

本文引用: 华 华, 刘向国, 夏 庆, 吴柏合, 朱 洁. 基于网络药理学和动物实验探讨补气益肺方治疗慢性阻塞性肺疾病的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(6): 1169-1178.

## 基于网络药理学和动物实验探讨补气益肺方治疗慢性阻塞性肺疾病的作用机制

华 华<sup>1</sup>, 刘向国<sup>2</sup>, 夏 庆<sup>1</sup>, 吴柏合<sup>3</sup>, 朱 洁<sup>2\*</sup>

1.安徽三联学院(现代康养产业学院),安徽 合肥 230601;2.安徽中医药大学中西医结合学院,安徽 合肥 230012;  
3.中卫市中医院,宁夏 中卫 755000

**[摘要]** **目的** 基于网络药理学及动物实验探讨补气益肺方治疗慢性阻塞性肺疾病(COPD)的作用机制。**方法** (1)通过 TCMS 和 Herb 数据库筛选补气益肺方的活性成分及潜在靶点,采用 DrugBank、GeneCards、OMIM 数据库检索 COPD 疾病基因;绘制韦恩图并获取药物-疾病共同靶点,借助 STRING 数据库和 Cytoscape 3.9.1 软件构建“成分-主要靶点-疾病”网络图以及蛋白质-蛋白质相互作用 PPI 网络图,并根据网络关系筛选核心靶点,采用 DVAID 数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析,利用 ADRFsuite 1.0 和 AutoDock Vina 1.1.2 软件将度值排名前 3 的核心成分与核心靶点进行分子对接。(2)动物实验验证:按照随机数字表法将 40 只 SD 大鼠分为对照组、模型组、桂龙咳喘宁组、补气益肺方组,每组 10 只。除对照组外,其余各组采用烟熏加脂多糖气管滴入方法构建 COPD 动物模型,于造模第 13 周的第 1 天开始药物干预,干预结束后检测各组大鼠的肺功能指标用力肺活量(FVC)、0.3 s 用力呼气容积(FEV0.3)、0.3 s 用力呼气容积与用力肺活量的比值(FEV0.3/FVC)和呼气峰值流速(PEF);HE 染色观察肺组织病理变化;ELISA 法检测血清肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(IL-6)含量;Western blot 法检测肺组织中磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)、磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶(p-PI3K)、蛋白激酶 B(Akt)和磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)的蛋白表达量。**结果** 网络药理学研究显示,补气益肺方治疗 COPD 的关键活性成分为氨噁-2-羧酸、山柰酚、槲皮素等,核心靶点有 Akt1、IL-6、TNF 等。GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析结果表明,补气益肺方治疗 COPD 与 PI3K-Akt 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、TNF 信号通路等有关,其中,PI3K-Akt 信号通路高度富集。分子对接结果显示,补气益肺方的关键活性成分氨噁-2-羧酸、山柰酚、槲皮素与治疗 COPD 的核心靶点 Akt1、IL-6 均有较好的结合活性。动物实验结果显示,与模型组相比,经补气益肺方与桂龙咳喘宁治疗后,大鼠肺功能指标明显升高( $P<0.01$ );肺组织病理学特征显著改善;炎症指标 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平明显降低( $P<0.05$ );p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 蛋白表达量明显降低( $P<0.01$ )。与桂龙咳喘宁组相比,补气益肺方组肺功能指标 FVC 值显著上升( $P<0.05$ ),FEV0.3/FVC 值明显下降( $P<0.05$ ),FEV0.3 和 PEF 值差异无统计学意义( $P>0.05$ );炎症指标 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平显著降低( $P<0.05$ );p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 蛋白表达量差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** 补气益肺方治疗 COPD 具有多成分、多靶点、多通路的作用特点,可通过调控 PI3K-Akt 信号通路减轻炎症反应,增强肺功能。

**[关键词]** 慢性阻塞性肺疾病;补气益肺方;PI3K-Akt 信号通路;炎症反应;网络药理学;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.2025.06.028

## Mechanism of action of Buqi Yifei Formula in treating chronic obstructive pulmonary disease based on network pharmacology and animal experiments

HUA Hua<sup>1</sup>, LIU Xiangguo<sup>2</sup>, XIA Qing<sup>1</sup>, WU Baihe<sup>3</sup>, ZHU Jie<sup>2\*</sup>

