

本文引用: 张婷婷, 刘 博, 邹 雪, 满益娟, 张宝昕. 基于网络药理学和实验验证探讨加味小柴胡汤治疗咳嗽变异性哮喘的分子机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(3): 419-426.

基于网络药理学和实验验证探讨加味小柴胡汤治疗咳嗽 变异性哮喘的分子机制

张婷婷, 刘 博*, 邹 雪, 满益娟, 张宝昕
河北省沧州中西医结合医院儿科, 河北 沧州 061001

[摘要] **目的** 通过网络药理学、分子对接和实验验证对加味小柴胡汤治疗咳嗽变异性哮喘的主要活性成分及潜在作用机制进行探讨。**方法** 应用网络药理学预测加味小柴胡汤治疗咳嗽变异性哮喘可能的作用机制, 并通过分子对接预测活性成分的结合位点。构建哮喘大鼠模型, 将 60 只大鼠随机分为正常组、模型组、地塞米松片组[0.5 mg/(kg·d)]、加味小柴胡汤组[5 g/(kg·d)], 每组 15 只。正常组、模型组给予生理盐水 2 mL 灌胃, 每日灌胃 2 次。给药 4 周后取大鼠血清及肺组织, ELISA 法检测血清白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-13(interleukin-13, IL-13)、免疫球蛋白 E(immunoglobulin E, IgE)、干扰素- γ (interferon- γ , INF- γ)水平, Western blot 法检测肺组织丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、GATA 结合蛋白-3 (GATA-binding protein-3, GATA-3)表达水平。**结果** 网络药理学共筛选出加味小柴胡汤有效成分 1 483 种, 作用靶点 274 个, 咳嗽变异性哮喘相关靶点 7 509 个, 其交集靶点 204 个。GO 和 KEGG 富集分析主要涉及信号转导、炎症反应、细胞凋亡等一系列的生物学反应过程, 主要参与表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、丝裂原活化蛋白激酶 1(mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)、丝裂原活化蛋白激酶 3(mitogen-activated protein kinase 3, MAPK3)、RELA 癌基因(RELA proto-oncogene, RELA)、细胞肿瘤抗原 p53 (cellular tumor antigen P53, TP53)、细胞性骨髓细胞瘤病毒癌(myelocytomatosis virus carcinoma, MYC)和蛋白激酶 C α (protein kinase C α , PRKCA)等靶点的调控。分子对接结果表明, 筛选得到的主要活性成分与靶点有较强的结合力。与正常组比较, 模型组大鼠肺组织中 IL-6、IL-13、IgE、MAPK、GATA-3 升高($P<0.05$), INF- γ 降低($P<0.05$)。与模型组比较, 地塞米松片组及加味小柴胡汤组 IL-6、IL-13、IgE、MAPK、GATA-3 降低($P<0.05$), INF- γ 升高($P<0.05$)。与地塞米松片组比较, 加味小柴胡汤组大鼠 IL-6、IL-13、IgE 降低($P<0.05$), INF- γ 升高($P<0.05$)。**结论** 加味小柴胡汤对咳嗽变异性哮喘具有治疗作用, 其作用机制可能与 EGFR、MAPK1、MAPK3、RELA、TP53、MYC 和 PRKCA 靶点有关。

[关键词] 加味小柴胡汤; 咳嗽变异性哮喘; 表皮生长因子受体; 丝裂原活化蛋白激酶; RELA 癌基因; 地塞米松; 分子对接
[中图分类号]R285.5 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.03.010

Molecular mechanism of Jiawei Xiaochaihu Decoction in treating cough-variant asthma based on network pharmacology and experimental validation

ZHANG Tingting, LIU Bo*, ZOU Xue, MAN Yijuan, ZHANG Baoxin

Pediatric Department, Hebei Cangzhou Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Cangzhou, Hebei 061001, China

[Abstract] **Objective** To explore the main active ingredients and potential mechanism of action of Jiawei Xiaochaihu

[收稿日期]2023-07-16

[基金项目]河北省中医药管理局科研计划项目(2021317)。

[通信作者]* 刘 博,男,副主任医师,E-mail:280346124@qq.com。

Decoction (JWXCHD) in treating cough-variant asthma through network pharmacology, molecular docking, and experimental validation. **Methods** The network pharmacology was applied to predicting the possible mechanism of action of JWXCHD in treating cough-variant asthma and molecular docking was used to predict the binding sites of active ingredients. A rat model of asthma was established, and 60 rats were randomly divided into normal group, model group, dexamethasone tablets group [0.5 mg/(kg·d)], and JWXCHD group [5 g/(kg·d)], with 15 rats in each group. The normal group and model group were given 2 mL of saline by gavage, twice a day. The serum and lung tissue of rats were collected after four weeks of administration. The levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-13 (IL-13), immunoglobulin E (IgE), and interferon- γ (INF- γ) were checked by ELISA, and the expression levels of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and GATA-binding protein-3 (GATA-3) in the lung tissue were examined by Western blot. **Results** Network pharmacology screened out a total of 1,483 active ingredients of JWXCHD, 274 action targets, 7,509 targets related to cough-variant asthma, and 204 intersection targets. GO and KEGG enrichment analyses yielded a series of biological reaction processes such as signal transduction, inflammatory response, and cell apoptosis, mainly involving the regulation of targets such as epidermal growth factor receptor (EGFR), mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), mitogen-activated protein kinase 3 (MAPK3), RELA proto-oncogene (RELA), cellular tumor antigen P53 (TP53), myelocytomatosis virus carcinoma (MYC), and protein kinase C α (PRKCA). The results of molecular docking showed that the main active ingredients screened out had strong binding force with the targets. Compared with the normal group, IL-6, IL-13, IgE, MAPK, and GATA-3 increased ($P<0.05$) and INF- γ decreased ($P<0.05$) in the lung tissue of the model group. Compared with the model group, IL-6, IL-13, IgE, MAPK, and GATA-3 decreased ($P<0.05$) and INF- γ increased ($P<0.05$) in the lung tissue of the dexamethasone tablets group and the JWXCHD group. Compared with the dexamethasone tablets group, IL-6, IL-13, and IgE decreased and INF- γ increased in the JWXCHD group ($P<0.05$). **Conclusion** JWXCHD has therapeutic effects on cough-variant asthma, and its mechanism of action may be related to targets of EGFR, MAPK1, MAPK3, RELA, TP53, MYC, and PRKCA.

