

[13] 周 红, 郑秀琴, 张志珺, 等. 甲基乙二醛诱导大鼠海马神经元损伤及氟西汀的保护作用[J]. 中华精神科杂志, 2009, 42(3): 167-171.

[14] Zhao Y, Shang P, Wang M, *et al.* Neuroprotective effects of fluoxetine against chronic stress-induced neural inflammation and apoptosis: Involvement of the p38 activity[J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 351.

[15] 陆博逊, 万 鹏. 银杏叶提取物联合丁苯酞对帕金森病病人认知功能、神经功能的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(20): 3350-3353.

[16] Adebayo O G, Asiwe J N, Ben-Azu B, *et al.* *Ginkgo biloba* protects striatal neurodegeneration and gut phagoinflammatory damage in rotenone-induced mice model of Parkinson's disease: Role of executioner caspase-3/Nrf2/ARE signaling[J]. *J Food Biochem*, 2022, 46(9): e14253.

[17] Yan H, Huang W, Rao J, *et al.* miR-21 regulates ischemic neuronal injury *via* the p53/Bcl-2/Bax signaling pathway[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(18): 22242-22255.

[18] 朱于临, 董克军, 李智帅. 麦角甾醇预处理对丙泊酚麻醉大鼠海马 CA1 区神经元损伤的影响[J]. 中华神经医学杂志, 2022, 21(3): 249-256.

[19] Liu J, Wu P, Xu Z, *et al.* Ginkgolide B inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis and attenuates cytotoxicity *via* activating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in H9c2 cells[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(1): 310-316.

[20] Yu D, Zhang P, Li J, *et al.* Neuroprotective effects of *Ginkgo biloba* dropping pills in Parkinson's disease[J]. *J Pharm Anal*, 2021, 11(2): 220-231.

基于网络药理学及动物实验探讨乌梅丸治疗支气管哮喘的作用

邓安妮¹, 陈 玉¹, 薛贝贝², 胥崑崑¹, 李沁瑶¹, 李建保³, 田金娜^{3*}
(1. 成都中医药大学临床医学院, 四川 成都 610075; 2. 成都中医药大学第三附属医院, 四川 成都 610071; 3. 成都中医药大学附属医院, 四川 成都 610072)

摘要: **目的** 通过网络药理学结合动物实验探讨乌梅丸治疗支气管哮喘的作用机制。**方法** 通过 TCMS 数据库获取乌梅丸的成分及其靶点, GeneCards、OMIM、TTD、DrugBank 数据库获取支气管哮喘靶点, Metascape 平台进行通路富集分析, Cytoscape 3.9.0 软件构建“乌梅丸成分-支气管哮喘靶点”网络, Autodock 软件将核心成分与其靶点进行分子对接。建立哮喘小鼠模型, 给予乌梅丸进行干预, 采用 HE 染色、PAS 染色、ELISA 以及免疫组化 (IHC) 实验对乌梅丸的药效作用及网络药理学预测靶点进行验证。**结果** 网络药理学分析结果显示, 乌梅丸治疗哮喘的核心成分为槲皮素、 β -谷甾醇、山柰酚、豆甾醇、原阿片碱等, 核心靶点有 Akt1、IL6、VEGFA、TNF、CXCL8 等, 并主要通过 PI3K-Akt 信号通路、TNF 信号通路、钙信号通路等发挥作用。分子对接结果显示, 乌梅丸核心成分与靶点分子对接亲和力和力均小于 -7 kcal/mol。动物实验验证结果显示, 乌梅丸可减轻哮喘小鼠气道炎症及气道上皮杯状细胞增生, 降低肺组织中 VEGFA 及 Akt 的表达。**结论** 乌梅丸可能通过以 Akt、VEGFA 为代表的核心靶点及 PI3K/Akt 等关键通路, 调控炎症反应及气道重塑, 进而改善支气管哮喘症状。

关键词: 乌梅丸; 支气管哮喘; 网络药理学; VEGFA; Akt

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)08-2778-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.08.048

支气管哮喘是一种常见的慢性呼吸道疾病, 全球哮喘网络 (Global Asthma Network) I 期研究显示成人哮喘患病率为 4.4%, 其中严重哮喘患病率为 2.6%^[1]。目前西药控制哮喘主要是支气管舒张剂, 长期控制效果欠佳, 而中医药在慢性疾病的治疗上有其独特的优势。乌梅丸出自《伤

寒论·辨厥阴病脉证并治第十二》, 原方多用于治疗上热下寒、蛔虫内扰所致的蛔厥。清代伤寒学家柯韵伯在《古今名医方论》提出:“乌梅丸为厥阴主方, 非只为蛔厥之剂”。且该方集酸苦甘辛、大寒大热于一体, 广泛用于寒热错杂虚实兼并之证。故古今医家常在乌梅丸基础上加减

收稿日期: 2023-03-16

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81574027); 成都中医药大学附属医院 (四川省中医医院) 项目 (20-Q16)

作者简介: 邓安妮 (1996—), 女, 硕士生, 研究方向为小儿肺系疾病的防治。Tel: 18408281978, E-mail: denganni@stu.cdutcm.edu.cn

* 通信作者: 田金娜 (1975—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为小儿肺系疾病的防治。Tel: 18508109516, E-mail: tianjinna@cdutcm.edu.cn

化裁，治疗寒热错杂之各科诸症，并在肺系疾病的防治上取得明显疗效。研究表明乌梅丸具有抗炎、调节免疫、抑制细胞凋亡、修复黏膜屏障和抗氧化损伤等作用^[2-3]，并且能够治疗哮喘，缓解气道重塑^[4]。但中药复方发挥作用的机制和药效物质基础复杂，目前尚未完全明确。

