◆网络药理学◆

基于网络药理学方法、分子对接技术及动物实验验证探讨通塞颗粒治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期的作用机制

付子坚[1,2]，李建生[2,3]，田燕歌[2,3]，赵鹏[2,3]，燕苗苗[2,3]，芦晓帆[1,2]

1. 河南中医药大学第二临床医学院，河南 郑州 450011
2. 河南中医药大学呼吸系统疾病重点实验室，河南 郑州 450046
3. 河南中医药大学第一临床医学院，河南 郑州 450046

［摘要］**目的：**基于网络药理学方法、分子对接技术和动物实验验证探讨通塞颗粒治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期（AECOPD）的作用机制。**方法：**①预测分析。通过中药系统药理学分析平台筛选通塞颗粒的活性成分及其对应靶点；利用人类基因（Genecards）、在线人类孟德尔遗传数据系统（OMIM）等数据库检索AECOPD疾病基因；绘制韦恩图并获取药物-疾病共同靶点；构建通塞颗粒活性成分-靶点网络图和蛋白质相互作用网络图，根据网络关系筛选核心靶点；借助R语言软件进行基因本体（GO）富集分析和京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集分析，使用AutoDockTool 1.5.6软件对通塞颗粒关键活性成分和核心靶点进行分子对接。②实验验证。随机将50只SD大鼠分为对照组、模型组、中药组、西药组、联合组各10只。除对照组外，其余各组均构建AECOPD大鼠模型，并于急性加重前2 d及其后4 d予药物灌胃治疗。治疗结束后检测各组大鼠的肺功能指标[0.3 s用力呼气容积（$FEV_{0.3}$）、用力肺活量（FVC）、0.3 s用力呼气容积与用力肺活量的比值（$FEV_{0.3}$/FVC）、呼气流量峰值（PEF）]，检测血清肿瘤坏死因子（TNF）-α、白细胞介素（IL）-17含量，通过苏木精-伊红染色法（HE）观察气道与肺组织的病理改变，采用免疫印迹法和酶联免疫吸附测定法初步验证网络药理学的预测结果。**结果：**通塞颗粒治疗AECOPD的关键活性成分为槲皮素、芹黄素、木犀草素、山柰酚、β-谷甾醇，主要作用于肿瘤抑制蛋白53（TP53）、丝裂原活化蛋白激酶3（MAPK3）等核心靶点。GO富集分析和KEGG通路富集分析结果表明，通塞颗粒治疗AECOPD与TNF、IL-17等信号通路干预氧化应激、减少细胞凋亡、抑制炎症反应有关。分子对接结果显示，通塞颗粒的关键活性成分与治疗AECOPD的核心靶点均有较好的结合活性。动物实验研究结果显示，模型组FVC、$FEV_{0.3}$、$FEV_{0.3}$/FVC、PEF值均较对照组降低（$P<0.05$）。中药组、西药组以及联合组的FVC、$FEV_{0.3}$、PEF值均较模型组升高（$P<0.05$）；联合组$FEV_{0.3}$/FVC值较模型组升高（$P<0.05$）。中药组FVC、$FEV_{0.3}$、$FEV_{0.3}$/FVC、PEF值与西药组比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。联合组FVC、PEF值均较中药组及西药组升高（$P<0.05$）；联合组$FEV_{0.3}$较西药组升高（$P<0.05$）。模型组血清TNF-α、IL-17含量均高于对照组（$P<0.05$）；中药组、西药组及联合组的TNF-α、IL-17含量均低于模型组（$P<0.05$）；联合组血清TNF-α、IL-17含量均低于中药组、西药组（$P<0.05$）。模型组肺组织磷酸化P65/非磷酸化P65、磷酸化AKT/非磷酸化AKT、磷酸化MAPK1/3/非磷酸化MAPK1/3和非磷酸化TP53/GAPDH蛋白表达含量均高于对照组（$P<0.05$）；中药组、西药组以及联合组上述蛋白表达含量均低于模型组（$P<0.05$）；联合组上述蛋白表达含量均低于中药组、西药组（$P<0.05$）。**结论：**通塞颗粒治疗AECOPD具有多成分、多靶点、多通路、整体调节的作用特点，为后续深入研究提供了数据支持。

［收稿日期］2023-07-29
［修回日期］2023-12-16
［基金项目］国家自然科学基金项目（81904165）；国家中医药临床科研基金建设项目（2019JDZX069）
［作者简介］付子坚（1993-），男，在读硕士研究生，E-mail：874040006@qq.com。
［通信作者］芦晓帆（1987-），女，医学博士，主治医师，硕士研究生导师，E-mail：lu_xiaofan2014@163.com。

［关键词］慢性阻塞性肺疾病急性加重期；通塞颗粒；网络药理学；分子对接技术；核心靶点；信号通路
［中图分类号］R285 ［文献标志码］A ［文章编号］0256-7415（2024）06-0170-16
DOI：10.13457/j.cnki.jncm.2024.06.033

Mechanism of Action of Tongsai Granules in the Treatment of Acute Exacerbation of COPD Based on Network Pharmacology, Molecular Docking Technology, and Experimental Validation in Rats

FU Zijian[1,2], *LI Jiansheng*[2,3], *TIAN Yange*[2,3], *ZHAO Peng*[2,3], *YAN Miaomiao*[2,3], *LU Xiaofan*[1,2]

1. The Second Clinical Medical School, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou Henan 450011, China; 2. Henan Key Laboratory of the TCM Prevention and Treatment of Respiratory Diseases, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou Henan 450046, China; 3. The First Clinical Medical School, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou Henan 450046, China

Abstract: Objective: To explore the mechanism of action of Tongsai Granules (TSG) in the treatment of acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (AECOPD) based on network pharmacology, molecular docking technology, and animal experiments. **Methods:** ① Predictive analysis. The active ingredients and corresponding targets of TSG were screened by the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform. AECOPD-related genes were retrieved by GeneCards, OMIM, and other databases. Venn diagrams were drawn to obtain intersecting drug-disease targets; active ingredient of TSG-intersecting target network and a protein-protein interaction network was constructed and core targets were screened out based on network relationships; R programming language software was used for Gene Ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis. Molecular docking of key active ingredients of TSG and core targets was performed by using AutoDockTool 1.5.6 software. ②Experimental verification. Fifty rats were randomly divided into control group, model group, Chinese medicine group, western medicine group, and combination group, with 10 rats in each group. The AECOPD rat model was constructed in all groups except the control group. And received drug gavage 2 days before and 4 days after the acute exacerbation. After treatment, the lung function indicators, including forced expiratory volume in 0.3 seconds ($FEV_{0.3}$), force vital capacity (FVC), the ratio of forced expiratory volume in 0.3 seconds to forced vital capacity ($FEV_{0.3}$/FVC), and peak expiratory flow (PEF), were measured in each group. The contents of tumor necrosis factor (TNF)-α and interleukin (IL)-7 in serum were measured; the pathological changes in airway and lung tissues were observed by using hematoxylin-eosin (HE) staining and the network pharmacological prediction results were validated by western blotting (WB) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** In the treatment of AECOPD, the key active ingredients of TSG were quercetin, apigenin, luteolin, kaempferol, and β-sitosterol, which mainly act on tumor suppressor protein 53 (TP53), mitogen-activated protein kinase 3 (MAPK3), and other core targets. GO and KEGG analyses showed that in AECOPD treatment, TSG was related to TNF, IL-17, and other signaling pathways related to intervening oxidative stress, reducing apoptosis, and inhibiting inflammation. Molecular docking analysis showed that the key ingredients of TSG had good binding activity to core targets for the treatment of AECOPD. The results of animal experimental research showed that the FVC, $FEV_{0.3}$, $FEV_{0.3}$/FVC, and PEF values in the model group were all lower than those in the control group ($P<0.05$). The FVC, $FEV_{0.3}$, and PEF values in the Chinese medicine group, western medicine group, and combination group were all higher than those in

the model group ($P<0.05$). The $FEV_{0.3}$/FVC value in the combination group was higher than that in the model group ($P<0.05$). There were no significant differences in FVC, $FEV_{0.3}$, $FEV_{0.3}$/FVC, and PEF values between the Chinese medicine group and the western medicine group ($P>0.05$). The FVC and PEF values in the combination group were higher than those in the Chinese medicine group and the western medicine group ($P<0.05$); the $FEV_{0.3}$ in the combination group was higher than that in the western medicine group ($P<0.05$). The levels of TNF-α and IL-17 in serum in the model group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). The levels of TNF-α and IL-17 in the Chinese medicine group, the western medicine group, and the combination group were all significantly lower than those in the model group ($P<0.05$). The levels of TNF-α and IL-17 in the serum in the combination group were lower than those in the Chinese medicine group and the western medicine group ($P<0.05$). The protein expression levels of P-P65/P65, P-AKT/AKT, P-MAPK1/3/MAPK1/3, and TP53/GAPDH in the lung tissue in the model group were higher than those in the control group ($P<0.05$). The expression levels of the above proteins in the Chinese medicine group, the western medicine group, and the combination group were all lower than those in the model group ($P<0.05$). The expression levels of the above proteins in the combination group were lower than those in the Chinese medicine group and the western medicine group ($P<0.05$). **Conclusion:** TSG has the characteristics of multiple components, multiple targets, multiple pathways, and general regulation in the treatment of AECOPD, providing data support for further in-depth research.

