

· 数据挖掘 ·

## 基于网络药理学探讨哮喘宁颗粒治疗支气管哮喘的作用机制及PI3K/Akt信号通路验证

黄帅阳<sup>1,2</sup>, 侯丹<sup>1,2</sup>, 黄贵锐<sup>1,2</sup>, 吕明圣<sup>1,2</sup>, 弓雪峰<sup>3</sup>, 张诗瑜<sup>1,2</sup>, 张志杰<sup>1,2</sup>, 崔红生<sup>1\*</sup>

(1. 北京中医药大学第三附属医院, 北京 100029;

2. 北京中医药大学, 北京 100029;

3. 首都医科大学附属北京朝阳医院, 北京 100020)

**[摘要]** 目的: 基于网络药理学预测哮喘宁颗粒治疗支气管哮喘的潜在分子机制, 并采用卵蛋白(OVA)致敏诱发的支气管哮喘大鼠模型对关键信号通路之一磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)进行实验验证。方法: 利用传统中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)和中药分子机制生物信息学分析网络(BATMAN-TCM)筛选哮喘宁颗粒的主要有效成分和作用靶点。通过人类基因数据库(GeneCards)、人类孟德尔遗传靶点数据库(OMIM)等5个疾病数据库获取支气管哮喘相关的疾病靶点。筛选并通过韦恩图获得两者的共同靶标, 使用蛋白相互作用数据库(String)构建化合物-疾病的蛋白质-蛋白质相互作用网络(PPI), 并用Cytoscape 3.8.0建立“哮喘宁关键活性成分-核心靶基因”网络。通过基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。制备OVA刺激诱导的支气管哮喘大鼠模型, 通过苏木素-伊红(HE)染色观察支气管与肺组织炎症情况, 蛋白免疫印迹法(Western blot)实验验证网络药理学富集分析结果。结果: 该实验分别获取哮喘宁活性成分232个, 相关靶点4687个, 收集哮喘宁与支气管哮喘的共同靶点233个, 包括嗜酸性粒细胞衍生神经毒素1(EDN1)、环磷腺苷效应元件结合蛋白1(CREB1)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A(CDKN1A)、表皮生长因子受体(EGFR)、丝裂原活化蛋白激酶14(MAPK14)、Akt1等。KEGG通路分析筛选了186条相关信号通路, 显示PI3K/Akt信号通路可能在哮喘宁治疗支气管哮喘的过程中起关键作用。动物实验表明, 与哮喘模型组比较, 哮喘宁组可明显减轻大鼠气道炎症反应和平滑肌增生, 并明显下调PI3K、Akt蛋白表达( $P < 0.05$ )。结论: 哮喘宁治疗哮喘具有多成分、多靶点、多通路协同作用的特点, 其中哮喘宁可能通过调控PI3K/Akt信号通路相关基因的表达, 进一步发挥抗炎的药理效应, 为后续深入研究哮喘宁治疗支气管哮喘的复杂机制提供了理论依据。

**[关键词]** 哮喘宁颗粒; 支气管哮喘; 网络药理学; 动物验证; 磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路

**[中图分类号]** R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)09-0150-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220725

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220207.1030.001.html>

**[网络出版日期]** 2022-02-07 14:42

### Mechanism of Xiaochuanning Granules in Treatment of Bronchial Asthma via PI3K/Akt Signaling Pathway Based on Network Pharmacology and Experimental Verification

HUANG Shuai-yang<sup>1,2</sup>, HOU Dan<sup>1,2</sup>, HUANG Gui-rui<sup>1,2</sup>, LYU Ming-sheng<sup>1,2</sup>, GONG Xue-feng<sup>3</sup>,  
ZHANG Shi-yu<sup>1,2</sup>, ZHANG Zhi-jie<sup>1,2</sup>, CUI Hong-sheng<sup>1\*</sup>

(1. Beijing University of Chinese Medicine Third Affiliated Hospital, Beijing 100029, China;

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

3. Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100020, China)

**[收稿日期]** 2021-11-20

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(82074390)