网络药理学对于揭示中药复方科学内涵、发现药物靶标、指导中药新药研发提供了新思路^[5]。分子对接对药物虚拟筛选和药物设计具有重要现实意义^[6]。故本研究采用网络药理学、分子对接结合实验验证探析乌梅丸治疗哮喘的作用机制。

1 材料与方法

1.1 网络药理学

1.1.1 乌梅丸相关靶点筛选 通过 TCMS 数据库^[7]寻找 10 味中药化学组成成分，根据口服利用度（OB）≥30% 和类药性（DL）≥0.18 筛选出乌梅丸化学成分及成分作用靶点，最后在 Uniprot^[8]数据库对靶点进行规范化。

1.1.2 支气管哮喘相关靶点筛选 以“Bronchial asthma（支气管哮喘）”和“Asthma（哮喘）”为关键词，在 GenCards 数据库^[9]、TTD 数据库^[10]、OMIM 数据库、DrugBank 数据库^[11]中查找治疗哮喘的靶点。在 GeneCards 数据库中，Score 值越大则代表该靶点与疾病联系越紧密。将 4 个疾病数据库中哮喘靶点合并后删去重复值，最后在 Uniprot 数据库对靶点进行规范化。

1.1.3 PPI 网络及乌梅丸成分-支气管哮喘靶点网络图的构建 将乌梅丸靶点和哮喘靶点取交集并绘制韦恩图。将交集靶点提交至 String 11.5 数据库^[12]构建蛋白互作（PPI）网络。将 PPI tsv 文件导入 Cytoscape 3.9.0 绘制乌梅丸成分-支气管哮喘靶点网络图。根据连接度（Degree）、介度（Betweenness Centrality）及紧密度（Closeness Centrality）判断核心靶点。

1.1.4 功能与通路的富集分析 将乌梅丸和哮喘的交集靶点导入 Metascape 平台^[13]，设置 $P<0.01$ ，进行功能与通路富集分析。

1.1.5 成分-靶点分子对接 先用 ChemOffice 软件构建核心活性成分的 3D 结构保存为 mol2 格式并使其能量最小化。选择核心活性成分作用于支气管哮喘的靶点进行分子对接，从 PDB^[14]数据库下载蛋白质 3D 结构 PDB 格式，运用 PyMol 软件对蛋白质进行去水、去除小分子配体等操作，利用 Auto Dock Tools 软件将核心活性成分及靶蛋白格式转换为 pdbqt 格式，最后运行 Auto Dock Vina 进行对接。

1.2 动物实验验证

1.2.1 药物 乌梅丸由当归 4 g（批号 21100122）、花椒 4 g（批号 20090210）、人参 6 g（批号 21050001）、细辛 6 g（批号 21100129）、制白附子 6 g（批号 21070204）、盐黄柏 6 g（批号 20090129）、桂枝 6 g（批号 21080020）、干姜 9 g（批号 20110010）、黄连片 12 g（批号 21090055）、乌梅 30 g（批号 21100367）组成，上述免煎颗粒购自四川新绿

色药业科技发展有限公司。醋酸泼尼松片（规格 5 mg/片，批号 H33021207）购自浙江仙琚制药股份有限公司。

1.2.2 动物 BALB/c 小鼠，SPF 级，雌性，体质量（20±2）g，6~8 周龄，购自成都达硕生物科技有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK（川）2020-030]，饲养于成都中医药大学中内脏腑病证实验室小鼠房 [实验动物使用许可证号 SCXK（川）2017-179]，普通饲料饲养，自由摄食饮水。动物实验设计经成都中医药大学动物实验伦理委员会审核通过（伦理号 2022-38）。

1.2.3 试剂 鸡卵清蛋白（OVA）（批号 A5253-250G，美国 Sigma-Aldrich 公司）；氢氧化铝干粉（批号 2204192，西陇科学股份有限公司）；小鼠 VEGF-A ELISA 试剂盒（货号 E-EL-M1292c，美国 eBioscience 公司）；小鼠 Akt 免疫组化试剂盒（货号 YT0185，美国 ImmunoWay 公司）。

1.2.4 仪器 D3024R 台式高速冷冻离心机（美国 SCILOGEX 公司）；Eclipse Ci-L 正置白光拍照显微镜（日本 Nikon 公司）；Pannoramic 全景切片扫描仪（匈牙利 3DHISTECH 公司）；NE-C28 欧姆龙压缩雾化器 [欧姆龙（大连）有限公司]；Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件（美国 Media Cybernetics 公司）。

1.2.5 分组、造模及给药 参照课题组前期造模方法^[15]。适应性饲养 1 周后，将 36 只小鼠随机分成正常组、模型组、泼尼松组和乌梅丸低、中、高剂量组，每组 6 只。除正常组外，其余组小鼠于第 1、8、15 天腹腔注射致敏液 0.2 mL（含 OVA 50 μg 和氢氧化铝干粉 4 mg），从第 22 天起，每天给予 1% OVA 溶液雾化吸入，每天 1 次，每次 30 min，共 7 d。每次雾化激发前 1 h，正常组、模型组给予生理盐水灌胃，乌梅丸低、中、高剂量组分别给予 5.8、11.6、23.2 g/kg 乌梅丸药液灌胃，泼尼松组给予 5.2 mg/kg 泼尼松药液灌胃，每天 1 次，连续 7 d。

