基于网络药理学和细胞实验探讨玉屏风散治疗慢性阻塞性肺病的作用机制

丁　敏，　何　芳*，　鲍　敏，　姜　维
（武汉市第三医院呼吸与危重症医学科，湖北 武汉 430060）

摘要：目的　基于网络药理学和细胞实验探讨玉屏风散治疗慢性阻塞性肺病的分子机制。**方法**　利用 TCMSP 数据库收集玉屏风散的活性成分和作用靶点，CTD、GenCLip3、DisGeNET、GeneCards 数据库获取慢性阻塞性肺病的相关靶点，STRING 网站构建蛋白互作网络，DAVID 进行 GO、KEGG 通路分析，Cytoscape 软件构建“成分-靶点-通路”网络。将 BEAS-2B 细胞分为对照组、模型组和槲皮素低、中、高剂量组，CCK-8 法检测细胞存活率，流式细胞术检测细胞凋亡率，ELISA 法检测细胞上清液 IL-1β、TNF-α、IL-6、CRP、PICP、ICTP 水平，RT-qPCR 法检测细胞 *Akt*1、*CASP*3、*CCL*2、*CXCL*8、*CCND*1、*EGFR* mRNA 表达，Western blot 检测细胞 TGF-β、Akt、MAPK1 蛋白表达。**结果**　共获取活性成分 41 种、相关靶点 215 个，玉屏风散与慢性阻塞性肺病共有靶点 74 个，核心靶点为 Akt1、CASP3、CCL2、CXCL8、CCND1、EGFR 等。KEGG 通路分析筛选了 152 条信号通路，IL-17 信号通路、PI3K/Akt 信号通路、TNF 信号通路、MAPK 信号通路、HIF-1 信号通路、Toll 样受体信号通路等可能在治疗慢性阻塞性肺病的过程中发挥关键作用。细胞实验表明，槲皮素能促进慢性阻塞性肺病细胞增殖，抑制细胞凋亡，降低炎症因子 IL-1β、TNF-α、IL-6 和细胞外基质损伤相关因子 CRP、PICP、ICTP 水平，核心靶点 *Akt*1、*CASP*3、*CCL*2、*CXCL*8、*CCND*1、*EGFR* mRNA 表达，以及 TGF-β、Akt、MAPK1 mRNA 和蛋白表达。**结论**　玉屏风散可能通过多成分、多靶点、多通路治疗慢性阻塞性肺病。

关键词：玉屏风散；慢性阻塞性肺疾病；槲皮素；炎症因子；细胞外基质；网络药理学；细胞实验
中图分类号：R285.5；R966　　**文献标志码：**B　　**文章编号：**1001-1528(2024)07-2407-08
doi：10.3969/j.issn.1001-1528.2024.07.048

慢性阻塞性肺病实质是一种慢性气道炎症性疾病，主要表现为持续及进行性加重的气流受限及通气功能障碍[1-2]，其被认为是影响全球死亡率和发病率的主要原因之一，给社会造成了巨大的经济负担[3]。研究表明，气道重构是慢性阻塞性肺病主要病理特点之一，能引起气道阻塞和肺功能减退[4]，而细胞外基质的改变是导致慢性阻塞性肺病气道重构的主要病理特点[5]。因此，研究细胞外基质的病理机制对慢性阻塞性肺病的治疗具有重要意义。

玉屏风散出自元代朱丹溪所著《丹溪心法》，由防风、黄芪、白术等组成，常用于治疗急性上呼吸道感染、过敏性鼻炎、支气管哮喘、慢性阻塞性肺病等多种呼吸道疾病[6]。目前研究表明，临床上玉屏风散对慢性阻塞性肺病有一定治疗效果，但其具体机制尚不明确。因此，本研究通过网络药理学预测玉屏风散治疗慢性阻塞性肺病的潜在成分、靶点和通路；从中药复方中选择主成分药物的活性成分进行细胞实验，并构建慢性阻塞性肺病细胞模型，以活性药物处理，检测其对细胞存活率、凋亡、炎症因子、细胞外基质水平及靶点基因、蛋白表达的影响，阐明该方治疗慢性阻塞性肺病的潜在机制，为临床相关治疗提供更多的理论依据和方法。

1　材料

1.1　细胞与试剂　人正常肺上皮细胞 BEAS-2B（中国科学院上海细胞库）。槲皮素（上海源叶生物科技有限公司）。气管上皮细胞培养基（瑞士 Lonza 公司）。PBS、0.25% 胰蛋白酶、CCK8、十二烷基硫酸钠、TEMED、过硫酸铵、Tween-20、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA（强）组织细胞快速裂解液（北京索莱宝科技有限公司）；胎牛血清（美国 Gibco 公司）；IL-1β、TNF-α、IL-6、CRP、PICP、ICTP 酶联免疫试剂盒，TGF-β、Akt、MAPK、GAPDH 抗体，HRP 标记山羊抗兔 IgG（武汉贝茵莱生物科技有限公司）；AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒（美国 BD 公司）；TRIzol（美国 Ambion 公司）；SYBR FAST qPCR Master Mix（美国 KAPA Biosystems 公司）；逆转录试剂盒（日本 TaKaRa 公司）；氯仿、异丙醇、无水乙醇（国药集团化学

收稿日期：2022-09-07
基金项目：武汉市卫健委医学科研项目（WZ20C24）
作者简介：丁　敏（1982—），女，硕士，主治医师，从事肺恶性肿瘤、慢性阻塞性肺病、内镜下介入治疗研究。Tel：（027）68894870，E-mail：dingmin_ 0013011@163.com
＊**通信作者：**何　芳（1979—），女，硕士，主治医师，从事支气管哮喘研究。Tel：（027）68894870，E-mail：hefangwh1127@163.com
网络出版日期：2023-06-27
网络出版地址：http：//kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20230627.0916.002.html.