**[收稿日期]** 2025-01-16

**[基金项目]** 安徽省高校杰出青年科研项目(2022AH0200);安徽三联学院 2024 年度校级自然科学研究项目(KJZD2024003)。

**[通信作者]** \* 朱 洁,女,博士,教授,E-mail:janezhutcm@foxmail.com。

1. College of Modern Health Industry, Anhui Sanlian University, Hefei, Anhui 230601, China;
2. College of Integrated Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230012, China;
3. Zhongwei Traditional Chinese Medicine Hospital, Zhongwei, Ningxia 755000, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the mechanism of action of Buqi Yifei Formula (BQYFF) in treating chronic obstructive pulmonary disease (COPD) based on network pharmacology and animal experiments. **Methods** (1) The active ingredients and potential targets of BQYFF were screened through TCMSP and Herb databases, and the COPD disease genes were searched using DrugBank, Gene Cards, and OMIM databases. Then a Venn diagram was drawn and the common targets between the drug and disease were obtained. With the help of STRING database and Cytoscape 3.9.1 software, the "component-major target-disease" network diagram and PPI network diagram were constructed. Core targets were screened according to network relationships, and GO and KEGG enrichment analysis were conducted using the DVAID database. The core components with the top 3 degree values were subjected to molecular docking with the core targets using ADFRSuite 1.0 and AutoDock Vina 1.1.2 software. (2) Animal experiment verification: According to the random number table method, 40 SD rats were divided into a control group, model group, Guilong Kechuaning (GLKCN) group, and BQYFF group, with 10 rats in each group. Except for the control group, all other groups were used to construct COPD animal models by smoking and tracheal instillation of lipopolysaccharides. Drug intervention began on the first day of the 13th week of modeling, and after the intervention, the lung function indicators including forced vital capacity (FVC), forced expiratory volume in 0.3 seconds (FEV<sub>0.3</sub>), ratio of FEV<sub>0.3</sub> to FVC (FEV<sub>0.3</sub>/FVC), and peak expiratory flow (PEF) were examined; HE staining was used to observe pathological changes in lung tissue; ELISA was used to detect the levels of serum tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6); Western blot was used to detect the protein expression levels of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase (p-PI3K), protein kinase B (Akt), and phosphorylated protein kinase B (p-Akt) in lung tissue. **Results** Network pharmacology studies have shown that the key active ingredients of BQYFF in treating COPD were azine-2-carboxylic acid, kaempferol, quercetin, etc. The core targets included Akt1, IL-6, TNF, etc. The GO enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis indicated that the treatment of COPD by BQYFF was related to the PI3K-Akt signaling pathway, AGE-RAGE signaling pathway, TNF signaling pathway, etc. Among them, the PI3K-Akt signaling pathway was highly enriched. The molecular docking results showed that the key active ingredients of BQYFF, such as azine-2-carboxylic acid, kaempferol, and quercetin, had good binding activity with the core targets Akt1 and IL-6 for treating COPD. Animal experiments demonstrated that treatment with either BQYFF or GLKCN significantly improved pulmonary function parameters compared to the model group ( $P < 0.01$ ). Additionally, HE analysis revealed marked amelioration of lung tissue pathology. The levels of pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 were significantly downregulated ( $P < 0.05$ ), while the protein expression ratios of p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt were substantially reduced ( $P < 0.01$ ). Compared to the GLKCN group, the BQYFF group exhibited significantly enhanced FVC ( $P < 0.05$ ) but reduced FEV<sub>0.3</sub>/FVC ratio ( $P < 0.05$ ), while no statistically significant differences were observed in FEV<sub>0.3</sub> or PEF values ( $P > 0.05$ ); the levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 were significantly reduced (both  $P < 0.05$ ); the protein expression ratios of p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt showed no statistically significant differences ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** BQYFF exerts its therapeutic effects on COPD through a multi-component, multi-target, and multi pathway mechanism. It can reduce inflammation and enhance lung function by regulating the PI3K-Akt signaling pathway.

**[Keywords]** chronic obstructive pulmonary disease; Buqi Yifei Formula; PI3K-Akt signaling pathway; inflammatory reaction; network pharmacology; molecular docking

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种以持续性气流受限为主要特征的慢性呼吸系统疾病,其病理改变呈进行性发展,严重影响患者的生活质量和预后<sup>[1]</sup>。流行病学研究表明,COPD的发病是多种因素共同作用的结果,包括长期吸烟、职业粉尘暴露、空气污染等环境因素,

以及遗传易感性、反复呼吸道感染等内在因素<sup>[2]</sup>。目前,临床治疗主要采用支气管扩张剂、糖皮质激素等药物对症治疗,虽能暂时缓解症状,但存在疗效有限、不良反应明显、医疗成本高等问题<sup>[3]</sup>。

补气益肺方是安徽中医药大学第一附属医院经多年临床实践总结的特色院内制剂,又称六味补气

方,由炙黄芪、生晒参、益智仁、玉竹、陈皮和肉桂 6 味中药组成。该方以黄芪、生晒参为君药,重在补气固表;益智仁温脾暖肾为臣药,辅以玉竹滋阴润燥,陈皮理气化痰,肉桂温通经脉,诸药配伍共奏益气固表、补脾益肺固肾之功效。临床研究表明,补气益肺方在 COPD 治疗中显示出独特优势;与单纯使用布地奈德福莫特罗粉相比,补气益肺方联合治疗能显著改善患者临床症状和肺功能指标<sup>[4]</sup>;联合常规抗炎平喘治疗可显著提高临床有效率,并明显降低外周血 C 反应蛋白水平<sup>[5]</sup>。然而,其具体作用机制尚未完全阐明。基于此,本研究通过网络药理学、分子对接技术与动物实验相结合的方法,探讨补气益肺方治疗 COPD 的作用机制,为临床应用开发提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 网络药理学与分子对接

1.1.1 补气益肺方活性成分筛选及潜在靶点预测 分别以“炙黄芪、生晒参、玉竹、益智仁、陈皮、肉桂”为检索词在 TCMSp 数据库(<https://tcmspw.com/tcmsp.php>)、Herb 数据库(<http://herb.ac.cn/>)进行检索,获取各单味药的相关活性成分。将检索后得到的活性成分通过 SwissADME 平台预测,同时满足肠胃吸收“High”、类药五原则中有 $\geq 3$ 个“Yes”,且口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 及类药性(drug-likeness, DL) $\geq 0.18$ 的化合物纳入活性成分范畴<sup>[6]</sup>。

将上述活性成分输入 SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>),设定生物种类为“Homo sapiens”,条件设为“Probability $\geq 0.12$ ”,检索得到其对应的药物靶点数据集。

1.1.2 药物-疾病靶点预测 利用 DrugBank 数据库(<https://www.drugbank.ca/>)、Gene Cards 数据库(<http://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库(<http://www.omim.org/>),以“chronic obstructive pulmonary disease”为关键词,检索得到 COPD 的作用靶点,利用 Venny 2.1.0 平台将补气益肺方活性成分靶点与 COPD 靶点取交集,从而获得补气益肺方治疗 COPD 的潜在靶点。