1.2.6 取材 末次给药 24 h 后处死小鼠，取小鼠左肺，用于制备肺组织石蜡切片；右肺组织置于-80℃冰箱冻存，待测。

1.2.7 肺组织病理学及免疫组织化学检测 取适量左肺组织，制备成石蜡切片进行 HE 染色来观察肺组织形态学改变及炎症情况，参照文献 [15] 报道进行分级。0 级，支气管结构完整，无明显炎性细胞浸润，肺泡形态规则；1 级，支气管结构较完整，少许炎性细胞浸润，肺泡形态较规则，肺泡壁无明显增厚；2 级，支气管结构不完整，较多炎性细胞浸润，偶有成团，肺泡形态不规则，肺泡壁轻到中度增厚；3 级，支气管结构不完整，大量炎性细胞浸润成团，肺泡形态不完整，结构被破坏，肺泡壁大面积重度增厚。石蜡切片 PAS 染色后，采用 Image-Pro Plus 6.0 软件对随机 2 个不同视野进行分析，得出平均光密度值（average optical, AO），AO 值越大表明阳性表达越强。使用免疫组化检测试剂盒，检测肺组织 Akt 表达，随机选择 3 个不同视野，采用 Image-Pro Plus 6.0 软件统计阳性染色值。

1.2.8 ELISA 法检测肺组织 VEGFA 水平 按照 ELISA 试剂盒说明书，检测右肺组织中 VEGFA 水平。

1.2.9 统计学分析 通过 SPSS 26.0 软件进行处理，若数据符合正态分布，以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，方差齐性时，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用最小显著性差异法 (LSD) 进行分析；若方差不齐，则采用塔姆黑尼法检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

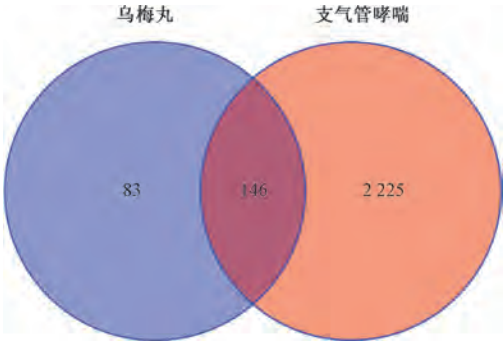
2 结果

2.1 乌梅丸治疗哮喘的网络药理学分析

2.1.1 乌梅丸活性成分靶点的获取 经 ADME 筛选后共获得乌梅 8 种，花椒 5 种，细辛 8 种，黄连 14 种，黄柏 36 种，附子 21 种，干姜 5 种，桂枝 7 种，人参 22 种，当归 2 种活性成分。乌梅靶点 181 个，花椒靶点 164 个，细辛靶点 102 个，黄连靶点 175 个，黄柏靶点 200 个，附子靶点 17 个，干姜靶点 42 个，桂枝靶点 47 个，人参靶点 109 个，当归靶点 50 个，合并后删除重复值共得到靶点 229 个。

2.1.2 乌梅丸与哮喘的交集靶点 在 GeneCards 数据库中，Asthma 靶点 Score 最大值为 71.26，最小值为 0.16，中位数为 1.32，设定 Score>1.32 的靶点为哮喘的潜在靶点，重复进行中位数筛选靶点的操作，直至靶点数<2 000，合并 Bronchial asthma、Asthma 靶点并删去重复值，即为 GeneCards 数据库中获取的哮喘靶点。合并 4 个疾病数据库靶点后删除重复值，最终得到 2 371 个哮喘相关靶点。乌梅丸与哮喘的交集靶点有 146 个，见图 1。

2.1.3 乌梅丸成分-支气管哮喘靶点 PPI 网络的构建 将交集靶点提交至 String 11.5 平台，得到乌梅丸靶点 PPI 网络，见图 2。将 PPI tsv 文件导入 Cytoscape 3.9.0，根据网络拓扑学参数判断核心靶点，见表 1。Akt1 在网络中的连接度、介度、紧密度最高，预测 Akt1 为乌梅丸治疗哮喘的最核心靶点。



注：蓝色圆圈代表乌梅丸靶点，粉色圆圈代表哮喘靶点，两圆相交部分为共同靶点。

图 1 乌梅丸与支气管哮喘交集靶点韦恩图

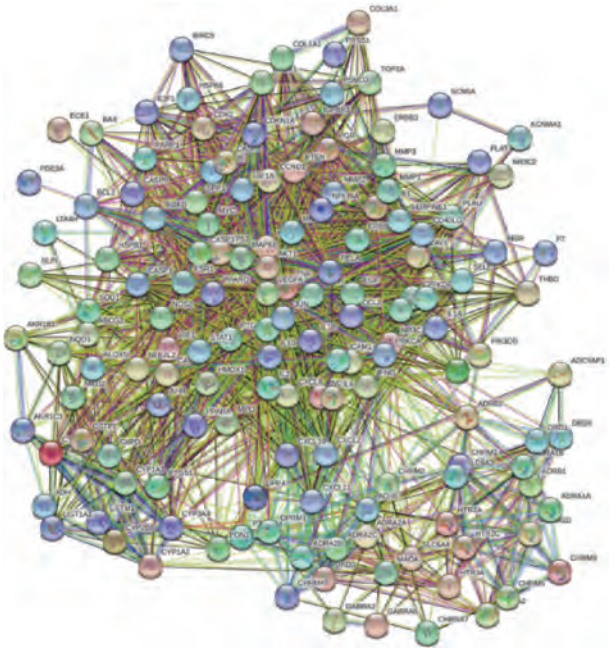


图 2 乌梅丸作用的 146 个共同靶点网络关系图

表 1 核心靶点网络节点特征参数

靶点	名称	连接度	介度	紧密度
Akt1	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	99	0.077 494 51	0.755 208 33
IL6	白细胞介素 6	97	0.047 747 72	0.747 422 68
VEGFA	血管内皮生长因子	90	0.029 969 59	0.710 784 31
TNF	肿瘤坏死因子	88	0.024 308 39	0.710 784 31
CXCL8	白细胞介素 8	84	0.031 763 67	0.697 115 38
PTGS2	前列腺素内过氧化物合酶 2	79	0.018 236 57	0.674 418 60
MMP9	基质金属蛋白酶 9	77	0.021 866 57	0.662 100 45
EGFR	表皮生长因子受体	74	0.019 055 75	0.665 137 61
FOS	Fos 原癌基因	74	0.056 687 28	0.671 296 29