[**Keywords**] Jiawei Xiaochaihu Decoction; cough-variant asthma; epidermal growth factor receptor; mitogen-activated protein kinase; RELA proto-oncogene; dexamethasone; molecular docking

咳嗽变异性哮喘是支气管哮喘的一种亚型,被认为是全球成年人慢性咳嗽最常见的原因之一^[1]。咳嗽变异性哮喘与典型的哮喘不同,通常表现为仅咳嗽而没有喘息或呼吸困难的症状,尤其是夜间咳嗽^[2]。由于咳嗽变异性哮喘与经典哮喘具有相同的病理生物学基础,临床上通常使用吸入性皮质类固醇或吸入性皮质类固醇联合长效 β 受体激动剂缓解顽固性咳嗽^[3]。尽管部分患者的咳嗽症状经治疗后可得到有效控制,但仍有30%~40%的咳嗽变异性哮喘患者会发展为典型哮喘^[4]。中医药治疗咳嗽变异性哮喘历史悠久,积累了丰富的实践经验,具有多成分、多靶点、多途径的优势。现代药理学研究发现,中药可以通过改善患者症状,延缓进程,从而起到治疗哮喘的作用^[5]。

《伤寒论·辨太阳病脉证并治》中记载:“伤寒五六日……或咳者,小柴胡汤主之。”小柴胡汤为《伤寒论》中治疗少阳病的主方,是治疗咳嗽的常用方,由柴胡、黄芩、法半夏、人参、生姜、大枣、炙甘草组成,加味小柴胡汤由小柴胡汤加陈皮燥湿化痰,以增强宣肺化痰、补脾益肺、调和营卫的功效,主治宿痰内

伏、肺失宣降证,目前临床上主要用于治疗咳嗽等多种肺疾病。尽管目前对加味小柴胡汤的疗效研究较多,但对于其有效成分、作用靶点和作用途径等药理机制的研究较少。网络药理学是一门基于人工智能和大数据的药物系统研究新发展的交叉学科,具有系统性、相关性和可预测性等特点,其可将生物信息学和系统生物学相结合,构建“成分-靶点-通路”的相互作用关系,可为活性化合物筛选和机制的探索提供新的思路^[6]。

本研究结合网络药理学预测加味小柴胡汤治疗咳嗽变异性哮喘的潜在活性成分、作用靶点以及发挥药效的相关分子通路;并通过哮喘大鼠模型进行动物实验验证,采用ELISA法和Western blot法进一步揭示加味小柴胡汤治疗咳嗽变异性哮喘的潜在作用机制。

1 方法

1.1 网络药理学及分子对接探讨加味小柴胡汤的作用机制

1.1.1 主要成分的检索、筛选和作用靶点的确定 通

过中国天然产物化学成分库(<http://pharmdata.ncmi.cn/cnpc/>)以及 SymMap(<http://symmap.org/>)数据库,分别以加味小柴胡汤中柴胡、法半夏、人参、黄芩、炙甘草、生姜、大枣、陈皮为关键词进行检索。对有效成分进行筛选(类药性 ≥ 0.18 和口服生物利用度 $\geq 30\%$),提取对应的靶点,并将靶点去重后与 UniProt 数据库进行匹配。

1.1.2 咳嗽变异性哮喘相关靶点的筛选 通过 GeneCards 数据库对咳嗽变异性哮喘相关基因进行检索,筛选得分 ≥ 1.0 ,与咳嗽变异性哮喘相关性高的基因靶点。

1.1.3 药物-有效成分-靶点网络的绘制 应用 R4.0.2 软件对加味小柴胡汤和咳嗽变异性哮喘的相同靶点进行整合,并结合上述关键靶点,构建“中药-有效成分-药物靶点”网络信息图。

1.1.4 KEGG 信号通路和 GO 功能分析 利用 R4.0.2 软件内 clusterProfiler 插件对所有关键靶点进行 KEGG 和 GO 分析,根据 P 值筛选出排名前 10 位的生物过程、细胞组分、分子功能的数据,绘制柱形图、气泡图和信号通路图。

1.1.5 PPI 网络构建及核心靶点的筛选 利用 STRING(<http://string-db.org/>)数据平台建立 PPI 网络,将加味小柴胡汤和咳嗽变异性哮喘共有的关键靶点导入,设置最高互作分值为 0.9,去除隐藏的游离节点后共得到 204 个关键靶点,构建 PPI 网络图。