1.1.3 蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络图构建及核心靶点基因的筛选 将补气益肺方活性成分与 COPD 的交集靶点导入 STRING 数据库(<https://string-db.org/>),将物种选定

为“Homo sapiens”。选取置信度 $>0.40$ 的数据,下载 TSV 格式后导入 Cytoscape 3.9.1 软件中,构建 PPI 网络,筛选补气益肺方治疗 COPD 的核心靶点。

1.1.4 “药物-成分-靶点-疾病”网络的构建 将药物、活性成分、靶点基因及疾病导入 Cytoscape 3.9.1 软件,利用 Cytoscape 软件中的 Network Analyzer 工具计算网络的拓扑学性质,经调整得到“药物-成分-靶点-疾病”网络调控关系图。

1.1.5 GO 功能及 KEGG 通路富集分析 利用 Metascape 数据库(<http://metascape.org/>)对补气益肺方治疗 COPD 的潜在靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析,设定阈值 $P < 0.05$ ,筛选排名靠前的条目,采用微生物信平台以及 Cytoscape 3.9.1 软件将结果可视化。

1.1.6 分子对接 将度值排名前三的核心靶点与其对应化学成分进行分子对接。首先,从 PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)中下载核心靶点蛋白的三维结构,使用 PyMol 2.5.5 对蛋白结构进行预处理,其次,从 PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中获取小分子化合物的三维结构,并在 MMFF 94 力场下进行了能量最小化预处理。再次,利用 ADFRsuite 1.0 工具,将处理好的小分子和受体蛋白转换为 AutoDock Vina 1.1.2 所需的 PDBQT 格式。最后,设置对接参数,并使用 PyMol 2.5.5 进行可视化分析。

### 1.2 动物实验

1.2.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只,体质量(180 $\pm$ 20) g,购于江苏华创信诺医药科技有限公司,生产许可证号为 SCXK(苏)2020-0009,质量合格证号为 210726240103333316。大鼠在 SPF 级环境中适应性喂养 1 周,温度 18~23 °C,明暗周期为 12/12 h,自由进食饮水。动物实验通过安徽中医药大学伦理委员会审核通过(2023019)。

1.2.2 药物 补气益肺方(炙黄芪 15 g、生晒参 10 g、玉竹 10 g、益智仁 6 g、陈皮 6 g、肉桂 3 g)购于安徽中医药大学第一附属医院,以上 6 味中药除生晒参外均置于容器中加水浸泡 60 min,煮两次后过滤合并药液,共煮 90 min,生晒参同法另煎,每次煮 30 min,置于水浴上浓缩至 1.06 g/mL 备用。桂龙咳喘宁购于广西泰诺制药有限公司,批号:Z20050558,制成混悬液 0.82 g/mL 备用。

1.2.3 主要试剂 雄狮牌香烟(浙江中烟工业有限责任公司,货号:6901028120616);脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(Biosharp 生物科技公司,货号:L-2880);

HE 染液(北京索宝来公司,货号:G1100-500 mL);大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)ELISA 检测试剂盒(武汉基因美科技有限公司,货号:JYM0635Ra、JYM0646Ra);兔抗大鼠一抗磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase, p-PI3K)、蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)和磷酸化蛋白激酶 B(phosphorylated protein kinase B, p-Akt)(武汉三鹰生物技术有限公司,货号:60225-1-Ig、67644-1-Ig、10176-2-AP、66444-1-Ig); $\beta$ -actin 抗体、山羊抗小鼠 IgG(英国 Abcam 公司,货号:ab7817、ab150115)。

1.2.4 主要仪器 石蜡切片机(北京精诚华泰仪表有限公司,型号:YD-HM-2235III);组织包埋机(金华市华速科技有限公司,型号:ES-500);动物肺功能仪(广源达科技发展有限公司,型号:FlexiVent);酶标仪(杭州奥盛仪器有限公司,型号:AMR-100);高速冷冻离心机(赛默飞科技中国有限公司,型号: Sorvall™ ST 8);光学显微镜(德国 Leica 公司,型号: DMi8);Image-pro plus 6.0 专业图像分析系统(Media Cybernetics,型号:Image-Pro Plus 6.0)。

1.2.5 动物分组及模型制备 将大鼠按随机数字表法分为对照组、模型组、桂龙咳喘宁组和补气益肺方组,每组 10 只。在前期实验和相关文献查阅的基础上<sup>[7-8]</sup>,除对照组外,其余 30 只大鼠采用气管滴入 LPS 联合烟熏法制备 COPD 动物模型,造模周期 12 周。造模成功后,对照组和模型组灌服生理盐水[10 mL/(kg·d)],桂龙咳喘宁组灌服桂龙咳喘宁混悬液[0.82 g/(kg·d)],补气益肺方组灌服补气益肺方混悬液[1.06 g/(kg·d)],于造模第 13 周的第 1 天开始药物干预,每天 2 次,疗程为 12 周。

1.2.6 肺功能测定 将大鼠置于 FlexiVent 肺功能测定装置中,连接大鼠气管与测定系统的管道。记录系统中用力肺活量(forced vital capacity, FVC)、0.3 s 用力呼气容积(forced expiratory volume in 0.3 seconds, FEV0.3)、0.3 s 用力呼气容积与用力肺活量的比值(ratio of forced expiratory volume in 0.3 seconds to forced vital capacity, FEV0.3/FVC)和呼气峰值流速(peak expiratory flow, PEF)值。

1.2.7 HE 染色观察肺组织病理学变化 取大鼠肺组织,在 4%多聚甲醛中固定后,梯度乙醇脱水,二

甲苯透明、浸蜡、包埋、切片、HE 染色、封片,光学显微镜观察各组大鼠肺组织病理学变化。

1.2.8 ELISA 法检测血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平 腹主动脉取血,离心取血清,ELISA 法检测血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平。