**[第一作者]** 黄帅阳, 在读博士, 从事中医药防治肺系疾病研究, E-mail: 1138507954@qq.com

**[通信作者]** \* 崔红生, 主任医师, 教授, 博士生导师, 从事中医药防治肺系疾病研究, E-mail: Hshcui@sina.com

**[Abstract] Objective:** To explore the underlying molecular mechanism of Xiaochuanning granules in the treatment of bronchial asthma based on the network pharmacology and experimental verification through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway on ovalbumin (OVA) sensitization-induced bronchial asthma model in rats. **Method:** The main active ingredients and targets of Xiaochuanning Granules were screened out from Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and Bioinformatics Analysis Tool for Molecular Mechanism of Traditional Chinese Medicine (BATMAN-TCM). The targets related to bronchial asthma were obtained from five disease databases such as GeneCards and Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). The common targets were screened out through the Venn diagram. STRING was used to construct the protein-protein interaction (PPI) network of "compound-disease", and Cytoscape 3.8.0 was used to establish a network of key active ingredients of Xiaochuanning granules and core target genes ("ingredient-gene" network). Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses were performed through DAVID. The bronchial asthma model was induced by OVA stimulation in rats. Bronchial and lung tissue inflammation was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, and the enrichment analysis results of the network pharmacology were verified by Western blot. **Result:** In this experiment, 232 active ingredients and 4 687 related targets of Xiaochuanning granules were screened out, and 233 common targets of Xiaochuanning granules and bronchial asthma were collected, including eosinophil-derived neurotoxin 1 (EDN1), cyclic AMP response element-binding protein 1 (CREB1), cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A), epidermal growth factor receptor (EGFR), mitogen-activated protein kinase 14 (MAPK14), and Akt1. KEGG pathway analysis revealed 186 related signaling pathways, indicating that the PI3K/Akt signaling pathway presumably played a key role in the treatment of bronchial asthma by Xiaochuanning granules. The animal experiment showed that Xiaochuanning granules relieved the airway inflammation and smooth muscle hyperplasia in rats and down-regulated the gene expression of PI3K and Akt as compared with the conditions in the model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Xiaochuanning granules have the characteristics of multi-component, multi-target, and multi-pathway synergistic effect in the treatment of asthma. Xiaochuanning granules may exert anti-inflammatory effects by regulating the expression of genes related to the PI3K/Akt signaling pathway. The present study is expected to provide a theoretical basis for follow-up in-depth research on the complex mechanism of Xiaochuanning granules in the treatment of bronchial asthma.

**[Keywords]** Xiaochuanning granules; bronchial asthma; network pharmacology; animal verification; phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway

哮喘是儿童和成人最常见的呼吸系统非传染病疾病之一,我国肺健康研究(CPH)结果显示,我国20岁及以上人群的哮喘患病率为4.2%,影响着4 570万20岁以上的成年人,这不仅给患者和家庭带来严重的经济负担,也是我国面临的主要公共卫生挑战<sup>[1]</sup>。哮喘作为呼吸道一种慢性炎症性疾病,常由过敏反应导致,组胺、乙酰甲胆碱或冷空气等刺激可引起气道高反应,产生气道阻塞,在临床上可引起反复发作的喘息、胸闷或咳嗽等症状<sup>[2]</sup>。典型的哮喘病理学特征表现为气道炎症、平滑肌收缩、上皮细胞脱落、黏液分泌过多、支气管高反应性和黏膜水肿等<sup>[3]</sup>。哮喘的标准疗法主要基于支气管扩张剂和免疫抑制药物,这些药物能短期缓解症

状,但不能治愈,中医药在治疗包括哮喘在内的各种呼吸系统疾病过程中发挥了重要作用,在治疗哮喘方面已有2 000多年的历史,近年来越来越多的研究人员聚焦中医药对哮喘的影响,在临床试验或基础实验模型中均取得了显著成果<sup>[4-5]</sup>。中药复方哮喘宁颗粒(以下简称哮喘宁)由柴胡、白芍、清半夏、枳壳、黄芩、丹参、地龙、葶苈子等组成,以《伤寒论》四逆散、小柴胡汤加减而成。重在肝肺同治、理气解郁、和调肝肺,使气机升降平衡,枢机得利,喘咳自平。本课题组前期研究表明,哮喘宁可抑制哮喘的炎症反应,临床观察发现其可明显改善哮喘患者的症状,控显率和总有效率分别为63.33%和90.00%<sup>[6]</sup>。动物实验表明哮喘宁能够抑制豚鼠哮喘

模型气道嗜酸性粒细胞(EOS)浸润,抑制小鼠哮喘模型肺组织内T淋巴细胞活化,促进辅助性T细胞1(Th1)/辅助性T细胞2(Th2)平衡<sup>[7]</sup>。然而哮喘宁治疗哮喘的作用机制尚不清楚。本研究运用网络药理学分析和大鼠哮喘模型实验验证相结合的方法,探讨哮喘宁治疗哮喘的潜在关键靶点和相关的信号通路。

## 1 材料

**1.1 药物** 哮喘宁颗粒由北京中医药大学第三附属医院中药房统一采购并鉴定。药物组成:柴胡10g、白芍10g、清半夏10g、枳壳10g、黄芩10g、丹参15g、地龙15g、葶苈子10g、炙麻黄6g、前胡10g、炙甘草6g(北京康仁堂药业有限公司;批号分别为21010771、21014001、21011221、21004161、21012201、21003421、21007351、21011071、20040921、20041691、21003471),每剂浓缩配方颗粒剂配方为9g/袋;卵清蛋白(OVA)、氢氧化铝佐剂(Sigma公司,批号分别为SLCH2414、VE301887),吸入用布地奈德混悬液(阿斯利康药业有限公司,批号LOT 325739)。

**1.2 动物** SPF级雄性SD大鼠24只,体质量(200±10)g,购自于北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2020-0033,饲养于北京中医药大学屏障环境动物室。本实验通过了北京中医药大学实验动物伦理委员会审批,伦理批件号为BUCM-4-2020122303-4150。

**1.3 试剂** 一抗兔抗大鼠磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)抗体、小鼠抗大鼠蛋白激酶B(Akt)抗体(Proteintech公司,货号分别是60225-1-Ig、10176-2-AP)、兔抗大鼠β-肌动蛋白(β-actin)抗体(CST公司,货号4970S),PAGE凝胶快速制备试剂盒(12.5%)(上海雅酶生物医药科技有限公司,货号PG113),RIPA组织/细胞裂解液(北京普利莱基因技术有限公司,货号R0010)、BCA蛋白浓度测定试剂盒、5×蛋白上样缓冲液、脱脂奶粉、ECL超敏发光液(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为PC0020、P1040、D8340、PE0010),PVDF膜(美国Millipore公司,IPVH00010),苏木素-伊红(HE)试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号BSBA-4025)。