试剂有限公司）；蛋白质 Marker（美国 Helix 公司）；PVDF 转移膜、化学发光试剂（美国 Millipore 公司）。

1.2　仪器　CO_2 恒温培养箱（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；倒置荧光显微镜（德国 Leica 公司）；超微量分光光度计、高速冷冻离心机（杭州奥盛仪器有限公司）；流式细胞仪（杭州艾森生物有限公司）；PCR 仪（杭州柏恒科技有限公司）；光定量 PCR 仪、电泳仪（美国 Bio-Rad 公司）；酶标仪（芬兰雷勃公司）；全自动化学发光分析仪（上海天能科技有限公司）。

2　方法

2.1　玉屏风散有效活性成分及靶点预测　在 TCMSP（http：//tcmspw.com/tcmsp. php，version 2.3）数据库中查找玉屏风散主要成分，以口服生物利用度（OB）≥30%、药物相似性（DL）≥0.18 为筛选标准，检索活性成分对应的靶点，利用 UniProt 数据库将其转换为基因，即为预测靶点。

2.2　网络药理学分析　利用 CTD（http：//ctdbase. org）、GenCLip3（http：//ci. smu. edu. cn/genclip3/analysis. php）、DisGeNET（https：//www. disgenet. org/home）、GeneCards（https：//www. genecards. org）数据库查找慢性阻塞性肺病相关靶点，取并集作为预测靶点。取玉屏风散和慢性阻塞性肺病预测靶点的交集，作为共有预测靶点，使用 STRING 网站分析蛋白互作关系，DAVID 进行 GO、KEGG 分析，将物种设置为人（*Homo sapiens*），以 $P<0.05$ 为标准确定功能及重要通路，并进行注释和分析。再将活性成分、靶点及 KEGG 通路分析中与炎症和免疫相关的通路导入 Cytoscape 3.7.0 软件，构建“成分-靶点-通路”网络图。

2.3　细胞培养　BEAS-2B 细胞移到气管上皮细胞培养基中，置于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养，当其生长达到融合度 80%～90% 时用 0.25% 胰蛋白酶在 37 ℃下消化，按1∶2 比例传代培养。

2.4　慢性阻塞性肺病细胞模型构建　点燃 4 支香烟，使烟雾溶于 10 mL PBS 中，以 0.22 μm 混合纤维素微孔滤膜正压过滤除菌，pH 调节至 7.4，提取物浓度设定为 100%。分别用 0、1%、2.5%、5%、10% 香烟提取物处理 BEAS-2B 细胞 12、24、48 h[7]，构建慢性阻塞性肺病模型，采用 CCK-8 法检测细胞生存情况，筛选出提取物最佳作用浓度和时间分别为 5%、24 h。

2.5　玉屏风散有效活性成分槲皮素对 BEAS-2B 细胞的毒性实验　用 0、2.5、40、80 μg/mL 槲皮素干预 12、24、48 h后收集细胞[8]，CCK-8 法检测其不同质量浓度和干预时间对细胞活力的影响，筛选出两者分别为 5、10、20 μg/mL和 24 h。

2.6　细胞分组及处理　将细胞分为对照组、模型组和槲皮素低、中、高剂量组，对照组细胞正常培养，不做任何处理；模型组按“2.4”项下方法构建模型；槲皮素低、中、高剂量组先构建模型，再分别加入 5、10、20 μg/mL 槲皮素干预 24 h。

2.7　CCK-8 法检测细胞存活率　细胞以每孔 3×10^3 个的密度接种于 96 孔板中，培养过夜，按“2.6”项下方法处理，培养 24 h 后每孔加入 10 μL CCK8 溶液，孵育 1 h，在 450 nm波长处检测吸光度。

2.8　流式细胞术检测细胞凋亡　细胞按“2.6”项下方法处理，预冷 PBS 洗涤，加入 200 μL PBS 重悬，再加入 10 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI，混匀后 4 ℃避光孵育 30 min，加入 300 μL PBS，进行流式检测，通过 NovoCyte 软件进行分析。

2.9　ELISA 法检测细胞上清液 IL-1β、TNF-α、IL-6、CRP、PICP、ICTP 水平　细胞按“2.6”项下方法处理，收集培养液，离心取上清液，按照相关试剂盒说明书检测 IL-1β、TNF-α、IL-6、CRP、PICP、ICTP 水平。

2.10　RT-qPCR 法检测细胞 *Akt*1、*CASP*3、*CCL*2、*CXCL*8、*CCND*1、*EGFR* mRNA 表达　细胞按“2.6”项下方法处理，TRIzol 法提取总 RNA，按照逆转录试剂盒步骤合成 cDNA，进行 PCR 扩增，扩增体系为 SYBR FAST qPCR Master Mix 10 μL，正反向引物各 0.5 μL，cDNA 模板 1 μL，ddH_2O 8 μL，共 20 μL；反应程序为 95 ℃预变性 3 min，扩增 95 ℃ 5 s，56 ℃ 10 s，72 ℃ 25 s，共 40 个循环。PCR 引物由武汉天一华煜基因科技有限公司合成，以 *GAPDH* 为内参，$2^{-\Delta\Delta CT}$法计算基因相对表达，引物序列见表 1。