1.2.9 Western blot 法检测肺组织中 PI3K、p-PI3K、Akt 和 p-Akt 的蛋白表达量 称量肺组织 50 mg 置于 2 mL 研磨管中,按照 1:10 的质量体积比例,加入 RIPA 裂解液研磨,12 000 r/min(半径 8.6 cm),离心 5 min,取 1 mL 上清液并加入缓冲液,加热 7-8 min,冷却后置于-80 °C 冰箱中保存备用。在使用前,将样本从冰箱中取出,并在 100 °C 下加热 6 min,然后制备凝胶、电泳、转膜、封闭、洗涤、放入一抗中孵育、洗涤、放入二抗中孵育、洗涤、成像。

1.2.10 统计学方法 采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,所有实验均独立重复 3 次或 6 次。符合正态分布的计量数据用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,3 组及以上数据组间差异评估采用单因素方差分析(One-way ANOVA)  $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 网络药理学与分子对接结果

2.1.1 补气益肺方活性成分筛选及潜在靶点预测结果 通过 TCMS 数据库和 Herb 数据库共收集得到补气益肺方的化学成分 146 个,其中炙黄芪 27 个、生晒参 25 个、益智仁 24 个、玉竹 15 个、陈皮 15 个、肉桂 40 个。经过化学成分与潜在靶点的对应分析,补气益肺方被确定含有 119 个有效化学成分(OB 值最高的前 20 个见表 1),有效化学成分对应 1 178 个潜在靶点。利用 UniProt 数据库标准化后,合并去重,最终得到 388 个基因靶点。

2.1.2 活性成分-疾病靶点筛选结果 利用 GeneCards、DrugBank 和 OMIM 数据库检索疾病靶点,并针对 COPD 进行深入检索。在合并去重后,共检索出 COPD 靶点 1 357 个。将 COPD 靶点与补气益肺方的成分靶点通过绘制韦恩图,筛选到共有的交集靶点 116 个。详见图 1。

2.1.3 “成分-主要靶点-疾病”网络 将上述药物主要靶点及疾病导入 Cytoscape 3.9.0 中进行可视化处理,成功构建“成分-主要靶点-疾病”网络图,如图 2 所示。在该网络图中共有 766 个节点和 4 461 条边,每个药物成分都与多个主要靶点相连,而这些

表 1 核心有效化学成分  
Table 1 Core active compounds

Mol ID	化合物名称	OB/%	DL
MOL000483	(Z)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]acrylamide	118.35	0.26
MOL010395	4',5,7-trihydroxy-6-methyl-8-methoxy-homoisoflavanone	89.70	0.33
MOL005815	citromitin	86.90	0.51
MOL000332	n-coumaroyltyramine	85.63	0.20
MOL000378	7-O-methylisomucronulatol	74.69	0.30
MOL000392	formononetin	69.67	0.21
MOL000433	FA	68.96	0.71
MOL005308	aposiopolamine	66.65	0.22
MOL005321	frutinone A	65.90	0.34
MOL003648	inermin	65.83	0.54
MOL000380	(6aR,11aR)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol	64.26	0.42
MOL005828	nobiletin	61.67	0.52
MOL005356	girinimbin	61.22	0.31
MOL010396	4',5,7-trihydroxy-6,8-dimethyl-homoisoflavanone	59.76	0.30
MOL004328	naringenin	59.29	0.21
MOL000787	fumarine	59.26	0.83
MOL005384	suchilactone	57.52	0.56
MOL010412	4'-methoxy-5,7-dihydroxy-6,8-dimethyl-homoisoflavanone	57.14	0.34
MOL000211	mairin	55.38	0.78
MOL000371	3,9-di-O-methylnissolin	53.74	0.48

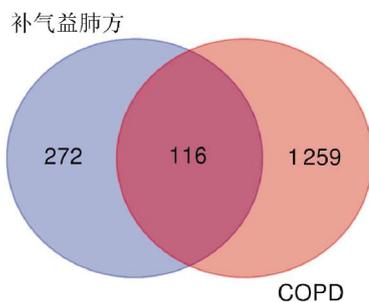


图 1 补气益肺方-COPD 靶点交集韦恩图

Fig.1 Venn diagram of BQYFF-COPD target intersection

靶点又进一步与 COPD 相关联,表明药物通过多成分、多靶点作用于疾病。其中度值排名前 6 的节点所对应的化学成分分别为 ZHQ17、ZHQ13、YZ7,这 3 种成分作用靶点数量较多,它们可能是药物中主要药理活性成分,在补气益肺方治疗 COPD 中起关键作用。

2.1.4 PPI 网络图构建及关键靶点筛选 将 116 个共同靶点输入 STRING 数据库中进行深入分析,并据此生成 PPI 网络图,见图 3。PPI 网络中,共有 116 个节点和 1 640 条边,其中度值排名前 5 的节点为 IL-6、TNF、Akt1、表皮生长因子受体(epidermal growth

factor receptor, EGFR)和肉瘤基因(sarcoma gene, SRC),它们与其他节点的联系非常紧密。这 5 个基因靶点可能是治疗 COPD 的关键所在。药物在发挥治疗作用时,其机制很可能与这 5 个基因的表达和调控密切相关。

2.1.5 补气益肺片治疗 COPD 交集靶点的 GO 分析结果 GO 富集分析结果显示,共得到 1 882 条 GO 富集条目,其中生物过程 2 072 条,细胞组分 79 条,分子功能 156 条。补气益肺方与 COPD 交集靶点基因的生物过程主要集中在 MAPK 级联正调控、正向调节转移酶活性等;细胞组分主要集中在膜筏、膜微区、囊泡腔等;分子功能主要集中在蛋白激酶活性、内肽酶活性等。详见图 4。

