46]。而XQL复方可能通过多靶点协同作用发挥疗效。若选择某一特定阳性药(如硝苯地平),可能无法全面反映HAPE的病理特征或复方的整体调节作用。临床实践中,HAPE常采用联合用药(如利尿剂+氧疗+钙通道阻滞剂),但动物模型难以完全模拟人体治疗场景。为避免阳性药选择的片面性,本研究优先聚焦于XQL防治HAPE的药效学评价,后续可进一步与经典药物进行横向比较。

本研究筛选出XQL的355个活性成分和2142个潜在靶点,其中236个靶点与HAPE相关,表明XQL可能通过多靶点协同作用干预HAPE。核心靶点分析显示,Akt1和HIF-1 α 在HAPE的发病机制中起关键作用。KEGG富集分析进一步表明,PI3K/Akt和HIF-1信号通路可能是XQL的主要作

用途径。分子对接和分子动力学模拟结果证实,XQL的活性成分[β -二氢紫罗兰酮、(S)-(+)-香芹酮]与Akt1、HIF-1 α 等靶点具有较高的结合亲和力,提示其可能直接调控这些关键蛋白的活性。同时,通过建立低压低氧HAPE小鼠模型,本研究观察到模型组小鼠肺组织出现典型的病理损伤,包括肺泡出血、间质增宽和炎症浸润,同时肺含水量、肺组织湿/干质量比及炎症因子(TNF- α 、IL-6、IL-1 β)显著升高,表明缺氧诱导的炎症反应在HAPE中起关键作用。而XQL干预后,肺组织病理损伤减轻,炎症因子表达下降,提示XQL具有抗炎和肺保护作用。此外,Real-time PCR、免疫组化和Western blot结果显示,XQL能显著抑制PI3K/Akt/mTOR、HIF-1 α 信号通路的激活,降低p-PI3K、p-Akt1、p-mTOR和HIF-1 α 的表达,表明其可能通过调控该通路减轻缺氧诱导的炎症反应。

本研究通过网络药理学预测、分子对接、分子动力学模拟及体内实验验证,系统揭示了XQL防治HAPE的作用机制。研究发现,XQL可能通过调控PI3K/Akt/mTOR、HIF-1 α 信号通路,显著减轻缺氧诱导的肺部炎症反应和组织水肿。这一发现不仅从现代药理学角度阐明了XQL的多靶点作用机制,为中医药治疗HAPE提供了新的理论依据,同时也与中医“未病先防”的传统理论相契合。研究成果既拓展了XQL在现代医学中的应用价值,又为开发HAPE的新型药物提供了潜在的分子靶点和科学依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] LUKS A M, HACKETT P H. Medical conditions and high-altitude travel[J]. N Engl J Med, 2022, 386(4):364-373.
- [2] MAIRBÄURL H, DEHNERT C, MACHOLZ F, et al. The hen or the egg: Impaired alveolar oxygen diffusion and acute high-altitude illness?[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(17):4105.
- [3] JENSEN J D, VINCENT A L. High Altitude Pulmonary Edema [M]. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.
- [4] MAGGIORINI M, MÉLOT C, PIERRE S, et al. High-altitude pulmonary edema is initially caused by an increase in capillary pressure [J]. Circulation, 2001, 103(16):2078-2083.
- [5] ZHENG M, ZHAO M, TANG L, et al. Ginsenoside Rg₁ attenuates hypoxia and hypercapnia-induced vasoconstriction in isolated rat pulmonary arterial rings by reducing the expression of p38[J]. J Thorac Dis, 2016, 8(7):1513-1523.
- [6] LUKS A M, AUERBACH P S, FREER L, et al. Wilderness

- medical society clinical practice guidelines for the prevention and treatment of acute altitude illness: 2019 Update [J]. *Wilderness Environ Med*, 2019, 30(4S): S3-S18.