Keywords: Acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease; Tongsai Granules; Network pharmacology; Molecular docking technology; Core targets; Signaling pathway

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种以呼吸道持续气流受限为特征的进行性发展的肺部疾病，其肺部症状急性恶化阶段又被称为COPD急性加重期(AECOPD)。感染是AECOPD最主要的诱因，是造成COPD患者肺功能恶化和气道重塑的关键因素，也是导致患者死亡的重要原因。AECOPD归属于中医学肺胀范畴。有学者对AECOPD中医证候分布规律进行文献研究与临床调查研究，得出痰热壅肺型为AECOPD的最常见证型[1-2]。通塞颗粒是河南中医药大学第一附属医院的院内制剂，由葶苈子、地龙、浙贝母等组成，具有清热涤痰活血、宣肺降气平喘等作用。经临床研究证实，该药物治疗痰热壅肺型AECOPD具有良好疗效，可以有效改善患者的通气功能和血气分析结果，减少肺部炎症，促进炎性分泌物的吸收[3-4]。团队前期研究表明，通塞颗粒-补肺益肾方序贯治疗AECOPD可有效减轻急性炎症渗出、改善AECOPD大鼠肺组织病理损伤，且其作用机制与调控Toll样受体4(TLR4)/核因子-κB(NF-κB)信号通路有关[5-6]。本研究在此基础上运用网络药理学和分子对接技术，通过构建中药复方调控网络，筛选出通塞颗粒治疗AECOPD的潜在靶标，并对富集分析出的通路及关键蛋白加以实验验证，为后续研究提供新思路。具体研究流程如图1所示。

1 实验材料

1.1 实验动物 SPF级SD大鼠50只，雄性，6～8周龄，体质量(200±20)g，动物质量合格证号：110011211105823815，购于北京维通利华实验动物技术有限公司，许可证号：SCXK(京)2016-0011。动物饲养于河南中医药大学动物实验室[SYXK(豫)2020-0004]。本研究通过河南中医药大学实验动物福利伦理审查委员会审查批准(伦理审查批号为YFYDW2021028)。

1.2 药物、试剂及仪器

1.2.1 药物 通塞颗粒(河南中医药大学第一附属医院院内制剂)，盐酸莫西沙星片(拜耳医药保健有限公司，国药准字J20150015，规格：0.4 g×3片)，硫酸沙丁胺醇片(江苏亚邦爱普森药业有限公司，国药准字H32024535，规格：2 mg×100片)。

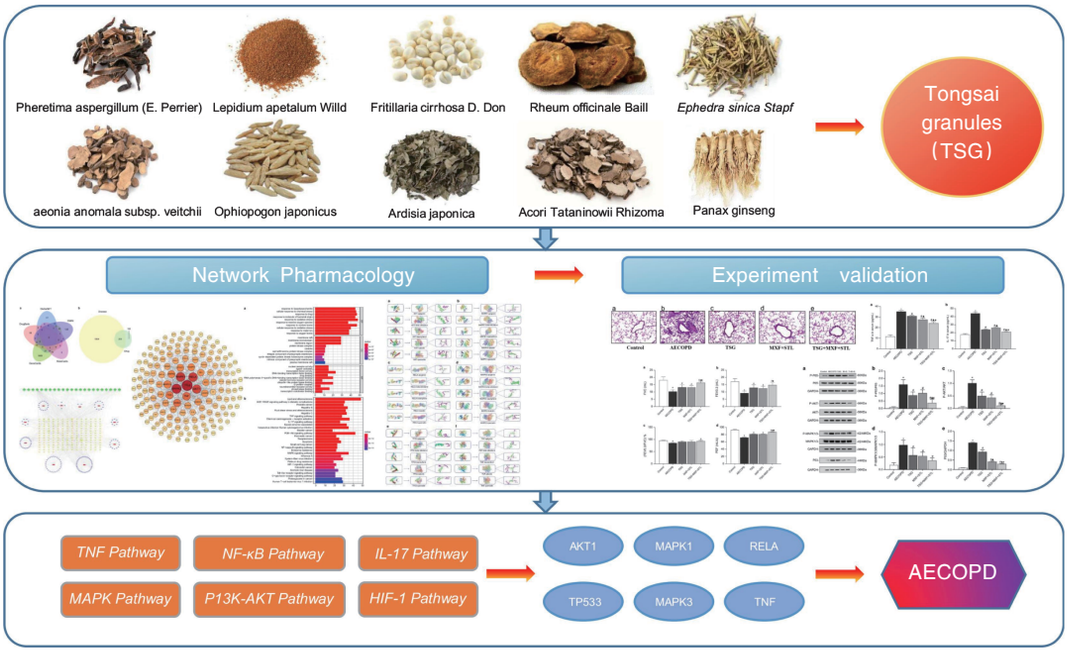


图 1　研究流程示意图

1.2.2　**试剂**　肺炎克雷伯杆菌(46117-5a1)，购于中国医学细菌保藏管理中心(CMCC)；红旗渠过滤嘴烤烟型香烟(河南中烟工业有限责任公司)；苏木素-伊红(HE)染液套装(Servicebio 武汉赛维尔生物科技有限公司)；大鼠肿瘤坏死因子-α(TNF-α)酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(ELISA Kit)、大鼠白细胞介素-17A(IL-17A)ELISA Kit 均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司；NF-κB P65 抗体(以下简写为 P65)(货号：GTX102090)、NF-κB P65(phospho Ser536)抗体(以下简写为 P-P65)(货号：GTX133899)，丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 B(AKT)抗体[N3C2]，Internal(以下简写为 AKT)(货号：GTX121937)，AKT(phospho Ser473)抗体(以下简写为 P-AKT)(货号：GTX128414)、兔抗丝裂原活化蛋白激酶 1(MAPK1)/丝裂原活化蛋白激酶 3(MAPK3)多克隆抗体[细胞外调节蛋白激酶(ERK1/2)，以下简写为 MAPK1/3](货号：GTX134462)、ERK1(phospho Thr202/Tyr204)+ERK2(phospho Thr185/Tyr187)抗体[HL173](以下简写为 P-MAPK1/3)(货号：GTX635617)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(货号：GTX28245)均购自美国 GENETEX，INC.；肿瘤抑制蛋白 53(TP53)抗体(货号：YT3528)购自美国 ImmunoWay Biotechnology Company；辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗鼠二抗(货号：SA00001-1)、HRP 标记山羊抗兔二抗(货号：SA00001-2)均购于武汉三鹰技术有限公司。RIPA 裂解液(货号：20-188)购自美国 EMD MILLIPORE CORPORATION；BCA 试剂盒(货号：PC0020)购自北京索莱宝科技有限公司；10% SDS-PAGE 电泳凝胶试剂盒(货号：PG112)购自上海雅酶生物医药科技有限公司。

1.2.3　**仪器**　DSI Buxco 非束缚小动物肺功能测量仪及 FinePointe 动物肺功能检测系统(DATA SCIENCES INTERNATIONAL，INC.，美国)；Multiskan GO 全波长酶标仪及 D-37520 台式高速冷冻离心机(赛默飞科技中国有限公司)；TissueLyser Ⅱ样品破碎系统(QIAGEN，德国)；DM6000 B 光学显微镜及 LAS V4.7 照相系统(Leica，德国)；Image-pro plus(IPP)6.0 专业图像分析系统(Media Cybernetics，美国)。

2　研究方法

2.1　**数据库与软件**　①数据库：中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)(https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php)、中药化学数据库(http://www.organchem.csdb.cn/scdb/default.htm)、蛋白质数据库(UniProt)(https://www.uniprot.org/)、人类基因(GeneCards)数据库(https://www.genecards.org/)、在线人类孟德尔遗传数据系统(OMIM)数据库(https://www.omim.org/)、人类疾病相关基因(DisGeNET)数据库(https://www.disgenet.org/)、人类疾病(MalaCards)数据库(https://www.

malacards. org/）、DrugBank 数据库（https://go.drugbank.com/）、微生信在线生物信息学分析、可视化云平台（http://www. bioinformatics. com. cn/）、STRING 数据库（https://cn.string-db.org/）、蛋白质结构数据库（RSCB PDB）（https://www.rcsb.org/）、有机小分子生物活性数据（Pub-chem）数据库（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）。②软件：Cytoscape 3.8.1 软件，R 4.1.3 软件，ChemoBio 3D Ultra 17.0 软件；Pymol 软件，AutoDockTool 1.5.6 软件，Vina 软件。

2.2 通塞颗粒活性成分和其对应靶点筛选 将通塞颗粒中的 10 味中药（矮地茶、赤芍、大黄、地龙、麻黄、麦冬、人参、石菖蒲、葶苈子、浙贝母）分别录入 TCMSP 数据库，根据 TCMSP 参数信息，将口服利用度（OB）≥20% 且类药性质（DL）≥0.1 作为筛选标准，获取各中药活性成分及其对应靶点，并从 Uniprot 数据库对靶点名称进行注释，转换为基因编号 ID（Gene Symbol ID）。其中地龙、麦冬 2 味中药并未被 TCMSP 数据库收录，将其录入中药化学数据库，获得 2 味中药的化学成分物质数字识别号码（CAS 号），再从 TCMSP 数据库根据参数信息，将 OB≥20% 且 DL≥0.1% 作为筛选标准，进一步筛选。

2.3 疾病基因筛选 以“acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease”为关键词，通过 GeneCards、OMIM、DisGeNET、MalaCards、DrugBank 5 个数据库，检索获取与 AECOPD 相关的基因。

2.4 共同靶点获取和网络图的绘制 通过微生信在线生物信息学分析、可视化云平台绘制韦恩图（Venn 图），获得通塞颗粒治疗 AECOPD 的交集靶点。将相关数据导入 Cytoscape 3.8.1 软件构建中药-有效成分-靶点-疾病网络图，并根据网络图平均度值（degree 值）筛选出核心活性成分。

2.5 蛋白质相互作用（PPI）网络构建及核心靶点筛选 将 2.4 项中筛选得到的交集靶点信息导入 STRING 数据库，从多种蛋白质（multiple proteins）中导入选中靶点，有机体（organism）选为“智人（homo sapiens）”，以最高置信度（highest confidence）> 0.900 作为筛选条件，下载交集靶点的 PPI 网络 TSV 文件。将下载文件导入 Cytoscape 3.8.1 软件构建 PPI 网络图，根据平均度值（degree 值）和平均中介中心度值（betweenness 值）筛选核心靶点。

2.6 相关通路富集分析 运用 R 语言软件中的“org.Hs.eg.db”数据包将核心靶点转化为基因 ID，导入 R 4.1.3 软件，设定 P-value < 0.05、Q-value < 0.05，利用“BiocManager”等软件包对关键节点进行基因本体（GO）富集分析和京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集分析，取前 30 项构建柱状图。并将 KEGG 通路富集分析得到的数据导入 Cytoscape 3.8.1 软件进一步构建靶点-通路网络图。