1.1.6 药物主要活性成分-核心靶点分子对接验证

在 RCSB PDB(<http://www.rcsb.org/>)数据库检索和下载潜在靶蛋白的 PDB ID,而活性化合物的结构则在中药系统药理学数据库和分析平台数据库中以“*mol2”格式下载。通过 AutoDock 软件对蛋白受体、化合物配体进行去水、加氢、分配电荷等处理后,保存为“PDBQT”格式。设置蛋白受体中心为对接盒子中心,设定格点盒子大小为 $126 \times 126 \times 126$ (每个格点的间距为 0.485 \AA),使其包围整个蛋白受体。重新运算的最大评估数中型为 25 000 000,最大的遗传世代为 27 000,遗传算法的运行数为 10,其余参数为默认,选择 Lamarckian 遗传算法进行柔性对接,应用 SYBYL-X 2.0 软件绘制模拟对接图像,并计算有效成分与靶蛋白对接的结合能,一般认为结合能小于 -5 kcal/mol 代表有良好的结合性^[7]。

1.2 实验验证

1.2.1 药物与主要试剂 加味小柴胡汤由柴胡、人参、法半夏、黄芩、炙甘草、大枣、陈皮、生姜组成。柴

胡、人参、法半夏、黄芩、炙甘草、大枣、陈皮(南京森贝伽生物科技有限公司,批号:120992、120917、120973、120955、120904、121040、120969);生姜(河北省沧州中西医结合医院药剂科提供,批号:2112101)。实验所需中药饮片经河北省沧州中西医结合医院药剂科鉴定为正品。地塞米松片(大同市利群制药厂,批准文号:国药准字 H14023268,规格:0.25 mg)。

卵清白蛋白(美国 Sigma 公司,批号:9006-59-1);氢氧化铝佐剂(美国赛默飞世尔科技公司,批号:21645-51-2);白细胞介素-13(interleukin-13, IL-13)ELISA 试剂盒(派普泰克生物科技有限公司,批号:400-16L);干扰素- γ (interferon- γ , INF- γ)ELISA 试剂盒[艾博抗(上海)贸易有限公司,批号:ab221834];白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)ELISA 试剂盒、免疫球蛋白 E(immunoglobulin E, IgE)ELISA 试剂盒、兔源 MAPK 抗体、GATA-3 抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab178013、ab315411、ab4822、ab106625)。

1.2.2 主要仪器 1510 型酶标仪[赛默飞世尔(上海)仪器有限公司];JB-P5 型包埋机(武汉俊杰电子有限公司);RM2016 型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司);WD-9405B 型水平摇床、DYY-7C 型电泳仪、WD-9413B 型凝胶成像系统、DYCZ-24DN 型双垂直蛋白电泳仪(北京六一生物科技有限公司)。

1.2.3 动物 60 只 3 月龄 SD 雄性大鼠,体质量(180 ± 20) g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号:北京瓦窑 SCXK(京)2021-0011。在河北大学动物实验中心 SPF 级动物房进行实验,饲养温度(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度 50%~60%。本研究通过河北大学动物实验中心伦理委员会审查,伦理审查编号:IACUC-210812。

1.2.4 动物分组、造模、给药与取样 将所购 SD 雄性大鼠按照随机数字表法分为 4 组,正常组、模型组、地塞米松片组、加味小柴胡汤组,每组 15 只。

于实验室内适应性饲养 1 周。依照动物模型制备规范^[8]制备哮喘大鼠模型,正常组大鼠于实验第 1 日和第 7 日于大鼠双侧足心、双侧腹股沟皮下、腹腔 5 点注射 1 mL 生理盐水,其余大鼠均注射含 1 mg 卵清白蛋白和 200 mg 氢氧化铝佐剂的混合剂 1 mL,且实验第 14 天开始予 1% 卵蛋白溶液雾化吸入,每日 30 min,共 14 d。最后一次雾化吸入后,随机取 1 只大鼠进行模型评价,以大鼠出现呼吸频率加快、腹部

肌肉痉挛及口周发绀等症状,肺组织出现哮喘样改变提示造模成功^[9]。

造模结束后,正常组和模型组大鼠予0.9%氯化钠溶液,每次2 mL,每日2次灌胃。地塞米松片组予地塞米松片溶液[0.5 mg/(kg·d)]灌胃,每次2 mL,每日2次^[10]。加味小柴胡汤组予加味小柴胡汤浓缩液[5 g/(kg·d)]灌胃,每次2 mL,每日2次。所有大鼠均连续灌胃治疗4周。

1.2.5 ELISA检测 取血清的上清液,按照ELISA试剂盒说明书检测血清中炎症因子IL-6、IL-13、IgE、INF- γ 水平。

1.2.6 Western blot检测 Western blot检测肺组织中丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、GATA结合蛋白-3(GATA-binding protein-3, GATA-3)表达水平。取约10 mg肺组织,加入组织裂解液,匀浆后以12 000 r/min(离心半径6 cm)离心10 min,离心后取上清液,通过聚丙烯酰胺凝胶分离出不同分子量的蛋白,电转移至硝酸纤维素膜,随后将硝酸纤维素膜在室温下用5%的脱脂牛奶在脱色摇床上封闭蛋白质1 h,添加一抗MAPK(1:1 000)、GATA-3(1:1 000)4℃孵育过夜,次日用TBST充分洗涤后添加二抗,37℃孵育1 h后,进行蛋白表达水平的定量分析。