- [7] 唐浩杰,王梦杰,赵鑫杰,等. 高原肺水肿的药物防治研究进展[J]. *西藏医药*, 2023, 44(6): 157-159.
TANG H J, WANG M J, ZHAO XJ, et al. Research progress on drug prevention and treatment of high altitude pulmonary edema[J]. *Tibetan Med*, 2023, 44(6): 157-159.
- [8] 付兴,付义. 高原肺水肿发病机制及中医药防治研究进展[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2019, 25(4): 563-566.
FU X, FU Y. Progress of research on the pathogenesis of plateau pulmonary edema and its prevention and treatment by traditional Chinese medicine [J]. *Chin J Basic Chin Med*, 2019, 25(4): 563-566.
- [9] BHATTACHARYA S, SHRIMALI N M, MOHAMMAD G, et al. Gain-of-function Tibetan PHD2D4E; C127S variant suppresses monocyte function: A lesson in inflammatory response to inspired hypoxia [J]. *E Bio Med*, 2021, 68: 103418.
- [10] EL ALAM S, PENA E, AGUILERA D, et al. Inflammation in pulmonary hypertension and edema induced by hypobaric hypoxia exposure[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(20): 12656.
- [11] SONG T T, BI Y H, GAO Y Q, et al. Systemic pro-inflammatory response facilitates the development of cerebral edema during short hypoxia[J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1): 63.
- [12] 汪新龙,梁波流,张鹏程,等. 小青龙汤变方在COPD大鼠气道炎症反应中的作用机制探讨[J]. *中国处方药*, 2023, 21(12): 54-57.
WANG X L, LIANG B L, ZHANG P C, et al. Study on the mechanism of Xiaoqinglongtang in airway inflammation of COPD rats[J]. *Chin Prescrip Med*, 2023, 21(12): 54-57.
- [13] WANG B, FAN X, SUN Q, et al. Xiaoqinglongtang enhances autophagy to antagonist airway inflammation induced by cold in asthmatic rats[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 3943343.
- [14] 徐世红,陆保革,蒋芝山. 小青龙汤加减预防筑路工人急进海拔4 500 m地区高原肺水肿120例疗效观察[J]. *青海医药杂志*, 2009, 39(3): 66-67.
XU S H, LU B G, JIANG Z S. Effectiveness of Xiaoqinglong Tang in preventing 120 cases of plateau pulmonary edema in road construction workers rushed to 4 500 m altitude [J]. *Qinghai Med J*, 2009, 39(3): 66-67.
- [15] KIBBLE M, SAARINEN N, TANG J, et al. Network pharmacology applications to map the unexplored target space and therapeutic potential of natural products [J]. *Nat Prod Rep*, 2015, 32(8): 1249-1266.
- [16] ZHAO S, IYENGAR R. Systems pharmacology: Network analysis to identify multiscale mechanisms of drug action[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2012, 52: 505-521.
- [17] LIU Z, GUO F, WANG Y, et al. BATMAN-TCM: A bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21146.
- [18] SCARDONI G, PETERLINI M, LAUDANNA C. Analyzing biological network parameters with CentiScape [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(21): 2857-2859.
- [19] LIN Z, HUANG T, HAN B, et al. Network pharmacology and experimental validation-based Investigation of the underlying mechanism of Yi-Yi-Fu-Zi-Bai-Jiang-San of nasopharyngeal carcinoma[J]. *J Cancer*, 2025, 16(7): 2212-2232.
- [20] 徐柠檬,董仕豪,秦粉,等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS和网络药理学探讨天麻抗炎的物质基础及其作用机制[J]. *食品科学*, 2025, 46(4): 30-43.
XU N M, DONG S H, QIN F, et al. Exploration of the material basis of anti-inflammatory properties and its mechanism of action of Tianma based on UPLC-Q-TOF-MS/MS and network pharmacology[J]. *Food Sci*, 2025, 46(4): 30-43.