2.7 关键活性成分与核心靶点分子对接 将 2.4、2.5 项中 degree 值排在前 5 的活性成分和 degree 值排在前 6 的核心靶点分别进行对接。将活性成分的英文名称导入 Pub-chem 数据库，下载其相应的小分子配体（2D 结构，sdf 格式），使用 ChemoBio 3D Ultra 17.0 软件转格式（3D 结构，mol2 格式）；将核心靶点导入 Uniport 数据库，限定物质来源设定为 homo sapiens，将得到的条目导入 RSCB PDB 数据库，下载其相应的基因蛋白（3D 结构，pdb 格式），利用 AutoDockTool 1.5.6 软件去水加氢转格式（3D 结构，pdbqt 格式），并设置保存活性口袋的数据参数（grid.gpf 格式）。运用 Vina 软件对活性成分和核心靶点进行分子对接，结果通过 Pymol 软件进行可视化展示。

2.8 通塞颗粒治疗 AECOPD 网络药理学实验验证

2.8.1 模型制备与分组干预 采用随机数字表法将 50 只大鼠随机分为对照组、模型组、中药组、西药组、联合组。每组 10 只。除对照组外，其余各组通过香烟和肺炎克雷伯杆菌刺激诱导制备 AECOPD 大鼠模型[7-8]。并于急性加重前 2 d（Day-1、0）及其后 4 d（Day 2～5）给予灌胃治疗，每天 2 次。药物灌胃剂量采用等效剂量系数换算公式计算，具体公式为：$D_{大鼠}=D_{人}\times(HI_{大鼠}/HI_{人})\times(W_{大鼠}/W_{人})2/3$（其中 D：剂量；HI：体型系数；W：体质量），具体给药方案见表 1。对照组、模型组均予同体积 0.9% 氯化钠溶液。

表 1 各组大鼠给药方案

组 别	通塞颗粒 1.62 g/(kg·d)	莫西沙星 0.036 g/(kg·d)	沙丁胺醇 1.08 mg/(kg·d)
对照组	-	-	-
模型组	-	-	-
中药组	+	-	-
西药组	-	+	+
联合组	+	+	+

2.8.2 肺功能检测 治疗结束后，用 DSI Buxco 非束缚小动物肺功能测量仪以及 FinePointe 动物肺功能检测系统检测大鼠的肺功能指标，包括 0.3 s 用力呼气

容积($FEV_{0.3}$)、用力肺活量(FVC)、0.3 s 用力呼气容积与用力肺活量的比值($FEV_{0.3}$/FVC)、呼气流量峰值(PEF)。

2.8.3 血清 TNF-α、IL-17 含量 麻醉大鼠，腹主动脉取血。取上清，采用 ELISA 法检测血清中 TNF-α、IL-17 的含量。

2.8.4 肺组织病理形态学观察 处死大鼠后，结扎未灌洗的左肺，取肺组织，经脱水、透明、浸蜡、包埋、切片后进行 HE 染色并封片，在光学显微镜 100 倍及 200 倍光镜下观察切片。

2.8.5 肺组织中 P-P65、P65、P-AKT、AKT、P-MAPK1/3、MAPK1/3 以及 TP53 的蛋白表达 在肺组织中加入 RIPA 裂解液，剪碎打成匀浆，用离心机离心后提取蛋白质，通过 BCA 试剂盒经全波长酶标仪进行蛋白质定量，经 10% SDS-PAGE 电泳凝胶分离，转膜、封闭、抗体孵育后，用 IPP 6.0 专业图像分析系统进行条带扫描，测定各目的条带及内参 GAPDH 的灰度值，计算比值，求得目的蛋白的相对表达含量。

3 统计学方法

应用 SPSS 22.0 软件统计数据。计量资料数据服从正态分布，以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，多组间比较采用单因素方差分析。方差齐时，多重比较采用 LSD 法；方差不齐时，多重比较采用 Dunnett T3 法。计量资料数据不服从正态分布，则采用非参数检验进行比较。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

4 研究结果

4.1 通塞颗粒活性成分及其预测靶点筛选 通过 TCMSP 数据库收集、基于药物代谢动力学(ADME)参数(OB≥20%、DL≥0.1)筛选出通塞颗粒的活性成分共 219 个，对应预测靶点 1 351 个，删去在 UniProt 数据库中不能匹配基因名的靶点，去重后，获得通塞颗粒有效成分 172 个，对应预测靶点 306 个。各中药的活性成分个数和其对应的靶点个数见表 2。部分中药活性成分名称见表 3。

表 2 通塞颗粒活性成分个数和靶点个数(去重)

中药	活性成分个数	靶点个数	中药	活性成分个数	靶点个数
矮地茶	25	166	麦冬	10	17
赤芍	21	128	人参	35	106
大黄	16	73	石菖蒲	27	151
地龙	2	3	葶苈子	16	211
麻黄	52	266	浙贝母	5	36

表 3 通塞颗粒治疗 AECOPD 的活性成分名称

中药	分子识别号(Mol ID)	分子名称(Mol Name)	OB(%)	DL
赤芍、大黄、麻黄、人参、葶苈子、浙贝母	MOL000358	β-谷甾(beta-sitosterol)	36.91	0.75
矮地茶、麻黄、人参、石菖蒲、葶苈子	MOL000422	山柰酚(Kaempferol)	41.88	0.24
赤芍、麻黄、麦冬、人参	MOL000449	豆甾醇(Stigmasterol)	43.83	0.76
矮地茶、麻黄、葶苈子	MOL000098	槲皮素(Quercetin)	46.43	0.28
矮地茶、麻黄、人参	MOL000066	别香橙(Alloaromadedrene)	53.46	0.10
赤芍、麻黄、葶苈子	MOL000675	油酸(oleic acid)	33.13	0.14
赤芍、麻黄、葶苈子	MOL000131	亚油酸(EIC)	41.90	0.14
麻黄、人参、葶苈子	MOL000676	邻苯二甲酸二丁酯(DBP)	64.54	0.13
矮地茶、麻黄	MOL001442	叶绿醇(Phytol)	33.82	0.13
矮地茶、麻黄	MOL000263	齐墩果酸(oleanolic acid)	29.02	0.76
矮地茶、麻黄	MOL000474	石竹素[(-)-Epoxycaryophyllene]	35.94	0.13
矮地茶、麻黄	MOL000208	香橙烯[()-Aromadendrene]	55.74	0.10
矮地茶、人参	MOL002879	邻苯二甲酸二异辛酯(Diop)	43.59	0.39
矮地茶、人参	MOL001312	棕榈油酸(9-HEXADECENOIC ACID)	35.78	0.10
矮地茶、赤芍	MOL000463	表木栓醇(16844-71-6)	27.34	0.76
赤芍、麻黄	MOL000357	西托糖苷(Sitogluside)	20.63	0.62
赤芍、麻黄	MOL000492	儿茶素[(+)-catechin]	54.83	0.24
赤芍、人参	MOL001641	亚油酸甲酯(METHYL LINOLEATE)	41.93	0.17
麻黄、石菖蒲	MOL001179	香树烯[(−)-Alloaromadendrene]	54.04	0.10

续表 3　通塞颗粒治疗 AECOPD 的活性成分名称

中药	分子识别号(Mol ID)	分子名称(Mol Name)	OB(%)	DL
麻黄、石菖蒲	MOL000008	芹菜素(Apigenin)	23.06	0.21
麻黄、葶苈子	MOL000432	亚麻酸(linolenic acid)	45.01	0.15
大黄、石菖蒲	MOL000472	大黄素(Emodin)	24.40	0.24
麦冬、葶苈子	MOL000295	胡萝卜甙(Alexandrin)	20.63	0.63

4.2　AECOPD 疾病靶点收集　将从各数据库检索 AECOPD 英文全称获取的疾病相关靶点与通塞颗粒的预测靶点结合，基于微生信在线生物学分析、可视化平台制图分析。数据库疾病靶点个数：GeneCard 数据库 1 993 个，OMIM 数据库 173 个，DrugBank 数据库 42 个，DisGeNET 数据库 63 个，MalaCards 数据库 97 个，见图 2。通塞颗粒与 AECOPD 的交集靶点共 200 个，见图 3。