表 1　引物序列

引物	序列(5′→3′)
TGF-β	正向 CGACTACTACGCCAAGGAG 反向 TGAGGTATCGCCAGGAAT
Akt	正向 CTGCCCTTCTACAACCA 反向 AGTCTCCGACGTGACCT
*MAPK*1	正向 CCACACAAAAATAAGGTGCCAT 反向 CTCGGGTCGTAATACTGCTCC
GAPDH	正向 GGGAAACTGTGGCGTGAT 反向 GAGTGGGTGTCGCTGTTGA
*Akt*1	正向 CACACCACCTGACCAAGATG 反向 GCACCCGAGAAATAAAAACC
*CASP*3	正向 GGTTCATCCAGTCGCTTT 反向 ATTCTGTTGCCACCTTTC
*CCL*2	正向 AACTCCGAAGACTTGAACA 反向 ACATCCCAGGGGTAGAAC
*CXCL*8	正向 CATAAAGACATACTCCAAACCT 反向 AAACTTCTCCACAACCCTC
*CCND*1	正向 GGCCACTTGCATGTTCGT 反向 GGATGGAGTTGTCGGTGTAGA
EGFR	正向 TCTCCGAAAGCCAACAAG 反向 CGACGGTCCTCCAAGTAG

2.11　Western blot 检测细胞 TGF-β、Akt、MAPK1 蛋白表达　细胞按“2.6”项下方法处理，充分裂解后进行蛋白质定量，取 20 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳，湿转至 PVDF 膜，5%脱脂奶粉溶液 4 ℃封闭过夜，加入 TGF-β、Akt、MAPK1、GAPDH 一抗稀释液（1∶1 000），室温孵育 1 h，PBST 洗涤 3 次后加入二抗稀释液（1∶20 000），室温孵育 1 h，洗膜后用 ECL 试剂盒显色，以 GAPDH 为内参，

全自动化学发光分析仪检测，通过 TANON GIS 软件读取灰度值，以目的蛋白、内参蛋白条带灰度值的比值表示目的蛋白相对表达量。

2.12　统计学分析　通过 GraphPad Prism 8.0 软件进行处理，数据以（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　玉屏风散活性成分　共得到玉屏风散 41 种活性成分，其中黄芪 19 种，防风 15 种，白术 7 种；各成分对应的预测靶点去除重复后共 215 个，靶点数目排名前五者分别为槲皮素 151 个、山柰酚 62 个、汉黄芩素 45 个、7-*O*-甲基异丙醇胺 45 个、芒柄花素 39 个，见表 2。

表 2　玉屏风散活性成分及对应靶点

序号	药材	分子 ID	活性成分	0B/%	DL	靶点数目/个
1	黄芪	MOL000211	白桦脂酸	55.38	0.78	1
2		MOL000239	熊竹素	50.83	0.29	13
3		MOL000296	常春藤皂苷元	36.91	0.75	21
4		MOL000033	(3*S*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*,14*S*,17*R*)-10,13-dimethyl-17-[(2*R*,5*S*)-5-propan-2-yloctan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1*H*-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	36.23	0.78	1
5		MOL000354	异鼠李素	49.60	0.31	35
6		MOL000371	3,9-二-*O*-甲基尼森香豌豆紫檀酚	53.74	0.48	23
7		MOL000374	5′-羟基异氟尿嘧啶-2′,5′-二-*O*-葡萄糖苷	41.72	0.69	0
8		MOL000378	7-*O*-甲基异丙醇胺	74.69	0.30	45
9		MOL000379	黄芪异黄烷苷,7,2′-二羟基-3′,4′-二甲氧基异黄烷	36.74	0.92	3
10		MOL000380	黄芪紫檀烷	64.26	0.42	22
11		MOL000387	联苯双酯	31.10	0.67	7
12		MOL000392	芒柄花素	69.67	0.21	39
13		MOL000398	异黄酮	109.99	0.30	0
14		MOL000417	毛蕊异黄酮	47.75	0.24	22
15		MOL000422	山柰酚	41.88	0.24	62
16		MOL000433	叶酸	68.96	0.71	3
17		MOL000439	异微凸剑叶莎醇-7,2′-二-*O*-葡萄糖苷	49.28	0.62	1
18		MOL000442	1,7-二羟基-3,9-二甲氧基紫檀烯	39.05	0.48	4
19		MOL000098	槲皮素	46.43	0.28	151
20	防风	MOL000011	(2*R*,3*R*)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-5-methoxy-2-methylol-2,3-dihydropyrano[5,6-h][1,4]benzodioxin-9-one	68.83	0.66	18
21		MOL011730	11-hydroxy-sec-*O*-beta-*D*-glucosylhamaudol_qt	50.24	0.27	7
22		MOL011732	白花前胡乙素	59.65	0.66	7
23		MOL011737	divaricatacid	87.00	0.32	5
24		MOL011740	divaricatol	31.65	0.38	15
25		MOL001941	欧前胡素	34.55	0.22	8
26		MOL011747	防风色酮醇	32.05	0.51	14
27		MOL011749	珊瑚菜素	43.39	0.28	4
28		MOL011753	5-*O*-甲维阿斯米醇	37.99	0.25	24
29		MOL002644	珊瑚菜内酯	40.19	0.28	11
30		MOL000359	谷甾醇	36.91	0.75	3
31		MOL000173	汉黄芩素	30.68	0.23	45
32		MOL000358	β-谷甾醇	36.91	0.75	37
33		MOL001494	亚油酸乙酯	42.00	0.19	3
34		MOL001942	异欧前胡素	45.46	0.23	1
35	白术	MOL000020	12-千里光酰基-8-反式白术三醇	62.40	0.22	0
36		MOL000021	14-乙酰基各里光酰基-8-反式白术三醇	60.31	0.31	0
37		MOL000022	14-乙酰基-12-千里光酰基-8-顺式折术三醇	63.37	0.30	1
38		MOL000028	α-香树素	39.51	0.76	0
39		MOL000033	(3*S*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*,14*S*,17*R*)-10,13-dimethyl-17-[(2*R*,5*S*)-5-propan-2-yloctan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1*H*-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	36.23	0.78	1
40		MOL000049	3β-乙酰氧基苍术酮	54.07	0.22	16
41		MOL000072	8β-乙氧基苍术内酯Ⅲ	35.95	0.21	5

