

UPLC-MS结合网络药理学及实验验证罗欧咳祖帕对哮喘气道重塑的作用

刘佳倪¹, 李莉^{1*}, 韩雪¹, 陈悦¹, 李玮¹, 刁娟娟²

(1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] **目的:**基于超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS)、网络药理学及实验验证探讨罗欧咳祖帕干预哮喘气道重塑的作用研究。**方法:**基于UPLC-MS指认罗欧咳祖帕中化学成分信息;借助中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)的口服利用度(OB)和类药性(DL)、SwissADME的Lipinski五规则及查阅文献筛选罗欧咳祖帕潜在有效成分;通过SwissTargetPrediction数据库筛选罗欧咳祖帕的成分靶点;利用在线人类孟德尔遗传目录(OMIM)、GeneCards、DrugBank及DisGeNET数据库获取哮喘气道重塑的相关靶点;利用STRING数据库对主要靶点进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)分析,通过DAVID数据库进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析;最后构建卵蛋白(OVA)诱导小鼠建立哮喘气道重塑模型,采用苏木素-伊红(HE)染色、过碘酸雪夫染色(PAS)染色、马松(Masson)染色观察肺组织病理情况,检测小鼠肺泡灌洗液(BALF)中炎症细胞,并用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠肺组织中蛋白的表达水平,进一步验证关键的信号通路。**结果:**UPLC-MS检测负离子模式下82个成分,正离子模式下74个成分;通过网络药理学研究共得到罗欧咳祖帕36个候选成分和578个预测靶点,并得到与哮喘气道重塑共同靶点173个,包括癸二酸、柳穿鱼黄素、柚皮素、芹菜素等关键化合物和蛋白激酶B1(Akt1)、低氧诱导因子1 α 重组蛋白(HIF1A)等潜在的作用靶点;KEGG富集分析预测罗欧咳祖帕主要通过磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)、HIF-1 α 、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等信号通路发挥抗哮喘气道重塑作用;动物实验表明,复方可减少哮喘小鼠气道杯状细胞增生,改善气道上皮胶原沉积情况,降低小鼠因OVA致敏激发而上调的磷酸化(p)-Akt/Akt、HIF-1 α 的相对表达水平($P<0.05$, $P<0.01$),与网络药理学结果相符。**结论:**采用UPLC-MS结合网络药理学的方法,初步明确了罗欧咳祖帕的化学组成及其干预哮喘气道重塑的潜在作用机制,罗欧咳祖帕可能通过以Akt1、HIF-1 α 为代表的核心靶点及以PI3K/Akt、HIF-1 α 通路为代表的多通路,起到协同干预哮喘气道重塑的作用,为罗欧咳祖帕后续进一步研究提供思路。

[关键词] 罗欧咳祖帕;哮喘气道重塑;网络药理学;超高效液相色谱-质谱联用

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)24-0087-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221219 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220729.1726.001.html>

[网络出版日期] 2022-08-01 11:22

Effect of Loki Zupa on Airway Remodeling in Asthma Based on UPLC-MS Combined with Network Pharmacology and Experimental Verification

LIU Jiani¹, LI Li^{1*}, HAN Xue¹, CHEN Yue¹, LI Wei¹, DIAO Juanjuan²

(1. School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

2. Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Loki Zupa on airway remodeling in asthma based on ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS) combined with network pharmacology and experimental verification. **Method:** The chemical constituents in Loki Zupa were identified

[收稿日期] 2022-02-26

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2018YFC1708303)

[第一作者] 刘佳倪,在读硕士,从事中药民族药的研究,E-mail:1127719019@qq.com

[通信作者] *李莉,博士,教授,博士生导师,从事中药民族药的研究,E-mail:llxjmu@163.com

by UPLC-MS. The potential active constituents of Loki Zupa were screened out based on literature retrieval, oral availability (OB) and drug-likeness (DL) in the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and Lipinski's rule of five in SwissADME. The constituent targets of Loki Zupa were obtained through the SwissTargetPrediction. The relevant targets of airway remodeling in asthma were screened out from Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), GeneCards, DrugBank, and DisGeNET. The STRING was used to conduct protein-protein interaction (PPI) among the main targets. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses were carried out through DAVID. Finally, an asthmatic airway remodeling model was induced by ovalbumin (OVA) in mice, followed by hematoxylin and eosin (HE), periodic acid Schiff (PAS), and Masson staining for the observation of the pathological conditions of lung tissues. The inflammatory cells in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of mice were detected. The protein expression levels in mouse lung tissues were detected by Western blot and key signaling pathways were further determined. **Result:** Eighty-two constituents were detected in the negative ion mode and 74 in the positive ion mode by UPLC-MS. Thirty-six candidate constituents and 578 predicted targets of Loki Zupa were screened out through network pharmacology, and 173 common targets with airway remodeling in asthma were obtained, including key compounds such as sebacic acid, pectolarigenin, naringenin, apigenin, and potential targets such as protein kinase B1 (Akt) 1 and hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α). As predicted by KEGG enrichment analysis, Loki Zupa mainly exerted the effect against airway remodeling in asthma through phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt, HIF-1 α , mitogen-activated protein kinase (MAPK), and other signaling pathways. Animal experiments showed that the compound formula of Loki Zupa could reduce the proliferation of airway goblet cells in asthmatic mice, improve the deposition of collagen under the airway epithelium, and decrease the up-regulated relative expression levels of phosphorylate(p)-Akt/Akt and HIF-1 α by OVA sensitization in mice ($P < 0.05$, $P < 0.01$), which was consistent with the results of network pharmacology. **Conclusion:** UPLC-MS combined with network pharmacology was used to preliminarily clarify the chemical composition of Loki Zupa and its underlying mechanism in intervention in airway remodeling in asthma. Specifically, Loki Zupa presumably synergistically intervened in airway remodeling in asthma through key targets represented by Akt1 and HIF-1 α , and multiple pathways represented by the PI3K/Akt and HIF-1 α pathways, which is expected to provide ideas for further research on Loki Zupa.

