

苓甘五味姜辛汤治疗支气管哮喘的网络药理学和分子对接研究*

武蕊¹, 史阳¹, 张嘉雯¹, 贺园莉¹, 李猛^{2△}

1 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046; 2 陕西省中医医院, 陕西 西安 710004

[摘要] 目的:运用网络药理学和分子对接方法探讨苓甘五味姜辛汤治疗支气管哮喘的作用机制。方法:通过中药系统药理学数据库与分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform,TCMSP)筛选苓甘五味姜辛汤中5种中药活性成分及靶点;利用人类基因数据库(the human gene database, GeneCards)、在线人类孟德尔遗传数据库(online mendelian inheritance in man, OMIM)以及DisGeNeT、Drugbank数据库筛选支气管哮喘的相关靶点,取药物与疾病交集靶点,制作韦恩图;利用STRING 11.5分析交集靶点蛋白-蛋白互作(protein-protein interactions, PPI)关系,并通过Cytoscape 3.8.2构建PPI网络,应用MCODE插件进行蛋白质功能聚类分析;运用Metascape进行基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析;通过Cytoscape 3.8.2构建“药物活性成分-靶点-通路”网络;利用Analyze Network分析得到药物核心成分与核心靶点,并采用AutoDock vina进行核心成分与关键靶点的分子对接验证。结果:共筛选得到苓甘五味姜辛汤126个活性成分,对应169个靶点,支气管哮喘相关靶点3484个,取交集后得到共同靶点112个;网络拓扑分析获得MAPKs、AKT1、RELA、JUN、PRKCA、BCL2等13个关键靶点,得到山柰酚、常春藤苷配基、 β -谷甾醇、柚皮素等7个核心成分;KEGG通路富集分析显示主要涉及AGE-RAGE、IL-17、PI3K/AKT、cAMP、雌激素、 Ca^{2+} 、HIF-1等信号通路。分子对接结果显示主要活性成分与关键靶点均有较强结合性。结论:苓甘五味姜辛汤通过多成分、多靶点、多通路治疗支气管哮喘,其作用机制可能与MAPKs、AKT1、RELA、JUN、PRKCA、BCL2等靶点调控AGE-RAGE、IL-17、PI3K/AKT、cAMP、雌激素、 Ca^{2+} 、HIF-1等信号通路有关。

[关键词] 支气管哮喘;苓甘五味姜辛汤;网络药理学;分子对接

[中图分类号] R256.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2096-9600(2025)02-0059-09

Network Pharmacology and Molecular Docking Analysis of *Linggan Wuwei Jiangxin Tang* in the Treatment of Bronchial Asthma

WU Rui¹, SHI Yang¹, ZHANG Jiawen¹, HE Yuanli¹, LI Meng^{2△}

1 Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;

2 Shaanxi Provincial TCM Hospital, Xi'an 710004, China

Abstract Objective: To explore the mechanism of treating bronchial asthma (BA) with *Linggan Wuwei Jiangxin Tang* using network pharmacology and molecular docking. Methods: The active components and the targets of *Linggan Wuwei Jiangxin Tang* were searched by TCMSP, and BA-related targets were screened by GeneCards, OMIM, DisGeNeT and Drugbank database, to draw Venn diagram after intersecting the targets of medicine with disease targets. STRING 11.5 was used to analyze protein-protein interactions (PPI) network, Cytoscape 3.8.2 was applied to construct PPI network, and cluster analysis of the protein was carried out using MCODE plug-in; Metascape was used for enrichment analysis of GO and KEGG; the network of "active ingredients of the herbs-targets-pathways" was built via Cytoscape 3.8.2; the core ingredients and core targets of the medicine were obtained using Analyze Network, molecular docking of the core ingredients and key targets were validated using AutoDock vina. Results: The study has yielded 126 active components, corresponding to 169 targets, 3484 BA-related targets, and 112 shared targets after the interaction; 13 key targets including MAPKs, AKT1, RELA, JUN, PRKCA, BCL2 and others were analyzed by network topology, obtaining seven core ingredients including Kaempferol, iviglycoside ligand, β -sitosterol and naringin; KEGG pathway enrichment analysis mainly involved AGE-RAGE, IL-17, and PI3K/Akt, cAMP, estrogen, Ca^{2+} , HIF-1 and other signaling pathways. The molecular docking results showed that the main active ingredients had strong binding with key targets. Conclusion: *Linggan Wuwei Jiangxin Tang* could treat BA via many ingredients, many targets and many pathways, and its mechanism might be related to the regulation of AGE-RAGE, IL-17, and PI3K/Akt, cAMP, estrogen, Ca^{2+} , HIF-1 and other signaling pathways via MAPKs, AKT1, RELA, JUN, PRKCA, BCL2 and other targets.

Keywords bronchial asthma; *Linggan Wuwei Jiangxin Tang*; network pharmacology; molecular docking

支气管哮喘是一种长期持续的慢性气道炎症性疾病。随着环境污染及人们生活方式的变化,支气管哮喘的患病率呈逐年上升趋势,目前全球支气管哮喘患者已接近4亿,而我国20岁以上人群中哮喘患者已达4000多万^[1]。虽然临床对于支气管哮喘的控制明显改善,但其仍是死亡率及致残率仅次于癌症的疾病。支气管哮喘属中医学“哮病”范畴,以痰阻气道、肺失宣降为基本病机。苓甘五味姜辛汤出自《金匮要略》,具有温肺化饮、止咳平喘功效,是治疗“冷哮”的常用方。研究发现,苓甘五味姜辛汤能促进哮喘模型小鼠气道液体分泌,降低黏蛋白浓度,从而缓解支气管哮喘症状^[2]。临床研究发现,苓甘五味姜辛汤通过调节炎症因子表达减轻患者临床症状,改善肺功能^[3],对支气管哮喘、咳嗽变异性哮喘、哮喘慢阻肺重叠综合征均有效^[4]。但目前对于苓甘五味姜辛汤治疗支气管哮喘作用机制的研究仍相对匮乏。

网络药理学是从整体角度探索药物与机体相互作用的新学科,目前已广泛应用于中药复方的研究。分子对接能够利用电脑模拟技术对小分子(配体)和靶点(受体)进行结合,并预测两者之间的结合亲和性以及结合方式,进而解释药物分子产生活性的原因。因此,本研究基于网络药理学与分子对接技术,探讨苓甘五味姜辛汤治疗支气管哮喘的作用机制,以期为苓甘五味姜辛汤的临床和基础研究提供一定思路。

1 研究方法

1.1 苓甘五味姜辛汤活性成分及靶点筛选 通过中药系统药理学数据库与分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TC-MSP)(<https://tcm-sp-e.com/>),并结合文献查阅获得苓甘五味姜辛汤所含活性成分。以口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%和药物相似性(drug-likeness, DL)≥0.18为条件筛选苓甘五味姜辛汤有效活性成分及作用靶点。在UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>)将所得靶点全称转换为基因符号。