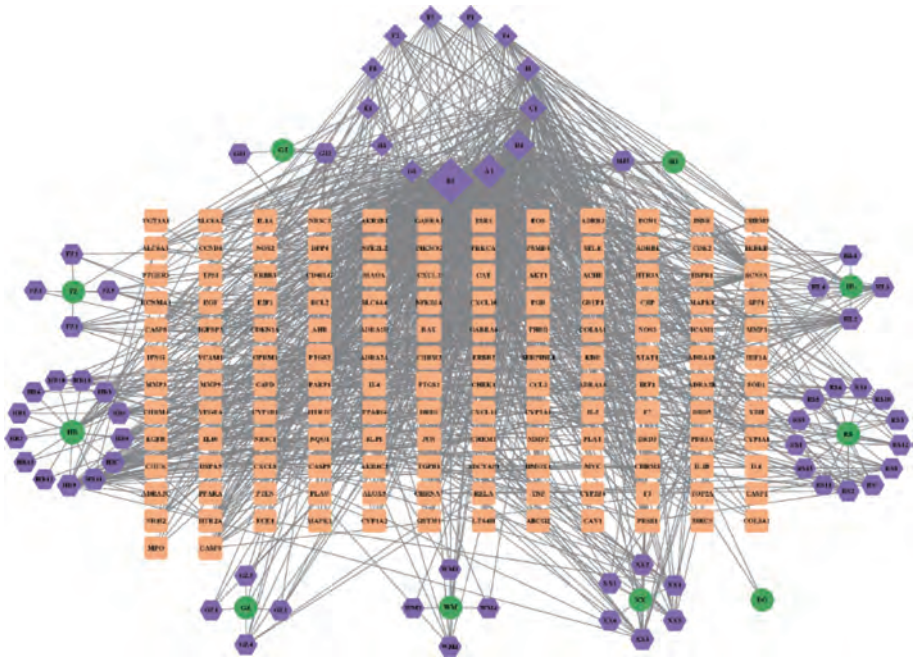
2.1.4 乌梅丸成分-支气管哮喘靶点网络图的构建 乌梅丸成分-支气管哮喘靶点网络见图 3。通过 Cytoscape 3.9.0 中 Network Analyzer 分析网络拓扑学参数，得到核心成分，见表 2。槲皮素连接度、介度、紧密度最高，预测槲皮素为乌梅丸治疗哮喘的最核心成分，其次为 β -谷甾醇、山柰酚、豆甾醇、原阿片碱。

2.1.5 靶点功能与通路的富集分析 GO 富集分析包括生

2780

表 2 乌梅丸主要活性成分网络节点特征参数

MOLID	名称	连接度	介度	紧密度
MOL000098	槲皮素	400	0.518 398 64	0.547 500 00
MOL000358	β -谷甾醇	203	0.076 003 38	0.417 142 85
MOL000422	山柰酚	141	0.133 495 71	0.438 877 75
MOL000449	豆甾醇	88	0.064 348 70	0.403 314 91
MOL000787	原阿片碱	40	0.020 002 67	0.391 771 02



注：DG 为当归，HJ 为花椒，RS 为人参，XX 为细辛，FZ 为附子，HB 为黄柏，GZ 为桂枝，JG 为干姜，HL 为黄连，WM 为乌梅。绿色圆形代表中药，紫色正六边形代表中药活性成分，橙色方形代表靶点，紫色菱形代表中药共有成分，形状越大表示该靶点越重要。

图 3 乌梅丸成分-支气管哮喘靶点网络

生物学过程（BP）主要涉及炎症反应、细胞对有机环状化合物的反应；细胞组分（CC）主要涉及薄膜筏、膜微区等定位；分子功能（MF）主要涉及蛋白质同源二聚活性、氧化还原酶活性、蛋白质结构域特异性结合等分子功能，具体见图 4。KEGG 富集分析结果见图 5，乌梅丸治疗哮喘主要参与的通路有 PI3K-Akt 信号通路、TNF 信号通路、钙信号通路、MAPK 信号通路、HIF-1 信号通路等。

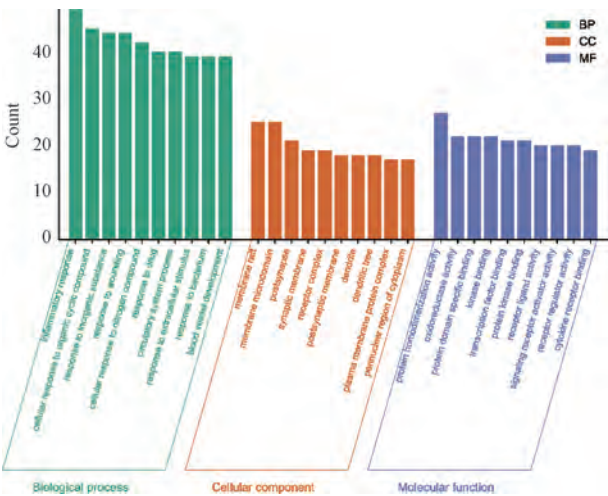


图 4 乌梅丸治疗哮喘的靶点 GO 功能富集分析结果

2.1.6 核心成分-哮喘靶点分子对接结果 根据网络拓扑学参数得到主要活性成分有槲皮素、β-谷甾醇、山柰酚、豆甾醇、原阿片碱。将上述 5 个活性成分与其靶点进行分子对接，对接亲和力越低，成分与靶点发生作用的可能性