[Keywords] Loki Zupa; airway remodeling in asthma; network pharmacology; ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS)

罗欧咳祖帕是新疆地区民间的一种传统方剂,用于治疗气道疾病,例如咳嗽、哮喘和慢性支气管炎^[1-2]。方中神香草是唇形科神香草属植物的全草,分布在新疆北部,药用全草可解除支气管痉挛,具有镇咳作用^[3]。喜碱鸢尾根是鸢尾科鸢尾属植物的根茎,喜生于中国甘肃、新疆阿勒泰地区,其根茎主要用于化脓性疮疖,湿疹等^[4-6]。近几年,随着中医药在临床上的广泛应用,其多途径、多环节、多靶点治疗疾病的特点决定了在防治哮喘方面具有优势。罗欧咳祖帕民间用于治疗哮喘的经典方药,目前针对罗欧咳祖帕组成中单味药材为主的类似制剂开展了一些研究^[7-10],但缺乏对制剂本身的研究,前期研究表明罗欧咳祖帕可以调节辅助型T细胞(Th)1/Th2细胞因子的平衡降低哮喘小鼠模型气道炎

症^[11]。一项多中心、双盲、随机的临床试验也显示,罗欧咳祖帕对哮喘有确切疗效^[12]。有报道称,复方中主药神香草乙醇提取物通过抑制核转录因子- κ B (NF- κ B)炎症信号来预防支气管哮喘^[13],且罗欧咳祖帕的化学成分具有抗炎抗氧化能力^[14],以上研究提示罗欧咳祖帕治疗哮喘能发挥较为理想的疗效,但评估罗欧咳祖帕对慢性哮喘气道重塑影响的直接实验证据相对较少,气道重塑是哮喘的重要特征,由气道炎症长期作用,组织损伤导致,是哮喘反复发作、难以痊愈的根本原因。研究表明,哮喘气道重塑并非只发生在哮喘晚期,哮喘早期和轻度哮喘患者也存在气道重塑^[15-16],气道重塑在哮喘发病过程中的作用受到越来越多的重视。因此本研究基于超高液相色谱质谱联用技术(UPLC-MS)对罗

欧咳祖帕化学成分指认,引入网络药理学对其进行整体,多层次、多水平的研究,能够通过网络可视化初步预测罗欧咳祖帕的主要活性成分及干预哮喘气道重塑作用机制,最后通过开展体内实验对网络药理学筛选出的结果进行验证,初步证实罗欧咳祖帕干预哮喘气道重塑的药效机制,尽可能为临床治疗提供新思路。

1 材料

1.1 仪器 1290型UHPLC超高效液相色谱仪(美国Agilent公司),QExactive Focus型高分辨质谱(美国Thermo Fisher Scientific公司),ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)、Multiskan GO型Fisher全波长酶标仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司],PowerPac型电泳仪(美国Bio-Rad公司),GL-88B型涡旋仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),SK-O180E型摇床(美国Scilogex公司),FluorChem E Alpha型化学发光凝胶成像系统(美国Protein Simple公司),SA-YLS-8B型小动物雾化给药仪(江苏塞昂丝生物科技有限公司),BC-5000Vet型动物专用全自动血细胞分析仪(迈瑞医疗公司)。

1.2 药材与试剂 神香草、喜碱鸢尾根(新疆维吾尔药业有限责任公司,批号分别为Y1911044、YWG-YP-190225),经新疆医科大学药学院丛媛媛教授鉴定为唇形科神香草属植物硬尖神香草*Hyssopus cuspidatus*的全草,鸢尾科植物喜碱鸢尾*Iris halophila*的干燥根茎,标本保存于新疆医科大学药学院天药/生药教研室;兔蛋白激酶B(Akt)抗体、磷酸化(p)-Akt(Ser473)抗体、缺氧诱导因子(HIF)-1α抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体和羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G-辣根过氧化物酶(HRP)(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为60203-2-Ig、66444-1-Ig、20960-1-AP、10494-1-AP、SA00001-2);高效RIPA组织/细胞裂解液、BCA蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒、苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、过碘酸雪夫(PAS)染色试剂盒、马松(Masson)三色染色试剂盒(北京Solarbio试剂公司,批号分别为20210512、20210729、20210719、G1120、G1285、G1340),甲醇、乙腈(LC-MS级,德国CNW Technologies公司),L-2-氯苯丙氨酸(上海恒柏生物科技有限公司,纯度≥98%);卵清蛋白(OVA)、氢氧化铝(美国Sigma公司,批号分别为A5503、V900163)。

1.3 动物 60只SPF级BALB/c小鼠,7周龄,雌

性,其体质量为(18±22)g,购于新疆医科大学,合格证号SCXK(新)2018-0002,许可证号SYXK(新)2018-0003。自由取水,12h昼夜,饲养环境温度(20±5)℃,湿度为(50±10)%,实验前饲养1周,观察生长情况。本实验由新疆医科大学伦理委员会审核批准,编号IACUC-20210805-08。

2 方法

2.1 基于UPLC-MS检测罗欧咳祖帕化学成分

2.1.1 罗欧咳祖帕制备 将购买的神香草与喜碱鸢尾根分别放入粉碎机进行粉碎,粉末过100目筛,得到药粉。按照临床用药的配伍比例,采用水煎煮法制备罗欧咳祖帕提取液,将提取液中加入乙醇溶液,静置过夜,上清液滤过,取续滤液浓缩并干燥,得到罗欧咳祖帕提取物。

2.1.2 供试品溶液制备 精密称取罗欧咳祖帕提取物10.00 mg,加入70%甲醇100 μL,混匀,置冰水浴超声1 h,4℃静置1 h后将样本以12 000 r·min⁻¹离心15 min,收集上清液,经0.22 μm滤膜过滤后上机检测。

2.1.3 色谱条件 采用Agilent超高效液相色谱1290 UPLC系统,Waters UPLC BEH C₁₈柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)进行LC-MS/MS分析。流速0.4 mL·min⁻¹,进样量5 μL,流动相为0.1%甲酸水(A)-0.1%甲酸乙腈(B),梯度洗脱(0~3.5 min,95%~85%A;3.5~6 min,85%~70%A;6~6.5 min,70%A;6.5~12 min,70%~30%A;12~12.5 min,30%A;12.5~18 min,30%~0%A;18~25 min,0%A;25~26 min,0%~95%A;26~30 min,95%A)。

2.1.4 质谱条件 采用QExactive Focus质谱仪结合Xcalibur软件,基于IDA采集模式获取质谱和质谱/质谱数据。在每个采集周期中,m/z 100~1 500,筛选每个采集周期的前三名,进一步获得相应的MS/MS数据,护套气体流量45 arb,辅助气体流量15 arb,毛细管温度400℃,全MS分辨率70 000,MS/MS分辨率17 500,碰撞能量15/30/45 eV,喷雾电压4.0 kV(正)或-3.6 kV(负)。

2.1.5 数据处理 使用XCMS软件将质谱原始导入,进行保留时间校正、峰识别、峰提取、峰积分、峰对齐等工作,利用BIOTREE TCM二级质谱数据库匹配进行物质注释,算法打分的cut off值设为0.6。XCMS使用的方法是cent Wave,δ 10,峰宽5~20,SN是3,预过滤步骤:仅在包含至少3个强度≥1 000的峰时才会保留。计算色谱峰m/z中心的函数是wMean即峰的m/z值的强度加权平均值,有重叠保

留时间的峰所需的最小 m/z 维度差异-0.001。

2.2 网络药理学分析

2.2.1 罗欧咳祖帕候选成分及潜在靶点的预测

根据 UPLC-QE-MS 分析结果,通过中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)数据库以口服利用度(OB) $\geq 30\%$ 、类药性(DL) ≥ 0.18 的2个吸收、分布、代谢属性值为筛选条件进行首次筛选^[17-19],再将筛选得到的化合物通过 SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>)的 Lipinski 五规则检验^[20],最终确定为候选化合物;结合相关研究报告^[21-25],以能吸收入血、药理活性较确切为原则,但未符合筛选标准的成分,也纳入为候选活性成分中。利用 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载候选化合物的 SDF 格式文件,以“Probability>0”为筛选条件在 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 进行靶点预测,去重后合并所有成分靶点,并经 UniProt 平台 (<https://www.uniprot.org/>) 校正为标准基因名称。