3.2　玉屏风散治疗慢性阻塞性肺病潜在靶点　共得到慢性阻塞性肺病靶点 555 个，将玉屏风散和慢性阻塞性肺病靶点取交集，得到共有靶点 74 个，见图 1。

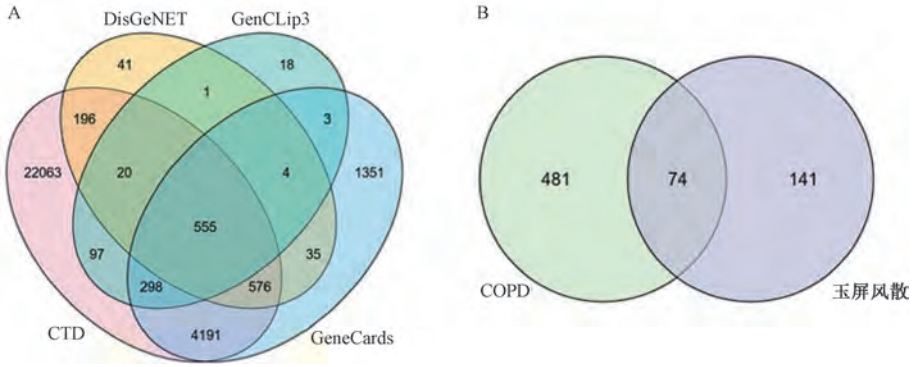


图 1　慢性阻塞性肺病（A）、玉屏风散（B）潜在靶点 Venn 图

3.3　PPI 网络　将玉屏风散 74 个靶点导入 STRING 构建共有靶点 PPI 图，见图 2，包含 74 个节点、1 155 条边。其中，综合数值评分为 0.999 的相互作用蛋白为 Akt1-NOS3、CAV1-EGFR、CAV1-NOS3、CCND1-CDKN1B、FOS-JUN、HIF1A-TP53、JUN-MAPK8、JUN-NFE2L2、KDR-VEGFA、PLAT-SERPINE1、PPARG-RELA、PTEN-TP53、SIRT1-TP53，在网络中具有重要地位。另外，筛选出邻接靶点数目最多的靶点有 Akt1、CASP3、CCL2、CXCL8、CCND1、EGFR 等，即为玉屏风散核心靶点。

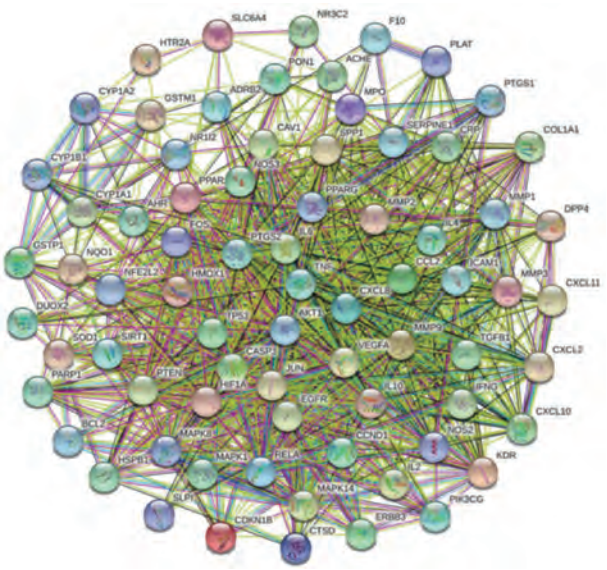


图 2　玉屏风散潜在靶点相互作用网络

3.4　GO、KEGG 通路富集分析　对 74 个共有靶点进行 GO 富集分析，共得到 2 124 个 GO 富集条目，包括 1 985 个生物学过程条目、24 个分子功能和 115 个细胞组成条目，见图 3。在生物学过程方面，玉屏风散抗慢性阻塞性肺病主要涉及氧化应激反应、对细胞外刺激的反应等；在细胞组成方面，玉屏风散对细胞膜的影响较大。

通过 KEGG 通路分析共得到 152 条信号通路，主要涉及 IL-17 信号通路、PI3K/Akt 信号通路、TNF 信号通路、MAPK 信号通路、HIF-1 信号通路、Toll 样受体信号通路，其中免疫相关通路主要涉及 IL-17 信号通路、TNF 信号通路、MAPK 信号通路等，见图 4。

3.5　“成分-靶点-通路”网络及分析　“成分-靶点-通路”网络图见图 5，有 74 个节点，包括 30 种玉屏风散活性成分（绿色三角形）、36 个玉屏风散与慢性阻塞性肺病的共同靶点（橙色圆形）和排名前八的与炎症和免疫相关的信号通路（紫色三角形），其中槲皮素作用靶点最多，是玉屏风散抗慢性阻塞性肺病的核心成分。

3.6　槲皮素对香烟提取物诱导 BEAS-2B 细胞存活率的影响　与对照组比较，模型组细胞存活率降低（$P<0.01$）；与模型组比较，槲皮素低剂量组细胞存活率无明显变化（$P>0.05$），槲皮素中、高剂量组细胞存活率升高（$P<0.01$），并呈剂量依赖性，见图 6。

3.7　槲皮素对香烟提取物诱导 BEAS-2B 细胞凋亡的影响　与对照组比较，模型组细胞凋亡率升高（$P<0.01$）；与模型组比较，槲皮素低各剂量组细胞凋亡率降低（$P<0.01$），并呈剂量依赖性，见图 7。