2.1.6 KEGG 代谢通路富集分析 KEGG 通路富集分析显示,本研究共得到了 152 条信号通路。根据 *P* 值选取前 20 条最为显著的通路,通过绘制气泡图的方式进行可视化展示,如图 5 所示,补气益肺方与 COPD 交集靶点基因的信号通路主要涉及 PI3K-Akt 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、TNF 信号通路等,其中,PI3K-Akt 信号通路显著富集。

2.1.7 分子对接 将度值排名前 3 的核心成分氨噻-2-羧酸、山柰酚、槲皮素与核心靶点 Akt1、IL-6



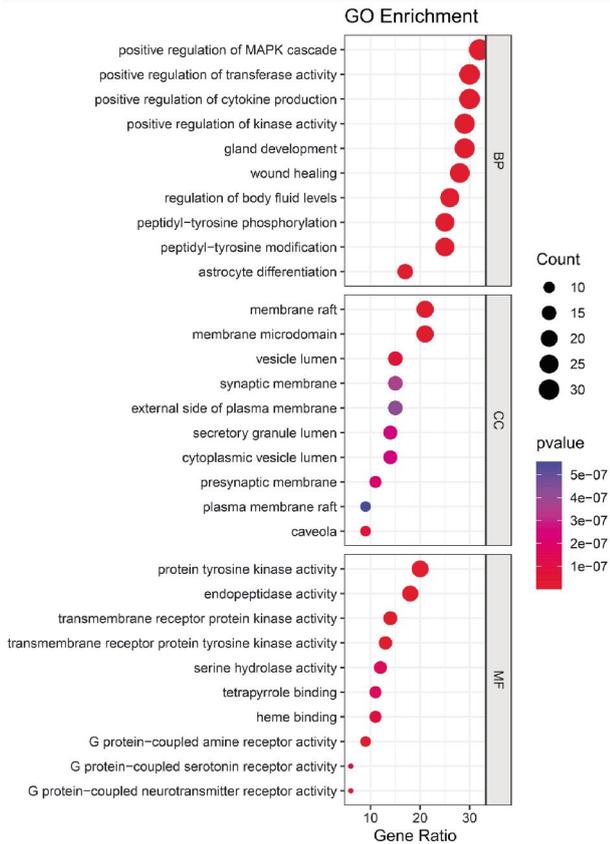


图4 GO功能富集分析

Fig.4 GO function enrichment analysis

2.2 动物实验结果

2.2.1 肺功能测定 与对照组相比,模型组肺功能指标 FVC、FEV0.3、FEV0.3/FVC 以及 PEF 值明显降低 ( $P<0.01$ );与模型组相比,补气益肺方和桂龙咳喘宁组肺功能指标FVC、FEV0.3、FEV0.3/FVC 以及 PEF 值显

著上升( $P<0.01$ );与桂龙咳喘宁组相比,补气益肺方组肺功能指标FVC 值显著上升( $P<0.05$ ),FEV0.3/FVC 值明显下降( $P<0.05$ ),FEV0.3 和 PEF 值差异无统计学意义( $P>0.05$ )。详见表 2。

2.2.2 肺组织病理学变化 对照组大鼠各级支气管以及细支气管壁结构完整,肺血管壁无增生,肺泡组织大小形态正常。模型组大鼠各级支气管黏膜纤毛柱状上皮结构破坏,纤毛脱落,存在大量炎症细胞浸润,肺血管壁出现明显增生,肺泡间隔断裂,融合成较大的囊腔。补气益肺方和桂龙咳喘宁组上述病理学均有不同程度的改善,但肺血管壁仍可见少许增厚。详见图 7。

2.2.3 血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平 与对照组相比,模型组炎症指标 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平明显升高 ( $P<0.01$ );与模型组相比,补气益肺方和桂龙咳喘宁组 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平显著降低 ( $P<0.05$ );与桂龙咳喘宁组相比,补气益肺方组 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平显著降低 ( $P<0.05$ ),详见表 3。

2.2.4 肺组织中 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达量 与对照组相比,模型组p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 蛋白表达量的比值明显升高 ( $P<0.01$ );与模型组相比,补气益肺方和桂龙咳喘宁组 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 蛋白表达量的比值显著降低 ( $P<0.01$ );与桂龙咳喘宁组相比,补气益肺方组 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 蛋白表达量差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。详见表 4、图 8。