2.2.2 罗欧咳祖帕治疗哮喘气道重塑的潜在靶点筛选

为了收集哮喘气道重塑潜在的靶点,以“Airway remodeling”及“asthma”为关键词,通过 DrugBank 数据库 (<https://go.drugbank.com>)、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <https://www.omim.org/>)、GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 及 DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>) 数据库,检索出相关疾病靶点。DrugBank 数据库^[26]中检索出目前临床上应用于治疗哮喘气道重塑的药物靶点;利用 OMIM 筛选出潜在哮喘气道重塑靶标;GeneCards 数据库及 DisGeNET 数据库基于科学文献等数据^[27-29];以结果相关性分数排序,以分值>2倍中位数为筛选条件,删除重复项,得到哮喘气道重塑高相关性疾病靶点。将筛选的候选成分靶点和疾病靶点利用微生信平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 分析,获得交集靶点。

2.2.3 成分-疾病靶点蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建

将获取的药物-疾病共有靶点导入 STRING 数据库 (<https://stringdb.org/>),物种设置为“homo sapiens”,置信度设置为 ≥ 0.9 ,获得靶标的相互作用关系^[30],以 TSV 格式保存,获得共有靶点蛋白互作网络关系,并导入 Cytoscape 3.7.2 进行拓扑分析,利用 Cytoscape 软件内置的拓扑分析插件 CytoNCA 限定 Degree ≥ 2 倍中位数,介度中心性及接近中心性值均 \geq 中位数,得到 PPI 核心网络。

2.2.4 靶点功能与通路的富集分析

将罗欧咳祖

帕治疗哮喘气道重塑的靶点录入 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) 数据库,选择研究背景为人,选择生物过程、细胞组成、分子功能及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路进行数据下载^[31-32],通过微生信平台进行可视化分析。

2.2.5 成分-靶点-通路网络图的构建

运用 Cytoscape 3.8.1 内置工具分析有效成分及靶点的网络拓扑参数,包括连接度、紧密度及介度等,并根据网络拓扑学参数判断发挥药效的主要活性成分,构建罗欧咳祖帕成分-哮喘气道重塑靶点-通路网络图。

2.3 动物实验验证

2.3.1 动物分组造模与给药

将小鼠随机分为5组($n=12$),分别为空白组、模型组、地塞米松组、罗欧咳祖帕低、高剂量组($4.55, 9.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,按照临床给药剂量换算)。除空白组外,其余各组制作小鼠哮喘模型,分别于第0、7、14天腹腔注射含 OVA $100 \mu\text{g}$ 和明矾 1 mg 的过敏原混悬液 0.2 mL ,第21至77天,除空白组其余各组隔天1次雾化5%OVA(空白组生理盐水雾化),同时罗欧咳祖帕低($4.55 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、高($9.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)剂量组,地塞米松组($0.005 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)灌胃给药。模型制备流程见增强出版附加材料。

2.3.2 小鼠肺泡灌洗液中细胞分类计数

小鼠在最后一次雾化24 h后,腹腔注射麻醉,摘眼球取血,每组小鼠中随机取6只,用75%乙醇进行常规消毒,剪开小鼠颈部外皮,找到支气管,在环形软管处剪出小口,插入留置针,加以固定,将预冷磷酸盐缓冲液(PBS) 1.6 mL 分2次注入肺中,不断按压肺部,缓慢回抽,收集小鼠肺泡灌洗液(BALF),以总回收率80%以上为合格。将回收后的 BALF $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $2\ 500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min (离心半径 8.5 cm ,下同),沉淀重悬置于全自动血细胞分析仪做细胞分类计数,每组未灌洗小鼠取左侧肺组织于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用,右侧肺组织固定用于病理染色。

2.3.3 肺组织学检查

固定后的肺组织依次进行脱水、浸蜡、包埋、将蜡块切成厚度为 $4 \mu\text{m}$ 的薄片,分别进行 HE、PAS、Masson 染色,观察小鼠气道壁、气道黏液分泌及气道上皮皮下胶原沉积情况。

2.3.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肺组织 Akt、p-Akt、HIF-1 α 蛋白表达

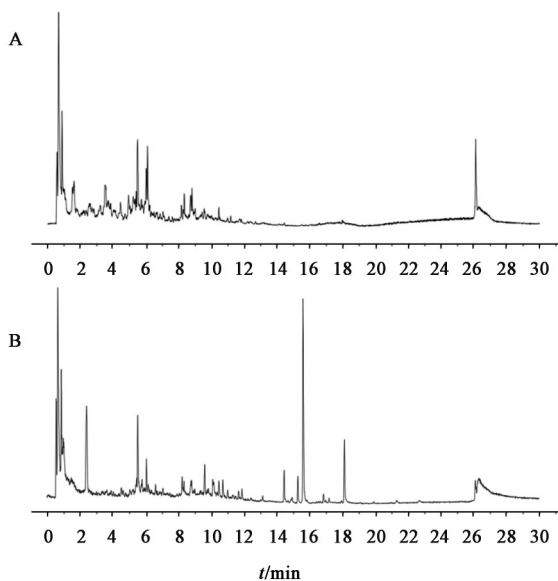
小鼠肺组织提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,各样品总蛋白量为 $50 \mu\text{g}$ 。制备8%的 SDS-PAGE 凝胶,取蛋白样品 $50 \mu\text{g}$ 上样,进行凝胶电泳, 300 mA 转膜 60 min 至 PVDF 膜上;5%的脱脂奶粉室温封闭 3 h ,PVDF 膜

浸泡于一抗孵育液(Akt 1:1万, p-Akt 1:5 000, HIF-1 α 1:5 000, GAPDH 1:2万)中4℃孵育过夜。二抗室温孵育1 h, TBST洗膜后用ECL发光试剂显色,于凝胶成像系统检测目的蛋白条带,采用Image J对蛋白条带进行定量分析。

2.4 统计学分析 采用SPSS 26.0统计软件进行分析,试验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。若数据符合正态分布,方差齐性,多组数据采用单因素方差分析(One way ANOVA),两两比较采用最小显著性差异法(LSD)进行分析,若数据方差不齐,则采Dunnett's T3法检验。

3 结果

3.1 主要化学成分 通过UPLC-MS技术分析得到罗欧咳祖帕总离子流,见图1,根据二级质谱匹配定性打分值,打分值越接近于1,代表匹配结果可信度越高,共筛选出156个化合物。负离子模式下化学成分类型主要有黄酮类22个、苯丙素类17个、酚类10个、萜类7个、苷类6个、有机酸类3个、生物碱类3个、环烯醚萜2个、糖类2个、酚酸类1个等;正离子模式下化学成分类型主要有:萜类22个、黄酮类14个、苯丙素类9个、生物碱类8个、苷类8个、酚类4个、香豆素类2个、倍半萜类2个、二萜类1个等。