- [21] 吕娟,戴恩来,张云霞,等. 基于网络药理学和实验验证探讨淫羊藿苷联合泼尼松治疗激素抵抗性肾病综合征大鼠的作用机制[J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2023, 25(7): 2426-2436.
LV J, DAI E L, ZHANG Y X, et al. Exploring the mechanism of action of epimedium glycoside combined with prednisone in the treatment of hormone-resistant nephrotic syndrome rats based on network pharmacology and experimental validation [J]. *World Sci Technol Mod Tradit Chin Med*, 2023, 25(7): 2426-2436.
- [22] 安君,裴帅,丁辉,等. 基于网络药理学和分子对接的泽泻汤治疗高脂血症作用机制研究[J]. *中国现代中药*, 2023, 25(3): 549-558.
AN J, PEI S, DING H, et al. Study on the mechanism of action of Zeaxia Tang for hyperlipidemia based on network pharmacology and molecular docking [J]. *Chin Mod Tradit Med*, 2023, 25(3): 549-558.
- [23] 孙宇,杨文慧,郭延生. 大柴胡汤治疗奶牛脂肪肝的网络药理学效应机制[J]. *农业科学研究*, 2025, doi: 10. 13907/j. cnki. nykxyj. 20250515. 001.
SUN Y, YANG W H, GUO Y S. Mechanism of network pharmacological effect of Da Chaihu Tang in the treatment of fatty liver in dairy cows [J]. *Res Agric Sci*, 2025, doi: 10. 13907/j. cnki. nykxyj. 20250515. 001.
- [24] LI M, CUI Y, WU X, et al. Integrating network pharmacology to investigate the mechanism of quercetin's action through Akt inhibition in co-expressed genes associated with polycystic ovary syndrome and endometrial cancer [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 297: 139468.
- [25] CHEN Y, ZHOU Q, ZHANG H, et al. Qingdai decoction suppresses prostate cancer growth in lethal-stage prostate cancer models[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 308: 116333.
- [26] 魏冠平,黄煜,何庆. 高原疾病的种类、发病机制及治疗药物[J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(5): 830-832.
WEI G P, HUANG Y, HE Q. Types, pathogenesis and therapeutic drugs of plateau diseases [J]. *J Anhui Med Univ*,

- 2019,54(5):830-832
- [27] DO NASCIMENTO X B M, FERREIRA L, FERREIRA L, et al. MHTP, a synthetic tetrahydroisoquinoline alkaloid, attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via p38 MAPK/p65 NF- κ B signaling pathway-TLR4 dependent [J]. *Inflamm Res*, 2019, 68(12): 1061-1070.
- [28] 王彬, 王新陆, 李兰馨, 等. 基于网络药理学、分子对接及实验验证探讨参附益心颗粒治疗心力衰竭的作用机制[J]. *中药新药与临床药理*, 2024, 35(9): 1352-1363.
- WANG B, WANG X L, LI L X, et al. Exploring the mechanism of action of Shenfu Yixin granules in the treatment of heart failure based on network pharmacology, molecular docking and experimental verification [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2024, 35(9): 1352-1363.
- [29] 胡虹, 赖莉, 王淑美, 等. 超滤亲和质谱结合分子对接探讨丹参活血化瘀功效成分群的显效形式[J]. *中草药*, 2024, 55(21): 7217-7229.
- HU H, LAI L, WANG S M, et al. Ultra-filtration affinity mass spectrometry coupled with molecular docking to explore effective form of blood-activating and stasis-resolving active ingredient group in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 2024, 55(21): 7217-7229.
- [30] 姜艳, 王雷琛, 王剑波. 高原肺水肿发病机制及防治研究进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2016, 43(1): 139-145.
- JIANG Y, WANG L C, WANG J B. Research progress on the pathogenesis and prevention of high altitude pulmonary edema [J]. *Int J Pharmaceut Res*, 2016, 43(1): 139-145.