1.2 支气管哮喘相关靶点筛选 以“Bronchial asthma”为关键词,通过人类基因数据库(the human gene database, GeneCards)(<https://www.gene-cards.org/>)、DisGeNet数据库(<https://www.disgenet.org/>)、在线人类孟德尔遗传数据库(online mendelian inheritance in man, OMIM)(<http://www.omim.org/>)、DrugBank数据库

(<https://go.drugbank.com/>)检索支气管哮喘疾病靶点,合并后删除重复值,获得支气管哮喘相关疾病靶点。

1.3 苓甘五味姜辛汤-支气管哮喘靶点蛋白-蛋白互作(protein-protein interactions, PPI)网络构建 将苓甘五味姜辛汤有效活性成分靶点与支气管哮喘疾病靶点在Venny 2.1(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)平台上进行映射,取两者交集,获得苓甘五味姜辛汤与支气管哮喘的交集靶点。将交集靶点导入STRING 11.0数据库(<https://string-db.org/>),选择“multiple proteins”,物种为“人类”,置信度为0.40,隐藏不相关节点,得到交集靶点PPI网络,并通过Cytoscape 3.8.2软件制作PPI网络图,其中的MCODE插件对蛋白质相互作用关系进行聚类分析。

1.4 苓甘五味姜辛汤-支气管哮喘靶点基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析 利用Metascape软件对作用靶点进行生物信息富集分析,包括GO分析的生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)和细胞组成(cellular component, CC)以及KEGG通路富集分析。以 $P \leq 0.01$ 为筛选条件,对各分析结果按 P 值从小到大排序,选取符合条件的前20条GO功能富集分析结果和KEGG通路,使用微生信网(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)绘制气泡图。

1.5 “药物活性成分-靶点-通路”网络构建 将选取的KEGG信号通路与通路对应的靶点及靶点对应的药物成分上传至Cytoscape 3.8.2,构建“药物活性成分-靶点-通路”网络图。利用Cytoscape 3.8.2内置的Network Analyzer分析药物成分及靶点的网络拓扑参数,根据度值≥2倍中位数筛选出核心靶点及关键活性成分。

1.6 分子对接验证 通过PDB数据库(<http://www.rcsb.org/pdb>)下载核心靶点蛋白的三维晶体结构,并以pdb格式进行保存。在TCMSP数据库下载核心成分的Mol2格式3D化学结构。采用PyMol软件脱水、删除配体。利用Autodock vina进行分子对接,记录每个配体与受体对接的最低自由结合能,使用PyMol软件进行可视化处理。

2 结果

2.1 苓甘五味姜辛汤活性成分及靶点 经筛选后获得有效活性成分茯苓16个、甘草92个、五味

子8个、干姜5个、细辛8个;根据活性成分搜索相关靶点,获得靶点茯苓23个、甘草141个、五味子20个、干姜44个、细辛108个,共获得相关靶点169个。

2.2 苓甘五味姜辛汤-支气管哮喘靶点 在GeneCards、DisGeNet、OMIM、DrugBank 数据库搜索支气管哮喘相关靶点,合并删除重复项,最终获得支气管哮喘疾病靶点3484个。将苓甘五味姜辛汤169个靶点与3484个支气管哮喘靶点通过Venny 2.1绘制韦恩图取交集,获得112个交集靶点。见图1。

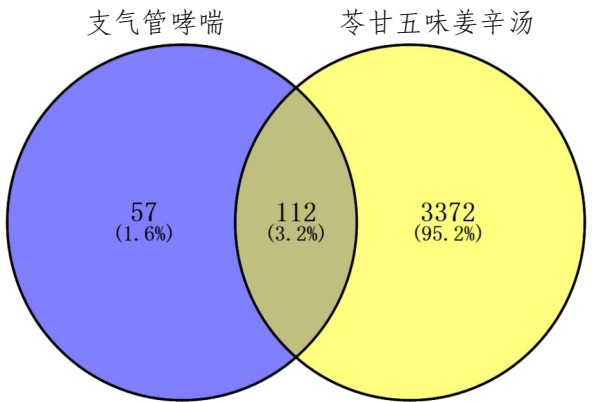


图1 苓甘五味姜辛汤-支气管哮喘靶点韦恩图

2.3 苓甘五味姜辛汤-支气管哮喘靶点 PPI 网络 将112个交集靶点输入STRING 11.0数据库,获得PPI网络关系,并利用CytoScape 3.8.2构建PPI网络图,见图2。运用CytoScape 3.8.2中的MCODE插件进一步分析PPI网络,得到潜在的模块,见图3,并描述其功能,见表1。