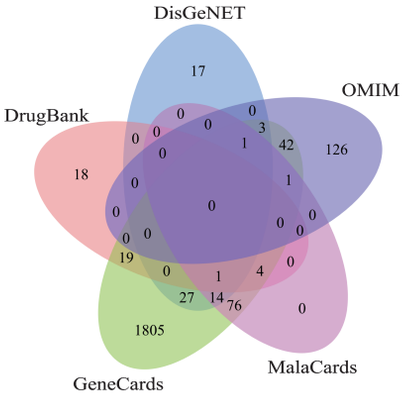


图 2　AECOPD 疾病相关靶点 Venn 图

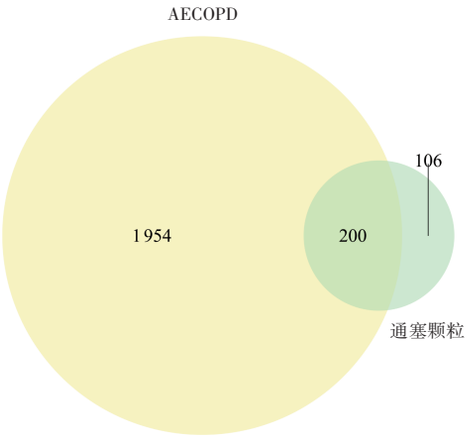
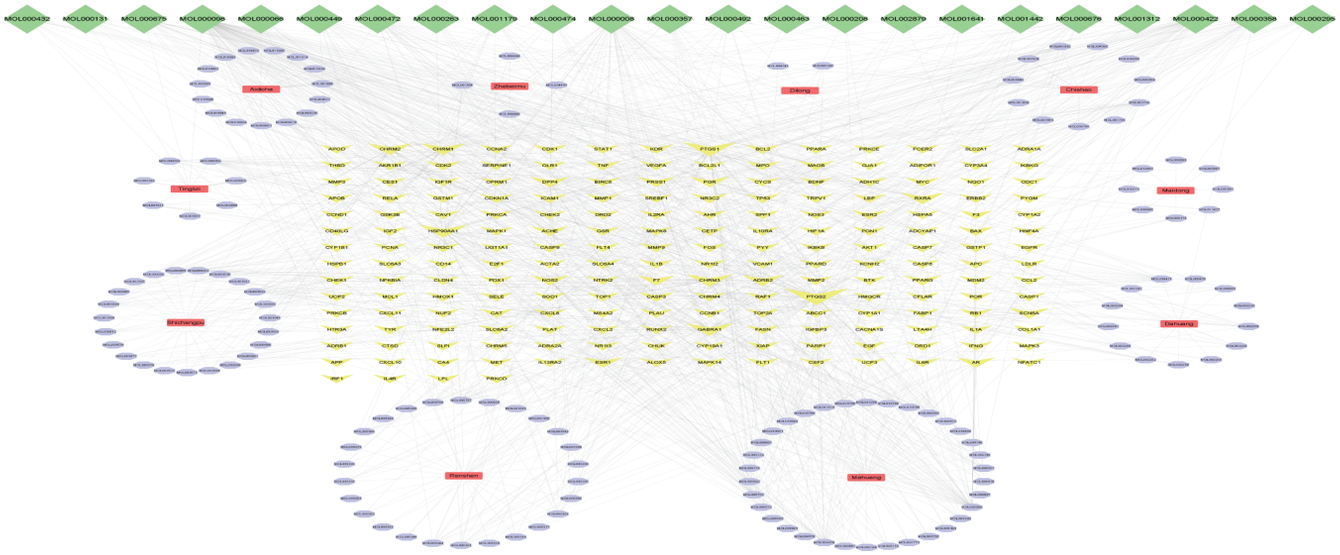


图 3　通塞颗粒-AECOPD 靶点交集 Venn 图

4.3　通塞颗粒活性成分与 AECOPD 交集靶点网络构建　使用 Cytoscape 3.8.1 软件构建通塞颗粒的活性成分与 AECOPD 交集靶点的关系网络图(见图 4)。在网络中通过 degree 值和 betweenness 值筛选得到前 5 名关键活性成分，分别为槲皮素、芹菜素、木犀草素、山柰酚、β-谷甾醇，见表 4。



注：该网络中包含 376 个节点和 1 415 条边。红色代表中药，紫色代表各中药的单独成分，绿色代表各中药的共有成分，黄色代表中药与 AECOPD 的共同靶点

图 4　通塞颗粒活性成分-AECOPD 交集靶点网络图

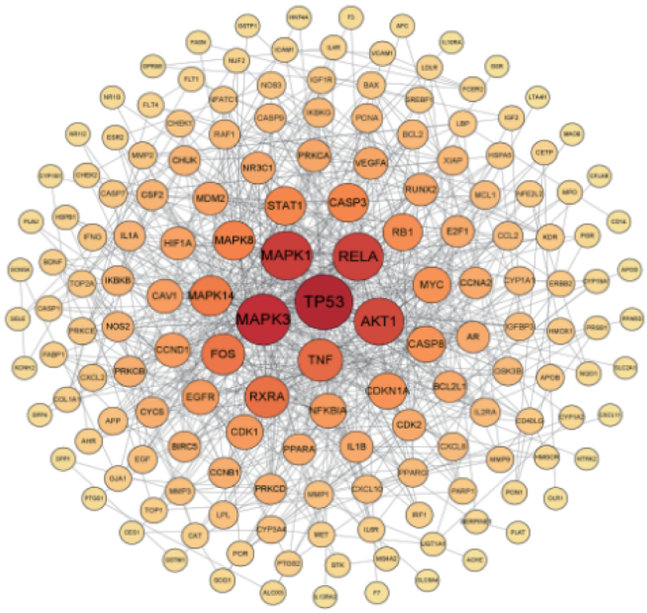
表 4　关键活性成分筛选

MOl ID	活性成分	degree 值	betweenness 值
MOL000098	槲皮素(Quercetin)	111	40 492
MOL000008	芹菜素(Apigenin)	51	11 227
MOL000006	木犀草素(Luteolin)	48	9 071
MOL000422	山奈酚(Kaempferol)	46	10 169
MOL000358	β-谷甾醇(beta-sitosterol)	29	5 078

4.4　核心靶点筛选　将从 STRING 数据库筛选得到的 162 个交集靶点信息导入 Cytoscape 3.8.1 软件进行处理，其 PPI 关系见图 5。将靶点根据 degree 值和 betweenness 值的大小进行排列，最终筛选得到前 6 名核心靶点，分别为 TP53、MAPK3、MAPK1、RELA 原癌基因(RELA)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1(AKT1)、肿瘤坏死因子(TNF)，见表 5。

表 5　核心靶点筛选

靶点	degree 值	betweenness 值
TP53	43	4 057
MAPK3	38	1 884
MAPK1	35	1 586
RELA	34	1 926
AKT1	33	1 744
TNF	27	1 568



注：该网络中包含 162 个节点，674 条边

图 5　中药-疾病共同靶点 PPI 网络图

4.5　GO 富集分析及 KEGG 通路富集分析　将交集靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析。GO 富集分析：将“P-value < 0.05、Q-value < 0.05”作为筛选条件，得到总条目 2 883 个，其中生物过程(BP) 2 566 条，细胞组成(CC)108 条，分子功能(MF)209 条，每组选取前 10 条生成可视化三合一柱状图，见图 6。

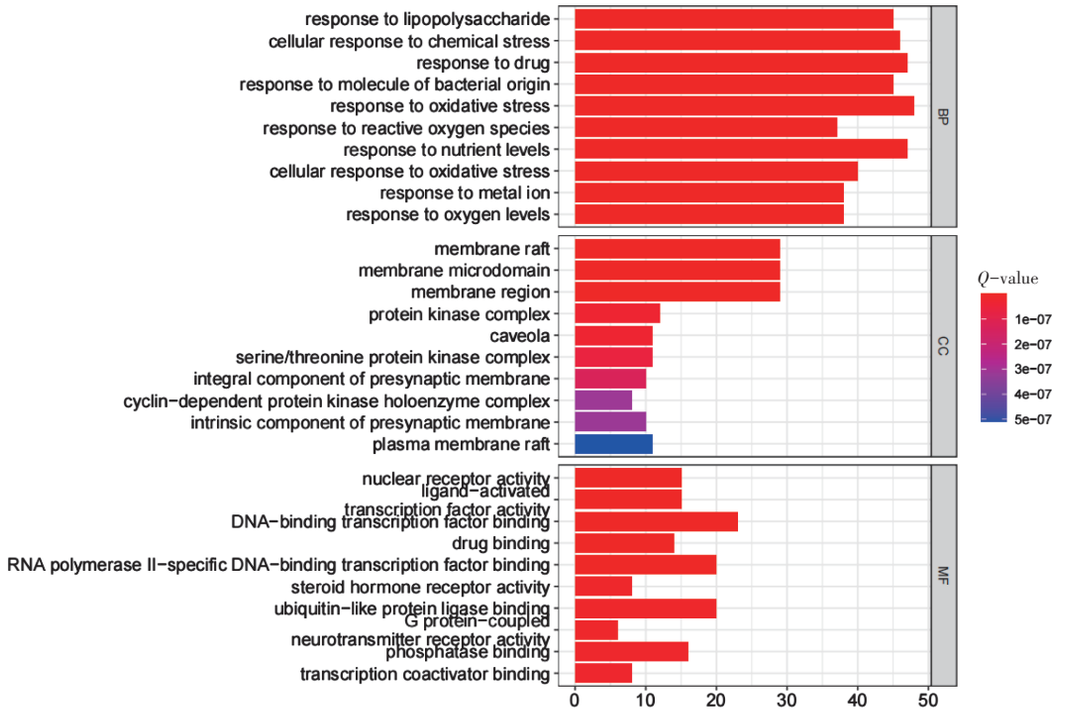


图 6　GO 富集分析柱状图

KEGG通路富集分析：关键靶点富集在178条通路上，根据*P*值和*Q*值排序，选取前30条绘制柱状图，见图7。查阅文献并结合*P*值和*Q*值，筛选出与AECOPD密切相关的TNF、IL-17、MAPK、NF-κB、磷脂酰肌醇3-激酶(P13K)-AKT、缺氧诱导因子1(HIF-1)通路，见图8。

4.6　分子对接　将关键活性成分槲皮素、芹菜素、木犀草素、山奈酚、β-谷甾醇与核心靶点TP53、MAPK3、MAPK1、RELA、AKT1、TNF进行分子对接。结合能(Binding energy)体现配体与受体之间结合的可能性，能值越低表示配体与受体之间亲和力越高，构象越稳定，在自然状态下更易结合。结合能<-5.0 kcal/mol表明有较好的结合活性；结合能<-7.0 kcal/mol表明具有强烈的结合活性[9]。结果显示，对接均具有较好的结合活性，见图9。具体分子对接见图10。

4.7　动物实验验证结果

4.7.1　各组大鼠肺组织病理表现　对照组大鼠：支气管结构基本完整，肺血管壁未见明显增厚，肺泡结构基本完整，少量散在的炎性细胞浸润。模型组大鼠：支气管上皮细胞脱落，杯状细胞增生，大量炎性细胞浸润，肺血管壁增厚，肺泡间隔变窄并断裂，融合成较大的囊腔。中药组大鼠：支气管结构的破坏、炎性细胞的浸润、肺泡间的融合均较用药前改善，但肺血管壁仍可见明显增厚。西药组大鼠：支气管病理学变化与中药组相当。联合组大鼠：支气管上皮细胞的破坏程度较模型组明显减轻，肺血管壁轻微增厚，炎性细胞的浸润及肺泡融合扩张明显改善，治疗效果最好。见图11。

4.7.2　各组大鼠肺功能指标比较　见表6。模型组FVC、$FEV_{0.3}$、$FEV_{0.3}$/FVC、PEF值均较对照组降低($P<0.05$)。中药组、西药组以及联合组的FVC、$FEV_{0.3}$、PEF值均较模型组升高($P<0.05$)；联合组$FEV_{0.3}$/FVC值较模型组升高($P<0.05$)。中药组FVC、$FEV_{0.3}$、$FEV_{0.3}$/FVC、PEF值与西药组比较，差异均无统计学意义($P>0.05$)。联合组FVC、PEF值均较中药组及西药组升高($P<0.05$)；联合组$FEV_{0.3}$较西药组升高($P<0.05$)。