- [31] MCVEY M J, KAPUR R, CSERTI-GAZDEWICH C, et al. Transfusion-related acute lung injury in the perioperative patient [J]. *Anesthesiology*, 2019, 131(3): 693-715.
- [32] SOREE P, GUPTA R K, SINGH K, et al. Raised HIF1 α during normoxia in high altitude pulmonary edema susceptible non-mountaineers [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 26468.
- [33] SHI J, LIU Z, LI M, et al. Polysaccharide from *Potentilla anserina* L ameliorate pulmonary edema induced by hypobaric hypoxia in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 139: 111669.
- [34] BALOGLU E, NONNENMACHER G, SELENINOVA A, et al. The role of hypoxia-induced modulation of alveolar epithelial Na⁺ transport in hypoxemia at high altitude [J]. *Pulm Circ*, 2020, 10(1 Suppl): 50-58.
- [35] MATHEW T, SARADA S. Intonation of Nrf2 and Hif-1 α pathway by curcumin prophylaxis: A potential strategy to augment survival signaling under hypoxia [J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2018, 258: 12-24.
- [36] SHI Q Q, HUANG Y H, LI Y F, et al. PEBP4 deficiency aggravates LPS-induced acute lung injury and alveolar fluid clearance impairment via modulating PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2024, 81(1): 133.
- [37] REN Y, LI X, ZHANG Y, et al. Xiaoqinglongtang suppresses childhood cough variant asthma and inhibited the body inflammatory response by regulating IL-6/STAT3 signalling pathway [J]. *Ann Med Surg (Lond)*, 2023, 85(11): 5469-5477.
- [38] SU J C, CHENG C, WANG C Y, et al. The Pretreatment of Xiaoqinglongtang alleviates inflammation and oxidative damage and up-regulates angiotensin-converting enzyme 2 in lipopolysaccharide-induced septic acute lung injury rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 2421198.
- [39] HUANG Q, YANG H, ZHANG C, et al. Xiaoqinglongtang protects the lungs of AECOPD Mice through the AMPK/mTOR signaling pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 9865290.
- [40] 祁磊, 张慧菲, 龚玲等. 小青龙汤对野百合碱诱导肺动脉高压大鼠右心功能的影响及机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2026, 32(4): 11-19.
- QI L, ZHANG H F, GONG L, et al. Effect and mechanism of Xiao Qinglongtang against right ventricular dysfunction in rats with pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2026, 32(4): 11-19.
- [41] PENA E, EL ALAM S, SIQUES P, et al. Oxidative stress and diseases associated with high-altitude exposure [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(2): 267.
- [42] KORZENIEWSKI K, NITSCH-OSUCH A, GUZEK A, et al. High altitude pulmonary edema in mountain climbers [J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2015, 209: 33-38.
- [43] 俞燕露, 杜文秀, 孙宝迪, 等. 《美国荒野医学会关于急性高原病预防、诊断和治疗的临床实践指南: 2024年更新》解读 [J]. *中国急救医学*, 2024, 44(10): 908-912.
- YU Y L, DU W X, SUN B D, et al. Interpretation of the American wilderness medical association's clinical practice guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of acute mountain sickness: update 2024 [J]. *China Emerg Med*, 2024, 44(10): 908-912.
- [44] LUKS A M, BEIDLEMAN B A, FREER L, et al. Wilderness medical society clinical practice guidelines for the prevention, diagnosis, and treatment of acute altitude illness: 2024 update [J]. *Wilderness Environ Med*, 2024, 35(1 Suppl): 2S-19S.
- [45] 周雯雯, 杨健. 急性高原病用药进展 [J]. *军事医学*, 2020, 44(8): 624-628.
- ZHOU W W, YANG J. Advances in acute mountain sickness medication [J]. *Military Med*, 2020, 44(8): 624-628.
- [46] TAPIA L, IRARRÁZAVAL S. Acetazolamide for the treatment of acute mountain sickness [J]. *Medwave*, 2019, 19(11): e7737.

[责任编辑 顾雪竹]