**1.4 仪器** LF-04-1001型电泳仪、LF-ZY02型电转仪(北京龙方科技有限公司),4800型全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司),BX53型光学显微镜(日本Olympus公司)。

## 2 方法

### 2.1 哮喘宁治疗支气管哮喘的网络药理学研究

**2.1.1 哮喘宁有效成分、靶点收集** 将柴胡、白芍、清半夏、枳壳、黄芩、丹参、地龙、葶苈子、炙麻黄、前胡、炙甘草作为关键词分别输入TCMSP(<http://tcmssp.com/tcmssp.php>)和BATMAN-TCM(<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)<sup>[8]</sup>选择“Ingredients”,以口服生物利用度(OB)≥30%,类药性(DL)≥0.18作为条件<sup>[9]</sup>,筛选出哮喘宁包含的活性成分。选择“Related Targets”,得到哮喘宁所有化学成分相对应的靶基因,使用UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>)进行中药靶点基因注释转换。

**2.1.2 支气管哮喘疾病的靶点收集** 在GeneCards(<https://www.genecards.org>)、OMIM(<https://db.idrblab.org/ttd/>)、遗传药理学与药物基因组学数据库(PharmGKB,<https://www.pharmgkb.org>)、药物作用靶点数据库(DrugBank,<https://www.drugbank.ca>)和治疗靶标数据库(TTD,<http://db.idrblab.net/ttd>)中以“bronchial asthma”为关键词进行检索,获得支气管哮喘的疾病靶点,整理后获得相关疾病靶基因。

**2.1.3 蛋白质-蛋白质相互作用网络(PPI)网络构建及筛选核心靶点** 利用R软件查找哮喘宁和支气管哮喘间的重合靶点,绘制韦恩图(VennDiagram安装包)。将活性成分靶基因-疾病靶基因导入STRING数据库(<https://string-db.org>),选择最高置信度为0.900,获得蛋白质-蛋白质相互作用文件进行分析。将下载的文件导入Cytoscape 3.8.0软件,使用cytoNCA插件计算中介中心性(BC)、接近中心性(CC)、度中心性(DC)、特征向量中心性(EC)、局部边连通性(LAC)、网络中心性(NC)值,值越高,说明该节点在PPI网络中越核心<sup>[10-11]</sup>。根据其中位值筛选,得到PPI网络核心基因。

**2.1.4 靶点功能分析** 将哮喘宁和支气管哮喘的重重合靶点导入注释及可视化整合分析工具(DAVID,<https://david.ncifcrf.gov/>)进行GO和KEGG通路分析,获得显著富集且与哮喘相关的通路及生物学过程, $P<0.05$ 表示具有统计学意义。利用R软件绘制柱状图和气泡图。

**2.1.5 “关键活性成分-核心靶基因”多层次网络可视化** 将哮喘宁关键活性成分和关键靶基因对应关系导入Cytoscape 3.8.0软件,构建关键活性成分-关键靶基因网络,使用CentiScape计算活性成分度值DC,节点DC越大,代表该活性成分在网络中越

重要使用 Strawberry Perl 软件对 DC 值前 10 位的有效成分作为关键活性成分与 PPI 筛选出的核心靶基因进行处理,得到关键活性成分与核心靶基因对应关系,再次导入至 Cytoscape,构建“关键活性成分-核心靶基因”网络。

## 2.2 哮喘宁治疗支气管哮喘药理学实验验证

### 2.2.1 哮喘模型制备和分组干预

24 只 SD 大鼠随机分为 4 组:正常组、哮喘模型组<sup>[12]</sup>、布地奈德组、哮喘宁组。哮喘大鼠模型是于实验第 1 天予大鼠腹腔注射含 OVA(100 mg)和氢氧化铝(100 mg)的混合液 1 mL 致敏,2 周后每天雾化吸入 1%OVA 溶液激发 20 min(流量 2 mL·min<sup>-1</sup>),连续 14 d。正常组致敏和激发均以生理盐水替代,流程同哮喘模型组。从实验第 15 天开始布地奈德组每天激发前 2 min 予布地奈德雾化吸入,每次 30 min,给予生理盐水灌胃;哮喘宁组予哮喘宁颗粒最佳剂量(2.18 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)灌胃<sup>[13]</sup>,同时予生理盐水雾化吸入;正常组灌胃和雾化均以生理盐水,以上操作从第 15 天开始每日 1 次,连续 14 d。

### 2.2.2 HE 染色观察肺组织形态

给药 14 d 后,给予 2%戊巴比妥钠液腹腔注射麻醉(50 mg·kg<sup>-1</sup>)。取每组 6 只大鼠左侧肺组织以多聚甲醛灌注固定用于病理染色,随后将固定的肺组织行冠状面取材、修块、脱水、石蜡包埋。对肺组织的石蜡块进行连续冠状切片,片厚约 4 μm,进行常规 HE 染色;切片二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化、苏木素染色、盐酸-乙醇分化、

伊红染色、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、封片。光学显微镜下观察和记录各组肺组织细胞形态的变化。

