DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20250916.001
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1089.R.20250916.1250.002

复方升降平喘止咳丸通过调控PI3K/AKT/NFκB信号通路抑制BA大鼠细胞凋亡和炎症反应

吴 桐[1,2],赵思超[1,2],白 敏[1,2],王成娟[3],何腾飞[1,2],鲁宝堂[1,2],段永强[1,2]✉,张常喜[1,3]✉
(1.宁夏医科大学中医学院,宁夏 银川 750004;2.宁夏医科大学中医燥证教育部重点实验室,宁夏 银川 750004;3.宁夏回族自治区中医医院,宁夏 银川 750021)

[摘要] **目的**:探讨复方升降平喘止咳丸干预支气管哮喘(bronchial asthma,BA)的作用和机制。**方法**:通过网络药理学获得药物治疗疾病的核心靶点,预测出可能的作用机制,并进行体内实验验证。从60只SPF级SD大鼠中随机选取10只为空白组,其余50只为造模组。采用卵清蛋白和氢氧化铝混合溶液腹腔注射和雾化激发的方法进行造模,将模型构建成功的大鼠随机分为模型组、阳性对照组及升降平喘止咳丸低、中、高剂量组,每组10只,治疗组雾化前1 h灌胃,连续治疗21 d。苏木素-伊红(H&E)染色观察大鼠肺组织病理形态;流式细胞术检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中细胞凋亡率;原位末端标记法(TUNEL)染色检测细胞凋亡情况;瑞氏-吉姆萨染色检测BALF中嗜酸性粒细胞(Eos)、中性粒细胞(Neu)和淋巴细胞(Lym);免疫组化(IHC)检测B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)及Bcl-2相关X蛋白(Bax)表达水平,免疫印迹(Western Blot)验证通路相关蛋白PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、NFκB表达水平。**结果**:网络药理学结果表明:共筛选出升降平喘止咳丸的靶点993个,支气管哮喘靶点2 627个,其交集靶点415个,PPI筛选出TNF、IL-6、AKT、Bcl-2、NFκB、STAT3、TP53、SRC等75个核心靶点,对核心靶点进行富集分析发现PI3K/AKT通路是治疗支气管哮喘的关键通路,分子对接发现AKT、TNF、IL-6与主要活性成分木犀草素、槲皮素、山柰酚对接<−8.1 kcal/mol。动物实验表明:升降平喘止咳丸可明显减轻哮喘大鼠肺组织结构破坏、平滑肌增厚、细支气管周围和血管周围炎症细胞浸润等病理损伤,同时BALF中嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞含量减少;流式细胞术和TUNEL染色显示细胞凋亡率下降;IHC结果显示Bax蛋白表达下调,Bcl-2蛋白表达上调;Western blot发现p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、NFκB蛋白表达下调。**结论**:升降平喘止咳丸通过多成分,多靶点有效改善BA大鼠肺组织病理损伤,其机制与调控PI3K/AKT/NFκB通路,减轻炎症微环境和细胞凋亡有关。

[关键词] 支气管哮喘;升降平喘止咳丸;细胞凋亡;PI3K/AKT/NFκB信号通路
[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 2097-5953(2026)19-1478-11

Compound Shengjiang Pingchuan Zhike Pills inhibit the apoptosis and inflammatory response in BA rats by regulating the PI3K/AKT/NFκB signaling pathway