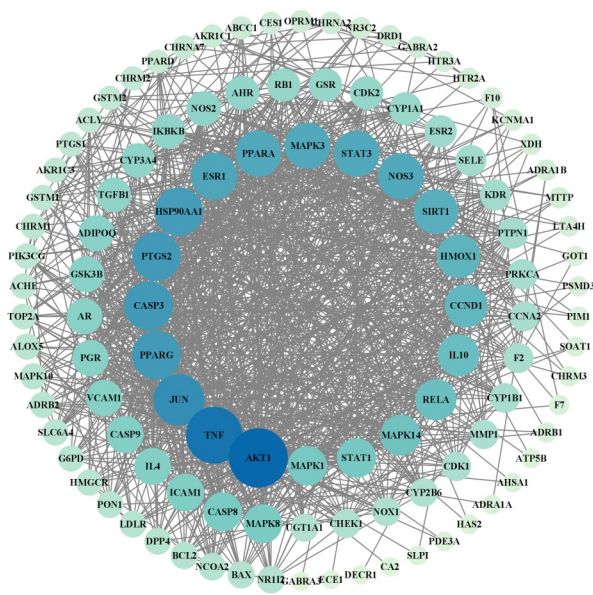


图2 苓甘五味姜辛汤-支气管哮喘靶点 PPI 网络

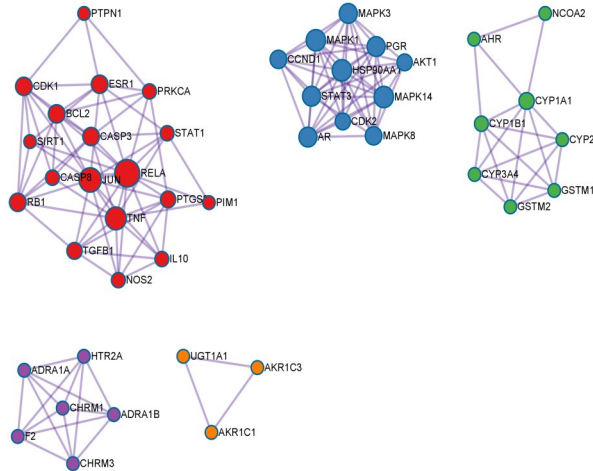


图3 PPI 网络中的模块

表1 PPI 网络蛋白聚类功能

| 模块 | 编码 | 名称 | Log10(P) |
|---------|------------|---|----------|
| MCODE_1 | G0:0097190 | apoptotic signaling pathway | -16.0 |
| MCODE_1 | G0:0032496 | response to lipopolysaccharide | -14.6 |
| MCODE_1 | G0:0002237 | response to molecule of bacterial origin | -14.4 |
| MCODE_2 | G0:0018105 | peptidyl-serine phosphorylation | -11.2 |
| MCODE_2 | G0:0018209 | peptidyl-serine modification | -11.0 |
| MCODE_2 | G0:0007568 | aging | -11.0 |
| MCODE_3 | G0:0006805 | xenobiotic metabolic process | -16.4 |
| MCODE_3 | G0:0071466 | cellular response to xenobiotic stimulus | -16.2 |
| MCODE_3 | G0:0009410 | response to xenobiotic stimulus | -16.0 |
| MCODE_4 | G0:0007200 | phospholipase C-activating G protein-coupled receptor signaling pathway | -11.4 |
| MCODE_4 | G0:0019229 | regulation of vasoconstriction | -9.4 |
| MCODE_4 | G0:0042310 | vasoconstriction | -9.0 |
| MCODE_5 | G0:0001523 | retinoid metabolic process | -7.6 |
| MCODE_5 | G0:0016101 | diterpenoid metabolic process | -7.5 |

2.4 GO功能和KEGG通路富集分析 GO功能分析结果表明, 苓甘五味姜辛汤治疗支气管哮喘主要涉及的BP为细胞对有机环化合物、无机物、营养水平、血液循环、脂多糖及对药物的反应等; CC主要包括细胞膜、突触后膜、受体复合体、细胞膜外侧、细胞核内、内质网、核膜、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶复合物等; MF包括蛋白质同源二聚化活动、核受体活动、神经递质受体活动、氧化还原酶活

性、G蛋白偶联胺受体活性、蛋白丝氨酸激酶活性、蛋白结构域特异性结合、乙酰胆碱受体活动等, 见图4。KEGG富集分析结果表明, 苓甘五味姜辛汤治疗支气管哮喘相关前20条信号通路主要包括AGE-RAGE、IL-17、Th17细胞分化、To11样受体、PI3K-Akt、cAMP、雌激素、Ca²⁺、HIF-1等信号通路。见图5。

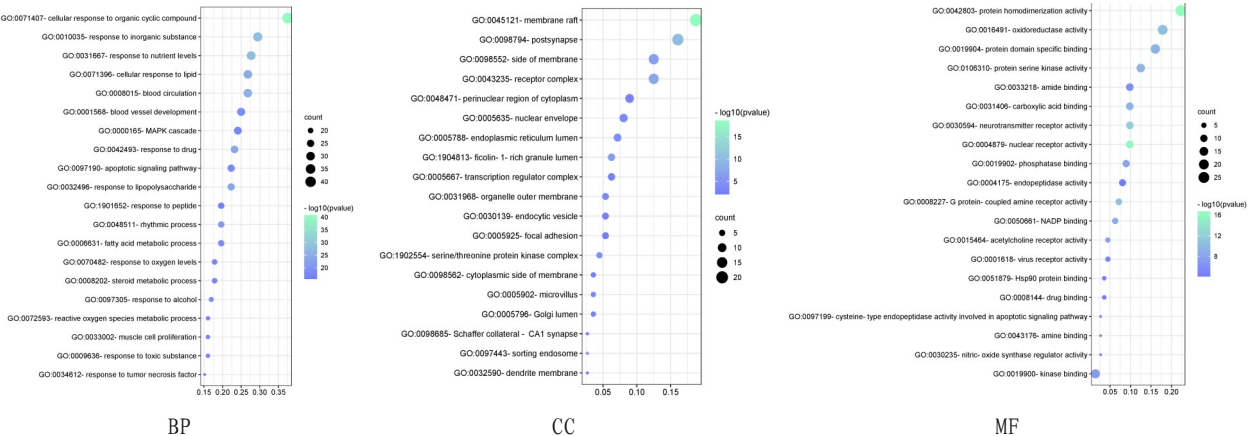


图4 GO功能分析

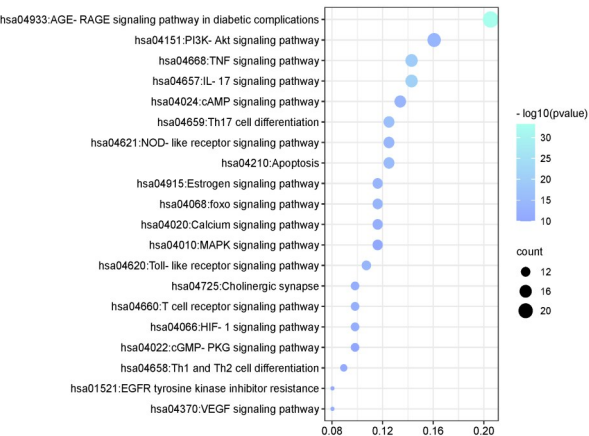


图5 KEGG通路富集分析

2.5 “药物活性成分-靶点-通路”网络 “药物活性成分-靶点-通路”网络包括96个节点和324条边, 橙色节点为通路, 黄色节点为药物活性成分, 绿色节点为基因靶点, 颜色越深, 图形越大代表度值越大。A代表甘草与细辛共有成分, B代表干姜和细辛共有成分, 其余成分均以中药首字母加数字代替, 见图6。其中核心成分包括山柰酚、常春藤苷配基、β-谷甾醇、丙三醇、紫檀素、柚皮素、Inermine, 见表2。各通路之间通过共同靶点相互关联发挥苓甘五味姜辛汤治疗支气管哮喘作用。见表3。核心靶点包括MAPK1、MAPK3、AKT1、RELA、JUN、IKKBK、MAPK10、MAPK14、MAPK8、PRKCA、BCL2、TNF、NOS3, 见表4。