注:A.负离子;B.正离子

图1 罗欧咳祖帕总离子流

Fig. 1 Total ion chromatogram of Loki Zupa

3.2 网络药理学分析

3.2.1 罗欧咳祖帕潜在成分筛选 将UPLC-MS得到的化学成分利用TCMSP数据库ADME过筛标准OB $\geq 30\%$ 及DL ≥ 0.18 , SwissADME数据库进行药代动力学参数评价,根据输出结果,对罗欧咳祖帕化

学成分进行筛选并通过查阅文献对其进行补充,共筛选出36个符合条件的潜在成分,主要类型有黄酮类、苷类、香豆素类、萜类、苯丙素类、生物碱类,具体信息见表1。

3.2.2 罗欧咳祖帕干预哮喘气道重塑潜在靶点收集 将罗欧咳祖帕候选成分预测的靶点,整理剔除重复项,共得到了578个靶点蛋白。根据2.2.2项下方法共获得哮喘气道重塑潜在靶点基因1 215个,将预测基因与疾病靶点基因映射以绘制韦恩图,即得到罗欧咳祖帕治疗哮喘气道重塑的交集靶点,见增强出版附加材料,由此可筛选得到罗欧咳祖帕治疗哮喘气道重塑交集靶点173个。

3.2.3 成分-疾病靶点PPI网络的构建及核心靶点筛选 将173个共同靶点导入STRING数据库中进行蛋白互作关系分析,该网络包括173个节点、341条边,平均Degree值为3.94,见增强出版附加材料,利用Cytoscape软件内置的拓扑分析插件CytoNCA限定Degree ≥ 8 、介度 $\geq 0.009 4$ 、紧密度 ≥ 0.273 ,得到PPI核心网络,自由度越大,表明该节点参与的生物功能越多;介数越大,说明该节点在网络中作用越大,线条代表靶点蛋白之间的联系,线条越多表示关联程度越大。最终筛选得到罗欧咳祖帕治疗哮喘气道重塑核心靶点27个,见增强出版附加材料、表2,表明罗欧咳祖帕的成分作用于多个靶点,且各靶点之间具有相互协同作用。

3.2.4 GO功能富集分析和KEGG富集分析

DAVID平台共富集894个GO条目,其中生物过程(BP)668个GO条目,细胞组成(CC)77个GO条目,分子功能(MF)149个GO条目,根据分析将各类GO条目按 $P\leq 0.05$ 进行筛选,取排名前10的条目,见增强出版附加材料。另外DAVID平台KEGG富集共得到160条通路,以 $P<0.05$ 为筛选条件并结合支气管哮喘气道重塑相关机制研究现状^[33-34],删去不相关通路选取前20条利用微生信平台进行气泡图绘制,见增强出版附加材料。罗欧咳祖帕主要参与酶结合、蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、内肽酶活性、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性、蛋白酶结合等分子功能。参与机体对药物、缺氧、血管收缩、脂多糖、细胞迁移、炎症反应、磷脂酰肌醇3-激酶(P13K)信号的正向调节、平滑肌细胞增殖、内皮细胞增殖的反应等生物学过程。与质膜的组成部分、膜筏、细胞表面、神经元细胞体、细胞外区、黏着斑等细胞组成有关;KEGG通路富集显示,罗欧咳祖帕治疗哮喘气道重塑主要涉及PI3K/Akt、MAPK、

表1 罗欧咳祖帕成分信息

Table 1 Information on active ingredients of Loki Zupa

No.	编号	分子式	化合物	类型	t_R/s	m/z	总分	OB/%	DL	Lipinski
1	MOL006472	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	橙黄决明 aurantio-obtusin	醌类及苷类	441.745	331.079 8	0.957 762	31.55	0.37	yes
2	MOL004564	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	山柰素 kaempferide	黄酮类	429.557	299.056 5	0.999 989	73.41	0.27	yes
3	MOL000422	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	山柰酚 kaempferol	黄酮类	417.218	285.040 5	0.999 959	41.88	0.24	yes
4	MOL005842	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	柳穿鱼黄素 pectolarigenin	黄酮类	593.546	313.071 4	0.999 889	41.17	0.30	yes
5	MOL003758	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	鸢尾黄酮乙素 iristectorigenin B	黄酮类及苷类	536.620	329.066 1	0.999 361	71.55	0.34	yes
6	MOL001735	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	高车前素 hispidulin	黄酮类	391.633	299.055 6	0.996 606	30.97	0.27	yes
7	MOL004328	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	柚皮素 naringenin	黄酮类	518.552	271.061 2	0.982 235	59.29	0.21	yes
8	MOL003648	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	山槐素(高丽槐素)inermin	黄酮类	421.559	283.060 2	0.933 298	65.83	0.54	yes
9	MOL002844	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	松属素 pinocembrin	黄酮类	591.693	255.065 9	0.862 097	64.72	0.18	yes
10	MOL001942	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	异欧前胡素 isoimperatorin	香豆素类	274.001	269.081 7	0.755 027	45.46	0.23	yes
11	MOL006821	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	表没食子儿茶素没食子酸酯 epigallocatechin-3-gallate	黄酮类	441.991	457.077 4	0.638 905	55.09	0.77	No
12	MOL002322	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	异牡荆素 isovitexin	黄酮类	324.505	431.097 7	0.630 854	31.29	0.72	yes
13	MOL001638	C ₂₀ H ₂₈ O ₆	佛波醇 phorbol	萜类	537.092	363.181 2	0.759 006	46.81	0.47	yes
14	MOL000354	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	异鼠李素 isorhamnetin	黄酮类	418.258	317.064 1	0.997 725	49.60	0.31	yes
15	MOL003404	C ₁₆ H ₁₀ O ₇	蟛蜞菊内酯 wedelolactone	苯丙素类	570.071	315.048 2	0.973 605	49.60	0.48	yes
16	MOL000417	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	毛蕊异黄酮 calycosin	黄酮类	826.918	285.075 4	0.999 963	47.75	0.24	yes
17	MOL000856	C ₃₂ H ₄₈ O ₆	泽泻醇 C-23-醋酸酯 alisol C- 23-acetate	萜类	537.536	529.347 7	0.998 120	33.06	0.83	yes
18	MOL000785	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄ ⁺	黄藤素 palmatine	生物碱	416.859	352.153 3	0.986 701	64.60	0.65	yes
19	MOL009047	C ₂₂ H ₂₆ O ₆	桉脂素 eudesmin	苯丙素类	609.422	425.134 2	0.938 216	33.29	0.62	yes
20	MOL001689	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	金合欢素 acacetin	黄酮类	710.992	285.074 8	0.922 972	34.97	0.24	yes
21	MOL010908	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	乌药醇 lindenenol	萜类	487.708	231.137 0	0.886 273	52.05	0.18	yes
22	MOL001592	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	胡椒碱 piperine	生物碱	194.175	305.184 8	0.665 843	42.52	0.23	yes
23	MOL002610	C ₁₅ H ₁₇ NO ₄	杜宾定 dubinidine	生物碱类	214.618	276.121 9	0.736 275	58.39	0.22	yes
24	MOL001454	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄ ⁺	小檗碱 berberine	生物碱类	420.697	336.122 0	0.719 135	36.86	0.78	yes
25	MOL010913	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	乌药醚内酯 linderane	倍半萜类	328.839	261.111 1	0.674 655	77.09	0.25	yes
26	MOL005088	C ₁₅ H ₂₀ O ₇	雪腐镰刀菌烯醇	萜类	105.177	313.126 9	0.686 726	35.28	0.68	yes
27	MOL005922	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₃	无梗五加 bacanthoside	苯丙素类	357.333	598.248 3	0.622 966	43.34	0.77	yes
28	MOL001790	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄	蒙花苷 linarin	黄酮类	424.774	593.183 9	0.947 520	39.84	0.71	yes
29	MOL009297	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	棕矢车菊素 jaceosidin	黄酮类	413.245	329.066 5	0.845 923	-	-	yes
30	MOL001302	C ₁₀ H ₁₈ O ₄	癸二酸 sebacic acid	脂肪酸	408.453	201.113 4	0.989 651	-	-	yes
31	MOL007425	C ₁₅ H ₂₄ O ₅	双氢青蒿素 dihydroartemisinin	萜类	480.391	283.154 7	0.889 503	50.75	0.30	yes
32	MOL003341	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	红景天苷 rhodioloside	酚类	389.097	299.112 8	0.792 400	-	-	yes
33	MOL007253	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	积雪草酸 asiatic acid	萜类	648.941	533.348 6	0.608 502	-	-	yes
34	MOL011865	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	迷迭香酸 rosmarinic acid	苯丙素类	365.55	359.077 1	0.990 568	-	-	yes
35	MOL000008	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	芹菜素 apigenin	黄酮类	475.788	271.059 1	0.977 128	-	-	yes
36	-	C ₂₂ H ₂₆ O ₆	白藜芦醇 quebrachitol	其他类	41.198	217.067 9	0.699 760	-	-	yes