WU Tong[1,2], ZHAO Sichao[1,2], BAI Min[1,2], WANG Chengjuan[3], HE Tengfei[1,2], LU Baotang[1,2], DUAN Yongqiang[1,2]✉, ZHANG Changxi[1,3]✉
(1. *College of Traditional Chinese Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan* 750004, *China*; 2. *Key Laboratory of Dryness Syndrome in Chinese Medicine, Ministry of Education, Ningxia Medical University, Yinchuan* 750004, *China*; 3. *Ningxia Hui Autonomous Region Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yinchuan* 750021, *China*)
[*Foundation Project*]: *This study was supported by the Ningxia Hui Autonomous Region Science and Technology Leading Talent Training Program* (2023*GKLRLX*18); *Autonomous Region Key R&D Program* (2024*BEG*02023); *Ningxia Natural Science Foundation* (2024*AAC*03730, 2024*AAC*02082)
[*Author*]: *WU Tong*, *E-mail*: *WuT*610240@163.*com*.
[*Correspondence to*]: *ZHANG Changxi*, *Chief Physician*, *Doctoral Supervisor*, *E-mail*: *zhangchangxizcx*@163.*com*; *DUAN Yongqiang*, *Professor*, *Doctoral Supervisor*, *E-mail*: *dyqgs*2008@163.*com*.
Received: 2025-08-01 *Revised*: 2025-09-02 *JHMU*, 2026;32(19):1478-1488

[基金项目] 宁夏回族自治区科技领军人才培养项目(2023GKLRLX18);自治区重点研发项目(2024BEG02023);宁夏自然科学基金(2024AAC03730,2024AAC02082)
[作者简介] 吴桐,E-mail:WuT610240@163.com。
[通讯作者] 张常喜,主任医师,博士生导师,E-mail:zhangchangxizcx@163.com;段永强,教授,博士生导师,E-mail:dyqgs2008@163.com。
[收稿日期] 2025-08-01 [修回日期] 2025-09-02 网络出版时间:2025-09-16 13:33:17

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective**: To explore the effect and mechanism of Compound Shengxia Pingchuan Zhike Pills in the intervention of bronchial asthma(BA). **Methods**: The core targets of drug treatment for diseases are obtained through network pharmacology, the possible mechanisms of action are predicted, and *in vivo* experiments are conducted for verification. From 60 SPF-grade SD rats, 10 were randomly selected as the blank group, and the remaining 50 were selected as the model group. The model was established by intraperitoneal injection of a mixed solution of ovalbumin and aluminum hydroxide and nebulization stimulation. The rats with successfully constructed models were randomly divided into the model group, the positive control group, and the low -dose, medium -dose, and high-dose groups of Shengjiang Pingchuan Zhike Pills, with 10 rats in each group. The treatment group was administered by gavage 1 hour before nebulization and was continuously treated for 21 days. Hematoxylin-eosin (H&E) staining was used to observe the pathological morphology of rat lung tissue. The apoptosis rate in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was detected by flow cytometry. Cell apoptosis was detected by in situ end-labeling (TUNEL) staining. Ray-giemsa staining was used to detect eosinophils (Eos), neutrophils (Neu) and lymphocytes (Lym) in BALF. Immunohistochemistry (IHC) was used to detect the expression levels of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax), and Western Blot was used to verify the expression levels of pathway-related proteins PI3K, p-PI3K, AKT, p-AKT, and NFκB. **Results**: The results of network pharmacology indicate that: A total of 993 targets, 2 627 bronchial asthma targets, and 415 intersection targets were screened out for the Shengjiang Pingchuan Zhike Pills. The PPI screened out 75 core targets, including TNF, IL-6, AKT, Bcl-2, NFκB, STAT3, TP53, SRC, etc. Enrichment analysis of core targets revealed that the PI3K/AKT pathway is a key pathway for the treatment of bronchial asthma. Molecular docking revealed that the docking of AKT, TNF, and IL-6 with the main active ingredients luteolin, quercetin, and kaempferol was all less than −8.1 kcal/mol. Animal experiments have shown that Shengjiang Pingchuan Zhike Pills can significantly alleviate pathological damages such as lung tissue structure destruction, thickening of smooth muscle, and infiltration of inflammatory cells around bronchioli and blood vessels in asthmatic rats. At the same time, the contents of eosinophils, neutrophils, and lymphocytes in BALF are reduced. Both flow cytometry and TUNEL staining indicated a decrease in the apoptosis rate of cells. The IHC results showed that the expression of Bax protein was down-regulated and the expression of Bcl-2 protein was up-regulated. Western blot revealed that the protein expressions of p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT and NFκB were down-regulated. **Conclusion**: Shengjiang Pingchuan Zhike Pills effectively improve the pathological damage of lung tissue in BA rats through multiple components and multiple targets. The mechanism is related to the regulation of the PI3K/AKT/NFκB pathway, the alleviation of the inflammatory microenvironment and cell apoptosis.