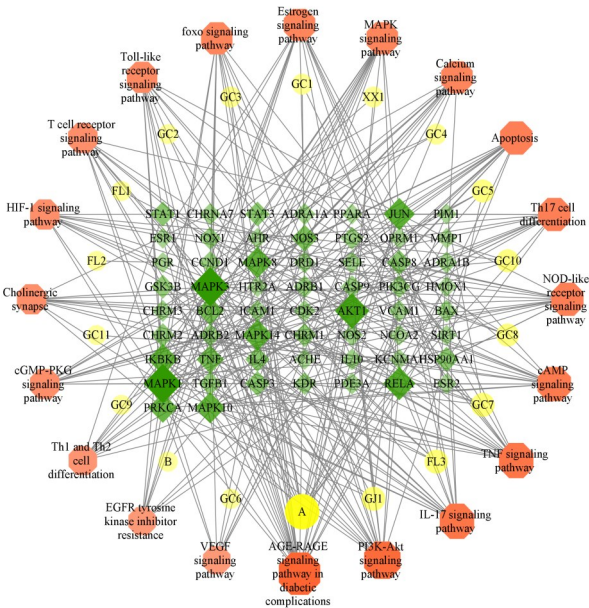


图6 “药物活性成分-靶点-通路”网络

表2 苓甘五味姜辛汤主要活性成分网络节点特征参数

| 成分 | 度值 | 中介度 | 紧密度 |
|----------------------|----|-------------|-------------|
| Kaempferol(A) | 32 | 0.043506972 | 0.374015748 |
| beta-sitosterol(GJ1) | 18 | 0.002813236 | 0.263888889 |
| Hederagenin(FL3) | 15 | 0.012087336 | 0.336879433 |
| Glycyrol(GC7) | 10 | 0.005622393 | 0.306451613 |
| Medicarpin(GC8) | 10 | 0.005766275 | 0.310457516 |
| Naringenin(GC10) | 10 | 0.004292925 | 0.304487179 |
| Inermine(GC5) | 9 | 0.005260891 | 0.346715328 |

表3 苓甘五味姜辛汤治疗支气管哮喘靶点通路富集结果

| 编号 | 信号通路名称 | 基因数 | 基因名称 |
|----------|---|-----|--|
| hsa04933 | AGE-RAGE signaling pathway | 23 | AKT1 BAX CCND1 BCL2 CASP3 MAPK14 ICAM1 JUN NOS3 PIM1 PRKCA MAPK1 MAPK3 MAPK8 MAPK10 RELA SELE STAT1 STAT3 TGFB1 TNF VCAM1 NOX1 |
| hsa04657 | IL-17 signaling pathway | 16 | CASP3 CASP8 MAPK14 GSK3B HSP90AA1 IKKBK IL4 JUN MMP1 MAPK1 MAPK3 MAPK8 MAPK10 PTGS2 RELA TNF |
| hsa04668 | TNF signaling pathway | 16 | AKT1 CASP3 CASP8 MAPK14 ICAM1 IKKBK JUN MAPK1 MAPK3 MAPK8 MAPK10 PTGS2 RELA SELE TNF VCAM1 |
| hsa04659 | Th17 cell differentiation | 14 | AHR MAPK14 HSP90AA1 IKKBK IL4 JUN MAPK1 MAPK3 MAPK8 MAPK10 RELA STAT1 STAT3 TGFB1 |
| hsa04210 | Apoptosis | 14 | AKT1 BAX BCL2 CASP3 CASP8 CASP9 IKKBK JUN MAPK1 MAPK3 MAPK8 MAPK10 RELA TNF |
| hsa04621 | NOD-like receptor signaling pathway | 14 | BCL2 CASP8 MAPK14 HSP90AA1 IKKBK JUN MAPK1 MAPK3 MAPK8 MAPK10 RELA STAT1 TNF NOX1 |
| hsa04068 | foxo signaling pathway | 13 | AKT1 CCND1 CDK2 MAPK14 IKKBK IL10 MAPK1 MAPK3 MAPK8 MAPK10 STAT3 TGFB1 SIRT1 |
| hsa04620 | Toll-like receptor signaling pathway | 12 | AKT1 CASP8 MAPK14 IKKBK JUN MAPK1 MAPK3 MAPK8 MAPK10 RELA STAT1 TNF |
| hsa04151 | PI3K-Akt signaling pathway | 18 | AKT1 CCND1 BCL2 CASP9 CDK2 CHRM1 CHRM2 GSK3B HSP90AA1 IKKBK IL4 KDR NOS3 PIK3CG PRKCA MAPK1 MAPK3 RELA |
| hsa04024 | cAMP signaling pathway | 15 | ADRB1 ADRB2 AKT1 CHRM1 CHRM2 DRD1 JUN PDE3A PPARA PRKCA MAPK1 MAPK3 MAPK8 MAPK10 RELA |
| hsa04915 | Estrogen signaling pathway | 13 | AKT1 BCL2 ESR1 ESR2 HSP90AA1 JUN NOS3 OPRM1 PGR PRKCA MAPK1 MAPK3 NCOA2 |
| hsa04660 | T cell receptor signaling pathway | 11 | AKT1 MAPK14 GSK3B IKKBK IL4 IL10 JUN MAPK1 MAPK3 RELA TNF |
| hsa04020 | Calcium signaling pathway | 13 | ADRA1B ADRA1A ADRB1 ADRB2 CHRM1 CHRM2 CHRM3 CHRNA7 DRD1 HTR2A NOS2 NOS3 PRKCA |
| hsa04725 | Cholinergic synapse | 11 | ACHE AKT1 BCL2 CHRM1 CHRM2 CHRM3 CHRNA7 PIK3CG PRKCA MAPK1 MAPK3 |
| hsa04066 | HIF-1 signaling pathway | 11 | AKT1 BCL2 HMOX1 NOS2 NOS3 PRKCA MAPK1 MAPK3 RELA STAT3 NOX1 |
| hsa04370 | VEGF signaling pathway | 9 | AKT1 CASP9 MAPK14 KDR NOS3 PRKCA MAPK1 MAPK3 PTGS2 |
| hsa04658 | Th1 and Th2 cell differentiation | 9 | MAPK14 IKKBK IL4 JUN MAPK1 MAPK3 MAPK8 MAPK10 RELA STAT1 |
| hsa01521 | EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance | 10 | AKT1 BAX BCL2 GSK3B KDR PRKCA MAPK1 MAPK3 STAT3 |
| hsa04010 | MAPK signaling pathway | 9 | AKT1 CASP3 MAPK14 IKKBK JUN PRKCA MAPK1 MAPK3 MAPK8 MAPK10 RELA TGFB1 TNF |
| hsa04022 | cGMP-PKG signaling pathway | 13 | ADRA1B ADRA1A ADRB1 ADRB2 AKT1 KCNA1 NOS3 PDE3A PIK3CG MAPK1 MAPK3 |