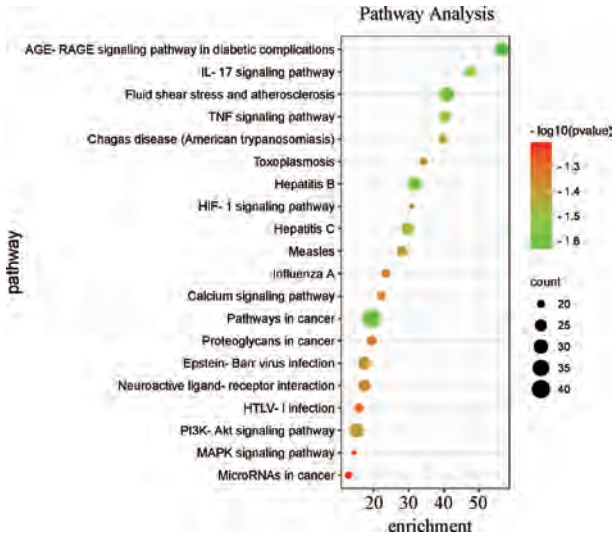


图 5 乌梅丸治疗哮喘的靶点 KEGG 通路富集分析气泡图

越大，见表 3。槲皮素与其作用于哮喘的 91 个靶点平均对接亲和力为-7.9 kcal/mol；β-谷甾醇与其作用于哮喘的 25 个靶点平均对接亲和力为-7.7 kcal/mol；山柰酚与其作用于哮喘的 38 个靶点平均对接亲和力为-8.1 kcal/mol；豆甾醇与其作用于哮喘的 17 个靶点平均对接亲和力为-8.0 kcal/mol；原阿片碱与其作用于哮喘的 14 个靶点平均对接亲和力为-8.5 kcal/mol。槲皮素与 MMP9 分子对接结果最佳，其结合能为-10.7 kcal/mol。再将 MMP9 的抑制剂伊洛马司他（Iloprost）与 6ESM 进行分子对接，其结合能为-9.6 kcal/mol。

表 3 分子对接结果（各活性成分对接亲和力排名前 5 位）

活性成分	靶点	Uniprot ID	PDB ID	对接亲和力/(kcal·mol ⁻¹)
槲皮素	MMP9	P14780	6ESM	-10.7
槲皮素	CYP1B1	Q16678	3PM0	-10.5
槲皮素	AKR1B1	P15121	3DN5	-10.3
槲皮素	CD40LG	P29965	3LKJ	-10.1
槲皮素	TOP2A	P11388	1ZXM	-10.0
β-谷甾醇	PTGS2	P35354	5IKR	-9.2
β-谷甾醇	PDE3A	Q14432	2O8H	-9.1
β-谷甾醇	SCN5A	Q14524	6LQA	-9.0
β-谷甾醇	TGFB1	P01137	6GFF	-8.9
β-谷甾醇	CASP9	P55211	3V3K	-8.8
山柰酚	CYP1B1	Q16678	3PM0	-10.6
山柰酚	AKR1C3	P42330	4DZ5	-10.1
山柰酚	CYP1A2	P05177	2HI4	-10.0
山柰酚	CYP3A4	P08684	6BD7	-9.9
山柰酚	NOS3	P29474	3EAH	-9.7
豆甾醇	MAOA	P21397	2Z5Y	-10.2
豆甾醇	PTGS2	P35354	5IKR	-9.7
豆甾醇	SCN5A	Q14524	6LQA	-9.7
豆甾醇	AKR1B1	P15121	3DN5	-9.3
豆甾醇	PLAU	P00749	3IG6	-8.9
原阿片碱	DRD1	P21728	7JVQ	-10.2
原阿片碱	PTGS2	P35354	5IKR	-10.2
原阿片碱	PDE3A	Q14432	2O8H	-9.7
原阿片碱	SCN5A	Q14524	6LQA	-9.4
原阿片碱	CHRM4	P08173	6KP6	-8.7

2.2 动物实验验证

2.2.1 乌梅丸对哮喘小鼠肺组织病理形态的影响

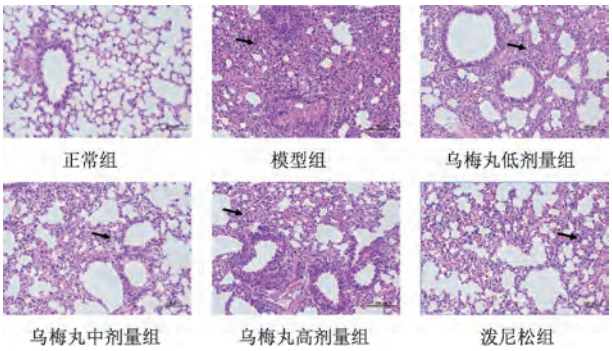
2.2.1.1 HE 染色 正常组气管壁及肺泡结构完整，无明显炎症细胞浸润；与正常组比较，模型组气道周围可见大量炎症细胞的浸润，支气管周围充血水肿，肺泡壁明显增厚；与模型组比较，乌梅丸各剂量组与泼尼松组气道炎症减轻，其中中剂量乌梅丸对哮喘小鼠气道炎症细胞浸润的抑制作用更加显著，见表 4、图 6。