3.8　槲皮素对香烟提取物诱导 BEAS-2B 细胞上清液 IL-1β、TNF-α、IL-6、CRP、PICP、ICTP 水平的影响　与对照组比较，模型组细胞上清液 IL-1β、TNF-α、IL-6、CRP、PICP、ICTP 水平升高（$P<0.01$）；与模型组比较，槲皮素各剂量组细胞上清液 IL-1β、TNF-α、IL-6、CRP、PICP、ICTP 水平降低（$P<0.05$，$P<0.01$），并呈剂量依赖性，见图 8。

3.9　槲皮素对香烟提取物诱导 BEAS-2B 细胞 *Akt*1、*CASP*3、*CCL*2、*CXCL*8、*CCND*1、*EGFR* mRNA 表达的影响　与对照组比较，模型组细胞 *Akt*1、*CASP*3、*CCL*2、*CXCL*8、*CCND*1、*EGFR* mRNA 表达升高（$P<0.01$）；与模型组比较，槲皮素各剂量组细胞 *Akt*1、*CASP*3、*CCL*2、*CXCL*8、*CCND*1、*EGFR* mRNA 表达降低（$P<0.05$，$P<0.01$），并呈剂量依赖性，见图 9。

3.10　槲皮素对香烟提取物诱导 BEAS-2B 细胞 TGF-β、Akt、MAPK1 mRNA 和蛋白表达的影响　与对照组比较，模型组细胞 TGF-β、Akt、MAPK1 mRNA 和蛋白表达升高（$P<0.01$）；与模型组比较，槲皮素各剂量组细胞 TGF-β、Akt、MAPK1 mRNA 和蛋白表达降低（$P<0.01$），且呈剂量依赖性，见图 10。