表4 苓甘五味姜辛汤主要活性成分靶点网络节点特征参数

| 靶点 | 度值 | 中介度 | 紧密度 | 靶点 | 度值 | 中介度 | 紧密度 |
|--------|----|-------------|-------------|--------|----|-------------|-------------|
| MAPK1 | 20 | 0.114978631 | 0.5 | MAPK14 | 12 | 0.021857627 | 0.365384615 |
| MAPK3 | 20 | 0.114978631 | 0.5 | MAPK8 | 12 | 0.018393159 | 0.389344262 |
| AKT1 | 16 | 0.088646274 | 0.47979798 | PRKCA | 11 | 0.058663495 | 0.435779817 |
| RELA | 14 | 0.026648682 | 0.402542373 | BCL2 | 9 | 0.027423458 | 0.395833333 |
| JUN | 13 | 0.034665475 | 0.413043478 | TNF | 9 | 0.005547071 | 0.346715328 |
| IKKBK | 12 | 0.014371808 | 0.374015748 | NOS3 | 8 | 0.036739343 | 0.420353982 |
| MAPK10 | 12 | 0.032814433 | 0.392561983 | | | | |

2.6 分子对接 将筛选出的苓甘五味姜辛汤的7种主要活性成分与13个核心靶点进行分子对接,最终得到91组受体-配体对接结果,见表5。

在91组受体-配体结果中,分值均小于-5 kcal/mol,提示均有较强的对接活性,部分核心活性成分对接模式,见图7。

表5 核心成分与核心靶点分子对接的结合能

| 成分 | 结合能(kcal/mol) | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|---------------|-------|------|------|------|-------|--------|--------|-------|-------|------|------|------|
| | MAPK1 | MAPK3 | AKT1 | RELA | JUN | IKBKB | MAPK10 | MAPK14 | MAPK8 | PRKCA | BCL2 | TNF | NOS3 |
| kaempferol(A) | -8 | -8.5 | -5.9 | -6.3 | -6.4 | -8.9 | -8.6 | -7.8 | -7.4 | -8 | -6.6 | -7.2 | -8.7 |
| hederagenin(FL3) | -7 | -6.7 | -6.6 | -7.3 | -6.8 | -7.2 | -7.2 | -7.6 | -7.8 | -7.5 | -7.8 | -5.7 | -9.3 |
| beta-sitosterol(GJ1) | -7.7 | -8.4 | -7.3 | -7.6 | -7.5 | -9.4 | -7.8 | -8.7 | -8.5 | -8.1 | -7.7 | -6.7 | -8.6 |
| Glycyrol(GC7) | 8.1 | -9.1 | -6.9 | -7.6 | -6.8 | -7.6 | -10 | -8.4 | -9 | -8.3 | -7.2 | -8.3 | -9.7 |
| Medicarpin(GC8) | -7.9 | -8.6 | -6.9 | -6.5 | -6.1 | -7.1 | -7.9 | -7.6 | -7.6 | -8.1 | -7.3 | -6.2 | -8.1 |
| Inermine(GC5) | -8.4 | -9.2 | -7.1 | -8.2 | -6.4 | -8.9 | -8.8 | -8.3 | -8.3 | -8.6 | -6.7 | -8.2 | -9.3 |
| naringenin(GC10) | -7.7 | -7.2 | -6 | -7.3 | -5.9 | -6.7 | -7.5 | -7.3 | -7 | -6.7 | -7.3 | -6.6 | -8 |

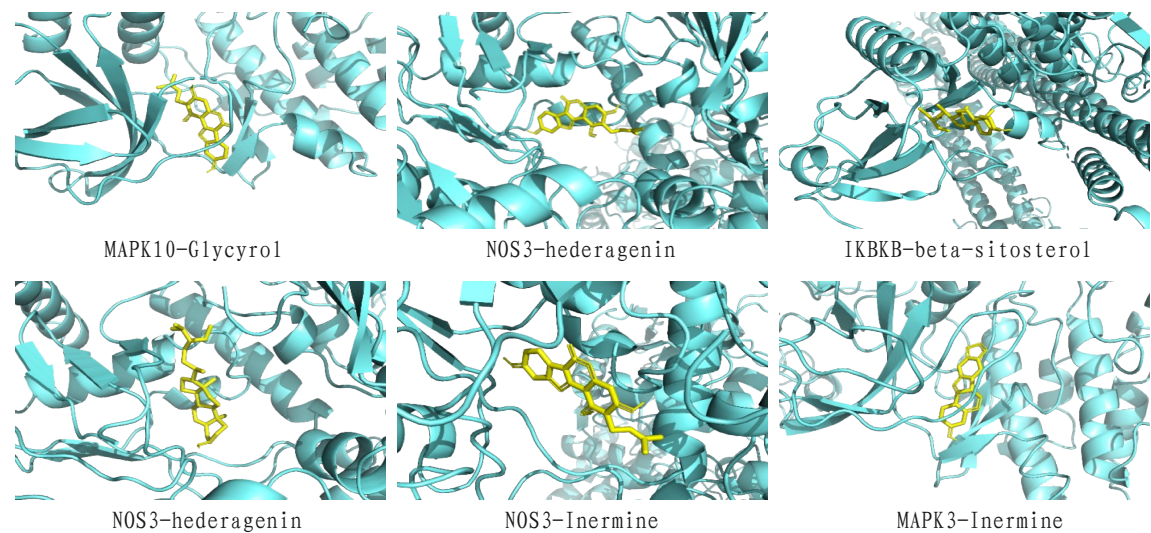


图7 苓甘五味姜辛汤部分核心成分与核心靶点分子对接

3 讨论

支气管哮喘病理机制复杂,其发病原因既有先天因素,又有后天因素,发病机制主要与炎症反应、气道高反应性、气道重塑等有关。目前主要采取糖皮质激素、 β_2 受体激动剂、胆碱能受体拮抗剂、白三烯受体拮抗剂、细胞因子抑制剂、支气管热成形术等方法治疗。中医认为支气管哮喘病位在肺,与肝、脾、肾相关,“宿根”是其反复发作的主要原因。“宿根”是由于机体津液不归正化,凝聚成痰,伏藏于肺。宿根遇外邪则被触发,痰随气升,气随痰阻,相互搏结,壅塞气道而致痰鸣气喘^[5]。吴鞠通曰:“盖饮为阴邪,非温不化。”苓甘五味姜辛汤具有温肺化饮、祛痰平喘功效。方中干姜为君,既温肺散寒化饮,又温运脾阳化湿;茯苓为臣,可助干姜健脾化湿,以阻生痰之源;细辛辛温走窜,助干姜温肺散寒化饮,可通肺窍,祛顽痰,除哮喘“宿根”,为佐药;五味子酸甘收敛,制约干姜、细辛温散太过,同时又可敛肺平喘;甘草调和诸药。全方温散并行,肺脾同治,标本兼顾,为温肺化饮之良方。