[Key words] Bronchial asthma; Shengjiang Pingchuan Zhike Pills; Apoptosis; PI3K/AKT/NFκB signaling pathway

支气管哮喘(bronchial asthma,BA)简称哮喘,是以咳嗽、喘息、胸闷、喉间哮鸣音,甚至憋气、呼吸困难为主的呼吸系统疾病[1]。若无有效治疗,BA将反复发作,迁延不愈[2],甚至发展为呼吸衰竭,窒息死亡[3]。BA发病机制复杂,与炎症反应、细胞凋亡、免疫损伤、气道上皮屏障损伤等有关[4],凋亡在BA研究中扮演重要角色[5]。生理性细胞凋亡是一种程序性死亡形式,其特征主要是细胞质收缩、染色质浓缩、DNA片段化、膜起泡和凋亡小体形成,这一过程清除衰老和病变的细胞[6],维持肺组织内稳态平衡[7]。若反复炎症刺激气道壁受损,诱导气道上皮细胞发生异常凋亡、脱落[8],导致肺上皮屏障完整性的破坏[9],使气道和肺暴露于过量的病原体及环境过敏原中,最终导致气道的炎症循环[10],因此,减少炎症反应,抑制气道上皮细胞的异常凋亡有利于BA的恢复。目前治疗BA的药物主要以吸入性皮质类固醇、长效β激动剂和靶向生物制剂为主[11],但只是减少发作次数缓解症状,难以实现BA根本性控制[12],中药在治疗BA减少其复发中有独特的优势,其通过多靶点、多途径起作用。

中医认为,肺主气,肾纳气。肺吸入的清气必须下行至肾,肾摄纳之,才能保持呼吸运动的平稳和深沉。若肾不纳气,则肺气上浮不能下行,使呼吸表浅,动辄喘甚[13]。因此治疗本病应以“补肺纳肾”为要。升降平喘止咳丸是在经典名方《升降散》的基础上加减化裁而得,已申请专利(专利号:ZL 2022 10416245.7),具有益气补肾、纳气平喘、宣肺止咳之效,且毒副作用小、疗效确切、是临床治疗BA的有效方法,但其作用机制尚不明确。为此,本研究采用生物信息学分析其有效成分、核心靶点和通路,体内实验验证以期为临床应用提供科学的依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取60只SPF级SD雄性大鼠,由宁夏医科大学动物中心提供,体重(180±20) g,饲养在宁夏医科大学SPF级动物房,温度(22±3) ℃,湿度(50±10)%,实验动物生产许可证号SCXK(宁)2020-0001,本课题动物实验由宁夏医科大学实验动物伦理委员会审查通过(伦理号:IACUC-NYLAC-

2024-139)。

1.2 药品和试剂

卵清蛋白(上海麦克林生物科技有限公司,货号:9006-59-1);地塞米松注射液(郑州卓峰制药有限公司,货号:2403131B6);一抗 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、Bcl-2 (Affinity,货号:AF6242、AF3241、AF6261、AF8357、AF6139);TUNEL试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号:C1089);吉姆萨染色液(北京索莱宝科技有限公司,货号:G1015);Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,货号:KGA1102-20)。

1.3 仪器

生物安全柜(广州瑞智净化设备有限公司,型号:SW-TFG-15);光学显微镜(日本OLYMPUS,型号:BX43);组织摊烤片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司,型号:KD-T);高速冷冻离心机(德国赛多利斯公司,型号:A-14C);掌上离心机(大龙兴创实验仪器北京有限公司,型号:D1008);流式细胞仪(深圳唯公,型号:Easycell 206A1)。