### 2.2.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达

大鼠麻醉后,迅速打开胸腔,将大鼠中的右侧肺组织剥离,放置-80℃冰箱中备用。取肺组织进行组织蛋白提取和 BCA 浓度测定。将适量肺组织加入 RIPA 组织/细胞裂解液,利用超声粉碎机匀浆之后进行低温离心,获得上清液。配置 BCA 工作液,对肺组织进行浓度测定。配置 SDS-PAGE 胶、蛋白样品加样、电泳、电转、牛奶封闭、一抗孵育过夜(PI3K、Akt 1:1 000;β-actin 1:8 000)、TBST 水洗、二抗孵育、发光。最后获得的电泳条带图通过 Image J 软件对所测蛋白条带进行分析,用 β-actin 灰度值作为比较,对结果进行分析并计算相对表达。

### 2.2.4 统计学分析

应用 SPSS 22.0 软件统计,以  $\bar{x} \pm s$  表示。数据方差齐性较好时,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素 ANOVA 方差分析;方差不齐时,采用非参数检验进行比较。*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 哮喘宁治疗支气管哮喘的网络药理学分子机制分析

#### 3.1.1 哮喘宁活性成分与潜在靶点筛选

本研究共收集到哮喘宁的活性成分经计算机筛选及去重得到共 232 种活性成分,相应潜在靶点 4 687 个,各中药活性成分见表 1。

表 1 哮喘宁中 OB 前 10 化合物活性成分

Table 1 OB top 10 compound active ingredients in Xiaochuanning

中药	ID	名称	OB/%	DL
丹参	MOL007064	przewalskin b	110.32	0.44
丹参	MOL007132	(2R)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-[(Z)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acryloyl]oxy-propionic acid	109.38	0.35
黄芩	MOL002934	Neobaicalein	104.34	0.44
葶苈子	MOL003908	cynotoxin	99.94	0.78
甘草	MOL002311	glycyrol	90.78	0.67
丹参	MOL007140	(Z)-3-[2-[(E)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)viny]l]-3,4-dihydroxy-phenyl]acrylic acid	88.54	0.26
白芍	MOL001918	paeoniflorgenone	87.59	0.37
前胡	MOL013098	[(9R)-8,8-dimethyl-2-oxo-9,10-dihydropyrano[6,5-h]chromen-9-yl](Z)-2-methylbut-2-enoate	87.48	0.37
甘草	MOL004990	7,2',4'-trihydroxy-5-methoxy-3-aryl coumarin	83.71	0.27
甘草	MOL004904	licopyranocoumarin	80.36	0.65

#### 3.1.2 支气管哮喘的疾病靶点及哮喘宁-支气管哮喘交集靶点

通过在 GeneCards、OMIM、TTD、PharmGkb、DrugBank 等数据库检索,并结合相关文献取并集,共得到与支气管哮喘疾病相关人类靶点

共 2 959 个。利用 R 软件提取哮喘宁与支气管哮喘之间的共同靶点 233 个,绘制 Venn 图,这些靶点被认为是哮喘宁治疗支气管哮喘的潜在靶点,见图 1。

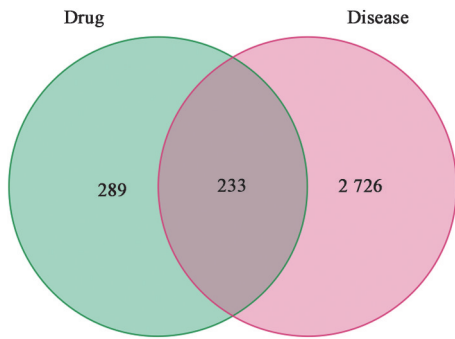


图1 哮喘宁治疗支气管哮喘的交集靶点  
Fig. 1 Intersection target of Xiaochuanning in the treatment of bronchial asthma

**3.1.3 PPI网络的构建及关键基因筛选** 将233个共同靶点导入STRING中,将结果导入Cytoscape软件中,利用Cytoscape软件中的CytoNCA插件得到各参数,根据各参数中位值进行首次筛选,分别为 $DC > 16$ ,  $BC > 90.785\ 517\ 62$ ,  $CC > 0.362\ 573\ 099$ ,  $EC > 0.032\ 780\ 182$ ,  $NC > 6.989\ 066\ 87$ ,  $LAC > 6$ ,结果显示共有53个中心节点和790个周边节点。再次筛选阈值为 $DC > 24$ ,  $BC > 14.690\ 056\ 51$ ,  $CC > 0.559\ 139\ 785$ ,  $EC > 0.101\ 642\ 795$ ,  $NC > 13.963\ 850\ 8$ ,  $LAC > 12$ ,第二次筛选结果为19个中心节点和224个周边节点,核心靶基因分别是EDN1、CREB1、CDKN1A、EGFR、MAPK14、转录因子激活蛋白-1(AP-1)家族成员JUN、抑癌基因(TP53)、信号转导及转录激活因子3(STAT3)、核转录因子- $\kappa$ B抑制因子 $\alpha$ (NFKB1A)、MAPK3、MAPK1、核蛋白转录因子(FOS)、NFKB1、Akt1、MAPK8、雌激素受体1(ESR1)、细胞周期蛋白D<sub>1</sub>(CCND<sub>1</sub>)、NF- $\kappa$ B转录因子家族(RELA)、酪氨酸蛋白激酶基因(SRC)。