表 4 乌梅丸对哮喘小鼠模型肺组织病理分级程度分布的影响（只）

组别	总动物数/只	0 级	1 级	2 级	3 级
正常组	6	3	3	0	0
模型组	6	0	0	3	3
乌梅丸低剂量组	6	0	1	4	1
乌梅丸中剂量组	6	0	4	2	0
乌梅丸高剂量组	6	0	1	4	1
泼尼松组	6	0	0	6	0

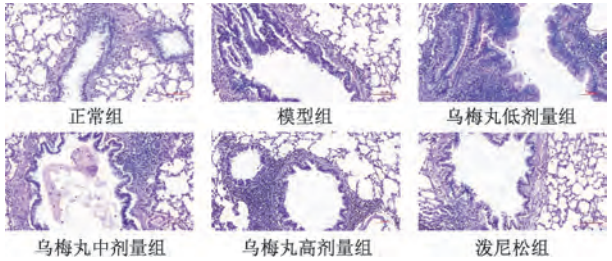
2.2.1.2 PAS 染色 与正常组比较，模型组气道上皮可见大量杯状细胞，PAS 阳性表达升高（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，乌梅丸高、中剂量组及泼尼松组能抑制气道杯状细胞增生，PAS 阳性表达降低（ $P<0.05$ ），而乌梅丸低剂量组无明显变化（ $P>0.05$ ），见图 7、表 5。

2.2.2 乌梅丸对哮喘小鼠肺组织 VEGFA 水平的影响 与正常组比较，模型组小鼠肺组织 VEGFA 水平升高（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，乌梅丸各剂量组及泼尼松组小鼠肺组织 VEGFA 水平降低（ $P<0.01$ ），见表 6。



注：箭头指示炎症浸润。

图 6 各组小鼠肺组织 HE 染色（×200）



注：紫红色染色为 PAS 阳性染色。

图 7 各组小鼠肺组织 PAS 染色（×200）

表 5 各组小鼠肺组织 PAS 阳性表达比较（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=6$ ）

组别	AO 值	阳性表达量/正常组
		阳性表达量
正常组	$1.50\times10^{-4}\pm4.00\times10^{-5}$	1.00 ± 0.00
模型组	$6.04\times10^{-3}\pm2.89\times10^{-3}\#\#$	$37.93\pm18.14\#\#$
乌梅丸低剂量组	$7.21\times10^{-3}\pm2.05\times10^{-3}$	45.29 ± 12.89
乌梅丸中剂量组	$1.09\times10^{-3}\pm5.60\times10^{-4}\#\#$	$6.88\pm3.54\#\#$
乌梅丸高剂量组	$2.41\times10^{-3}\pm3.50\times10^{-4}\#$	$15.12\pm2.23\#$
泼尼松组	$9.60\times10^{-4}\pm6.10\times10^{-4}\#\#$	$6.07\pm3.88\#\#$

注：与正常组比较， $\#\#P<0.01$ ；与模型组比较， $\#P<0.05$ ， $\#\#\#P<0.01$ 。

表 6 各组小鼠肺组织 VEGFA 水平比较（ $\mu\text{g}/\text{mg}$ ， $\bar{x}\pm s$ ， $n=6$ ）

组别	VEGFA
正常组	182.259 ± 36.972
模型组	$344.180\pm57.003\#\#$
乌梅丸低剂量组	$194.088\pm16.909\#\#$
乌梅丸中剂量组	$174.176\pm18.680\#\#$
乌梅丸高剂量组	$211.116\pm29.422\#\#$
泼尼松组	$188.755\pm19.122\#\#$

注：与正常组比较， $\#\#P<0.01$ ；与模型组比较， $\#\#P<0.01$ 。

2.2.3 乌梅丸对哮喘小鼠肺组织 Akt 蛋白表达的影响 Akt 蛋白免疫组化显示，细胞核染色呈蓝色，阳性表达呈棕黄色，以气道周围为主。与正常组比较，模型组小鼠肺组织 Akt 阳性表达升高（ $P<0.05$ ）；与模型组比较，乌梅丸高、低剂量组及泼尼松组小鼠肺组织 Akt 阳性表达 AO 值降低（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），乌梅丸中剂量组 Akt 阳性表达降低，但差异无统计学意义（ $P>0.05$ ），见图 8、表 7。

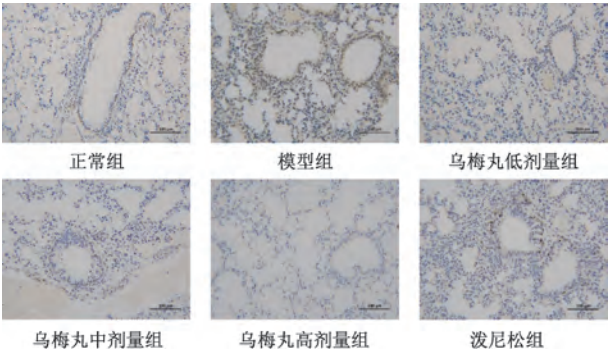


图 8 各组小鼠肺组织 Akt 蛋白免疫组化染色 (×200)

表 7 各组小鼠肺组织 Akt 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	AO 值	阳性表达量/正常 组阳性表达量
正常组	$5.40\times10^{-3}\pm2.70\times10^{-3}$	1.00 ± 0.00
模型组	$1.13\times10^{-2}\pm6.30\times10^{-3}\#$	$2.06\pm1.16\#$
乌梅丸低剂量组	$4.30\times10^{-3}\pm1.60\times10^{-3}^{**}$	$0.78\pm0.30^{**}$
乌梅丸中剂量组	$6.10\times10^{-3}\pm2.70\times10^{-3}$	1.11 ± 0.49
乌梅丸高剂量组	$3.90\times10^{-3}\pm2.00\times10^{-3}^{**}$	$0.71\pm0.36^{**}$
泼尼松组	$5.20\times10^{-3}\pm2.60\times10^{-3}^{*}$	$0.95\pm0.48^{*}$