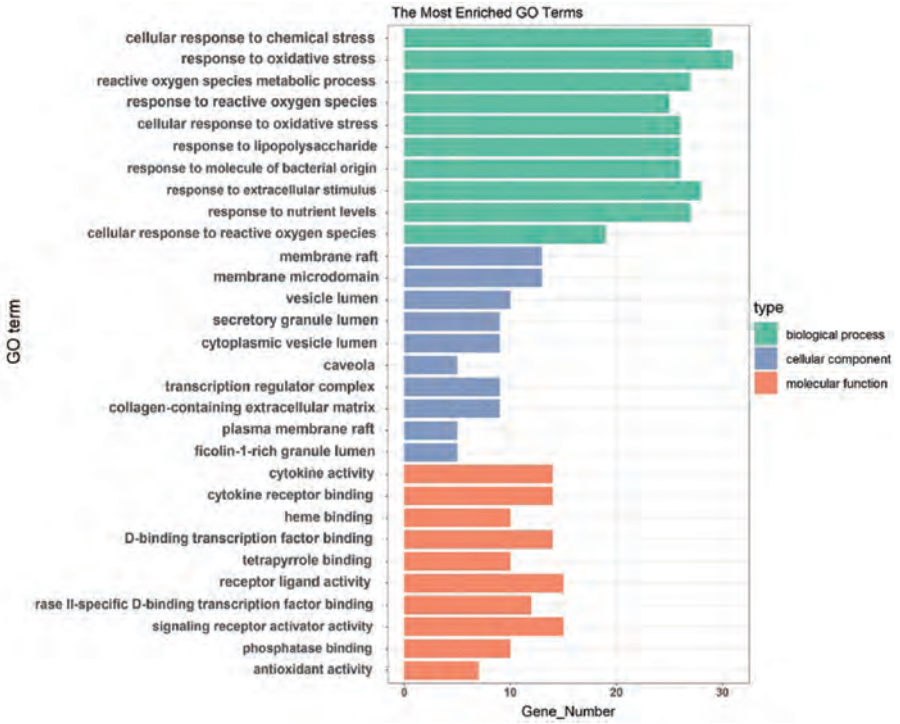


图 3　GO 富集分析

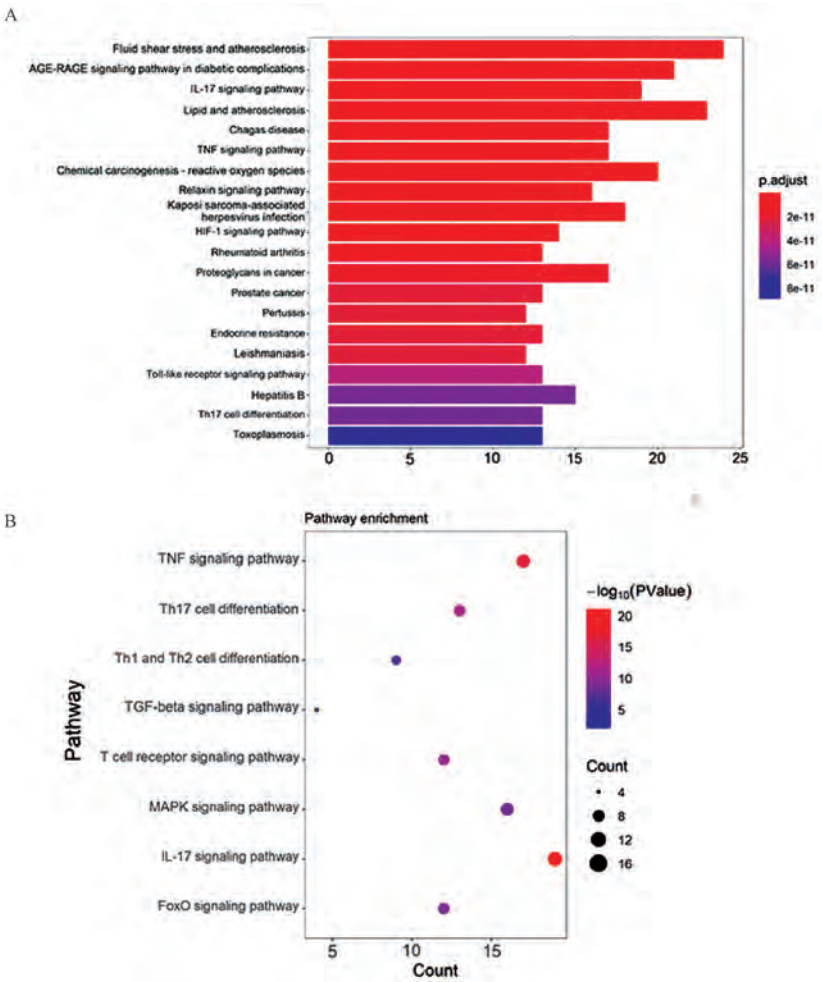


图 4　KEGG 通路富集分析

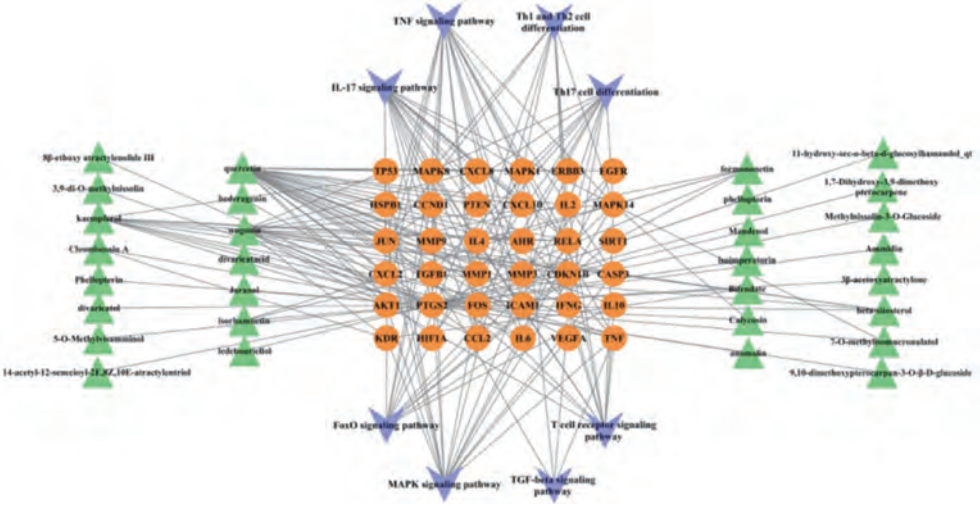
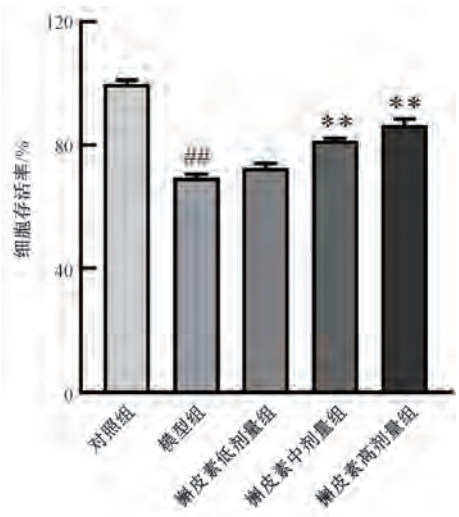


图 5　“成分-靶点-通路”网络



注：与对照组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{**}P<0.01$。

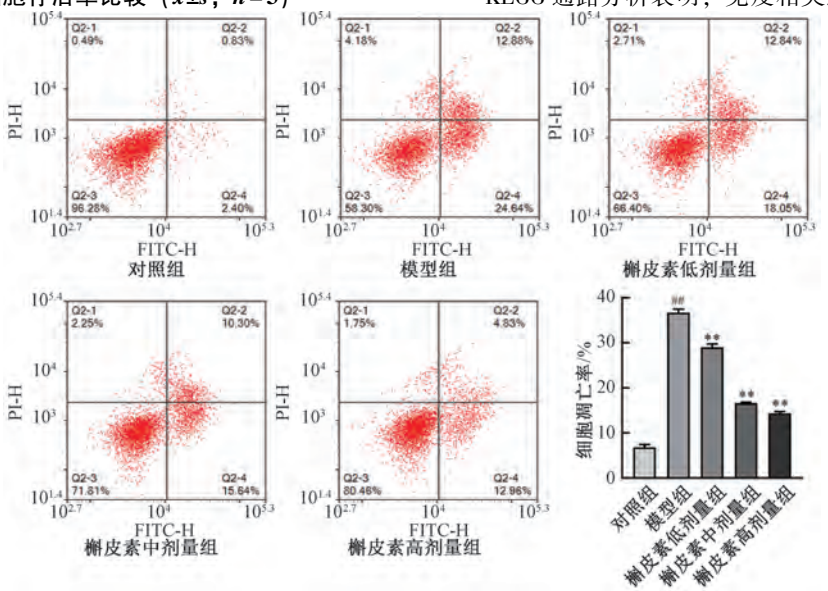
图 6　各组细胞存活率比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

4　讨论

本研究发现，玉屏风散中靶标数目最多的活性成分槲皮素、山柰酚、芒柄花素、汉黄芩素均为黄酮类化合物，可通过调节多种信号通路发挥治疗慢性阻塞性肺病的作用，表明该方是通过多成分发挥疗效的。