1.4 网络药理学研究

1.4.1 升降平喘止咳丸有效成分筛选及靶点预测 将升降平喘止咳丸中药物输入中药系统药理学分析平台(TCMSP),设置筛选相关参数为:OB≥30、DL≥0.18,在PubChem数据库中得到SMILES号,将SMILES号输入SwissADME平台筛选升降平喘止咳丸活性成分的药物靶点,同时进行文献查阅补充[14],合并去除重复值。

1.4.2 疾病靶点的筛选 以Bronchial asthma和asthma为关键词,分别在Disgene数据库、OMIM数据库、GeneCard数据库检索筛选,将获得的靶点汇总去除重复值。

1.4.3 PPI网络核心靶点筛选 利用jvenn将药物靶点和疾病的靶点取交集,交集靶点输入String12.0数据库,构建蛋白互作(PPI)网络,将TSV文件导入Cytoscape3.9.1绘制升降平喘止咳丸-疾病靶点网络图,设置Closeness、Betweenness、Degree值筛选核心靶点。

1.4.4 GO功能及KEGG通路富集分析 利用DAVID网站将交集靶点上传,进行GO功能的分析和KEGG通路的富集分析。

1.4.5 分子对接及可视化 活性成分3D结构在PubChem数据库中获取,关键靶点的蛋白结构在PDB数据库下载,使用Autodock tools 1.5.6进行分子对接,使用pymol进行可视化分析。

1.5 体内实验

1.5.1 模型构建分组及治疗 实验动物中心适应性饲养1周,将60只SD雄性大鼠随机分为空白组、造模组,参考文献[15]造模组大鼠第7、14、21天腹腔注射10%卵清蛋白(OVA)和氢氧化铝混合溶液1 mL致敏,空白组给予生理盐水。第28天将大鼠放置在39 cm×29 cm×23 cm的雾化箱中,每天用2% OVA和氢氧化铝混合溶液雾化激发30 min,连续7 d,观察到大鼠出现喘息、喉部哮鸣音、烦躁、呼吸急促、流鼻涕、搔抓等症状为激发成功。第35天将大鼠分为模型组、阳性对照组(约相当于70 kg的成人每天2片)0.125 mg/kg及升降平喘止咳丸低剂量组(0.54 g/kg)、中剂量组(1.08 g/kg)、高剂量组(2.16 g/kg),按成人剂量换算大鼠等效剂量(约相当于成人剂量的6.3倍),各组给予灌胃治疗连续3周。

1.5.2 样本采集 末次干预禁食24 h后用3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,腹主动脉取血,灌注2 mL预冷的PBS,连续灌注3次,回收肺泡灌洗液(BALF),取大鼠左肺用于制备肺组织石蜡切片;右肺组织置于-80 ℃冰箱冻存,进行分子生物学检测。

1.5.3 苏木素-伊红染色观察肺组织病理变化 从多聚甲醛中取肺组织,分别用70%、80%、90%、100%乙醇进行梯度脱水、脱水后浸入二甲苯中透明处理,经过石蜡包埋、切片、烤片,制备石蜡切片,苏木素染色液染色,乙醇分化液分化,中性树胶封片后,显微镜下图像采集分析,参照文献[16]进行炎症评分。

1.5.4 原位末端标记法(TUNEL)染色检测细胞凋亡情况 切片机石蜡切片5 μm,烤片约4.5 h,制备TUNEL反应混合液,每个组织上加TUNEL反应混合液,在37 ℃湿盒避光反应1 h,PBS漂洗3次,每次5 min,滴加DAPI染色液100 μL于样本上,恒温孵育盒避光室温孵育20 min,PBS漂洗3次,每次5 min,水溶性封片剂封片,荧光显微镜观察。

1.5.5 流式细胞术检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中细胞凋亡率 新采集的BALF以1 000 r/min离心10 min,用预冷的PBS洗涤细胞2次,各组收集1×10^6个细胞,加入400 μL的Binding Buffer成单细胞悬液,加入4 μL的Annexin V-FITC混匀,加入4 μL的Propidium Iodide混匀,室温避光反应10 min,1 h内进行上机检测,用FlowJo软件进行数据分析。