本研究结果发现,苓甘五味姜辛汤治疗支气管哮喘的关键成分有山柰酚、常春藤苷配基、 β -谷

甾醇、紫檀素、柚皮素等。其中山柰酚在过敏性哮喘小鼠体内可通过调控NF- κ B信号通路,减少嗜酸性粒细胞在气道和肺组织中的聚集,从而减轻哮喘气道炎症反应^[6]。另有实验表明,山柰酚可减弱小鼠组胺诱导的气管平滑肌收缩力,降低气道阻力,消除过敏导致的咳嗽反射,还可降低小鼠支气管肺泡灌洗液中白细胞介素5(interleukin-5, IL-5)、IL-13、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor,GM-CSF)表达水平和肺组织中转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 ,TGF- β_1)蛋白水平,以改善慢性气道炎症^[7-8]。 β -谷甾醇能够抑制嗜酸性粒细胞浸润和杯状增生引起的黏液分泌过多,降低血清中免疫球蛋白E(Immunoglobulin E,IgE)水平^[9],也可降低过敏性哮喘豚鼠血液、支气管肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞和中性粒细胞计数,抑制Th2细胞介导的肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α ,TNF- α)、IL-4和IL-5释放^[10]。柚皮素可通过激活苦味受体(type 2 bitter taste receptor,TAS2Rs),舒张气道平滑肌细胞,有可能成为新型支气管扩张剂^[11]。另有动物实验证明柚皮素可降低支气管肺泡灌洗液中

总血清 IgE 和 Th2 细胞分泌的细胞因子水平,从而延缓气道重塑^[12]。柚皮素还可通过阻断肥大细胞中受体相互作用蛋白 2(receptor interacting protein 2,RIP2)和含半胱天冬氨酸蛋白酶(cysteiny aspartate specific proteinase1,Caspase-1)信号级联,抑制胸腺基质淋巴生成素产生,发挥抗炎抗过敏作用^[13]。研究发现,常春藤皂苷元能够抑制 IgE 介导的哮喘模型豚鼠肺部嗜酸性粒细胞和中性粒细胞的募集和化学介质、组胺的释放,具有治疗哮喘的作用^[14]。紫檀素有类似于糖皮质激素的作用,通过抑制 IV 型过敏反应,发挥治疗哮喘的作用^[9]。结合本研究分子对接结果预测苓甘五味姜辛汤可能通过山柰酚、常春藤皂苷配基、 β -谷甾醇、紫檀素、柚皮素等多成分治疗支气管哮喘。

本研究结果发现苓甘五味姜辛汤治疗支气管哮喘的关键靶点为 MAPK1、MAPK3、AKT1、RELA、JUN、MAPK10、MAPK14、MAPK8、PRKCA、BCL2、TNF、NOS3。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase,MAPK)是细胞内外信号的重要传递者,参与细胞生长、分化、炎症等多种病理生理过程。研究表明,MAPK1(ERK2)与 MAPK3(ERK1)组成的 ERK1/2 信号通道与支气管哮喘大鼠气道平滑肌细胞表型分化、迁移和分泌功能变化密切相关^[15],也可能通过细胞周期以及 Caspase-3 等对支气管哮喘气道平滑肌细胞增殖与凋亡起调控作用^[16]。MAPK10 即 p38,中性粒细胞型哮喘小鼠肺组织中 p38 MAPK 的磷酸化水平增高与 TLR4-MyD88-p38 MAPK 信号通路的活化有关,靶向抑制 p38 MAPK 可改善中性粒细胞哮喘的激素抵抗性^[17]。MAPK8 即为 JNK1,MAPK10 又称 JNK3,研究发现,模式识别受体 2(Toll-like receptor2,TLR2)介导的 JNK 信号分子通路可能参与了支气管哮喘的炎症反应过程,也与哮喘的气道重塑密切相关^[18]。PRKCA 基因多效性与支气管哮喘发病相关^[19]。丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1(serine/threonine protein kinase 1,AKT1)主要参与细胞增殖、分化、代谢等功能。AKT1 过度表达可增加体外培养的气管平滑肌细胞大小及细胞内蛋白质含量,与哮喘气道重塑相关^[20]。AKT 通过去乙酰化酶可上调人支气管上皮样细胞中 IL-6 表达,与支气管哮喘患者慢性气道炎症密切相关^[21]。JUN 是组成激活蛋白 1(activator protein-1,AP-1)转录因子的一个亚基,AP-1 是调控增殖、凋亡和分化的关键调控因子,AP-1 高表达参与了支气管哮喘的发病,且与糖皮质激素抵抗有关^[22]。

microRNA-23a 通过靶向气道上皮细胞中的 B 淋巴细胞瘤 2 基因(B-cell lymphoma-2,BCL-2)和成纤维细胞中的趋化因子配体 12 促进哮喘发生^[23]。BCL2 是参与细胞凋亡的重要蛋白,其在支气管哮喘患者体内高表达,BCL-2 抑制剂通过诱导中性粒细胞凋亡,从而减轻气道炎症^[24]。一氧化氮合酶 3(nitric oxide synthase3,NOS3)为内皮型一氧化氮合酶,其基因的多态性与过敏性哮喘发病相关^[25]。动物实验表明,NOS3 过表达可抑制嗜酸性粒细胞趋化因子的产生和血管内皮中黏附分子的表达,并减弱支气管对乙酰胆碱的反应,从而减轻过敏性哮喘小鼠气道炎症和气道高反应性^[26]。

GO 功能分析发现,BP 包括对细胞有机环化化合物的反应、对无机物的反应、对营养水平的反应以及对脂多糖、MAPK 级联、肌肉细胞增殖等。KEGG 通路富集分析发现,涉及的通路主要包括 AGE-RAGE、IL-17、Th17 细胞分化、Toll 样受体、PI3K-AKT、cAMP、雌激素、 Ca^{2+} 、HIF-1 等信号通路,主要与炎症反应、细胞分化、细胞增殖等有关。

AGE-RAGE 信号通路目前在支气管哮喘方面的研究相对较少。在一项队列研究中发现人晚期糖基化终产物受体(receptor for advanced glycation end products,RAGE)基因表达与哮喘和慢性阻塞性肺疾病的发病相关^[27]。动物实验发现 RAGE 介导 T 细胞增殖和分化而影响哮喘发作,表明 RAGE 在 Th2 型细胞介导的哮喘中起关键作用^[28]。研究表明,RAGE 敲除或 RAGE 抑制剂治疗的支气管哮喘小鼠体内炎症反应明显减轻^[29]。