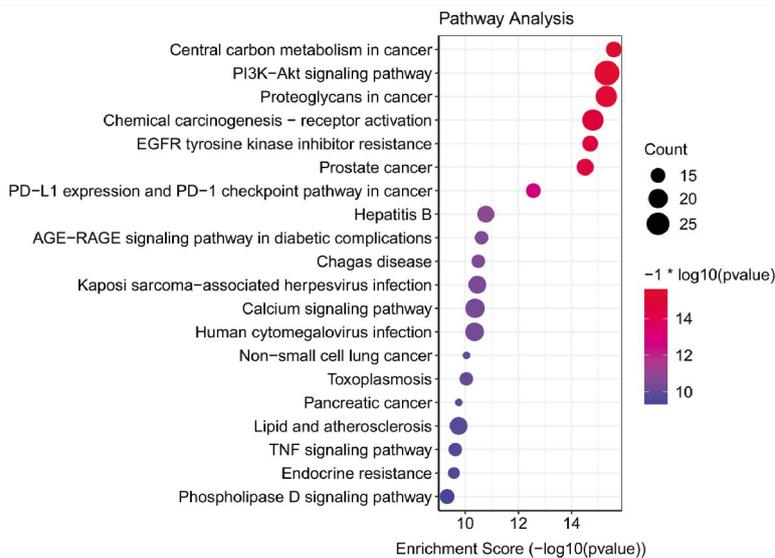


图5 KEGG通路富集分析

Fig.5 KEGG pathway enrichment analysis

注:纵轴代表不同的 KEGG 通路,横轴则表示富集倍数。气泡的颜色深浅,采用 $-\lg(P)$ 来表示,颜色越深表示  $P$  值越小,即富集越显著。

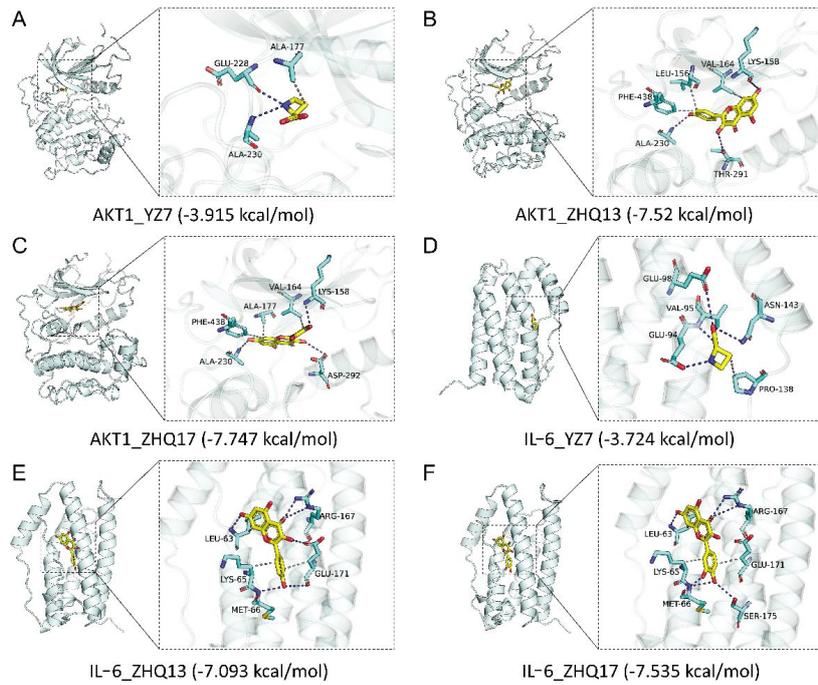


图 6 中药关键活性成分与核心靶点对接图

Fig.6 Docking diagram of key active ingredients and core targets in Chinese medicines

注:A.AKT1 与氨噻-2-羧酸相互作用图;B.AKT1 与山柰酚相互作用图;C.AKT1 与槲皮素相互作用图;D.IL-6 与氨噻-2-羧酸相互作用图;E.IL-6 与山柰酚相互作用图;F.IL-6 与槲皮素相互作用图。

表 2 各组大鼠肺功能参数比较( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 2 Comparison of lung function parameters among different groups of rats ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	FVC/mL	FEV0.3/mL	FEV0.3/FVC/(%)	PEF/(mL/s)
对照组	14.29±0.77	12.32±1.13	90.58±1.99	39.58±1.65
模型组	8.02±1.78**	6.67±2.85**	69.26±6.60**	27.97±4.64**
桂龙咳喘宁组	10.68±0.97 <sup>##</sup>	10.01±0.58 <sup>##</sup>	86.85±7.53 <sup>##</sup>	31.47±1.06 <sup>##</sup>
补气益肺方组	11.63±1.03 <sup>##Δ</sup>	10.93±1.29 <sup>##</sup>	80.88±2.36 <sup>##Δ</sup>	32.51±1.45 <sup>##</sup>

注:与对照组比较, \*\* $P<0.01$ ;与模型组比较, <sup>##</sup> $P<0.01$ ;与桂龙咳喘宁组比较, <sup>Δ</sup> $P<0.05$ 。

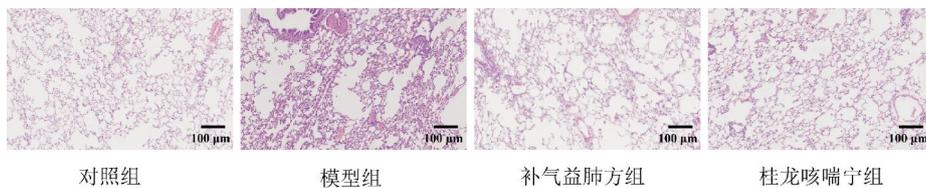


图 7 各组大鼠肺组织病理学变化(HE 染色, ×200)

Fig.7 Pathological changes in lung tissues of rats in each group (HE staining, ×200)

表 3 各组大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平比较( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 3 Serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 of rats in each group ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-6/(pg/mL)
对照组	65.78±5.30	37.06±3.76
模型组	122.04±13.39**	101.40±6.93**
桂龙咳喘宁组	94.14±8.59 <sup>##</sup>	88.46±12.60 <sup>#</sup>
补气益肺方组	82.71±11.24 <sup>##Δ</sup>	72.00±7.94 <sup>##ΔΔ</sup>

注:与对照组比较, \*\* $P<0.01$ ;与模型组比较, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$ ;与桂龙咳喘宁组比较, <sup>Δ</sup> $P<0.05$ , <sup>ΔΔ</sup> $P<0.01$ 。

### 3 讨论

中医学中并无 COPD 的病名,根据其临床特征,历代医家认为其属于“喘病”“肺胀”等范畴。COPD 以肺气虚为主,渐及脾肾;久病则痰瘀互结,形成虚实夹杂的复杂病机。补气益肺方具有益气固表、补脾益肺固肾作用。前期研究表明,补气益肺方可通过调控活性氧(reactive oxygen species, ROS)/NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor

表4 各组大鼠肺组织 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白表达量比较( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 4 Expression levels of p-PI3K and p-Akt proteins in lung tissues of rats in each group ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt
对照组	0.66±0.05	0.47±0.10
模型组	1.32±0.06**	1.28±0.14**
补气益肺方组	0.85±0.09 <sup>#</sup>	0.76±0.06 <sup>#</sup>
桂龙咳喘宁组	0.82±0.06 <sup>#</sup>	0.79±0.05 <sup>#</sup>

注:与对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.01$ 。

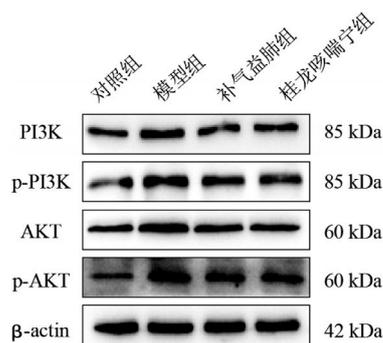


图8 各组大鼠肺组织 PI3K、p-PI3K、Akt 和 p-Akt 蛋白表达条带图

Fig.8 Expression levels of PI3K, p-PI3K, Akt, and p-Akt proteins in lung tissues of rats in each group

family pyrin domain containing 3, NLRP3)/Caspase-1 信号通路,抑制细胞焦亡<sup>[9]</sup>;也可通过调节 Th1/Th2 类细胞平衡,增加免疫功能<sup>[7]</sup>;或通过上调 SIRT-1 表达,下调 NF- $\kappa$ B 和 p53 蛋白表达,抑制衰老相关分泌表型,从而改善大鼠肺功能,延缓 COPD 的进展<sup>[8]</sup>。

本研究鉴定出补气益肺方包含槲皮素、氨噻-2-羧酸和山柰酚等主要活性成分,既往研究表明,这些成分均具有显著的肺保护作用<sup>[10-11]</sup>。其中,槲皮素不仅能改善 COPD 模型小鼠肺组织病理变化,还可通过抑制炎症因子和氧化介质的释放减轻肺部损伤<sup>[12]</sup>。氨噻-2-羧酸则通过非 TNF- $\alpha$  依赖机制调控 TLR 信号通路,促进巨噬细胞向抗炎表型转化,从而缓解 LPS 诱导的炎症反应<sup>[13]</sup>。而山柰酚及其衍生物对多种呼吸系统疾病均具有治疗价值,特别是通过调控 PI3K-Akt 信号通路降低炎症反应、改善肺功能<sup>[14-15]</sup>。这些发现共同证实了补气益肺方多组分协同发挥肺保护作用的药效基础。

PPI 结果揭示,补气益肺方治疗 COPD 的核心靶点涉及 IL-6、Akt1、TNF、EGFR 和 SRC 等关键分

子。其中,IL-6 是 COPD 气道炎症中的重要促炎因子,可通过激活酪氨酸激酶 1(Janus kinase 1, JAK1)/信号转导因子和转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)信号通路促进气道炎症和重塑<sup>[16]</sup>;Akt1 作为细胞调控的关键激酶,其磷酸化抑制可显著改善肺纤维化和炎症<sup>[17-18]</sup>;TNF- $\alpha$  则可通过 TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B 和 TNF- $\alpha$ /TNFR1/RIPKs 双重通路驱动 COPD 炎症进程<sup>[19]</sup>。分子对接分析证实,槲皮素、氨噻-2-羧酸和山柰酚与 IL-6、Akt1 靶点具有强结合亲和力。进一步的 GO 和 KEGG 通路富集分析表明,补气益肺方可能通过调控 PI3K-Akt、AGE-RAGE 和 TNF 信号通路发挥治疗作用,其中,PI3K-Akt 信号通路显著富集。

PI3K-Akt 信号通路作为调控细胞存活、增殖、代谢等生命活动的核心通路<sup>[20]</sup>,在 COPD 的发病机制中扮演着关键角色。研究表明,该通路的异常激活可促进炎症反应、细胞凋亡和氧化应激,而靶向抑制 PI3K-Akt 信号通路能有效缓解 COPD 的病理进程<sup>[21]</sup>。例如,清肺化痰汤联合地塞米松通过调控 PI3K-Akt 信号通路上调 HDAC2,显著改善 COPD 模型大鼠的肺功能<sup>[22]</sup>;补肺纳神丸通过抑制 PI3K-Akt 信号通路,减轻肺组织损伤和炎症反应<sup>[23]</sup>;银杏叶提取物则通过 PI3K-Akt-mTOR 途径调控巨噬细胞自噬发挥 COPD 防治作用<sup>[24]</sup>。

本研究结果表明,补气益肺方可显著改善 COPD 大鼠的肺功能参数,包括提高 FVC、FEV0.3、FEV0.3/FVC 比值和 PEF 值,同时减轻肺组织病理损伤并降低血清 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平。Western blot 分析显示,模型组 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 比值较对照组显著升高,而补气益肺方干预后该比值明显降低。这些结果提示,补气益肺方可能通过下调 PI3K-Akt 信号通路的过度活化,抑制炎症反应,进而改善 COPD 大鼠的肺功能和组织病理学改变。这一发现为阐明补气益肺方治疗 COPD 的分子机制提供了重要实验依据。

综上,本研究采用网络药理学、分子对接技术和动物实验评估了补气益肺方对 COPD 的治疗效果并探讨了相关机制。结果表明,补气益肺方可通过调控 PI3K-Akt 信号通路,减轻炎症反应,改善肺功能和组织病理损伤。这些发现不仅为补气益肺方临床应