1.5.6 瑞氏-吉姆萨染色观察BALF中总细胞数、嗜酸性粒细胞(Eos)、中性粒细胞(Neu)、淋巴细胞

(Lym)水平　按照说明书配置吉姆萨染色液,将收集好的BALF以1 000 r/min离心10 min后取沉淀重悬,均匀地涂抹在载玻片上,待干后用甲醇固定2～3 min,滴加配好的染色液室温染色20～30 min。自来水冲洗晾干,镜下观察结果,计算中性粒细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞数量。

1.5.7　免疫组化检测大鼠肺组织中Bax和Bcl-2蛋白表达水平　石蜡切片脱蜡处理、抗原修复、一抗孵育、二抗孵育、显色、染核、脱水、封片在光学显微镜下观察肺组织中蛋白的表达情况,拍片保存,用ImageJ软件分析结果。

1.5.8　免疫印迹法检测大鼠肺组织PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、NFκB蛋白表达水平　取肺组织提取蛋白,用BCA定量检测样品蛋白浓度,凝胶电泳、转膜、封闭、洗膜、一抗PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、NFκB(稀释比1∶800)4 ℃孵育过夜,二抗兔抗(稀释比1∶4 000)常温摇床1.5 h,加入特超敏发光液曝光,用ImageJ软件测定目的条带与内参β-actin的灰度值。

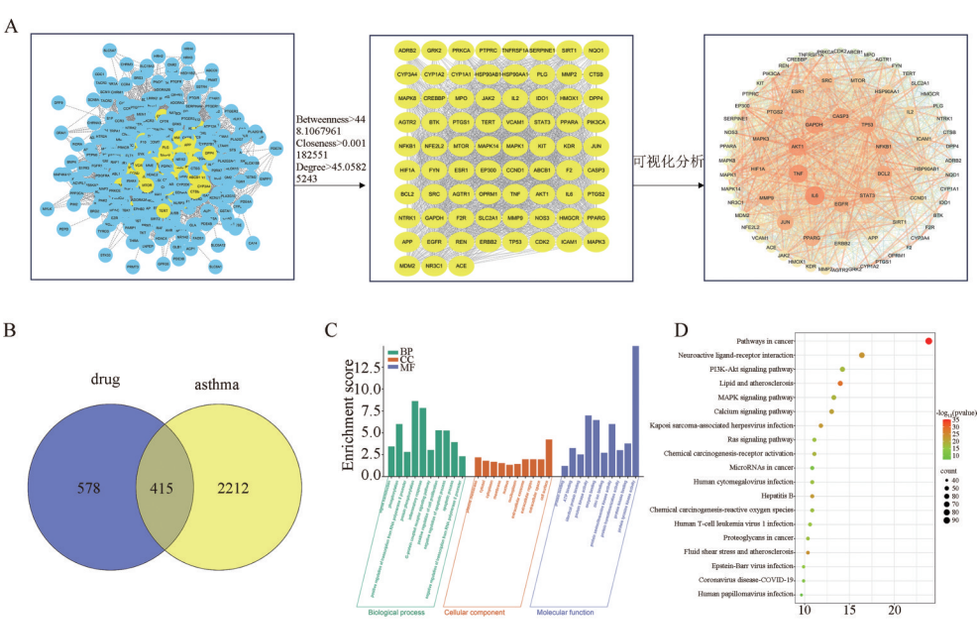
1.6　统计学处理

所有统计数据采用GraphPad Prism软件进行分析,采用t检验测量2组间差异,采用单因素方差分析评价多组间比较。实验数据用$\bar{x}\pm s$表示,$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　升降平喘止咳丸治疗BA的网络药理学分析