1.3 统计学方法

采用R 4.0.2软件及SPSS 22.0统计软件对数据进行分析。计量资料先予以正态性检验,正态分布资料采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,组内样本均数差异行独立 t 检验,组间比较采用单因素方差分析;计数资料用[例(%)]或构成比表示,采用 χ^2 检验。均以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 加味小柴胡汤活性成分及靶点

通过中国天然产物化学成分库和SymMap数据库提取1 483个有效成分,经过口服生物利用度和类药性筛选后获得有效潜在活性成分,其中人参134个、大枣133个、柴胡349个、法半夏116个、甘草280个、生姜265个、陈皮63个、黄芩143个。将有效成分输入TCMSP数据库,搜索与成分相对应的作用靶点,共得到主要化学成分作用靶点274个。加味小柴胡汤“药物-有效成分-靶点”网络内重要性排前10位的主要化学成分见表1。

2.2 加味小柴胡汤与咳嗽变异性哮喘共同靶点

通过数据库检索,共得到7 509个咳嗽变异性哮喘相关靶点。将加味小柴胡汤主要化学成分靶点和咳嗽变异性哮喘相关基因取交集后得到204个靶基因。详见图1。

2.3 加味小柴胡汤有效成分治疗咳嗽变异性哮喘核心靶点的KEGG信号通路

KEGG富集分析结果显示,MAPK信号通路、磷脂酰肌醇3激酶-蛋白激酶B(phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B, PI3K-Akt)信号通路、神经营养因子信号通路、调控细胞衰老的信号通路、细胞周期信号通路、细胞凋亡信号通路、黏着斑信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、ErbB受体酪氨酸激酶(ErbB receptor tyrosine kinase, RTK)信号通路、叉头转录因子(forkhead transcription factor, FoxO)信号通路与204个核心靶点密切相关。详见图2。

2.4 加味小柴胡汤有效成分治疗咳嗽变异性哮喘核心靶点的GO功能分析

GO功能富集分析包括生物过程、细胞组分、分

表1 加味小柴胡汤有效成分(重要性排名前10位)

序号	分子标识	英文名	中文名	口服生物利用度/%	类药性	涉及药物
1	MOL000098	quercetin	槲皮素	46.43	0.28	法半夏
2	MOL000449	stigmasterol	豆甾醇	43.83	0.76	柴胡
3	MOL000675	oleic acid	油酸	33.13	0.14	柴胡
4	MOL000358	beta-sitosterol	β -谷甾醇	36.91	0.75	柴胡
5	MOL000422	kaempferol	山柰酚	41.88	0.24	柴胡
6	MOL004328	naringenin	柚皮素	59.29	0.21	甘草
7	MOL003896	7-methoxy-2-methyl isoflavone	7-甲氧基-2-甲基异黄酮	42.56	0.20	甘草
8	MOL000676	dibutyl phthalate	邻苯二甲酸二丁酯	64.54	0.13	柴胡
9	MOL002714	baicalein	黄芩素	33.52	0.21	人参
10	MOL000131	linoleic acid	亚油酸	41.90	0.14	法半夏

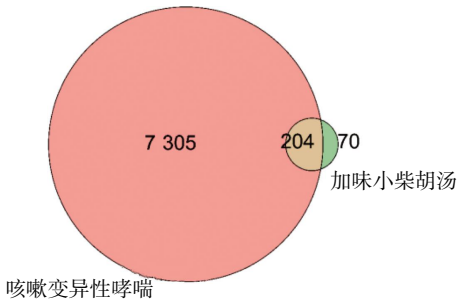


图 1 加味小柴胡汤靶基因与咳嗽变异性哮喘相关基因的韦恩图

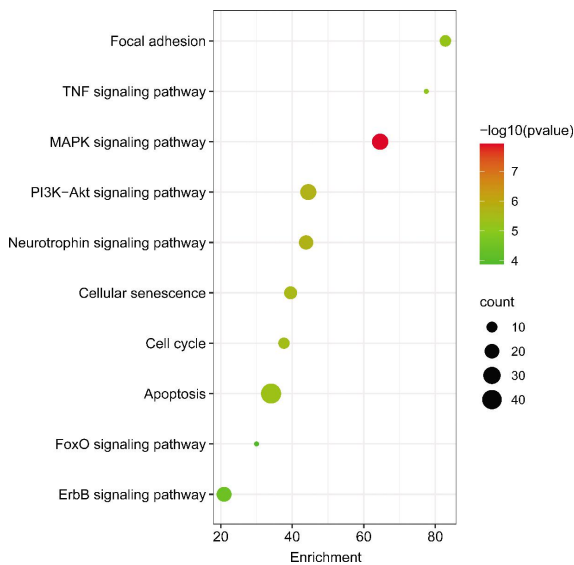


图 2 KEGG 富集分析气泡图

子功能 3 个部分。本研究结果中,生物过程主要为蛋白质修饰过程的调控、蛋白质代谢过程的调节、细胞蛋白质代谢过程的调节、细胞周期的调节、分子功能的调节、蛋白质代谢过程的正向调控、蛋白质修