4.7.3　各组大鼠血清TNF-α、IL-17含量比较　见表7。模型组、中药组、西药组、联合组的血清TNF-α、IL-17含量均高于对照组($P<0.05$)；中药组、西药组及联合组的TNF-α、IL-17含量均低于模型组($P<0.05$)；联合组血清TNF-α、IL-17含量均低于中药组、西药组($P<0.05$)。中药组TNF-α含量

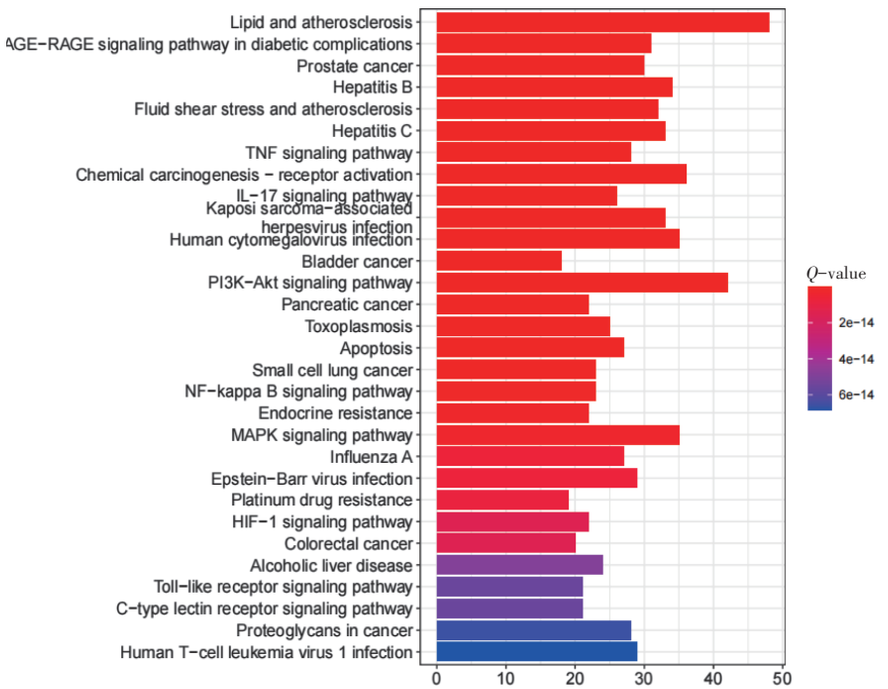
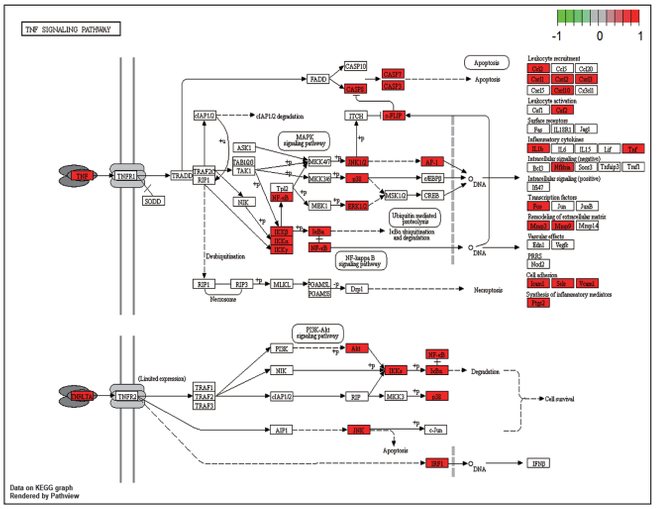
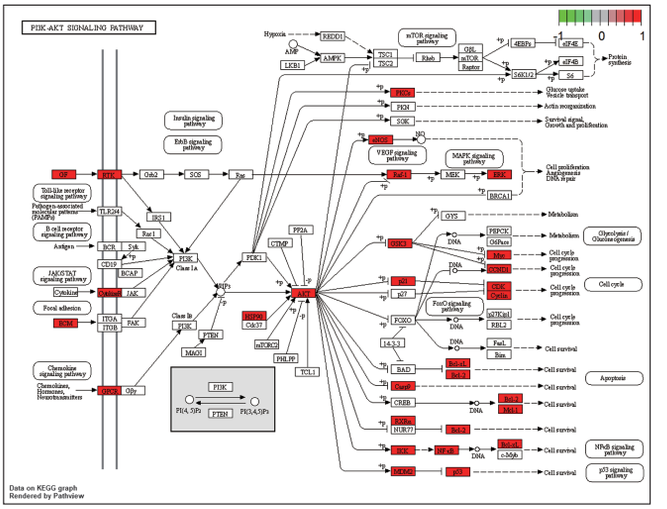


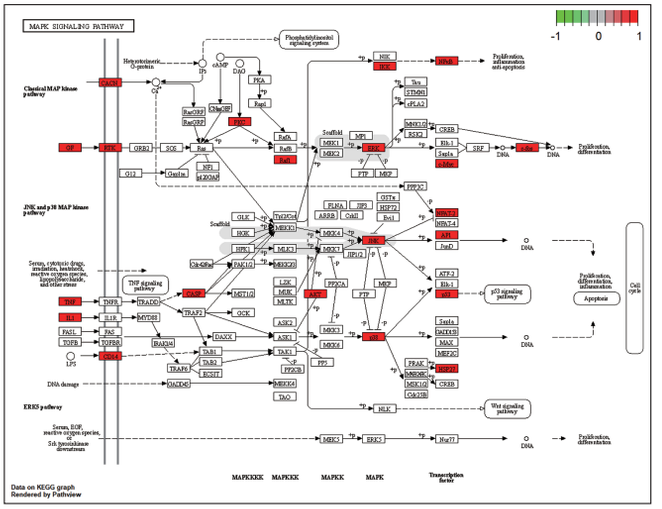
图7　KEGG通路富集分析柱状图



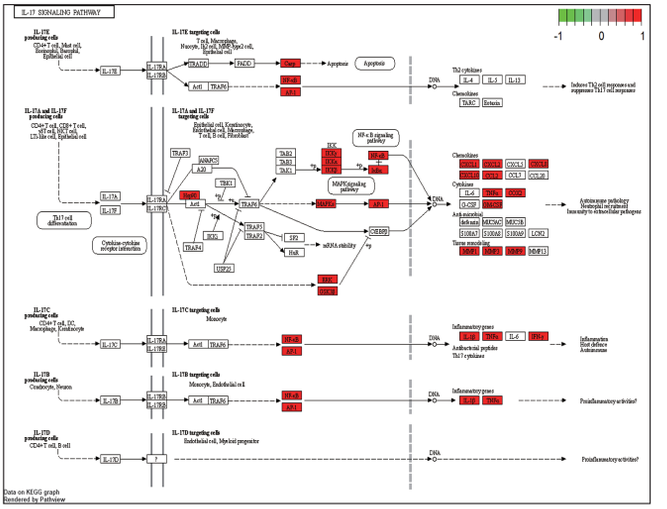
TNF Pathway



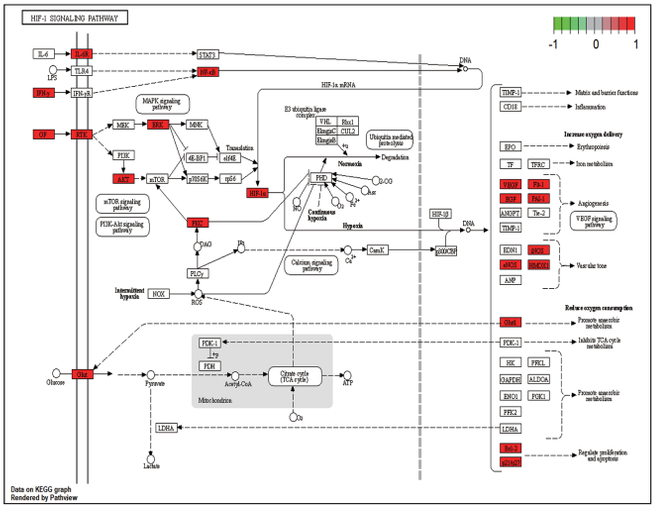
P13K-AKT Pathway



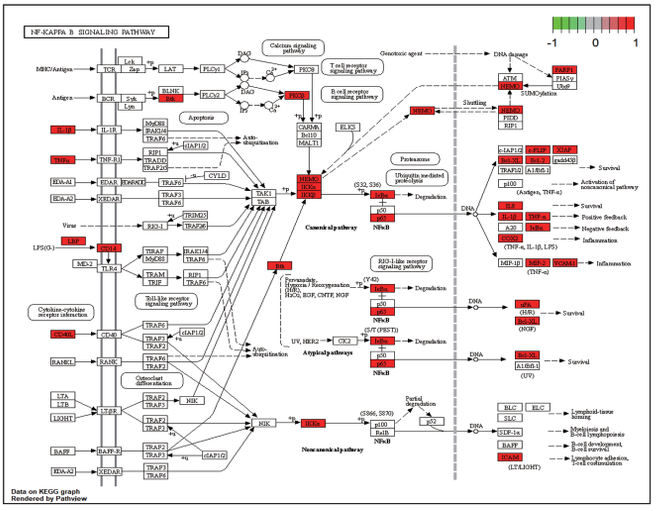
MAPK Pathway



IL-17 Pathway



HIF-1 Pathway



NF-κB Pathway

图 8　交集靶点-信号通路图

高于西药组($P<0.05$),IL-17含量低于西药组($P<0.05$)。

4.7.4　各组大鼠肺组织蛋白表达含量比较　见表8、图12。模型组肺组织P-P65/P65、P-AKT/AKT、P-MAPK1/3/MAPK1/3和TP53/GAPDH蛋白表达含量均高于对照组($P<0.05$)；中药组、西药组以及联合组上述蛋白的表达含量均低于模型组($P<0.05$)；联合组上述蛋白的表达含量均低于中药组、西药组($P<0.05$)。注："P"代表磷酸化，"非P"代表非磷酸化。前者代表该蛋白的磷酸化水平，后者代表该蛋白的含量。因很多信号通路的蛋白在受到刺激后，均是通过其磷酸化水平的改变而引起一系列细胞反应，所以用磷酸化与非磷酸化的比值来体现各组检测蛋白的实际表达含量。P65、MAPK1/3及AKT均是通过磷酸化表达来证明通路的激活，但TP53不是此类型，所以用TP53与内参GAPDH的比值来体现蛋白的表达含量。