升降平喘止咳丸活性成分通过Swiss ADME筛选出丁香4种、蝉蜕3种、柴胡13种、姜黄9种、细辛8种、金沸草4种、芥子2种、紫苏子1种、防风11种、续断4种、肉苁蓉4种、黄精9种、莪蔚子2种、附子10种、黄芪15种、白术4种、紫苏2种、鹿角霜10种、僵蚕5种活性成分,各成分靶点汇总去除重复值,共获得993个靶点。在Disgene数据库、OMIM数据库、GeneCard数据库检索筛选,将疾病的靶点以Relevant Score数值为目标计算中位数,筛选出大于中位数的靶点进行合并去除重复值,得到治疗BA的靶点为2 627个,升降平喘止咳丸和BA的交集靶点415个。将415个交集靶点导入STRING中能获得整个PPI网络图,PPI网络图下载TSV文件,导入Cytoscape3.9.1软件,用CytoNAC插件进行分析,得出75个节点,1 639条边,根据Closeness、Betweenness、Degree值逐渐筛选关键靶点,最终得到75个核心靶点,颜色越深代表基因的重要性越高,可以看出*IL-6*、*AKT*、*Bcl-2*、*NFκB*、*TP53*、*STAT3*、*JUN*、*MTOR*等在网络图中处于关键节点,是升降平喘止咳丸治疗BA的关键基因。利用DAVID数据库对75个核心靶点进行GO和KEGG的富集分析,其中生物过程(BP)条目465个,细胞组分(CC)条目51个,分子功能(MF)条目112个,BP中主要涉及炎症反应、细胞促凋亡过程、G蛋白偶连体信号通路等,CC中主要涉及细胞质、细胞核、细胞区域等,MF中主要涉及蛋白结合、ATP结合、蛋白激酶活性等。以$P<0.05$为筛选条件,富集前20的有PI3K/AKT通路、JAK/STAT通路、MAPK通路、



A:PPI核心靶点筛选图;B:药物疾病交集Venny图;C:GO功能注释图;D:KEGG富集通路图

图1　药物-哮喘潜在关键靶点及功能通路图

Fig 1　Drug-asthma Potential Key Targets and Functional pathways diagram

RAS通路等，以上通路可能在支气管治疗中发挥重要作用。见图。

2.2　分子对接分析

药物-成分-靶点网络图中根据度值，排名前3的活性成分是山柰酚、槲皮素、木犀草素，PPI网络用Cytohubba插件MCC算法得到核心靶点，将升降平喘止咳丸治疗BA的活性成分与IL-6、TNF、AKT进行对接，活性成分及结合能见表1、2。一般认为结合能＜－5.0 kcal/mol是具有良好的结合力，结果显示＜－8 kcal/mol表明主要活性成分和核心靶点具有良好的结合力，可能在升降平喘止咳丸治疗BA中发挥重要作用，可视化见图2。

表1　药物主要活性成分

Tab 1　Main Active Ingredients of the Drug

化合物ID	化合物名称	所属中药
MOL000422	山柰酚(kaempferol)	黄芪、丁香、柴胡、细辛、僵蚕
MOL000098	槲皮素(quercetin)	柴胡、黄芪、肉苁蓉、僵蚕、金沸草
MOL000006	木犀草素(luteolin)	金沸草、紫苏子、紫苏叶

表2　药物主要活性成分与靶点的结合能

Tab 2　Binding energies of the main active ingredients of the drug to the target

活性成分	关键靶点	PDB ID	结合能(kcal/mol)
山柰酚	AKT	7nh5	－10.1
山柰酚	TNF	5m21	－8.8
山柰酚	IL-6	7L4V	－8.1
槲皮素	AKT	7nh5	－9.9
槲皮素	TNF	5m21	－8.7
槲皮素	IL-6	7L4V	－8.3
木犀草素	AKT	7nh5	－10.2
木犀草素	TNF	5m21	－8.6
木犀草素	IL-6	7L4V	－8.4

2.3　体内实验结果分析

2.3.1　升降平喘止咳丸对各组大鼠肺组织病理损伤的影响　空白组大鼠肺组织结构完整，支气管管腔光滑无增厚；与空白组比较，模型组大鼠肺组织气道壁明显增厚、结构损伤、管腔狭窄、细支气管周围和血管周围炎症细胞浸润，炎症评分升高(P＜0.01)；与模型组比较，升降平喘止咳丸中、高剂量组肺组织结构破