饰过程的正向调控、代谢过程的正向调节、细胞蛋白质代谢过程的正向调控、细胞代谢过程的正向调节;细胞组分主要为胞质溶胶、核质、核腔、膜封闭内腔、细胞器腔、核部分、蛋白质复合物、高分子复合物、染色体、染色体部分;分子功能主要涉及酶结合、激酶结合、蛋白激酶结合、依赖于 DNA 的转录正调控、RNA 聚合酶 II 启动子的转录、转录因子结合、蛋白质结构域特异性结合、转录负调控、DNA 依赖性、蛋白质结合转录因子活性、蛋白质复合物。详见图3。

2.5 加味小柴胡汤治疗咳嗽变异性哮喘的靶点 PPI 网络及核心靶点

将交集靶点上传至 STRING 数据库,物种选择“Homo sapiens”,互作分数选择 ≥ 0.9 ,使用 Cytoscape 对 PPI 网络进行拓扑分析,将度值 ≥ 2 倍中值的节点确定为关键靶点,得到表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、丝裂原活化蛋白激酶 1(mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)、丝裂原活化蛋白激酶 3(mitogen-activated protein kinase 3, MAPK3)、RELA 癌基因(RELA proto-oncogene, RELA)、细胞肿瘤抗原 p53(cellular tumor antigen p53, TP53)、细胞性骨髓细胞瘤病毒癌(myelocytomatosis virus carcinoma, MYC)和蛋白激酶 C α (protein kinase C α , PRKCA)核心靶点。详见图 4。

2.6 分子对接验证结果

由以上分析结果选取加味小柴胡汤中药化合物槲皮素、豆甾醇、油酸、 β -谷甾醇和山柰酚以及靶点 EGFR、MAPK1、MAPK3、RELA、TP53 进行分子对接。

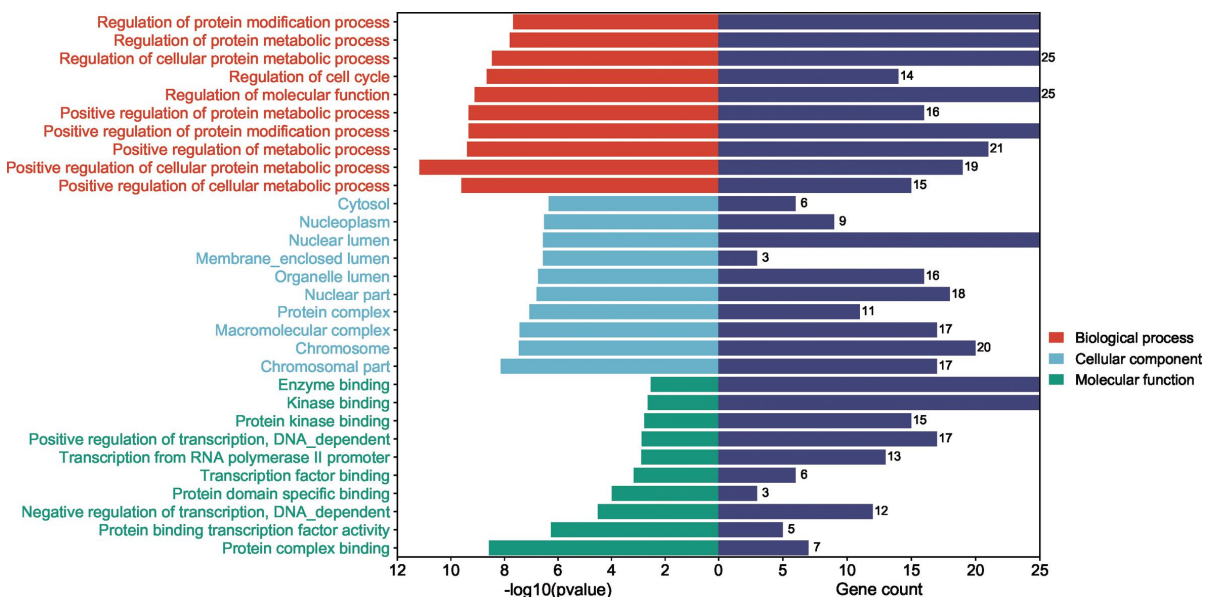


图 3 GO 功能分析图

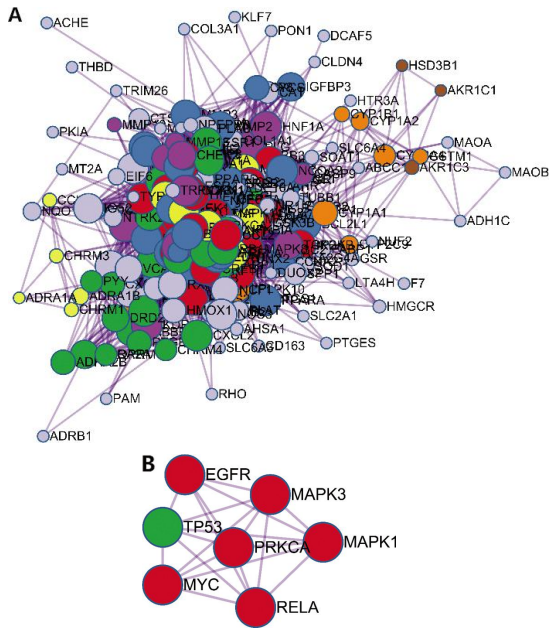


图 4 加味小柴胡汤与咳嗽变异性哮喘的核心靶点

PPI 网络图

注:A 为加味小柴胡汤与咳嗽变异性哮喘的共同靶点 PPI 网络图;B 为加味小柴胡汤与咳嗽变异性哮喘的核心靶点 PPI 网络图。图中节点与节点之间连线越粗、颜色越深代表两个靶点之间联系越紧密;节点越大、颜色越深代表该靶点更可能为加味小柴胡汤治疗咳嗽变异性哮喘的关键靶点。