注:Lipinski五规则为相对分子质量<500、脂水分配系数(Alog 2P)<5、氢键供体数(Hdon)<5、氢键受体数(Hacc)<10和旋转键(RBN)<10;罗欧咳祖帕化学成分符合Lipinski五规则,则输出结果为“yes”,反之则为“no”

表2 PPI网络拓扑分析核心靶点

Table 2 Core targets of PPI network topology analysis

名称	连接度	介度	紧密度
PIK3CA	23	0.081 060 65	0.352 435 53
Akt1	18	0.069 411 87	0.345 505 62
EGFR	18	0.091 089 20	0.366 071 43
RAC1	16	0.064 301 25	0.352 435 53
ITGB1	15	0.092 162 97	0.331 536 39
VEGFA	15	0.051 633 21	0.347 457 63
PLG	14	0.091 421 27	0.317 010 31
JUN	14	0.065 949 97	0.353 448 28
MAPK8	13	0.116 528 70	0.355 491 33
HDAC1	12	0.052 838 60	0.325 396 83
F2	12	0.051 086 62	0.298 543 69
JAK2	11	0.041 844 81	0.320 312 50
CYP3A4	11	0.131 033 63	0.271 523 18
MTOR	11	0.059 889 62	0.343 575 42
STAT1	10	0.087 356 03	0.343 575 42
IL-2	10	0.014 941 82	0.332 432 43
CDH1	10	0.047 669 15	0.327 127 66
JAK1	10	0.015 015 07	0.328 000 00
ERBB2	10	0.019 784 54	0.333 333 33
MMP9	9	0.049 668 44	0.315 384 62
CYP1A1	9	0.080 420 78	0.263 383 30
MAP2K1	9	0.014 316 51	0.305 970 15
HIF1A	9	0.038 648 49	0.319 480 52
EZR	9	0.061 479 65	0.297 101 45
TNF	8	0.019 132 82	0.306 733 17
PPARG	8	0.145 168 64	0.343 575 42
PRKCA	8	0.023 84 548	0.327 127 66

HIF-1 α 、肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素-17(IL-17)、血管内皮生长因子(VEGF)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)等信号通路。

3.2.5 成分-靶点-通路网络图构建 运用 Cytoscape 3.8.1 构建罗欧咳祖帕成分-哮喘气道重塑靶点-通路网络,通过 Cytoscape 3.8.1 内置的 Network Analyzer 分析罗欧咳祖帕治疗哮喘气道重塑网络拓扑学参数,得到核心成分见表3。

3.3 动物实验验证 根据 UPLC-MS 和网络药理学分析结果,结合哮喘研究前沿热点,提出罗欧咳祖帕可能通过调控 PI3K/Akt、HIF-1 α 通路,从而减缓哮喘气道重塑。因此,建立了 OVA 诱导哮喘小鼠气道重塑模型,给予罗欧咳祖帕,并对肺组织进行 HE、PAS、Masson 染色,观察病理情况,检测肺组织

表3 罗欧咳祖帕主要活性成分网络节点特征参数

Table 3 Characteristic parameters of network nodes of main active ingredients of Loki Zupa

MOL ID	名称	连接度	介度	紧密度
MOL001302	癸二酸	36	0.016 873 35	0.401 050 79
MOL005842	柳穿鱼黄素	34	0.010 801 28	0.405 309 73
MOL004328	柚皮素	34	0.014 814 14	0.401 050 79
MOL000785	黄藤素	34	0.014 358 49	0.395 509 50
MOL002844	松属素	33	0.014 431 53	0.402 460 46
MOL001592	胡椒碱	31	0.012 803 88	0.390 119 25
MOL001454	小檗碱	31	0.012 335 85	0.390 119 25
MOL001689	金合欢素	30	0.006 317 09	0.394 148 02
MOL001735	高车前素	29	0.006 183 81	0.396 880 42
MOL000008	芹菜素	29	0.006 003 23	0.396 880 42

中 PI3K/Akt 相关蛋白 Akt、p-Akt 及 HIF-1 α 蛋白水平来进行验证。

3.3.1 BALF 中炎症细胞分类及计数 与正常组比较,模型组小鼠 BALF 中的白细胞总数显著增加 ($P<0.01$);与模型组比较,罗欧咳祖帕和地塞米松能够不同程度地减少 BALF 中的白细胞数量 ($P<0.05$, $P<0.01$),但是罗欧咳祖帕高剂量组对 BALF 中的白细胞数量的影响较地塞米松组小。与正常组比较,模型组小鼠 BALF 中嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、中性粒细胞数量显著高于正常组 ($P<0.01$);与模型组比较,罗欧咳祖帕高剂量组和地塞米松组能够明显减少嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和中性粒细胞的数量 ($P<0.05$, $P<0.01$),见表4。