Th-17 属 CD4^{+} T 细胞亚群,主要通过分泌 IL-17 趋化中性粒细胞在气道募集而促进非 Th2 优势型哮喘的发生,Th-17 细胞与严重型哮喘的发展密切相关,严重型哮喘以中性粒细胞-嗜酸性粒细胞浸润的混合模式和糖皮质激素不敏感为特征^[30]。IL-17A 的增加可促使巨噬细胞及中性粒细胞向肺部浸润,促进气道炎症反应^[31],IL-17 也可通过促进上皮下纤维化促进气道重塑,此过程可能与 IL-17 诱导线粒体自噬有关^[32]。

PI3K-AKT 信号转导通路通过多种途径参与支气管哮喘的气道炎症。PI3K-AKT 信号转导通路的激活能够促进辅助性 T 细胞分化为 Th2 细胞,诱导嗜酸性粒细胞分化、聚集、活化,促进辅助性 B 细胞产生 IgE,从而介导 I 型变态反应,导致过敏性炎症和气道重塑^[33]。PI3K 抑制剂通过阻断 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,从而抑制炎症反应与气道重塑^[34]。

Toll 样受体(Toll like receptors,TLRs)

是人体内一大类模式识别受体,也是参与适应性免疫的重要分子之一。在不同诱因刺激哮喘发作时,机体可激活不同的TLRs,各种TLRs与Th2向Th1表型的分化与辅助型T细胞的成熟密切相关。部分TLRs激动剂可通过诱导免疫耐受或气道免疫反应向Th1分化,从而阻止变应性气道疾病进展,在恢复过敏患者气道保护性免疫反应方面有很好的应用前景^[35]。

β_2 受体激动剂能够通过增加细胞内cAMP,诱导气道平滑肌松弛。维持细胞内cAMP水平升高可减弱肥大细胞和嗜碱性细胞中介质释放,cAMP激活的交换蛋白对支气管哮喘气道炎症和气道重塑具有保护作用^[36]。动物实验表明苓甘五味姜辛汤可通过上调细胞内cAMP表达水平,发挥对支气管哮喘的治疗作用^[37]。

缺氧诱导因子1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)是一种机体为适应缺氧环境而产生的调节因子,HIF-1 α 是其主要的功能亚单位。研究表明,哮喘患者体内HIF-1 α 、氧化应激水平与嗜酸性粒细胞数目呈正相关,缺氧、氧化应激可以通过增加支气管哮喘患者嗜酸性粒细胞数目促进哮喘气道炎症^[38]。此外,HIF-1 α 能作用于血管内皮生长因子促进炎症,并诱导与气道重塑相关基因活化,HIF-1 α 、血管内皮生长因子表达水平与支气管哮喘患儿病情严重程度呈正相关^[39]。

细胞内Ca²⁺浓度对气道收缩、分泌和重塑至关重要。支气管平滑肌的收缩性升高被认为是气道高反应性的原因之一。包括气道平滑肌在内的平滑肌收缩由Ca²⁺依赖性和Ca²⁺非依赖性途径介导。Ca²⁺通道阻滞剂降低了严重哮喘患者支气管平滑肌细胞的增殖,抑制支气管平滑肌重塑并防止哮喘发作的发生^[40]。

研究表明哮喘患者气道平滑肌细胞上的雌激素受体表达增加可促进气道平滑肌松弛,抑制气道平滑肌细胞增殖和哮喘小鼠气道高反应性^[41]。围绝经期雌激素水平下降可能与支气管哮喘发生及肺功能下降相关^[42]。ER β 激动剂治疗哮喘,可逆转由过敏原引起的气道力学、生化、分子和组织学参数变化^[43],雌激素替代治疗可降低绝经妇女发生迟发性哮喘的风险^[44]。

本研究基于网络药理学和分子对接方法,预测苓甘五味姜辛汤主要通过山柰酚、常春藤苷配基、 β -谷甾醇、柚皮素等作用于MAPKs、AKT1、RELA、JUN、PRKCA、BCL2等靶点,调控AGE-RAGE、IL-17、PI3K/Akt、cAMP、雌激素、Ca²⁺、HIF-1等信号通路治疗支气管哮喘。表明苓甘五味姜辛汤通

过多成分、多靶点、多通路协同发挥治疗支气管哮喘的作用,为临床和基础研究提供了新思路。本研究仅从理论层面对苓甘五味姜辛汤治疗支气管哮喘的作用机制进行了探讨,未来仍需更多的基础及临床研究进行以验证。

参考文献

- [1] 王导新,熊伟,王勤,等.《中国支气管哮喘防治指南(2020年版)》评述[J].西部医学,2022,34(1):1-4.
- [2] 李岩,李荣科,王燕,等.苓甘五味姜辛汤对哮喘大鼠环腺苷酸、环腺苷酸依赖性蛋白激酶A及水通道蛋白5的影响[J].中国中医药信息杂志,2015,22(10):67-69.
- [3] 周松晶,李玉玲,史佳.加味苓甘五味姜辛汤对支气管哮喘慢性持续期痰证患者炎症因子的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(4):198-202.
- [4] 丘冠东,黄飞平,李发茂.苓甘五味姜辛汤合陈夏六君子汤加减治疗咳嗽变异性哮喘的临床疗效研究[J].临床医药文献电子杂志,2020,7(47):141-142.
- [5] 安晓彤.中西医治疗支气管哮喘的研究综述[J].内蒙古中医药,2021,40(12):156-158.
- [6] GONG J H, SHIN D, HAN S Y, et al. Kaempferol suppresses eosinophil infiltration and airway inflammation in airway epithelial cells and in mice with allergic asthma[J]. J Nutr, 2012, 142(1):47-56.
- [7] MOLITORISOVA M, SUTOVSKA M, KAZIMIEROVA I, et al. The anti-asthmatic potential of flavonol kaempferol in an experimental model of allergic airway inflammation[J]. Eur J Pharmacol, 2021, 891:173698.
- [8] 李丽博,劳慧敏,陈梦琦,等.中医药逆转支气管哮喘上皮间质转化相关信号通路研究概述[J].西部中医药,2024,37(7):72-75.
- [9] YUK J E, WOO J S, YUN C Y, et al. Effects of lactose-beta-sitosterol and beta-sitosterol on ovalbumin-induced lung inflammation in actively sensitized mice[J]. Int Immunopharmacol, 2007, 7(12):1517-1527.
- [10] MAHAJAN S G, MEHTA A A. Suppression of ovalbumin-induced Th2-driven airway inflammation by β -sitosterol in a guinea pig model of asthma[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 650(1):458-464.
- [11] 段萌萌,张葆青.基于网络药理学和分子对接技术探讨敏煎治疗儿童哮喘的作用机制[J].西部中医药,2024,37(8):73-81.
- [12] SHI Y, TAN Y, MAO S, et al. Naringenin inhibits allergen-induced airway remodeling in a murine model of asthma[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(4):1204-1208.
- [13] MOON P D, CHOI I H, KIM H M. Naringenin suppresses the production of thymic stromal lymphopoietin through the blockade of RIP2 and caspase-1 signal cascade in mast cells[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 671(1-3):128-132.
- [14] CHO J H, LEE J Y, SIM S S, et al. Inhibitory effects of diterpene acids from root of *Aralia cordata* on IgE-mediated asthma in guinea pigs[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2010, 23(3):190-199.
- [15] 谢敏. ERK1/2信号通道在哮喘支气管平滑肌表型转化、迁移