结果显示,5 个活性成分与 5 个度值最高的核心靶点结合能均小于 -5 kcal/mol,表明小分子配体与蛋白结合的构象稳定。详见图 5、表 2。

表 2 核心靶点与加味小柴胡汤主要成分模拟对接结果

靶蛋白	主要成分	结合能/(kcal/mol)
EGFR	槲皮素	-6.679 79
	豆甾醇	-6.270 02
	油酸	-8.143 77
	β-谷甾醇	-6.051 15
	山柰酚	-5.725 45
MAKP1	槲皮素	-5.296 90
	豆甾醇	-5.614 01
	油酸	-5.233 15
	β-谷甾醇	-6.286 88
	山柰酚	-5.620 60
MAPK3	槲皮素	-6.627 84
	豆甾醇	-5.271 08
	油酸	-5.474 08
	β-谷甾醇	-6.361 23
	山柰酚	-6.558 46
RELA	槲皮素	-7.239 85
	豆甾醇	-5.860 66
	油酸	-5.522 44
	β-谷甾醇	-7.679 22
	山柰酚	-7.076 44
TP53	槲皮素	-5.850 33
	豆甾醇	-7.001 13
	油酸	-5.210 50
	β-谷甾醇	-7.187 07
	山柰酚	-5.126 81

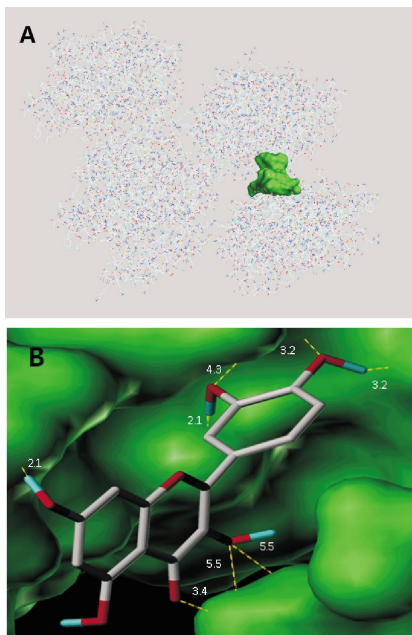


图 5 加味小柴胡汤主要成分与核心靶点分子对接图

注:A 为靶蛋白 EGFR 的分子结构图,绿色部分为 EGFR 的三维结构活性口袋;B 为槲皮素与 EGFR 活性口袋的模拟对接图,其中未被绿色覆盖部分为槲皮素分子结构,黄色虚线为槲皮素与 EGFR 模拟对接的作用点,白色数字为键长。

2.7 各组大鼠炎症因子水平比较

与正常组比较,模型组大鼠中 IL-6、IL-13、IgE 升高($P < 0.05$),INF- γ 降低($P < 0.05$)。与模型组比较,地塞米松片组及加味小柴胡汤组大鼠 IL-6、IL-13、IgE 降低($P < 0.05$),INF- γ 升高($P < 0.05$)。与地塞米松片组比较,加味小柴胡汤组大鼠 IL-6、IL-13、IgE 降低($P < 0.05$),INF- γ 升高($P < 0.05$)。详见表 3。

2.8 各组大鼠肺组织中 MAPK、GATA-3 蛋白表达水平比较

与正常组比较,模型组 MAPK、GATA-3 蛋白表达水平升高($P < 0.05$);与模型组比较,地塞米松片组和加味小柴胡汤组 MAPK、GATA-3 蛋白表达水平降低($P < 0.05$)。详见图 6。

3 讨论

咳嗽变异性哮喘是慢性咳嗽的最常见原因。中国流行病学调查结果显示,咳嗽变异性哮喘占慢性咳嗽病例的 1/3^[11]。在临床治疗方面,多使用吸入性皮质类固醇联合长效 β_2 受体激动剂维持治疗。相关研究发现,停药 6 个月后高达 67% 的咳嗽变异性

表3 各组大鼠炎症因子水平比较($\bar{x}\pm s$, pg/mL)

组别	IL-6	IL-13	IgE	INF- γ
正常组	37.06 \pm 7.12	14.83 \pm 3.06	15.86 \pm 3.16	58.37 \pm 12.76
模型组	173.54 \pm 15.27*	45.57 \pm 6.09*	127.24 \pm 14.38*	19.36 \pm 3.24*
地塞米松片组	59.12 \pm 8.49**	23.56 \pm 6.01**	57.54 \pm 11.29**	31.95 \pm 8.57**
加味小柴胡汤组	52.39 \pm 7.61** \blacktriangle	19.01 \pm 5.23** \blacktriangle	43.45 \pm 10.26** \blacktriangle	38.27 \pm 7.89** \blacktriangle

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,** $P<0.05$;与地塞米松组比较, $\blacktriangle P<0.05$ 。