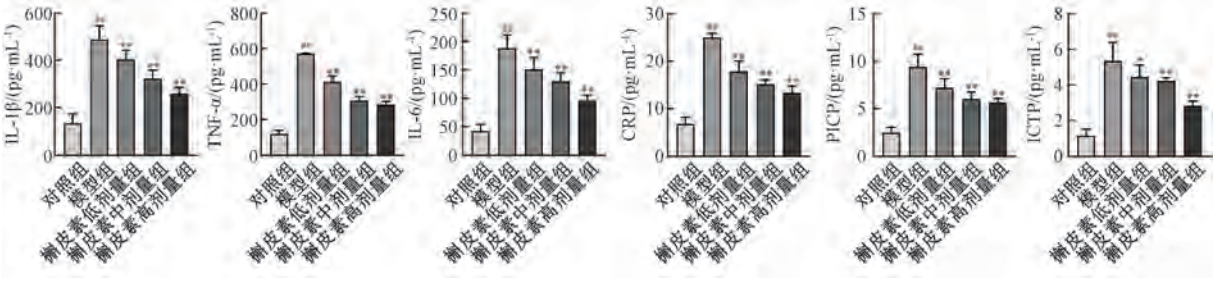
Akt1、CASP3、CCL2、CXCL8、CCND1、EGFR 为核心预测靶点，其中 Akt1 参与细胞增殖和凋亡等的调控，可调控炎性因子的释放和炎症细胞的活化，对慢性阻塞性肺病的发生具有重要作用[9-10]；CASP3 在诱导慢性阻塞性肺病细胞凋亡中发挥重要作用[11]；CCL2 和 CXCL8 能介导气道炎症反应，促进慢性阻塞性肺病的发生发展[12-13]；CCND1 能调控细胞周期进展，影响慢性阻塞性肺病的发展[14]。研究发现，多种中药通过 EGFR 通路治疗慢性阻塞性肺病气道黏液高分泌[15]，表明玉屏风散是通过多靶点协同作用来治疗慢性阻塞性肺病的。

KEGG 通路分析表明，免疫相关通路 IL-17 信号通路、



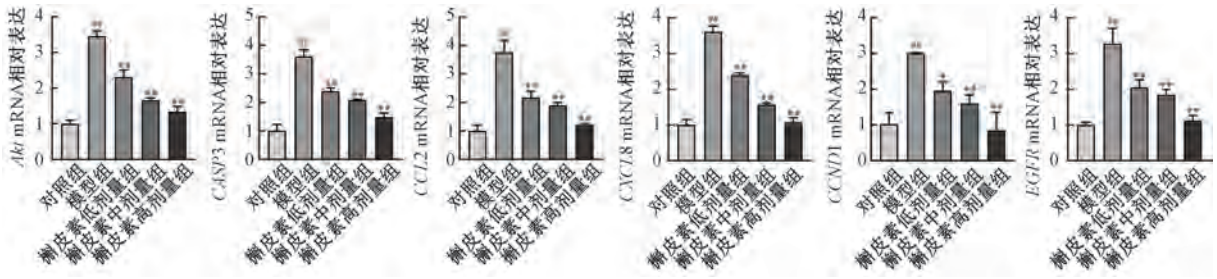
注：与对照组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{**}P<0.01$。

图 7　各组细胞凋亡率比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）



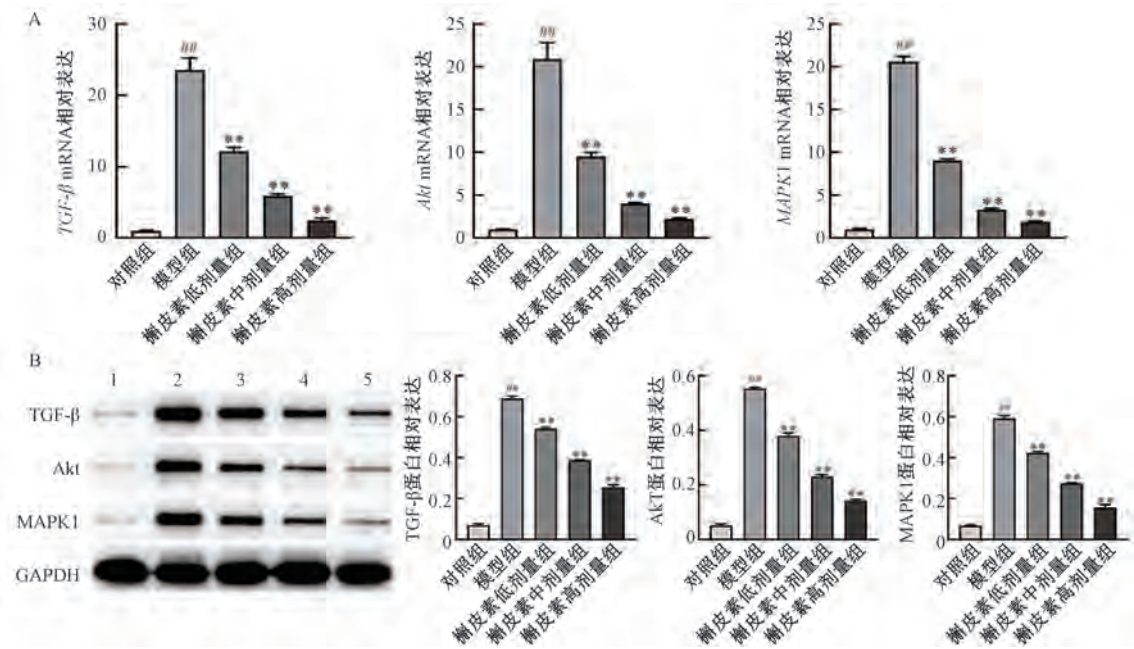
注：与对照组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

图 8　各组细胞上清液 IL-1β、TNF-α、IL-6、CRP、PICP、ICTP 水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）



注：与对照组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

图 9　各组细胞 *Akt*1、*CASP*3、*CCL*2、*CXCL*8、*CCND*1、*EGFR* mRNA 表达比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）