- 和分泌调控中作用的研究[D]. 武汉:华中科技大学,2007.
- [16] 白晶. ERK信号通路对慢性哮喘大鼠气道平滑肌细胞增殖与凋亡的调控作用[D]. 武汉:华中科技大学,2007.
- [17] 王国强. p38 MAPK在NTHi诱导的中性粒细胞哮喘中的作用及靶向干预研究[D]. 长春:吉林大学,2019.
- [18] 沈佩婷. Toll样受体2介导的JNK信号分子在小鼠支气管哮喘发病中的作用机制[D]. 合肥:安徽医科大学,2016.
- [19] 潘琼,岳虹霓,丁梅芳,等. 蛋白激酶C- α 基因rs228883多态性与哮喘易感性的关系[J]. 中华医院感染学杂志,2011(18):3795-3797.
- [20] MA L, BROWN M, KOGUT P, et al. Akt activation induces hypertrophy without contractile phenotypic maturation in airway smooth muscle[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011, 300(5):701-709.
- [21] ZHANG Y Z, WU Q J, YANG X, et al. Effects of SIRT1/Akt pathway on chronic inflammatory response and lung function in patients with asthma[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(11):4948-4953.
- [22] 史琰,王向华,杨达胜. AP-1与肿瘤、自身免疫性疾病、哮喘、肾脏疾病关系的研究进展[J]. 山东医药,2019,59(20):93-96.
- [23] JIN A, BAO R, ROTH M, et al. MicroRNA-23a contributes to asthma by targeting BCL2 in airway epithelial cells and CXCL12 in fibroblasts[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(11):21153-21165.
- [24] 王晓晖. Bcl-2抑制剂诱导粒细胞凋亡缓解PM引起的气道炎症[D]. 杭州:浙江大学,2017.
- [25] IORDANIDOU M, PARASKAKIS E, TAVRIDOU A, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms are associated with sensitization to seasonal aeroallergens in asthmatic children[J]. *World J Pediatr*, 2017, 13(1):34-40.
- [26] KOBAYASHI K, NISHIMURA Y, YAMASHITA T, et al. The effect of overexpression of endothelial nitric oxide synthase on eosinophilic lung inflammation in a murine model[J]. *Int Immunopharmacol*, 2006, 6(7):1040-1052.
- [27] NIU H, YANG T, NIU W, et al. Association of RAGE gene multiple variants with the risk for asthma and COPD in a population-based Han Chinese cohort[C]. *Genes and environment. European Respiratory Society*, 2019, 11(10):3220-3237.
- [28] AKIRAV E M, HENEGARIU O, PRESTON-HURLBURT P, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) affects T cell differentiation in OVA induced asthma[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4):95678.
- [29] MILUTINOVIC P S, ALCORN J F, ENGLERT J M, et al. The receptor for advanced glycation end products is a central mediator of asthma pathogenesis[J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(4):1215-1225.
- [30] RAMAKRISHNAN R K, HEIALY SAL, HAMID Q. Role of IL-17 in asthma pathogenesis and its implications for the clinic[J]. *Expert Rev Respir Med*, 2019, 13(11):1057-1068.
- [31] 陈晓璐,王华英,徐涛,等. Th17细胞及IL-17A在慢性气道炎症疾病中的研究进展[J]. 医学理论与实践, 2021, 34(5):746-748.
- [32] RAMAKRISHNAN R K, BAJBOUJ K, HEIALY SAL, et al. IL-17 induced autophagy regulates mitochondrial dysfunction and fibrosis in severe asthmatic bronchial fibroblasts[J]. *Front Immunol*, 2020, 11:1002.
- [33] LIU L L, LI F H, ZHANG Y, et al. Tangeretin has anti-asthmatic effects via regulating PI3K and Notch signaling and modulating Th1/Th2/Th17 cytokine balance in neonatal asthmatic mice[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2017, 50(8):5991.
- [34] 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.
- [35] 刘佩强,许显. Toll样受体激动剂在变应性气道炎症性疾病治疗中的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(24):3047-3051.
- [36] 黄革,钟金男,何光珍,等. cAMP直接激活的交换蛋白在哮喘小鼠气道重塑中的作用[J]. 武汉大学学报(医学版), 2016, 37(1):20-24.
- [37] 李岩. 苓甘五味姜辛汤对寒饮伏肺型哮喘大鼠cAMP-PKA通路相关分子表达的影响[D]. 兰州:甘肃中医药大学,2016.
- [38] 文颖. HIF-1 α 、氧化应激状态与支气管哮喘的相关性研究[D]. 太原:山西医科大学,2021.
- [39] 王青青. 哮喘患儿血清HIF-1 α 、VEGF与其病情程度的研究[D]. 开封:河南大学,2020.
- [40] GIRODET P O, DOURNES G, THUMEREL M, et al. Calcium channel blocker reduces airway remodeling in severe asthma. A proof-of-concept study[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015, 191(8):876-883.
- [41] KALIDHINDI R S R, AMBHOORE N S, BHALLAMUDI S, et al. Role of estrogen receptors α and β in a murine model of asthma: exacerbated airway hyperresponsiveness and remodeling in ER β knockout mice[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10:1499.
- [42] 胡家荣,阳代春. 围绝经期妇女雌激素水平变化与支气管哮喘和肺功能的关系[J]. 中国妇幼保健, 2021, 36(4):917-919.
- [43] AMBHOORE N S, KALIDHINDI R S R, LOGANATHAN J, et al. Role of differential estrogen receptor activation in airway hyperreactivity and remodeling in a murine model of asthma[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019, 61(4):469-480.
- [44] SHAH S A, TIBBLE H, PILLINGER R, et al. Hormone replacement therapy and asthma onset in menopausal women: national cohort study[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2021, 147(5):1662-1670.

收稿日期:2024-08-21

*基金项目:陕西省科技厅重点研发计划(2017ZDXM-SF-109)。

作者简介:武蕊(1992—),女,硕士学位,主治医师。研究方向:呼吸系统疾病的中医诊治。

△通讯作者:李猛(1981—),男,博士学位,副主任医师。研究方向:呼吸系统疾病的临床与基础研究。Email:zwmwq7812@sina.com。