3.3.2 小鼠肺组织病理学 HE 染色结果见图2,与正常组比较,模型组的切片存在气道上皮的破坏与脱落,平滑肌的体积明显增加,并且还发现代表哮喘特征性改变的嗜酸性粒细胞出现大面积浸润的现象;与模型组比较后发现,治疗组上述症状均有不同程度改善。

Masson 染色结果表明见图2,与正常组比较,模型组有大量纤维状物被染成蓝色,代表有胶原纤维的广泛形成;另外发现气道平滑肌的肌纤维被染成红色,并且有明显增厚增多现象;与模型组比较后发现,其余3组治疗组病理改变(胶原沉积、气道平滑肌增厚)的程度有减轻改善。

PAS 染色结果表明见图2,与正常组比较,模型组小鼠气道上皮杯状细胞大量增生,管腔中黏液分泌较多,导致气道狭窄,与模型组相比,各给药组杯状细胞数目及管腔内黏液分泌减少,表明罗欧咳祖帕能减少哮喘小鼠气道上皮杯状细胞数目,改善气

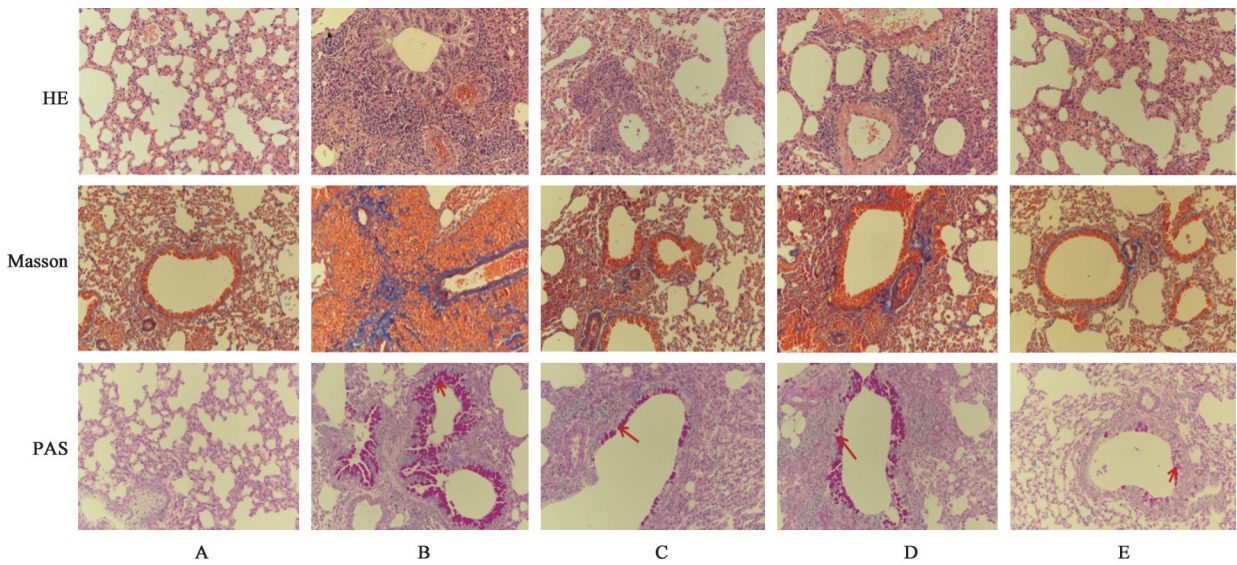
表4 BALF中炎症细胞计数($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Count of inflammatory cells in BALF ($\bar{x}\pm s, n=6$)

$\times 10^9/L$

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	WBC	Neu	Lym	Mon	Eos	Bas
正常组		0.42±0.15	0.12±0.05	0.12±0.05	0.03±0.01	0.13±0.07	
模型组		3.12±1.18 ²⁾	0.82±0.19 ²⁾	1.79±0.55 ²⁾	0.13±0.06 ¹⁾	0.80±0.13 ²⁾	0.02±0.01
罗欧咳祖帕高剂量组	9.1	1.96±0.66 ³⁾	0.32±0.17 ³⁾	1.05±0.29 ⁴⁾	0.08±0.05	0.50±0.22 ³⁾	0.01±0.01
罗欧咳祖帕低剂量组	4.55	1.89±0.51 ³⁾	0.28±0.12 ³⁾	0.99±0.26 ⁴⁾	0.10±0.02	0.40±0.11 ⁴⁾	0.01±0.01
塞米松组	0.005	1.37±1.24 ⁴⁾	0.29±0.14 ³⁾	0.48±0.44 ⁴⁾	0.08±0.11	0.18±0.06 ⁴⁾	0.02±0.01

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5同);WBC.白细胞计数;Neu.中性粒细胞计数;Lym.淋巴细胞;Mon.单核细胞比;Eos.嗜酸性粒细胞计数;Bas.嗜碱性粒细胞百分数



注:A.正常组;B.模型组;C.罗欧咳祖帕高剂量组;D.罗欧咳祖帕低剂量组;E.地塞米松组(图3同);黑色箭头为炎症细胞浸润,黄色箭头所指部位代表大量纤维状物被染成蓝色,红色箭头所指为杯状细胞增生部位

图2 罗欧咳祖帕对哮喘小鼠肺组织病理学的影响($\times 200$)

Fig. 2 Effect of Loki Zupa Prescription on lung tissue of asthmatic mice ($\times 200$)

道黏液分泌情况。

3.3.3 Western blot分析 Western blot对罗欧咳祖帕干预哮喘气道重塑关键信号通路上的蛋白进行验证。结果显示,与正常组比较,模型组的p-Akt/Akt、HIF-1 α 蛋白的相对表达水平显著增加($P<0.01$);与模型组比较,罗欧咳祖帕各剂量组及地塞米松组的p-Akt/Akt及HIF-1 α 蛋白的相对表达水平明显降低($P<0.05$ 、 $P<0.01$),综上说明罗欧咳祖帕可降低小鼠因OVA致敏激发而上调的p-Akt、HIF-1 α 的相对表达水平,验证了网络药理学预测结果,见图3和表5,罗欧咳祖帕可通过调节PI3K-Akt/HIF-1 α 信号通路改善哮喘小鼠。

4 讨论

气道重塑是支气管哮喘的重要特征,支气管哮喘患者由于气道炎症、组织损伤及随后的不正常修复导致的气道壁结构改变被称为气道重塑。研究

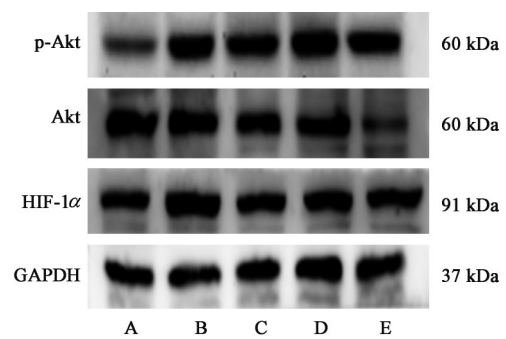


图3 各组小鼠肺组织Akt、p-Akt、HIF-1 α 蛋白的表达

Fig. 3 Expression of Akt, p-Akt and HIF-1 α protein in lung tissues of mice in each group