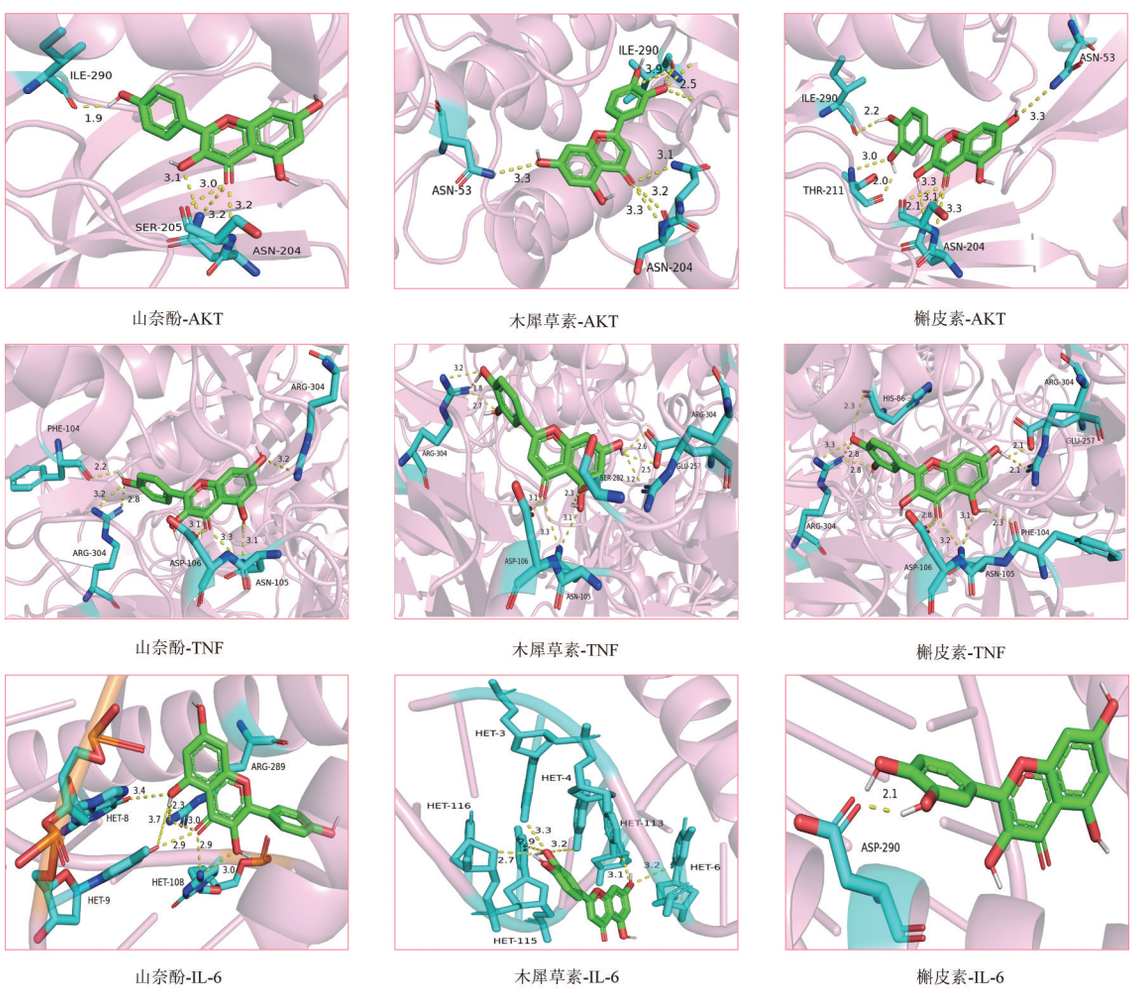
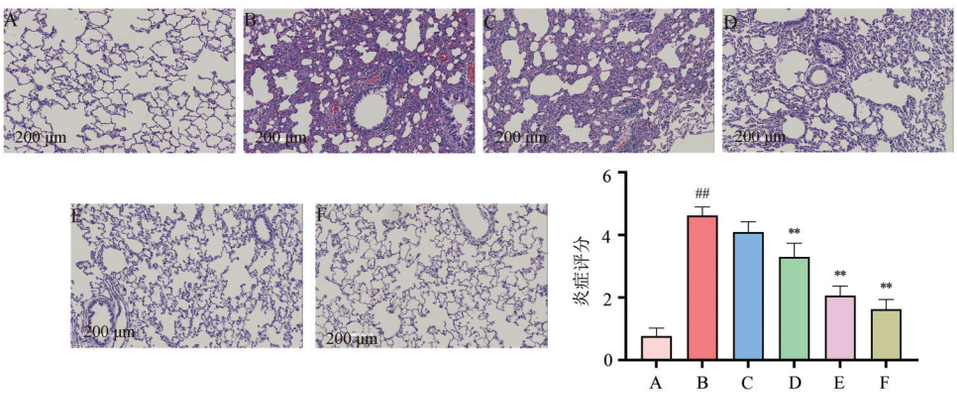