**3.1.4 “药物关键活性成分-核心靶基因”网络** 将233个哮喘宁治疗支气管哮喘的靶基因与哮喘宁相关药物的活性成分使用Strawberry Perl软件进行数据处理,得到与哮喘宁治疗哮喘相关的232个有效活性成分。建立“药物关键活性成分-核心靶基因”文件,导入到Cytoscape,使用CentiScape计算活性成分DC值,见表2。再次使用Strawberry Perl软件对关键活性成分与PPI筛选出的核心靶基因进行处理,得到关键活性成分与核心靶基因对应关系文件,最后导入至Cytoscape,构建最终“关键活性成分-核心靶基因”网络,见图2。

**3.1.5 哮喘宁和支气管哮喘重合靶点GO与KEGG通路富集分析** 通过GO分析,共富集3333个细胞组分、分子功能和生物学过程,根据校正后P值进行排序,分别选择其前10个进行条形柱状图进行展

表2 哮喘宁核心活性成分DC值前10位

Table 2 Top 10 DCs for the core active ingredients of Xiaochuanning

来源	有效成分ID	名称	DC
柴胡	MOL000098	槲皮素	690
甘草	MOL000422	山柰酚	275
白芍	MOL000358	$\beta$ -谷甾醇	197
柴胡	MOL000449	豆甾醇	108
丹参	MOL000006	木犀草素	108
甘草	MOL004328	柚皮素	105
地龙	9066	胍	96
柴胡	MOL000354	异鼠李素	87
丹参	MOL007154	丹参酮II <sub>a</sub>	78
黄芩	MOL002714	黄芩素	66

注:展示DC值前10位

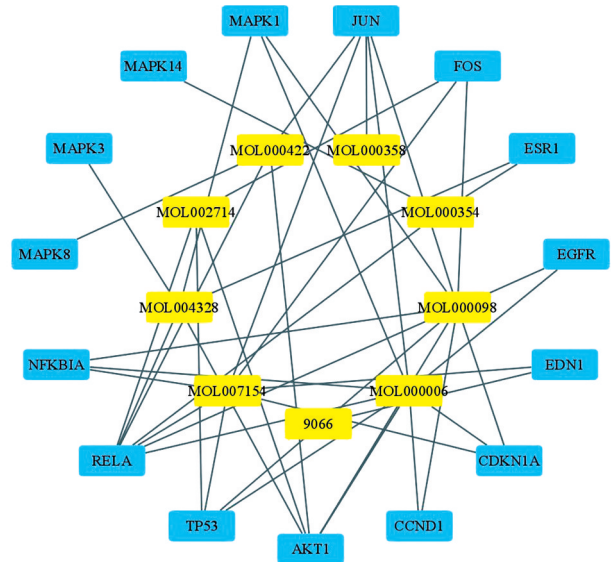


图2 “哮喘宁关键活性成分-核心靶基因”网络

Fig. 2 Network of "Key Active Ingredients of Xiaochuanning-Core Target Genes"

示。哮喘宁主要参与血红素结合、四吡咯化合物结合、核受体的结合、配体激活的转录因子活性、DNA结合转录因子结合、受体配体活性、信号受体激活物的活性、细胞因子受体结合、RNA聚合酶II-特异性DNA结合转录因子结合、类固醇结合等分子功能。参与机体对脂多糖、细菌源分子、药物、化学应激、氧化应激、活性氧代谢、营养水平、上皮细胞增殖的反应等生物学过程。

通过KEGG分析,共富集186条通路,根据校正后P值进行排序,选择前30个进行气泡图展示。KEGG通路富集显示,哮喘宁治疗支气管哮喘主要涉及丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、PI3K/Akt、肿瘤

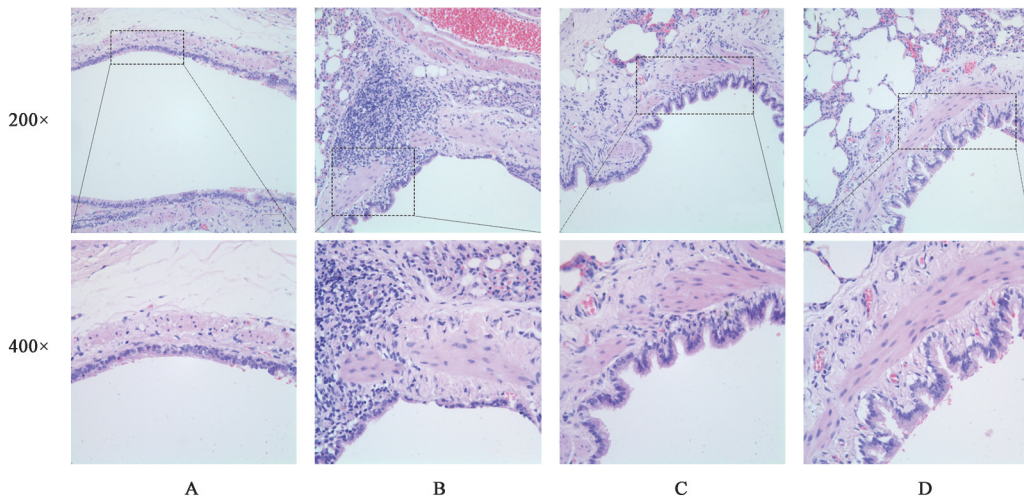
坏死因子(TNF)、白细胞介素-17(IL-17)、脂质和动脉粥样硬化、Th17细胞分化、化学致癌作用-受体激活等信号通路。