注：与正常组比较, # $P<0.05$; 与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

3 讨论

阴阳学说是中医学重要的思维方法，阴阳失衡是疾病发生发展的根源。哮喘的发病机制复杂，“气虚-痰饮-瘀血”错杂胶结密切相关，贯穿哮喘发病整个过程，涉及多脏腑的阴阳失衡^[16-17]。基于中医学“阴平阳秘、精神乃治”“本于阴阳”等相关理论，尝试从整体进行阴阳调节以实现对于哮喘的治疗。乌梅丸中乌梅疏肝平肝、酸涩收敛止咳；花椒、细辛、附子、干姜、桂枝辛燥温热，温脏驱寒，细辛兼备温肺化饮、止咳平喘之功；黄连黄柏苦寒清热；人参当归补脾益肺养血，以益久咳久喘所耗之气血。全方从整体上疏肝补脾益肺，燮理阴阳、和畅气血、通调寒热、和调枢机，具有以杂治杂的多角度、多层次的整体阴阳调理之功。

网络药理学分析发现，乌梅丸治疗哮喘的核心成分有槲皮素、β-谷甾醇、山柰酚、豆甾醇、原阿片碱等。研究表明槲皮素、β-谷甾醇可改善小鼠哮喘症状，减轻气道炎症^[18-19]。山柰酚、豆甾醇可抑制嗜酸性细胞浸润，对气道炎症和重塑有明显的抑制作用，豆甾醇还可抗氧化^[20-21]。原阿片碱为一种异喹啉类生物碱，其具有松弛平滑肌、解痉止痛等作用^[22]，可能通过降低环核苷酸 PDE 活性从而抑制气管平滑肌的收缩^[23]。

网络药理学分析发现，乌梅丸治疗哮喘的核心靶点有 Akt1、IL6、VEGFA、TNF、CXCL8、PTGS2、MMP9、EGFR、FOS 等。研究发现，Akt1^[24]、IL6^[25]、CXCL8^[26]、PTGS2^[27]、MMP9^[28]、FOS^[29]参与了哮喘气道炎症，并且 IL8 会刺激气道重塑，可能是哮喘患者一秒用力呼气容积加速下降的生物标志物和治疗靶点。VEGF 是一种特异性的促

血管内皮细胞生长因子，其可能参与了哮喘气道重建中气道平滑肌细胞增殖的过程^[30]。EGFR 激活诱导紧密连接蛋白 1 抗体的减少促进杯状细胞化生^[31]。

有研究表明，激活 TNF-α 通路能够活化胱天蛋白酶 3 和胱天蛋白酶 8 从而诱发细胞凋亡，促使哮喘发生^[32]。钙离子通路与气道炎症、气道高反应性以及气道重塑关系密切^[33]。钙通道抑制剂 SKF96365 可抑制慢性哮喘气道重塑和气道高反应性^[34]。MAPK 通路介导免疫炎症细胞反应及气道结构细胞反应^[35]。PI3K-Akt 通路参与哮喘气道平滑肌增殖和气道重塑^[36]。实验研究证实哮喘组小鼠气管炎性细胞浸润明显，HIF-1α/VEGFA 通路可能参与了哮喘的发病过程^[37]。

VEGFA 能够促进内皮细胞在血管中的迁移和增殖，激活 PI3K/Akt 通路从而启动血管生成过程，并引起支气管细胞炎症^[38]。因此，通过阻断 VEGFA/PI3K/Akt 通路可能是干预哮喘的重要途径。本实验结果表明，乌梅丸使哮喘小鼠肺组织炎性反应得到改善。PAS 染色显示乌梅丸低剂量组气道上皮杯状细胞阳性表达无明显变化，可能与实验样本量较小、未达到阈剂量^[39]等因素有关。泼尼松组和乌梅丸各剂量组哮喘小鼠 VEGFA 及 Akt 表达降低。

综上所述，乌梅丸可降低哮喘小鼠上调的 Akt、VEGFA 表达，说明乌梅丸可能通过抑制 VEGFA/PI3K/Akt 信号通路相关靶点的激活，降低气道炎症或气道重塑，从而达到治疗哮喘的作用。

参考文献:

[1] Mortimer K, Lesosky M, García-Marcos L, *et al.* The burden of asthma, hay fever and eczema in adults in 17 countries; GAN Phase I study[J]. *Eur Respir J*, 2022, 60(3): 2102865.

[2] 丁晓洁, 孙喜灵, 于晓飞, 等. 乌梅丸对腹泻型肠易激综合征模型大鼠肠道菌群和炎症因子的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2019, 46(6): 1296-1299; 1345.

[3] 周国佩, 吴帆, 朱金华, 等. 乌梅丸对 2 型糖尿病模型大鼠肠道菌群、炎症因子及短链脂肪酸的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(10): 8-15.

[4] 陈秋仪, 任培中, 王佳美, 等. 加减乌梅丸颗粒对哮喘大鼠激素干预模型气道重塑及转化生长因子-β₁/Smad 信号通路的影响[J]. *世界中医药*, 2020, 15(8): 1114-1119.

[5] 张雨, 李恒, 李克宁, 等. 复方中药网络药理学的研究进展[J]. *中成药*, 2018, 40(7): 1584-1588.

[6] 刘玉甜, 赵诗雨, 吕邵娃. 基于分子对接的计算机虚拟筛选技术在新药发现中的应用进展[J]. *化学工程师*, 2020, 34(2): 59-63.

[7] Ru J, Li P, Wang J, *et al.* TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. *J Cheminform*, 2014, 6(1): 13.