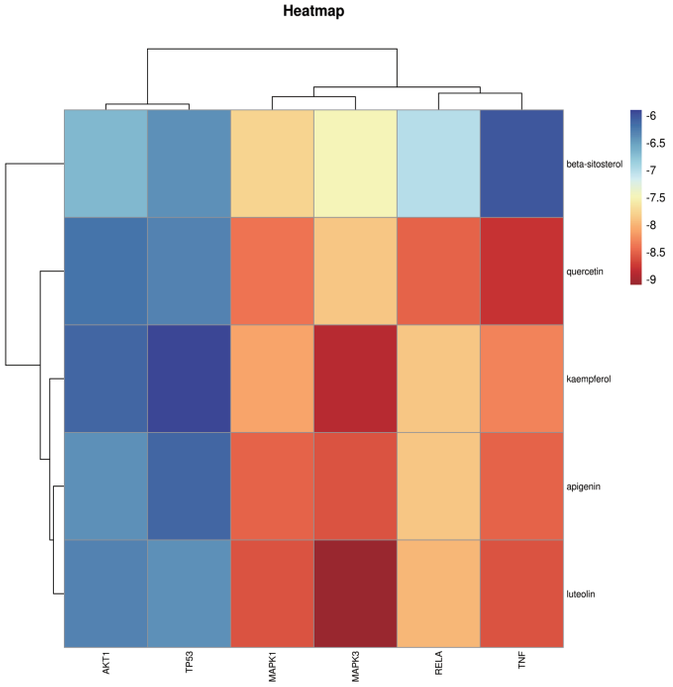


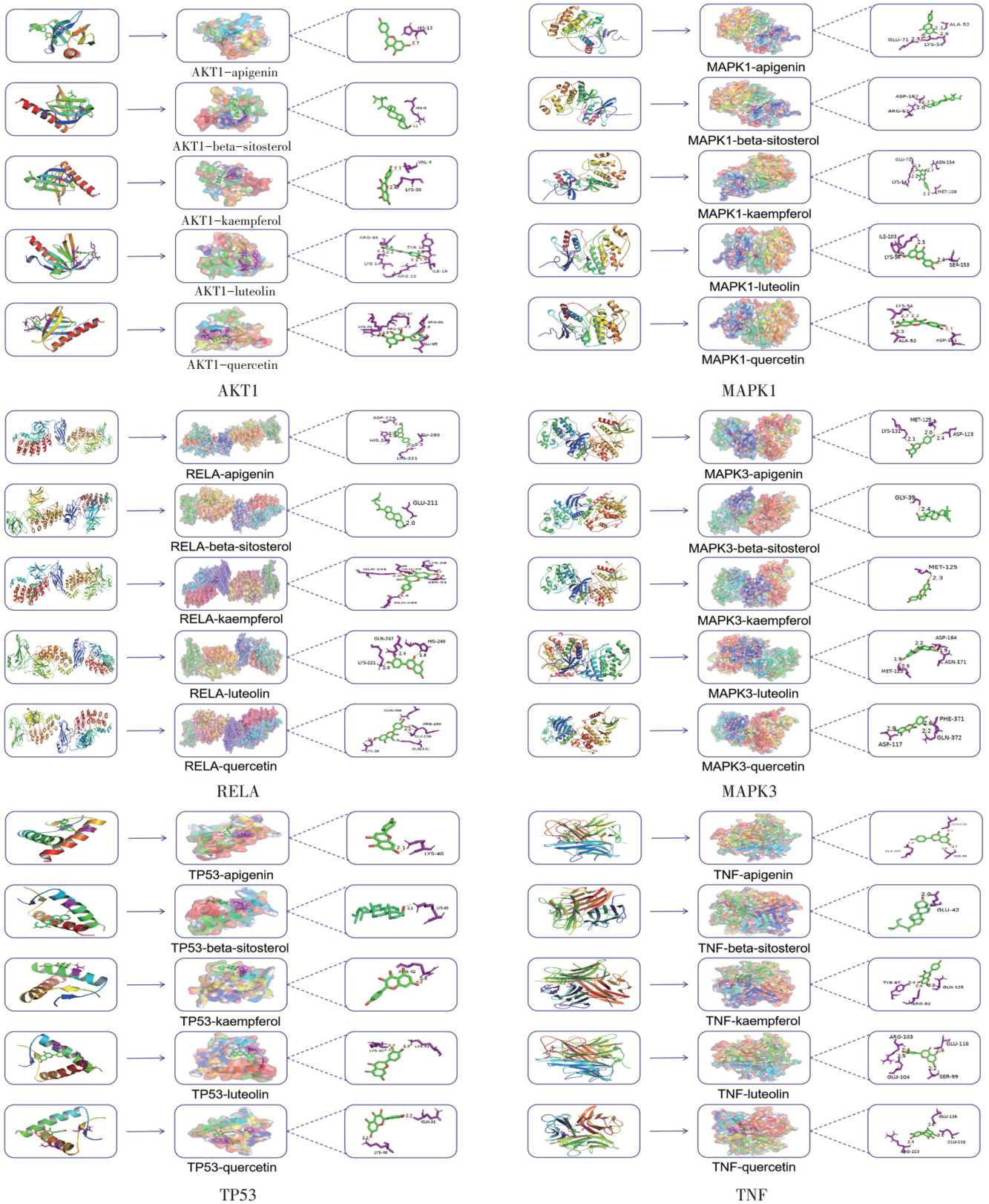
图9　分子对接自由结合能热图

5　讨论

本研究通过网络药理学对通塞颗粒治疗AECOPD的作用机制进行了分析，并进行了动物实验验证。动物实验病理学及肺功能检测结果显示通塞颗粒可有效改善AECOPD肺泡融合、血管壁增厚，减轻肺损伤并有助于恢复呼吸功能。

网络药理学研究结果显示，通塞颗粒的关键活性成分是槲皮素、山柰酚、芹菜素、木犀草素和β-谷甾醇，除β-谷甾醇外，其余成分均为天然黄酮。黄酮类化合物具有抗氧化、抗炎、抗菌、调节免疫等药理作用，而抗炎、抗氧化特性使其成为治疗肺部炎症疾病的潜在药物[10]。有研究表明，槲皮素能通过抑制磷酸二酯酶4(PED-4)、激活cAMP/PKA信号通路，抑制NF-κB活化，并可有效减轻气道炎症[11-12]；在COPD鼠体模型中，槲皮素可显著降低TNF-α表达水平，抑制肺泡细胞凋亡，减少肺部损伤，预防COPD的急性加重[13]。Chung MJ等[14]通过实验证明，山柰酚可以显著减少哮喘模型小鼠肺泡灌洗液中的炎症细胞数量，改善肺泡充血及气道壁增厚等急性肺损伤的病理特征；另外，山柰酚还可通过调节Nrf2和NF-κB信号通路来减少氧化应激、炎症和细胞凋亡[15]。木犀草素可以通过抑制内毒素刺激导致的巨噬细胞磷酸化，降低IL-6等炎症因子的表达水平，提高肺血管通透性，减轻COPD患者的肺水肿症状，改善肺功能[16-17]。芹菜素碳苷可通过抑制TLR4/瞬时受体电位通道蛋白6(TRPC6)信号通路的激活，减轻脂多糖(LPS)诱导的BALB/c小鼠急性肺损伤模型的肺部炎症和免疫毒性[18]。β-谷甾醇是一种天然甾醇，临床上应用以它为主要成分的中药球兰治疗呼吸道疾病有很好的消炎作用[19]；有实验证明，β-谷甾醇可通过下调硫氧还蛋白(Trx)/硫氧还蛋白-1(Trx1)激活TP53表达，诱导A549肺癌细胞的凋亡，起到抗癌作用[20]。

通过中药-疾疾共同靶点PPI网络图发现，通塞颗粒治疗AECOPD的核心靶点涉及TP53、MAPK1、MAPK3、TNF、AKT1、RELA。TP53是人体重要的抑癌因子，其功能为调控细胞增殖和凋亡[21]；目前有研究已证实TP53可通过外源性和内源性凋亡途径，调控细胞凋亡[22]；TP53能通过下调B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)及上调细胞凋亡促进基因Bax的表达水平来促进细胞凋亡过程[23]；TP53抑制剂可有效减少COPD大鼠肺泡上皮细胞的凋亡，减轻肺组织损伤[24-25]。MAPK作为一种丝裂原活化蛋白激酶，负责在细胞内传递信号，参与多种炎症细胞因子和应激信号的传导[26]；MAPK1、MAPK3均属于MAPK家族，可以通过介导炎症、免疫应答、气道结构、细胞反应等途径参与哮喘和COPD的发生与发展[27-29]。文献[30]报道MAPK1、MAPK3的激活可以抑制细胞凋亡。有研究



注：核心靶点 AKT1、MAPK1、RELA、MAPK3、TP53、TNF 与关键活性成分芹菜素、β-谷甾醇、山柰酚、木犀草素、槲皮素分别依次进行对接

图 10　中药关键活性成分与核心靶点对接图

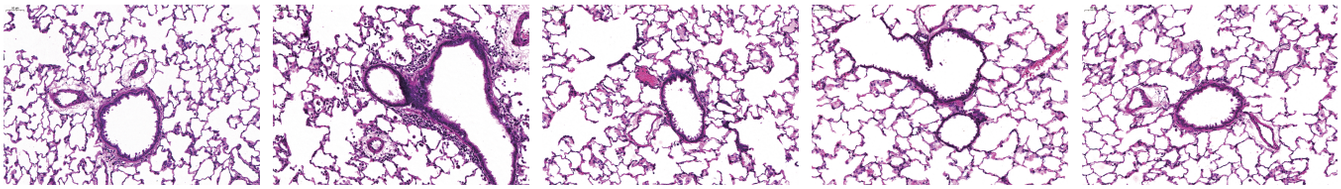


图 11　各组大鼠左肺组织 HE 染色图(×100)