注：1 为对照组，2 为模型组，3~5 分别为槲皮素低、中、高剂量组。与对照组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{**}P<0.01$。

图 10　各组细胞 TGF-β、Akt、MAPK1 mRNA（A）、蛋白（B）表达比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

TNF 信号通路、MAPK 信号通路为玉屏风散治疗慢性阻塞性肺病的关键通路，其中 IL-17 水平与慢性阻塞性肺病的严重程度及肺功能具有相关性[16]，TNF 过表达能够降低肺对氧化损伤的保护能力[17]，MAPK 活化与慢性阻塞性肺病患者肺功能损害程度和肺泡壁炎症密切相关[18]。此外，PI3K/Akt 信号通路在玉屏风散治疗慢性阻塞性肺病中也发挥着重要作用，可通过调节自噬诱导慢性阻塞性肺病肺泡上皮细胞的凋亡[19-20]。上述研究表明，玉屏风散治疗慢性阻塞性肺病具有多通路协同作用的特点。

本研究选择靶标数目最多的活性成分槲皮素进行细胞实验验证，结果显示，槲皮素能提高慢性阻塞性肺病细胞存活率，抑制其凋亡，降低炎症因子、细胞外基质损伤相关因子水平及关键靶点、通路相关蛋白表达，验证了网络药理学预测药物作用于疾病靶点的可行性。

综上所述，本研究采用网络药理学和细胞实验对玉屏风散治疗慢性阻塞性肺病的作用机制进行了探索，证实了

该方通过多成分、多靶点和多通路发挥治疗作用，可为进一步揭示其药理机制提供理论依据。

参考文献：

[1] Labaki W W, Rosenberg S R. Chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Ann Intern Med*, 2020, 173(3): ITC17-ITC32.

[2] Segal L N, Martinez F J. Chronic obstructive pulmonary disease subpopulations and phenotyping[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(6): 1961-1971.

[3] Rhee C K. Chronic obstructive pulmonary disease research by using big data[J]. *Clin Respir J*, 2021, 15(3): 257-263.

[4] Lu Z, Van Eeckhoutte H P, Liu G, *et al*. Necroptosis signaling promotes inflammation, airway remodeling, and emphysema in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2021, 204(6): 667-681.

[5] Sonbol H S. Extracellular matrix remodeling in human disease [J]. *J Microsc Ultrastruct*, 2018, 6(3): 123-128.

[6] 耿利娜，薛 征. 玉屏风散临床运用及药理研究进展[J]. 山东中医杂志，2020，39(12)：1369-1374.

[7] Chen P, Xiao Z T, Wu H, *et al*. Beneficial effects of naringenin in cigarette smoke-induced damage to the lung based on bioinformatic prediction and *in vitro* analysis[J]. *Molecules*, 2020, 25(20): 4704.

[8] 刘 学. 基于网络药理学方法研究玉屏风散治疗哮喘的作用机理[D]. 成都：西南交通大学，2017.

[9] Sun X J, Chen L, He Z Y. PI3K/Akt-Nrf2 and anti-inflammation effect of macrolides in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Curr Drug Metab*, 2019, 20(4): 301-304.

[10] Nie Y J, Hu Y D, Yu K K, *et al*. Akt1 regulates pulmonary fibrosis *via* modulating IL-13 expression in macrophages [J]. *Innate Immun*, 2019, 25(7): 451-461.

[11] Song Q, Chen P, Liu X M. The role of cigarette smoke-induced pulmonary vascular endothelial cell apoptosis in COPD [J]. *Respir Res*, 2021, 22(1): 39.

[12] Kubo F, Ariestanti D M, Oki S, *et al*. Loss of the adhesion G-protein coupled receptor ADGRF5 in mice induces airway inflammation and the expression of CCL2 in lung endothelial cells[J]. *Respir Res*, 2019, 20(1): 11.

[13] Coates M S, Alton E W F W, Rapeport G W, *et al*. *Pseudomonas aeruginosa* induces p38MAP kinase-dependent IL-6 and CXCL8 release from bronchial epithelial cells *via* a Syk kinase pathway[J]. *PLoS One*, 2021, 16(2): e0246050.

[14] Xaing M, Liu X S, Zeng D X, *et al*. Changes of protein kinase Calpha and cyclin D1 expressions in pulmonary arteries from smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2010, 30(2): 159-164.

[15] Stolarczyk M, Scholte B J. The EGFR-ADAM17 axis in chronic obstructive pulmonary disease and cystic fibrosis lung pathology [J]. *Mediators Inflamm*, 2018, 2018: 1067134.

[16] 谷慧英. 慢性阻塞性肺疾病患者血清 IFN-γ、IL-6 及 IL-17 水平及其与肺功能的相关性[J]. 临床医学，2022，42(1)：35-37.

[17] Matera M G, Calzetta L, Cazzola M. TNF-α inhibitors in asthma and COPD: We must not throw the baby out with the bath water [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2010, 23(2): 121-128.

[18] Banerjee A, Koziol-White C, Panettieri R J. p38 MAPK inhibitors, IKK2 inhibitors, and TNFα inhibitors in COPD[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2012, 12(3): 287-292.

[19] Zhang F, Ma H, Wang Z L, *et al*. The PI3K/Akt/mTOR pathway regulates autophagy to induce apoptosis of alveolar epithelial cells in chronic obstructive pulmonary disease caused by PM2.5 particulate matter[J]. *J Int Med Res*, 2020, 48(7): 300060520927919.

[20] Sun X J, Chen L, He Z Y. PI3K/Akt-Nrf2 and anti-inflammation effect of macrolides in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Curr Drug Metab*, 2019, 20(4): 301-304.