[8] UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D480-D489.

[9] 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.

[10] Zhou Y, Zhang Y, Lian X, *et al.* Therapeutic target database update 2022: facilitating drug discovery with enriched comparative data of targeted agents [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 50(D1): 1398-1407.

[11] Wishart D S, Feunang Y D, An C G, *et al.* DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 46(D1): D1074-D1082.

[12] Damian S, 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.

[13] Zhou Y, Zhou B, Pache L, *et al.* Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1523.

[14] Burley S K, Charmi B, Bi C, *et al.* RCSB Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 49(D1): D437-D451.

[15] 薛贝贝, 陈 玉, 邓安妮, 等. 基于网络药理学及实验验证探讨金水六君煎治疗支气管哮喘的作用机制[J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(2): 19-26.

[16] 王 霞, 李建保, 陈 迪, 等. 从“气虚-痰饮-瘀血”浅析儿童支气管哮喘与气道重塑的关系[J]. *四川中医*, 2019, 37(11): 23-25.

[17] 陈 迪, 纪文祥, 李明璠, 等. 基于“虚-痰-瘀-玄府气液”论儿童哮喘的病机[J]. *四川中医*, 2018, 36(11): 23-25.

[18] 朱 翔, 肖云斌, 易晓莲. 槲皮素对支气管哮喘小鼠气道炎症的作用及机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(13): 19-22.

[19] Wang R, Zeng M N, Zhang B B, *et al.* β -Sitosterol inhibits ovalbumin-induced asthma-related inflammation by regulating dendritic cells[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2022, 44(6): 1013-1021.

[20] Shin D, Park S H, Choi Y J, *et al.* Dietary Compound kaempferol inhibits airway thickening induced by allergic reaction in a bovine serum albumin-induced model of asthma [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(12): 29980-29995.

[21] Opoku A A, Darko O D, Newman O. Stigmasterol modulates allergic airway inflammation in guinea pig model of ovalbumin-induced asthma[J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017: 2953930.

[22] Yan L. Identification and quantification, metabolism and pharmacokinetics, pharmacological activities, and botanical preparations of protopine: A review [J]. *Molecules*, 2022, 27(1): 215.

[23] 樊继山, 黄燮南, 吴 芹, 等. 普罗托品松弛气管平滑肌的作用机制研究[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2004, 18(4): 285-288.

[24] Zhou D D, Ran J, Li C C, *et al.* Metallothionein-2 is associated with the amelioration of asthmatic pulmonary function by acupuncture through protein phosphorylation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 123: 109785.

[25] 齐玉红, 孙 思, 王 玲, 等. 颗粒蛋白前体通过抑制 IL-6 表达减轻哮喘气道炎症[J]. *中国应用生理学杂志*, 2021, 37(4): 423-429.

[26] Marc-Malovrh M, Camlek L, Škrgat S, *et al.* Elevated eosinophils, IL5 and IL8 in induced sputum in asthma patients with accelerated FEV1 decline [J]. *Respir Med*, 2020, 162(3): 105875.

[27] Rumzhum N N, Ammit A J. Cyclooxygenase 2: its regulation, role and impact in airway inflammation [J]. *Clin Exp Allergy*, 2016, 46(3): 397-410.

[28] 杨 云, 焦德清, 周 利. 血清 1, 25- (OH)₂D₃ 和 MMP-9 对哮喘患儿病情发生发展的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2018, 28(4): 86-90.

[29] Sutovska M, Kocmalova M, Joskova M, *et al.* The effect of long-term administered CRAC channels blocker on the functions of respiratory epithelium in guinea pig allergic asthma model [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2015, 34(2): 167-176.

[30] Kim S H, Pei Q M, Jiang P, *et al.* Upregulation of MUC5AC by VEGF in human primary bronchial epithelial cells: implications for asthma [J]. *Respir Res*, 2019, 20(1): 282.

[31] Jia Z, Bao K, Wei P, *et al.* EGFR activation-induced decreases in claudin1 promote MUC5AC expression and exacerbate asthma in mice [J]. *Mucosal Immunol*, 2020, 14(1): 125-134.

[32] 齐 玲, 王玮瑶, 张艳春, 等. 肿瘤坏死因子 α 信号传导通路在儿童哮喘发病机制中的作用 [J]. *吉林大学学报 (医学版)*, 2015, 41(2): 379-382.

[33] Giang N, Villeneuve T, Pelletier L, *et al.* Ca_v1 calcium channels as a potential therapeutic target in allergic asthma [J]. *Rev Fr Allergol*, 2019, 59(4): 329-335.

[34] 曹 欢, 王泽民, 谢宝娟, 等. 钙池操纵性钙通道抑制剂 SKF96365 对慢性哮喘小鼠气道重塑和气道高反应性的作用 [J]. *内科急危重症杂志*, 2018, 24(3): 248-252.

[35] 武明云, 虞坚尔, 薛 征, 等. 基于 MAPK 信号通路的中药治疗支气管哮喘的实验研究进展 [J]. *上海中医药大学学报*, 2019, 33(2): 86-91.

[36] 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.

[37] 王 莉, 张艳丽, 王秀芳, 等. mTOR/4EBP1/HIF-1 α /VEGF 信号通路在哮喘小鼠肺组织中的表达及意义 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2017, 19(1): 104-110.

[38] Laddha A P, Kulkarni Y A. VEGF and FGF-2: Promising targets for the treatment of respiratory disorders [J]. *Respir Med*, 2019, 156: 33-34.

[39] 傅延龄, 蔡坤坐, 宋 佳. 药量效关系文献与理论研究思考 [J]. *北京中医药大学学报*, 2010, 33(9): 601-605; 640.