表明,哮喘气道重塑并非只发生在支气管哮喘晚期^[35],轻度支气管哮喘和重度支气管哮喘气道重塑表现没有明显差异^[36-37]。研究发现,嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞等炎性细胞浸润肺组织是引发哮喘过敏的主要原因^[38]。嗜酸性粒细胞活化后

表5 各组小鼠肺组织 p-Akt/Akt、HIF-1 α 蛋白的表达 ($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 5 Expression of p-Akt/Akt and HIF-1 α protein in lung tissues of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	HIF-1 α /GAPDH	p-Akt /Akt
正常组		0.68 \pm 0.12	0.50 \pm 0.09
模型组		1.59 \pm 0.31 ²⁾	1.43 \pm 0.79 ²⁾
罗欧咳祖帕高剂量组	9.1	0.89 \pm 0.28 ⁴⁾	0.85 \pm 0.37 ³⁾
罗欧咳祖帕低剂量组	4.55	1.00 \pm 0.51 ⁴⁾	1.00 \pm 0.48
塞米松组	0.005	0.79 \pm 0.42 ⁴⁾	0.57 \pm 0.22 ⁴⁾

可释放大量碱性蛋白、白三烯和自由基等诱导肺泡和气管上皮细胞凋亡,引起气道结构重塑,使气管渗出物和黏液分泌物增多^[39-40],因此抑制和减少哮喘患者肺内炎性细胞浸润是防治和缓解哮喘发作的策略之一。本研究结果发现,罗欧咳祖帕高、低剂量组可使哮喘小鼠肺泡灌洗液中淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞计数显著减少;且罗欧咳祖帕可改善小鼠肺组织病理变化,使哮喘小鼠肺组织的气道重塑及肺泡损伤明显缓解,表明罗欧咳祖帕对哮喘小鼠的气道重塑具有较好的抑制作用。

为了进一步分析罗欧咳祖帕治疗哮喘气道重塑的潜在作用机制,研究采用UPLC-MS联合网络药理学方法,分析结果表明,通过筛选得到罗欧咳祖帕潜在活性成分37个,相应靶点基因578个;通过疾病数据库获得哮喘相关靶点1215个,二者交集基因173个,即为罗欧咳祖帕治疗哮喘的潜在靶点,潜在靶点PPI网络分析显示,罗欧咳祖帕治疗哮喘的核心靶点有Akt1、HIF-1 α 等;KEGG富集分析结果进一步显示,PI3K/Akt、HIF-1 α 等信号通路可能是罗欧咳祖帕治疗哮喘气道重塑的潜在作用通路;综合成分-靶点-疾病网络关键成分和罗欧咳祖帕公开报道的化学成分筛选出癸二酸、柳穿鱼黄素、柚皮素、黄藤素等10个可能的关键成分。故为了验证网络药理学预测结果中罗欧咳祖帕多成分、多靶点治疗哮喘气道重塑,选取罗欧咳祖帕和核心靶点及相关通路作为研究目标,进一步用体内实验加以验证。

PI3K属于脂质激酶家族,Akt是PI3K的直接下游效应体PI3K/Akt通路在细胞调控、增殖、生长、分化、凋亡、细胞代谢和运动中发挥重要作用^[41-42]。有研究表明使Akt去磷酸化来阻断PI3K/Akt通路,可减少缺氧诱导因子HIF-1 α 和血管内皮生长因子(VEGF)的表达,从而降低呼吸道黏膜的通透性,抑制呼吸道水肿和收缩,使血管黏液分泌减少,降低

卵蛋白诱导的气道重塑^[43]。PI3K/Akt信号通路在哮喘发病中至关重要,对气道炎症、气道重塑等哮喘症状的发生有明显的促进作用^[44],哮喘可激活体内的缺氧反应通路,其中HIF-1 α 是介导缺氧反应的重要因子,其能促进炎症并诱导与气道重塑相关基因的活化,参与胶原蛋白合成、纤维化和成纤维细胞增殖,导致炎症细胞浸润增加、纤维化增加^[45]。因此,通过阻断PI3K/Akt/HIF-1 α 途径可能是干预哮喘气道重塑的重要途径,本研究罗欧咳祖帕可降低小鼠因OVA致敏激发而上调的p-Akt、HIF-1 α 的相对表达水平从而影响PI3K/Akt/HIF-1 α 信号途径。

综上所述,罗欧咳祖帕的多靶点作用可能通过调节PI3K/Akt、HIF-1 α 信号通路的失衡,抑制肺组织炎症反应及气道重塑,从而发挥抗哮喘的作用。该结论为罗欧咳祖帕治疗哮喘气道重塑的作用机制、物质基础及临床应用研究提供了理论及实验依据,然而存在的问题是单纯利用网络模型、与数据分析无法完全评价罗欧咳祖帕的物质基础,故仍需进一步实验加以证实,挖掘该方中专属的质量标志物(Q-Marker),寻找新疆特色药材的独特的化学成分,这些Q-Marker是否在已知的富集通路上具有高效的抗哮喘活性是后续重点展开的研究内容。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 买买提江·阿布都瓦克,阿卜杜麦吉提·阿卜杜喀迪尔,阿曼古丽·艾则孜,等. 维吾尔医治疗哮喘制剂罗欧咳祖帕的研究概况[J]. 新疆医学,2017,47(2): 123-128.
- [2] MOHAMMADTURSUN N, LI Q, ABUDUWAKI M, et al. Loki zupa alleviates inflammatory and fibrotic responses in cigarette smoke induced rat model of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Chin Med, 2020,15:92.
- [3] 谷会青,张洪平,侯亚申,等. 神香草挥发油对急性炎症的作用[J]. 医药导报,2019,38(9):1163-1166.
- [4] 杨丽华,李湘玉,姜红宇,等. 华夏鸢尾中化学成分的研究[J]. 广东化工,2019,46(19):28,10.
- [5] 喀力比努尔·吾拉木,乃比江·麦图荪,帕提古丽·阿布都拉,等. 喜碱鸢尾根化学成分的LC-ESI-Q-TOF-MS/MS分析[J]. 现代中药研究与实践,2019,33(6): 19-23.
- [6] 杨阳,董晓芳,申美伦,等. 膜苞鸢尾和中亚鸢尾中抑制脂多糖诱导小鼠RAW264.7细胞产生NO的活性成分研究[J]. 中草药,2018,49(23):5503-5509.
- [7] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志:

- 第66卷[M].北京:北京科学出版社,1977:242-243.
- [8] VENDITTI A, BIANCO A, FREZZA C, et al. Essential oil composition, polar compounds, glandular trichomes and biological activity of *Hyssopus cuspidatus* subsp. *aristatus* (Godr.) Nyman from central Italy [J]. *Ind Crops Prod*, 2015, 77: 353-363.
- [9] 谷会青,张洪平,侯亚申,等. 神香草挥发油对急性炎症的作用[J]. *医药导报*, 2019, 38(9): 1163-1166.
- [10] 阿勒腾图娅,姜敏,郭玉婷,等. 神香草挥发油抗氧化能力和血管舒张作用及其机制研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2016, 28(4): 579-585.
- [11] WEI Y, ABDUWAKI M, LI M, et al. Loki zupa (Luoukezupa) decoction reduced airway inflammation in an OVA-induced asthma mouse model [J]. *Chin Med*, 2016, 11: 22.
- [12] LV Y, WEI Y, ABDUWAKI M, et al. A Multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study of the effects of Loki zupa in patients with chronic asthma [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 351.
- [13] YUAN F, LIU R, HU M, et al. JAX2, an ethanol extract of *Hyssopus cuspidatus* Boriss, can prevent bronchial asthma by inhibiting MAPK/NF- κ B inflammatory signaling [J]. *Phytomedicine*, 2019, 57: 305-314.
- [14] 李玮,李莉,王晓梅,等. 复方罗欧咳祖帕中总多酚总黄酮的含量测定与抗氧化活性研究[J]. *新疆医科大学学报*, 2021, 44(7): 842-845.
- [15] VETERINARY M-S, ANIMAL P, STUDIES FROM J E TRZIL, et al. Add new findings in the area of small animal practice (Feline asthma: Diagnostic and treatment update) [J]. *Veterinary Week*, 2020.
- [16] WILSON S J, RIGDEN H M, WARD J A, et al. The relationship between eosinophilia and airway remodelling in mild asthma [J]. *Clin Exp Allergy*, 2013, 43(12): 1342-1350.
- [17] YANG R, YANG H, WEI J, et al. Mechanisms underlying the effects of lianhua qingwen on sepsis-induced acute lung injury: A network pharmacology approach [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 717652.
- [18] JI S, XU F, ZHU R, et al. Mechanism of Yinquin oral liquid in the treatment of chronic pharyngitis based on network pharmacology [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 4413-4421.
- [19] 许海玉,黄璐琦,卢鹏,等. 基于体内ADME过程和网络药理学的中药现代研究思路[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(2): 142-145.
- [20] DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42717.
- [21] 陈悦,闫俊林,刘佳倪,等. 罗欧咳祖帕复方的血清药物化学研究[J]. *中南药学*, 2022, 20(4): 772-778.
- [22] 吴明亮,王志英,孙光胜,等. 红景天苷抑制哮喘小鼠气道重塑及其机制研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 35(14): 1453-1455.
- [23] 王子健,庄作会,刘春霞. 积雪草酸通过调控PI3K/Akt/mTOR信号通路抑制A549细胞的增殖和迁移 [J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(21): 4827-4830.
- [24] 李红岩,张业清,肖庆龄,等. 芹菜素对哮喘小鼠肺组织OX40表达、气道炎症和气道高反应性的影响 [J]. *江苏医药*, 2016, 42(6): 621-624, 封2.
- [25] 明丹,郑荣秀. 白藜芦醇对过敏性哮喘小鼠的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(5): 536-539.
- [26] WISHART D S, FEUNANG Y D, GUO A C, et al. DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46 (D1): D1074-D1082.
- [27] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54: 1. 30. 1-1. 30. 33.
- [28] PIÑERO J, RAMÍREZ-ANGUITA J M, SAÜCH-PITARCH J, et al. The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1): D845-D855.
- [29] 依木然·马瑞士,陈春丽,开沙尔江·买买提吐逊,等. 基于网络药理学和实验验证探讨阿里红治疗阿尔茨海默病的作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(11): 173-183.
- [30] SZKLARCZYK D, GABLE A L, NASTOU K C, et al. The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D605-D612.
- [31] MARTUCCI D, MASSEROLI M, PINCIROLI F. Gene ontology application to genomic functional annotation, statistical analysis and knowledge mining [J]. *Stud Health Technol Inform*, 2004, 102: 108-131.
- [32] KANEHISA M, FURUMICHI M, TANABE M, et al. KEGG: New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45 (D1): D353-D361.
- [33] 李竹英,孙丽丽,王婷,等. 中药对哮喘气道重塑相关蛋白作用的实验研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(3): 208-213.
- [34] 邹璐,孙祝美,郭春荣,等. 中医药防治支气管哮喘气

- 道重塑相关信号通路研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(11): 5057-5060.
- [35] MALMSTRÖM K, PELKONEN A S, MALMBERG L P, et al. Lung function, airway remodelling and inflammation in symptomatic infants: Outcome at 3 years[J]. *Thorax*, 2011, 66(2): 157-162.
- [36] 潘亦林, 朱燕亭, 李满祥. 支气管哮喘气道重塑的研究进展[J]. 中华肺部疾病杂志: 电子版, 2015, 8(6): 97-100.
- [37] 邹璐, 孙祝美, 郭春荣, 等. 中医药防治支气管哮喘气道重塑相关信号通路研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(11): 5057-5060.
- [38] 吴巧珍, 汤颖, 张剑峰, 等. 甘草酸对支气管哮喘小鼠气道炎症的影响机制[J]. 中华医学杂志, 2014, 94(42): 3338-3344.
- [39] VENTURINI C L, MACHO A, ARUNACHALAM K, et al. Vitexin inhibits inflammation in murine ovalbumin-induced allergic asthma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 143-151.
- [40] 李海龙, 罗庆波, 何静江, 等. 大蒜素对哮喘小鼠肺组织 p38MAPK、PI3K、Akt 及 VEGF 表达水平的影响[J]. 中药药理与临床, 2018, 34(3): 43-46.
- [41] MA B, ATHARI S S, MEHRABI NASAB E, et al. PI3K/Akt/mTOR and TLR4/MyD88/NF- κ B signaling inhibitors attenuate pathological mechanisms of allergic asthma[J]. *Inflammation*, 2021, 44(5): 1895-1907.
- [42] ATHARI S S. Targeting cell signaling in allergic asthma[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2019, 4: 45.
- [43] DAHLIN A, QIU W, LITONJUA A A, et al. The phosphatidylinositide 3-kinase (PI3K) signaling pathway is a determinant of zileuton response in adults with asthma[J]. *Pharmacogenomics J*, 2018, 18(5): 665-677.
- [44] 吕伟伟, 郑锐, 谭明旗. PI3K/Akt 信号通路在哮喘气道重塑中的研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(15): 2961-2965.
- [45] 牛晓婷, 胡红, 刘巧维, 等. 支气管哮喘大鼠缺氧诱导因子-1 α 及血管内皮生长因子的表达研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2015, 38(8): 625-626.

[责任编辑 顾雪竹]