表 6　各组大鼠肺功能指标比较($\bar{x}\pm s$)

组　别	样本量	FVC(mL)	$FEV_{0.3}$(mL)	$FEV_{0.3}$/FVC(%)	PEF(mL/s)
对照组	6	18.03 ± 2.24	17.13 ± 1.96	95.55 ± 1.01	92.10 ± 2.77
模型组	6	10.23 ± 1.40①	9.16 ± 1.40①	85.08 ± 1.61①	71.59 ± 1.19①
中药组	6	13.07 ± 1.86①②	12.83 ± 1.98①②	90.77 ± 4.03	81.19 ± 0.89①②
西药组	6	13.10 ± 1.38①②	12.47 ± 1.46①②	90.44 ± 5.94	80.96 ± 1.05①②
联合组	6	16.28 ± 0.97②③④	14.71 ± 1.80①②④	93.50 ± 2.82②	86.94 ± 0.80①②③④

注：①与对照组比较，$P<0.05$；②与模型组比较，$P<0.05$；③与中药组比较，$P<0.05$；④与西药组比较，$P<0.05$

表 7　各组大鼠血清 TNF-α、IL-17 含量比较($\bar{x}\pm s$)　pg/mL

组　别	样本量	TNF-α	IL-17
对照组	6	11.84 ± 1.37	17.67 ± 1.09
模型组	6	35.63 ± 0.76①	44.10 ± 2.17①
中药组	6	31.26 ± 0.45①②	23.84 ± 0.75①②
西药组	6	27.92 ± 1.42①②③	26.29 ± 0.71①②③
联合组	6	24.50 ± 1.23①②③④	21.08 ± 0.62①②③④

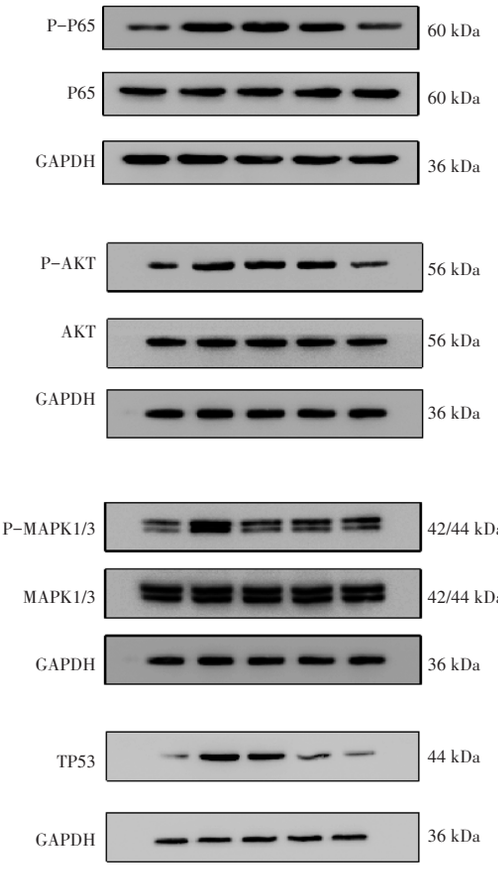
注：①与对照组比较，$P<0.05$；②与模型组比较，$P<0.05$；③与中药组比较，$P<0.05$；④与西药组比较，$P<0.05$

表 8　各组大鼠肺组织蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组　别	样本量	P-AKT/AKT	P-MAPK1/3/MAPK1/3	P-P65/P65	TP53/GAPDH
对照组	6	0.05±0.02	0.18±0.10	0.08±0.36	0.09±0.01
模型组	6	1.01±0.14①	0.98±0.20①	1.59±0.34①	1.41±0.03①
中药组	6	0.50±0.15①②	0.57±0.30①②	0.88±0.23①②	0.92±0.12①②
西药组	6	0.43±0.12①②	0.54±0.16①②	1.02±0.24①②	0.42±0.03①②③
联合组	6	0.11±0.04②③④	0.36±0.11②	0.37±0.24①②③④	0.29±0.02①②③④

注：①与对照组比较，$P<0.05$；②与模型组比较，$P<0.05$；③与中药组比较，$P<0.05$；④与西药组比较，$P<0.05$

结果显示，香烟烟雾提取物(cCSE)诱导的 A549 肺癌细胞 MAPK1、MAPK3 磷酸化水平显著升高，并且增加了肺泡上皮细胞的凋亡[31]。RELA 是 NF-κB 家族的重要成员，RELA/p65 具有激活 NF-κB 转录的功能，当 NF-κB 被激活，将出现核转位过程，结合于相关基因上游的转录活性调控元件，促进相关基因 mRNA 的转录，诱导对应分子的表达[32-33]。近年越来



注：WB 条带，从左至右依次为对照组、模型组、中药组、西药组、联合组

图 12　各组大鼠肺组织中相关蛋白条带图

越多的研究表明，通过对 RELA/P65 翻译后修饰可以对 NF-κB 通路进行精准和复杂的调控[34]。临床研究表明，抑制 RELA/P65 的过度活化可以减轻 COPD 患者的气道炎症反应，改善肺功能和血气指标[35]。本研究的 GO 富集分析结果显示，通塞颗粒可能通过调控 LPS 反应、氧化应激反应、丝/苏氨酸蛋白激酶复合物、转录因子活性、DNA-转录因子结合等 BP 而发挥治疗 AECOPD 的功效。KEGG 通路富集分析结果表明，通塞颗粒治疗 AECOPD 主要涉及 TNF、IL-17、

MAPK、NF-κB、P13K、HIF-1等多条信号通路。TNF信号通路是COPD疾病病理过程中的关键通路，参与多种信号转导，主要通过上调MAPK、ERK、NF-κB等信号通路来诱导细胞凋亡及促进炎症反应[36]。TNF信号通路通过释放TNF-α等促炎因子，产生大量炎性介质，促进气道炎性浸润，增加血管通透性，形成肺水肿，加重肺损伤[37-38]。有研究证实，TNF-α广泛存在于COPD患者的肺组织中，其升高会引起炎性介质的瀑布样连锁反应，从而加重COPD的病情发展[39-40]。辅助性T细胞17(Th17)是人类辅助性T细胞分化出的一类细胞亚群，主要通过分泌IL-17A导致炎性因子释放，促使气道黏液腺分泌大量黏液，与肺气肿的形成、气流阻塞密切相关[41]。有研究发现，IL-17可诱导中性粒细胞的募集，增加COPD患者支气管上皮细胞细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的表达，增强ICAM-1的黏附作用，并加剧气道炎症反应[42-43]。HIF-1信号通路在细胞代谢、氧化应激、损伤修复等环节中发挥重要作用[44]；其由HIF-1α和HIF-1β两种亚基组成异源二聚体，HIF-1α是内源性保护机制的始动因子，也是P13K-AKT信号通路的下游因子[45]。COPD患者普遍存在缺氧的临床表现，在缺氧条件下，P13K-AKT通路被激活，AKT活化，下游蛋白mTOR磷酸化，促使HIF-1α蛋白合成，以应对低氧环境，改善气道缺血、缺氧状态[46]。在PI3K-AKT经典信号通路中，AKT是处于PI3K下游的关键蛋白，在激活后，可以通过各种下游因子的磷酸化来进行细胞调控[47]；该通路上调会激活NF-κB上游抑制蛋白κB抑制因子激酶(IKK)及NF-κB抑制蛋白(IKB)，使后者被泛素化降解，继而激活NF-κB信号通路，引起TNF-α和IL-17等多种炎症因子的释放[48-49]。另外，NF-κB信号通路通过调节呼吸道细胞因子活性，增强促炎分子分泌，从而加重COPD[50]。因此许多药物通过抑制NF-κB信号通路的转导，从而起到抗炎作用，延缓COPD的发展[51-52]。本研究动物实验验证结果显示，通塞颗粒可有效下调TP53、P-P65、P-AKT、P-MAPK1/3蛋白表达，减轻炎症反应和氧化应激反应，减少细胞凋亡，起到保护肺黏膜的作用。

综上所述，通塞颗粒治疗AECOPD是一个涉及多成分、多靶点、多通路的过程。动物实验验证结果显示相较于模型组，通塞颗粒可显著下调网络药理学中筛选出的核心靶点蛋白表达，减轻炎症反应，缓解肺损伤，起到治疗AECOPD的功效。本研究系统地阐释了通塞颗粒治疗AECOPD的潜在活性成分、核心靶点以及相关通路，为后续深入验证和探讨通塞颗粒治疗AECOPD的分子机制提供了基础和思路。

[参考文献]

[1] 张海龙，李建生，王海峰，等. 慢性阻塞性肺疾病急性加重危险窗证候分布的临床调查研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化，2014，16(7)：1587-1592.

[2] 王至婉，李建生，王明航，等. 慢性阻塞性肺疾病急性加重期中医证候分布规律的文献研究[J]. 中医杂志，2008，49(8)：727-730.

[3] 李建生，李素云，马利军，等. 通塞颗粒治疗老年慢性阻塞性肺疾病(COPD)急性加重期的临床疗效评价[J]. 河南中医学院学报，2003，18(5)：35-38.

[4] 李建生，李素云，王又红，等. 慢性阻塞性肺疾病急性加重期模型大鼠肺组织基质金属蛋白酶的变化及通塞颗粒的治疗作用[J]. 中国老年学杂志，2005，25(2)：174-175.

[5] LU X F，LI Y，LI J S，et al. Sequential Treatments with Tongsai and Bufei Yishen Granules Reduce Inflammation and Improve Pulmonary Function in Acute Exacerbation-Risk Window of Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Rats[J]. Evid Based Complement Alternat Med，2016，2016：1359105.

[6] 梅雪，李建生，周红艳，等. 通塞颗粒对AECOPD痰热证大鼠肺组织TLR4信号通路的影响[J]. 时珍国医国药，2015，26(3)：540-542.

[7] LI Y，LI S Y，LI J S，et al. A rat model for stable chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke inhalation and repetitive bacterial infection[J]. Biol Pharm Bull，2012，35(10)：1752-1760.