### 3.2 哮喘宁对哮喘大鼠模型的干预作用

#### 3.2.1 哮喘宁对哮喘大鼠模型肺组织形态学的影响

正常组大鼠肺组织内可见气道黏膜上皮结构完整,各层次结构排列整齐,无明显坏死及脱落,无明显的炎症细胞浸润,肺泡结构大致正常,肺泡隔较薄,间质未见纤维组织增生。哮喘模型组气道黏

膜上皮结构存在破损,气管管腔狭窄,伴有大量炎性细胞浸润,可见部分区域黏液腺、平滑肌增生,伴有部分黏膜下层充血、水肿。肺泡壁较正常组有明显增厚,肺泡腔缩小,肺泡数量增多。布地奈德组及哮喘宁组气道组织结构与模型组比较,组织病理学改变程度均有所不同程度的减轻,气道较狭窄,黏膜下层略有充血水肿,基本未见渗出,伴有炎细胞浸润,平滑肌略有增生,病变程度较模型组均减轻。结果见图3~图5。



注:A. 正常组;B. 哮喘模型组;C. 布地奈德组;D. 哮喘宁组(图4-图6同)

图3 哮喘宁对大鼠肺组织大气道形态学的影响(HE)

Fig. 3 Effect of Xiaochuanling granules on morphological in atmospheric tract of rats (HE)

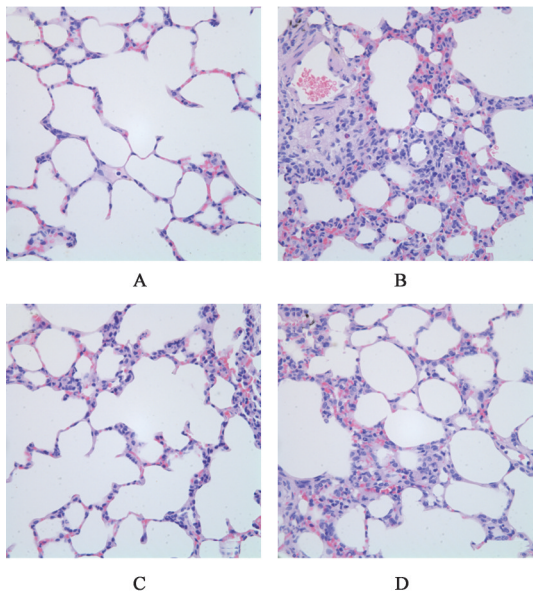


图4 哮喘宁对大鼠肺组织肺泡形态学的影响(HE,×400)

Fig. 4 Effect of Xiaochuanling granules on morphological in alveolar of rats (HE,×400)

#### 3.2.2 哮喘宁对模型大鼠肺组织PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组

PI3K、Akt蛋白表达显著增加( $P<0.01$ );与模型组比较,布地奈德组、哮喘宁组PI3K、Akt蛋白表达明显减少( $P<0.05$ )。说明布地奈德、哮喘宁均可抑制PI3K、Akt蛋白的表达。见表3、图6。

### 4 讨论

哮喘是多种细胞和细胞成分参与的一种气道慢性炎症性疾病,气道重塑是哮喘气道结构变化的统称,其特征是气道平滑肌(ASMCs)增生、杯状细胞增多和上皮下纤维化改变<sup>[14]</sup>。支气管哮喘可归属于中医学的“哮病”等范畴。医家根据哮喘发病机制可从“风、火、痰、瘀、郁、虚”的角度进行阐述,可分为虚哮和实哮<sup>[15]</sup>。随着生活节奏的加快,社会压力的增加,气机郁滞、肺气上逆可诱发哮喘。基于肝肺生理相关、病理相因理论,故应以调肝理肺为基本治法,哮喘宁为其代表方。

哮喘宁中“柴胡、白芍”取四逆散之意透邪解郁、疏解肝阳,“柴胡、半夏”取小柴胡汤之功和解少阳之枢,麻黄、地龙、前胡、葶苈子宣肺止咳平喘,枳壳行气推饮,黄芩、丹参透解郁热、清热祛痰。全方

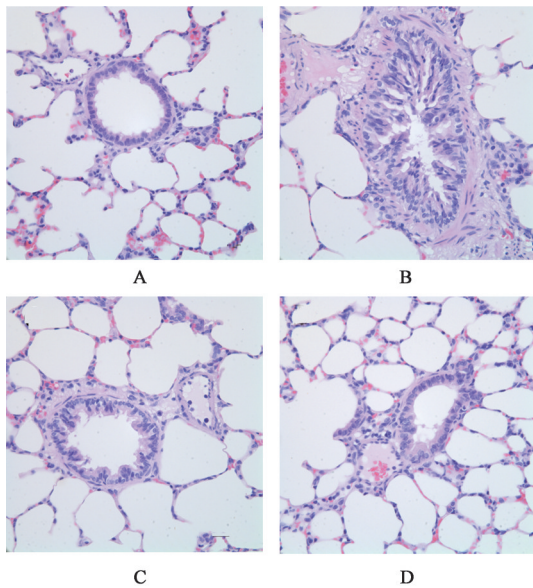


图5 哮喘宁对大鼠肺组织小气道形态学的影响(HE, ×400)  
Fig. 5 Effect of Xiaochuanling granules on morphological changes in alveolar of rats (HE, ×400)