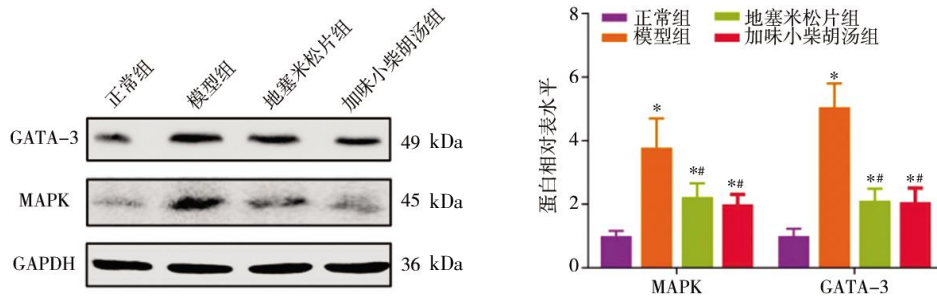


图6 各组大鼠肺组织 MAPK、GATA-3 蛋白表达水平比较

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

哮喘患者咳嗽症状评分增加,肺功能和嗜酸性气道炎症加重^[12]。为了缓解咳嗽变异性哮喘患者的症状,通常需要多种治疗。故本研究结合咳嗽变异性哮喘的病因特点,预测加味小柴胡汤对咳嗽变异性哮喘具有一定的治疗作用,并基于网络药理学,对加味小柴胡汤的有效成分和疾病靶点进行分析,建立药物-靶点-疾病的网络关系,最后应用分子对接和动物实验验证网络药理学结果。

PPI 网络图分析结果表明,加味小柴胡汤的有效成分主要作用于 EGFR、MAPK1、MAPK3、RELA、TP53、MYC、PRKCA 多个核心靶点,其中,EGFR/MAPK/NF- κ B/RELA 通路介导的炎症反应可能是加味小柴胡汤治疗咳嗽变异性哮喘的关键靶点。先前研究发现,空气污染物、病毒和细菌等环境因素会诱导 MAPK 蛋白(ERK、JNK 和 p38)的活化,激活 MAPK/NF- κ B/RELA 信号通路,使 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等炎症因子的表达上调,诱导嗜酸性粒细胞浸润肺组织,直接引起气道炎症和气道高反应性,从而导致咳嗽变异性哮喘病情加重^[13]。Qi 等^[14]发现,柚皮素通过调节 P13K/Akt、Erk/JNK 信号通路上调 HO-1 的表达,抑制了氧化应激反应对肺组织的损伤,进一步减轻了炎症反应,从而起到肺保护作用。CHAN-JITWIRIYA 等^[15]研究发现,槲皮素通过促进 VEGFA 和 TNF 的释放作用于膜 EGFRs 和 TNFR1,从而影响 Ras、Raf、MEK 的激活以及 MAPK1 和 MAPK3 的磷酸化,减轻了炎症反应,有助于咳嗽变异性哮喘的治疗。另外,相关实验研究发现,山柰酚、豆甾醇、 β -谷

甾醇可通过调节雌激素信号通路上 MAPK 核心靶点的表达,抑制 MAPK/NF- κ B 的信号传导,调控细胞因子的水平,从而发挥抗炎作用^[16-17]。由上述研究可知,MAPK/NF- κ B/RELA 信号通路可能是加味小柴胡汤治疗咳嗽变异性哮喘的关键靶点。

另外,KEGG 通路分析发现,TP53、MYC、PRKCA 信号通路可能是加味小柴胡汤治疗咳嗽变异性哮喘的相关靶点。既往研究发现,P53 信号通路在调节细胞周期方面具有核心作用,其中 TP53 为关键基因,可干扰抗凋亡因子和铜的结合,触发促凋亡蛋白从线粒体中释放并最终导致肺组织细胞死亡^[18]。除此之外,最新的实验研究发现,P53 可通过诱导 MYC 活化,激活 Fas/FasR、TNF- α 和 TNF 相关的凋亡诱导配体的转录和信号传导来诱导细胞凋亡^[19]。另一项研究发现,PRKCA 为 PI3K/Akt 信号通路的重要因子,可促进 Akt 级联的磷酸化,诱导 Bax 转位,进而促进线粒体内凋亡蛋白的释放,加速细胞凋亡^[20]。AMMAR 等^[21]发现,柚皮素可通过调节 P53 信号通路,促进 Bcl-2 的表达和降低 Bax 的表达,抑制肺组织细胞的凋亡,从而延缓咳嗽变异性哮喘的进程。相关研究发现,槲皮素可通过调节 MYC 基因的表达,调控 Wnt/ β -catenin 信号通路,抑制肺组织细胞的凋亡,从而减轻气道组织的损伤^[22-23]。由上述研究可知,TP53、MYC、PRKCA 可能是加味小柴胡汤治疗咳嗽变异性哮喘的相关靶点。