用提供了科学依据,也为COPD 治疗新策略开辟了途径,展现了中药复方在慢性气道疾病治疗中的独特优势和应用前景。

## 参考文献

- [1] LIU X M, MA Y M, LUO L J, et al. Dihydroquercetin suppresses cigarette smoke induced ferroptosis in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease by activating Nrf2-mediated pathway[J]. *Phytomedicine*, 2022, 96: 153894.
- [2] WANG J M, REN C X, JIN L L, et al. Seabuckthorn Wuwei Pulvis attenuates chronic obstructive pulmonary disease in rat through gut microbiota-short chain fatty acids axis[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2023, 314: 116591.
- [3] SOUSA CARVALHO G F, MARQUES L K, SOUSA H G, et al. Phytochemical study, molecular docking, genotoxicity and therapeutic efficacy of the aqueous extract of the stem bark of *Ximenia americana* L. in the treatment of experimental COPD in rats[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 247: 112259.
- [4] 张开宇, 刘欣欣, 梅少奇, 等. 六味补气方联合信必可治疗慢性阻塞性肺病稳定期(肺气虚证)临床研究[J]. *中医药临床杂志*, 2019, 31(1): 137-140.
- [5] 张开宇, 吴同利, 刘欣欣, 等. 六味补气方联合常规治疗对慢性阻塞性肺病急性加重期的疗效研究[J]. *中国中医急症*, 2016, 25(11): 2115-2117.
- [6] 王玉洁, 林晨, 王一凤, 等. 基于网络药理学与实验研究探讨黄芩苷对 Hepa1-6 肝癌细胞凋亡的影响[J]. *上海中医药杂志*, 2024, 58(7): 31-39.
- [7] 于芳春. 基于 Notch/STAT 信号通路研究六味补气方对 COPD 模型大鼠 EOS 调控作用的实验研究[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2022.
- [8] 谢桂元, 刘向国, 方芳, 等. 六味补气方对 COPD 大鼠肺部衰老相关分泌表型及 NF- $\kappa$ B/SIRT-1/p53 信号通路的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2023, 32(16): 2209-2215.
- [9] 吴柏合, 于芳春, 谢桂元, 等. 六味补气方对慢性阻塞性肺病细胞焦亡的干预作用及机制研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2024, 44(5): 583-591.
- [10] 国书雅. 基于 SUMO 化修饰探究槲皮素改善急性肺损伤的作用机制[D]. 天津: 天津中医药大学, 2024.
- [11] 王峥业, 徐圣麟, 王文文, 等. 山柰酚对慢性阻塞性肺病大鼠气道炎症反应的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(2): 215-219.
- [12] 高露洋, 罗丹, 王文军. 槲皮素通过 p53-p21-Rb 通路缓解慢性阻塞性肺病的肺衰老[J]. *西部医学*, 2024, 36(2): 217-221, 227.
- [13] ROGLIANI P, MATERA M G, PAGE C, et al. Efficacy and safety profile of mucolytic/antioxidant agents in chronic obstructive pulmonary disease: A comparative analysis across erdoesteine, carbocysteine, and N-acetylcysteine[J]. *Respiratory Research*, 2019, 20(1): 104.
- [14] MISHRA S, GANDHI D, TIWARI R R, et al. Beneficial role of kaempferol and its derivatives from different plant sources on respiratory diseases in experimental models[J]. *Inflammopharmacology*, 2023, 31(5): 2311-2336.
- [15] PANG L Y, ZHAO Y J, XU Y, et al. Mechanisms underlying the therapeutic effects of JianPiYiFei II granules in treating COPD based on GEO datasets, network pharmacology, molecular docking, and molecular dynamics simulations[J]. *Biology*, 2024, 13(9): 711.
- [16] KEIR H R, CHALMERS J D. IL-6 trans-signalling: How Haemophilus surfs the NET to amplify inflammation in COPD[J]. *The European Respiratory Journal*, 2021, 58(4): 2102143.
- [17] 徐国睿, 冯湘仪, 曲怡, 等. 基于网络药理学方法预测定喘汤治疗慢性阻塞性肺疾病的作用机制及验证研究[J]. *世界中医药*, 2024, 19(4): 455-463.
- [18] NIE Y J, HU Y D, YU K K, et al. Akt1 regulates pulmonary fibrosis via modulating IL-13 expression in macrophages[J]. *Innate Immunity*, 2019, 25(7): 451-461.
- [19] SINGH R, NARANG M, DAWSON L, et al. Could disease severity and inflammatory markers (IL-6, Hs-CRP, TNF- $\alpha$ ) be related to frailty in COPD? A prospective study[J]. *The Journal of the Association of Physicians of India*, 2022, 70(4): 11-12.
- [20] 陈壮, 刘高阳, 谢文英, 等. 基于 TNF- $\alpha$ /TNFR1/RIPKs 通路探讨二陈汤加味对 COPD 炎症的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(9): 40-47.
- [21] SUN X J, CHEN L, HE Z Y. PI3K/Akt-Nrf2 and anti-inflammatory effect of macrolides in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Current Drug Metabolism*, 2019, 20(4): 301-304.
- [22] 屈飞, 徐尚呈, 席超, 等. 清肺化痰汤联合地塞米松通过调控 PI3K/Akt 通路上调 HDAC2 治疗 COPD 的研究[J]. *中药药理与临床*, 2023, 39(10): 53-58.
- [23] PING X C, ZHANG C X, ZHANG A N, et al. The Bufei Nashen pill inhibits the PI3K/Akt/HIF-1 signaling pathway to regulate extracellular matrix deposition and improve COPD progression[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2024: 118390.
- [24] 郭栋伟, 张鹏飞, 任明君, 等. 银杏叶提取物防治慢性阻塞性肺疾病的机制研究: 基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路调控肺泡巨噬细胞自噬[J]. *中国全科医学*, 2023, 26(3): 293-303.

(本文编辑 苏维)