表3 哮喘宁对大鼠肺组织PI3K、Akt蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )  
Table 3 Effect of Xiaochuanling granules on expression of PI3K and Akt protein in rats ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量	PI3K/ $\beta$ -actin	Akt/ $\beta$ -actin
正常组		0.728 1 $\pm$ 0.125 0	1.342 8 $\pm$ 0.353 8
模型组		1.115 1 $\pm$ 0.255 4 <sup>1)</sup>	1.902 4 $\pm$ 0.319 3 <sup>1)</sup>
布地奈德组	0.5 g·L <sup>-1</sup>	0.860 8 $\pm$ 0.165 9 <sup>2)</sup>	1.445 2 $\pm$ 0.328 1 <sup>2)</sup>
哮喘宁组	2.18 g·kg <sup>-1</sup>	0.881 7 $\pm$ 0.189 0 <sup>2)</sup>	1.502 1 $\pm$ 0.289 2 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.01;与哮喘模型组比较<sup>2)</sup>P<0.05

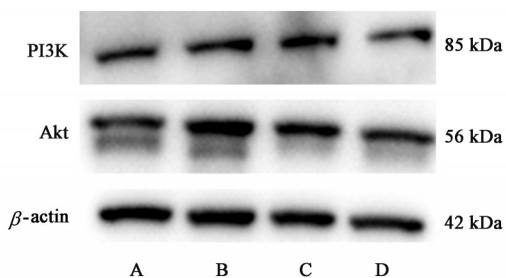


图6 各组大鼠肺组织PI3K、Akt蛋白表达电泳  
Fig. 6 Electrophoresis of PI3K and Akt protein in lung tissue

肝肺和合、气机升降相宜,枢机得利,喘咳自停<sup>[16-17]</sup>。前期课题组既往临床试验观察哮喘宁临床疗效显著;并通过动物实验探究哮喘宁的疗效机制,证实哮喘宁能够抑制豚鼠哮喘模型气道EOS的浸润和炎症细胞内c-Jun的阳性表达<sup>[7]</sup>;哮喘宁也可促进大鼠肺组织STAT1的磷酸化表达,并激活其信号传导通路,增强Th1而抑制Th2免疫应答<sup>[18]</sup>。

本研究采用网络药理学方法系统分析哮喘宁

治疗哮喘的潜在作用机制。通过TCMSP筛选得到哮喘宁活性成分232种,相应靶点基因4 687个;通过疾病数据库获得哮喘相关靶点2 959个。二者交集基因233个,即为哮喘宁治疗哮喘的潜在靶点。潜在靶点PPI网络分析显示,哮喘宁治疗哮喘的最重要靶点之一为Akt1;KEGG富集分析结果进一步显示,PI3K/Akt信号通路可能是哮喘宁治疗哮喘的潜在作用通路。PI3K属于脂质激酶家族,Akt是PI3K的直接下游效应体,PI3K/Akt/mTOR通路在细胞调控、增殖,生长、分化、凋亡、细胞大小、代谢和运动中发挥重要作用<sup>[19-22]</sup>。ASM已被确定为哮喘气道高反应的主要调节因素,与哮喘的严重程度密切相关,实验发现动物哮喘模型中miR-221可调节ASMCs细胞外基质中的胶原沉积,且生物信息学和Western blot数据分析均证实PI3K/Akt通路参与ASMC中的细胞外基质沉积<sup>[23]</sup>。另一重要的生物学过程是,气道炎症中的白细胞(如嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、巨噬细胞和T细胞)在趋化因子和其他趋化剂的作用下可迁移到炎症病灶,这种迁移已被证明依赖于PI3K的激活<sup>[24]</sup>。相关研究证实高山素通过调节PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B信号通路在支气管哮喘中表现出有效的抗炎活性<sup>[25]</sup>,可作为一种有前景的支气管哮喘治疗剂。