综上所述,加味小柴胡汤具有宣肺化痰、补脾益肺、调和营卫的功效,其对咳嗽变异性哮喘的治疗或

许具有积极作用,作用机制可能与 EGFR、MAPK1、MAPK3、RELA、TP53、MYC 和 PRKCA 靶点有关,后期有待于研究组进一步实验和临床验证。

参考文献

- [1] RYBKA-FRACZEK A, DABROWSKA M, GRABCZAK E M, et al. Does bronchial hyperresponsiveness predict a diagnosis of cough variant asthma in adults with chronic cough: A cohort study[J]. *Respiratory Research*, 2021, 22(1): 252.
- [2] LI H Y, ZHANG X M, ZHAO Q J, et al. Assessment of clinical diagnostic efficacy of pulmonary function test based on DBN-SVM of pediatric asthma and cough variant asthma[J]. *Computational Intelligence and Neuroscience*, 2022, 2022: 1182114.
- [3] NAKAJIMA T, NAGANO T, NISHIMURA Y. Retrospective analysis of the starting dose of combined ICS/LABA for cough-variant asthma and cough-predominant asthma[J]. *In Vivo*, 2022, 36(2): 949-953.
- [4] MIKAMI M, TOMITA K, YAMASAKI A. A history of recurrent episodes of prolonged cough as a predictive value for determining cough variant asthma in a primary care setting[J]. *Yonago Acta Medica*, 2021, 64(4): 353-359.
- [5] 米洋, 邓虎, 赵克明. 加味小柴胡汤对哮喘模型大鼠 TGF- β 1/Smad3 信号传导通路影响的实验研究[J]. *山西中医药大学学报*, 2021, 22(6): 410-413, 419.
- [6] AN W R, HUANG Y Q, CHEN S Q, et al. Mechanisms of Rhizoma Coptidis against type 2 diabetes mellitus explored by network pharmacology combined with molecular docking and experimental validation[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 20849.
- [7] CHEN S, LIAO M M, LI J P, et al. The correlation between microvessel pathological changes of the endplate and degeneration of the intervertebral disc in diabetic rats[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2020, 20(5): 1.
- [8] 徐方蔚, 路晨, 李盼盼, 等. 加味六安煎对咳嗽变异性哮喘豚鼠 Notch 受体/配体蛋白的影响[J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(10): 2309-2312.
- [9] 曹晓梅, 朱慧志, 杨磊, 等. 基于 TLR4/NF- κ B 通路探讨阳和平喘颗粒对哮喘大鼠气道炎症和气道重塑的实验研究[J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(6): 2-8.
- [10] 李雨鹏, 宓丹, 潘冲, 等. 扶正固本汤联合穴位贴敷对咳嗽变异性哮喘大鼠 Th2/Tregs 平衡的调节作用机制研究[J]. *时珍国医国药*, 2023, 34(1): 223-227.
- [11] WANG J X, SUN R, WANG R Y, et al. A traditional Chinese patent medicine-Suhuang Zhike capsule for cough variant asthma in adults: A protocol of systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Medicine*, 2019, 98(50): e18335.
- [12] FAN R R, WEN Z H, WANG D W, et al. Chinese herbal medicine for the treatment of cough variant asthma: A study protocol for a double-blind randomized controlled trial[J]. *Trials*, 2019, 20(1): 3.
- [13] BAI D H, SUN T X, LU F, et al. Eupatilin suppresses OVA-induced asthma by inhibiting NF- κ B and MAPK and activating Nrf2 signaling pathways in mice[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(3): 1582.
- [14] QI P, WEI C H, KOU D B. Beneficial effects of naringenin and morin on interleukin-5 and reactive oxygen species production in BALB/c mice with ovalbumin-induced asthma[J]. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 2021, 25(6): 555-564.
- [15] CHANJITWIRIYA K, ROYTRAKUL S, KUNTHALERT D. Quercetin negatively regulates IL-1 β production in Pseudomonas aeruginosa-infected human macrophages through the inhibition of MAPK/NLRP3 inflammasome pathways[J]. *PLoS One*, 2020, 15(8): e0237752.
- [16] CHO I H, GONG J H, KANG M K, et al. Astragaloside inhibits airway eosinophil induction and epithelial apoptosis through modulating oxidative stress-responsive MAPK signaling[J]. *BMC Pulmonary Medicine*, 2014, 14: 122.
- [17] 吴力超, 李俊峰, 张婷婷, 等. 基于网络药理学和细胞实验探讨豆甾醇抗炎作用[J]. *中成药*, 2022, 44(2): 609-615.
- [18] RUANGSURIYA J, CHARUMANEE S, JIRANUSORNKUL S, et al. Depletion of β -sitosterol and enrichment of quercetin and rutin in *Cissus quadrangularis* Linn fraction enhanced osteogenic but reduced osteoclastogenic marker expression[J]. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 2020, 20(1): 105.
- [19] TREJO-SOLIS C, ESCAMILA-RAMIREZ A, JIMENEZ-FARFAN D, et al. Crosstalk of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in the induction of apoptosis on cancer cells[J]. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(9): 871.
- [20] 孔庆新, 李思阳, 张径, 等. 鱼藤素联合喜树碱对宫颈癌细胞自噬、凋亡及 PI3K/Akt 通路的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2022, 33(7): 882-888.
- [21] AMMAR N M, HASSAN H A, ABDALLAH H M I, et al. Protective effects of naringenin from *Citrus sinensis* (var. Valencia) peels against CCl₄-induced hepatic and renal injuries in rats assessed by metabolomics, histological and biochemical analyses[J]. *Nutrients*, 2022, 14(4): 841.
- [22] 罗孟雄, 毕亦飞, 王象鹏. 基于 Wnt/ β -catenin 信号通路探讨槲皮素对自身免疫性葡萄膜炎大鼠的影响机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(16): 204-210.
- [23] GU Y Y, ZHANG M, CEN H, et al. Quercetin as a potential treatment for COVID-19-induced acute kidney injury: Based on network pharmacology and molecular docking study[J]. *PLoS One*, 2021, 16(1): e0245209.

(本文编辑 周旦)