[8] LI J S，LI Y，LU X F，et al. Dynamic Characteristics of Sequential Acute Exacerbations and Risk Windows in AECOPD Rats Induced by Cigarette - Smoke and Exposure to Klebsiella pneumoniae[J]. Biol Pharm Bull，2018，41(10)：1543-1553.

[9] 裴超，邵霖霖，刘晶，等. 基于网络药理学与分子对接技术探讨红花治疗视网膜静脉阻塞的作用机制研究[J]. 天然产物研究与开发，2020，32(11)：1844-1851.

[10] 俞文英，张欢欢，吴月国，等. 黄酮类化合物的构效关系及其在肺部炎症疾病中的应用[J]. 中草药，2018，49(20)：4912-4918.

[11] 张鹏，叶陈丽，马婧，等. 槲皮素预防急性加重慢性阻塞性肺疾病的作用及机制研究[J]. 今日药学，2021，31(6)：416-421.

[12] WANG X F，SONG S D，LI Y J，et al. Protective Effect of Quercetin in LPS-Induced Murine Acute Lung Injury Mediated by cAMP-Epac Pathway[J]. Inflammation，2018，41(3)：1093-1103.

[13] 魏萍，陈志斌，王春娥，等. 槲皮素对慢性阻塞性肺疾病大鼠的保护作用[J]. 中国免疫学杂志，2019，35(21)：2570-2575.

[14] CHUNG M J，PANDEY R P，CHOI J W，et al. Inhibitory effects of kaempferol-3-O-rhamnoside on ovalbumin-induced lung inflammation in a mouse model of allergic asthma[J]. Int Immunopharmacol，2015，25(2)：302-310.

[15] ZHANG L，GUO Z X，WANG Y，et al. The protective effect of kaempferol on heart via the regulation of Nrf2，NF-κβ，and PI3K/Akt / GSK-3β signaling pathways in isoproterenol-induced heart failure in diabetic rats[J]. Drug Dev Res，2019，80(3)：294-309.

[16] WANG S，CAO M，XU S，et al. Luteolin Alters Macrophage Polarization to Inhibit Inflammation[J]. Inflammation，2020，43(1)：95-108.

[17] 刘娟，王军，邓庆华. 慢性阻塞性肺疾病炎症机制及中药单体成分对其治疗作用的研究进展[J]. 中国药房，2018，29(8)：1145-1149.

[18] LI K，HE Z，WANG X，et al. Apigenin C-glycosides of Microcos paniculata protects lipopolysaccharide induced apoptosis and inflammation in acute lung injury through TLR4 signaling pathway[J]. Free Radic Biol Med，2018，124：163-175.

[19] 魏金婷，刘文奇. 植物药活性成分β-谷甾醇研究概况[J]. 莆田学院学报，2007，14(2)：38-40，46.

[20] RAJAVEL T，PACKIYARAJ P，SURYANARAYANAN V，et al. β-Sitosterol targets Trx/Trx1 reductase to induce apoptosis in A549 cells via ROS mediated mitochondrial dysregulation and p53 activation[J]. Sci Rep，2018，8(1)：2071.

[21] 李虹，姚开泰. TP53结构功能及活性调节的最新研究进展[J]. 国外医学(分子生物学分册)，2001，23(5)：257-260.

[22] MORTON J P，KANTIDAKIS T，WHITE R J. RNA polymerase Ⅲ transcription is repressed in response to the tumour suppressor ARF[J]. Nucleic Acids Res，2007，35(9)：3046-3052.

[23] 许瑶，沈明勤，许尤琪. 健脾化痰方对裸鼠前胃癌MFC瘤组织P53 Bcl-2 Survivin Bax基因表达的影响[J]. 时珍国医国药，2018，29(1)：3-6.

[24] TARGOWSKI T，JANDA P，OWCZAREK W，et al. Evaluation of occurrence frequency of circulating p53 protein in serum of patients with chronic obstructive pulmonary diseases and non-small cell lung cancer[J]. Pol Merkur Lekarski，2010，28(166)：265-267.

[25] HU W，XIE J，ZHAO J，et al. Involvement of Bcl-2 family in apoptosis and signal pathways induced by cigarette smoke extract in the human airway smooth muscle cells[J]. DNA Cell Biol，2009，28(1)：13-22.

[26] 吴阳洋，刘玲琳，周玲利，等. 基于网络药理学研究六君子汤治疗慢性阻塞性肺疾病的作用机制[J]. 实用中医内科杂志，2021，35(4)：19-23.

[27] 王玮，崔婷. miR-20b通过调节MAPK/ERK途径对COPD动物模型气道炎症改善情况及作用机制研究[J]. 国际呼吸杂志，2020，40(23)：1766-1770.

[28] 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.

[29] 吕天宜，程思益，杨道文，等. 基于p38MAPK信号通路探讨中药在肺系疾病中的靶向干预作用[J]. 中医药导报，2020，26(15)：129-132.

[30] 祝盼盼，商亚珍. MAPK信号通路介导细胞凋亡的研究进展[J]. 承德医学院学报，2021，38(3)：243-246.

[31] GUAN R J，WANG J，LI D F，et al. Hydrogen sulfide inhibits cigarette smoke-induced inflammation and injury in alveolar epithelial cells by suppressing PHD2/HIF-1α/MAPK signaling pathway[J]. Int Immunopharmacol，2020，81：105979.

[32] ZHU T，WANG D X，ZHANG W，et al. Andrographolide protects against LPS-induced acute lung injury by inactivation of NF-κB[J]. PLoS One，2013，8(2)：e56407.

[33] ZHU T，WU X L，ZHANG W，et al. Glucagon Like Peptide-1(GLP-1) Modulates OVA-Induced Airway Inflammation and Mucus Secretion Involving a Protein Kinase A (PKA)-Dependent Nuclear Factor-κB (NF-κB) Signaling Pathway in Mice[J]. International Journal of Molecular Sciences，2015，16(9)：20195-20211.

[34] PERKINS N D. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway[J]. Oncogene，2006，25(51)：6717-6730.

[35] 李宾，李海菊，张维. 血单核细胞核因子-κB p65活化水平与黄藤素治疗的慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者炎症反应的相关性研究[J]. 中华诊断学电子杂志，2019，7(4)：273-278.

[36] 陈兰英，尹力，周朦静，等. 泽漆醇提物对LPS诱导小鼠急性肺损伤及其炎症信号通路MAPK/NF-κB的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26(20)：46-51.

[37] 蔡东，孙钟，赵益庆. 慢性阻塞性肺疾病稳定期BODE指数、IL-8、TNF-α水平与肺肾气虚证相关性研究[J]. 陕西中医，2020，11(41)：1573-1575.

[38] RESENDIZ-HERNANDEZ J M，AMBROCIO-ORTIZ E，PEREZ-RUBIO G，et al. TNF promoter polymorphisms are associated with genetic susceptibility in COPD secondary to tobacco smoking and biomass burning[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis，2018，13：627-637.

[39] SHAW J G，VAUGHAN A，DENT A G，et al. Biomarkers of progression of chronic obstructive pulmonary disease (COPD)[J]. J Thorac Dis，2014，6(11)：1532-1547.

[40] MIRAVITLLES M，SOLER-CATALUNA J J，CALLE M，et al. Treatment of COPD by clinical phenotypes：putting old evidence into clinical practice[J]. Eur Respir J，2013，41(6)：1252-1256.

[41] 周金花，王伟，刘瑞娟. Treg/Th17在慢性阻塞性肺疾病合并肺癌中的相关研究进展[J]. 中国肺癌杂志，2019，22(12)：794-797.

[42] RITZMANN F，BEISSWENGER C. Preclinical studies and the function of IL-17 cytokines in COPD[J]. Ann Anat，2021，237：151729.

[43] XIONG J，ZHOU L，TIAN J Y，et al. Cigarette Smoke-Induced

Lymphoid Neogenesis in COPD Involves IL-17/RANKL Pathway[J]. Front Immunol，2020，11：588522.

[44] 滑雅娜，鲁芙爱，王永福. HIF-1相关信号通路及其在自身免疫性疾病中作用[J]. 中国免疫学杂志，2019，35(8)：1013-1017.

[45] 刘小平，朱小兵，吴论. P13K-Akt-HIF-1α信号通路在右美托咪定减轻大鼠呼吸机相关性肺损伤中的作用[J]. 中国医药科学，2018，8(12)：17-20.

[46] 许云姣，吴文笛，张志毕，等. 基于P13K/AKt及NF-kB信号通路探讨大鼠应激性溃疡的关键保护因子[J]. 云南中医中药杂志，2021，42(6)：79-83.

[47] SAAHENE R O，AGBO E，BARNES P，et al. A Review：Mechanism of Phyllanthus urinaria in Cancers-NF-κB，P13K/AKT，and MAPKs Signaling Activation[J]. Evid Based Complement Alternat Med，2021，2021：4514342.

[48] 杨鑫，李源力，蒋萍，等. 杨梅素通过PI3K/AKT/NF-κB信号通路对骨性关节炎发展的影响[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版)，2020，41(1)：48-57.

[49] HARIKRISHNAN H，JANTAN I，HAQUE M A，et al. Anti-Inflammatory Effects of Hypophyllanthin and Niranthin Through Downregulation of NF-κB/MAPKs/PI3K-Akt Signaling Pathways[J]. Inflammation，2018，41(3)：984-995.

[50] LIU D S，CHEN Q，ZHU H L，et al. Association of Respiratory Syncytial Virus Toll-Like Receptor 3-Mediated Immune Response with COPD Exacerbation Frequency[J]. Inflammation，2018，41(2)：654-666.

[51] DANG X，HE B，NING Q，et al. Alantolactone suppresses inflammation，apoptosis and oxidative stress in cigarette smoke-induced human bronchial epithelial cells through activation of Nrf2/HO-1 and inhibition of the NF-κB pathways[J]. Respir Res，2020，21(1)：95.

[52] 窦丹，刘迪，贾元萍，等. 基于网络药理学探讨参苓白术散“异病同治”慢性阻塞性肺疾病和溃疡性结肠炎作用机制[J]. 辽宁中医药大学学报，2021，23(7)：71-77.

(责任编辑：吴凌，李海霞)