目前的哮喘疗法主要通过减弱ASM收缩和抑制气道炎症来预防和/或逆转ASM重构<sup>[26]</sup>。吸入皮质类固醇(ICS)和长效 $\beta$ 激动剂(LABAs)联合治疗仍是哮喘管理的主要药物治疗方法<sup>[27]</sup>。中医药具有多靶点、多信号、多系统的作用特点,在哮喘的治疗过程中发挥了重要作用。本研究运用网络药理学分析哮喘宁治疗哮喘的潜在关键靶点和信号通路,并通过动物实验进行了初步验证。实验研究采用OVA刺激和激发的方式诱导大鼠哮喘模型,实验结果显示哮喘宁方可明显减轻大鼠气道炎症反应和平滑肌增生,并显著降低PI3K、Akt1蛋白表达水平,PI3K/Akt信号通路可能是哮喘宁治疗哮喘的关键信号通路之一。综上所述,哮喘宁的多靶点作用可能通过调节PI3K/Akt信号通路的失衡,抑制肺组织炎症反应和气道结构重塑,从而发挥抗哮喘的作用。这些为哮喘宁的药理学作用机制提供了一定实验基础,也为进一步探讨中医药对哮喘的可能干预途径和防治哮喘的新药提供了新的研究思路。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] HUANG K, YANG T, XU J, et al. Prevalence, risk factors, and management of asthma in China: A national cross-sectional study [J]. *Lancet*, 2019, 394(10196):407-418.
- [2] STERN J, PIER J, LITONJUA A A. Asthma epidemiology and risk factors [J]. *Semin Immunopathol*, 2020, 42(1):5-15.
- [3] SOCKRIDER M, FUSSNER L. What Is Asthma? [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020, 202(9): p25-p26.
- [4] WANG Y, CHEN Y J, XIANG C, et al. Discovery of potential asthma targets based on the clinical efficacy of traditional Chinese medicine formulas [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 252(24): 112635.
- [5] YAN S F, YU T, LI F S, et al. Effectiveness and safety of 3 different traditional Chinese therapies for asthma in minors: A protocol for systematic review and network meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(47):e23021.
- [6] 崔红生, 武维屏, 赵燕荣, 等. 哮喘宁煎剂治疗支气管哮喘急性发作期的临床研究[J]. *北京中医药大学学报*, 1999, 22(1):57-60
- [7] 崔红生, 黄启福, 武维屏. 哮喘宁煎剂对哮喘豚鼠模型气道嗜酸细胞浸润的影响[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 1999, 22(8):495-496.
- [8] 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(16): 21146.
- [9] WAN Y, XU L, LIU Z, et al. Utilising network pharmacology to explore the underlying mechanism of Wumei Pill in treating pancreatic neoplasms [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1): 158.
- [10] LI X, HE P, HOU Y, et al. Berberine inhibits the interleukin-1 beta-induced inflammatory response via MAPK downregulation in rat articular chondrocytes [J]. *Drug Dev Res*, 2019, 80(5): 637-645.
- [11] LIU X, LIU X, QIAO T, et al. Identification of crucial genes and pathways associated with colorectal cancer by bioinformatics analysis [J]. *Oncol Lett*, 2020, 9(3):1881-1889.
- [12] 候丹, 黄帅阳, 吕明圣, 等. 桑梅止咳颗粒对咳嗽变异性哮喘大鼠气道炎症反应的作用及机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(2):62-66.
- [13] 单敏敏, 李长安, 崔红生. 哮喘宁颗粒对哮喘大鼠白三烯 B<sub>4</sub>、白三烯 C<sub>4</sub>、C-反应蛋白表达的调节作用[J]. *世界中西医结合杂志*, 2019, 14(1):1-3, 12.
- [14] FEHRENBACH H, WAGNER C, WEGMANN M. Airway remodeling in asthma: What really matters [J]. *Cell Tissue Res*, 2017, 367(3):551-569.
- [15] 李竹英, 陈璐, 王丽洁. 中药药对治疗支气管哮喘的研究进展[J]. *长春中医药大学学报*, 2021, 37(2): 451-455.
- [16] 武维屏, 崔红生. 试论支气管哮喘从肝论治的生理病理学基础[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2002, 8(10): 7-8.
- [17] 崔红生, 靳锐锋, 田彦. 情志因素与支气管哮喘证治探析[J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(3):771-773.
- [18] 单敏敏, 李长安, 崔红生. 哮喘宁颗粒对哮喘大鼠 Th1/Th2 平衡和 STAT1 通路调节作用的研究[J]. *中国医药导报*, 2019, 16(10):11-15.
- [19] MA B, ATHARI S S, MEHRABI NASAB E, et al. PI3K/Akt/mTOR and TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling inhibitors attenuate pathological mechanisms of allergic asthma [J]. *Inflammation*, 2021, 44(5): 1895-1907.
- [20] ATHARI S S. Targeting cell signaling in allergic asthma [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2019, 4(1):1-19.
- [21] 赵革, 张丹, 杨小会, 等. 丁香活性组分抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路诱导人结肠癌 HCT116 细胞凋亡的研究[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(5):1197-1204.
- [22] 刘小虎, 赵志慧, 周玥, 等. PI3K/Akt/mTOR 自噬通路在人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 延缓 D-gal 诱导的卵巢早衰小鼠模型卵巢早衰中的作用[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(24):6036-6042.
- [23] PAN J, YANG Q, ZHOU Y, et al. MicroRNA-221 modulates airway remodeling via the PI3K/Akt pathway in OVA-induced chronic murine asthma [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8(495):1-10.
- [24] CURNOCK A P, LOGAN M K, WARD S G. Chemokine signalling: Pivoting around multiple phosphoinositide 3-kinases [J]. *Immunology*, 2002, 105(2):125-136.
- [25] WU D, LI S, LIU X, et al. Alpinetin prevents inflammatory responses in OVA-induced allergic asthma through modulating PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B and HO-1 signaling pathways in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 89(Pt A):1-11.
- [26] ELLIOT J G, NOBLE P B, MAUAD T, et al. Inflammation-dependent and independent airway remodelling in asthma [J]. *Respirology*, 2018, 23(12):1138-1145.
- [27] SOBIERAJ D M, WEEDA E R, NGUYEN E, et al. Association of inhaled corticosteroids and long-acting  $\beta$ -agonists as controller and quick relief therapy with exacerbations and symptom control in persistent asthma: A systematic review and Meta-analysis [J]. *JAMA*, 2018, 319(14):1485-1496.

[责任编辑 张丰丰]