图2　分子对接可视化图

Fig 2　Visualization diagram of molecular docking

坏及炎性细胞浸润有所减轻($P<0.01$),高剂量组和阳性对照组大鼠肺组织炎性损伤改善明显,说明升降平喘止咳丸对BA大鼠的肺组织病理损伤有保护作用,见图3。



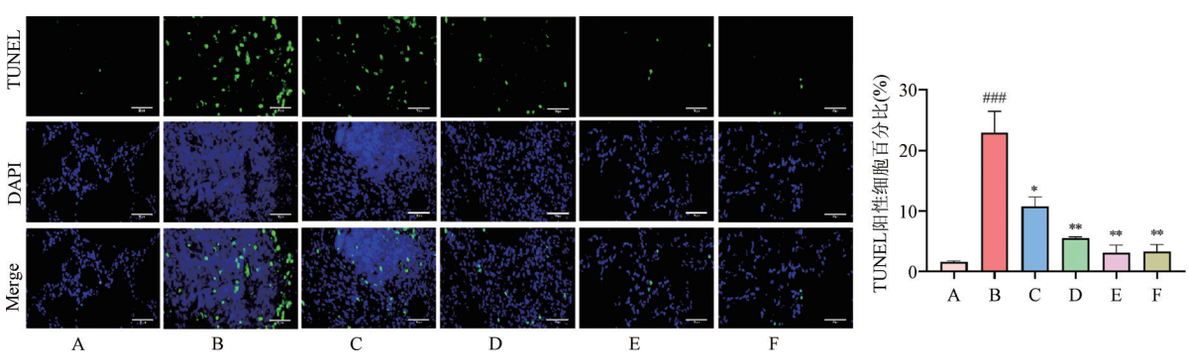
与空白组比较,$^{\#\#}P<0.01$;与模型组比较,$^{**}P<0.01$

A:空白组;B:模型组;C:低剂量组;D:中剂量组;E:高剂量组;F:阳性对照组

图3　各组大鼠肺组织病理变化

Fig 3　Pathological changes of lung tissues in each group of rats

2.3.2　升降平喘止咳丸对各组大鼠肺组织细胞凋亡的影响　在荧光显微镜下观察到蓝色为细胞的整体形态和细胞核的位置,绿色为凋亡细胞荧光。空白组肺组织TUNEL阳性细胞极少,核形态正常,与空白组比较,模型组凋亡细胞数量增多($P<0.001$),密集分布在增厚的黏膜下层及肺泡壁,细胞核呈皱缩、破裂,说明OVA诱导后凋亡细胞增多,与模型组比较,不同剂量的干预组细胞凋亡数量减少($P<0.05$),见图4。



与空白组比较,$^{\#\#\#}P<0.001$;与模型组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$

A:空白组;B:模型组;C:低剂量组;D:中剂量组;E:高剂量组;F:阳性对照组

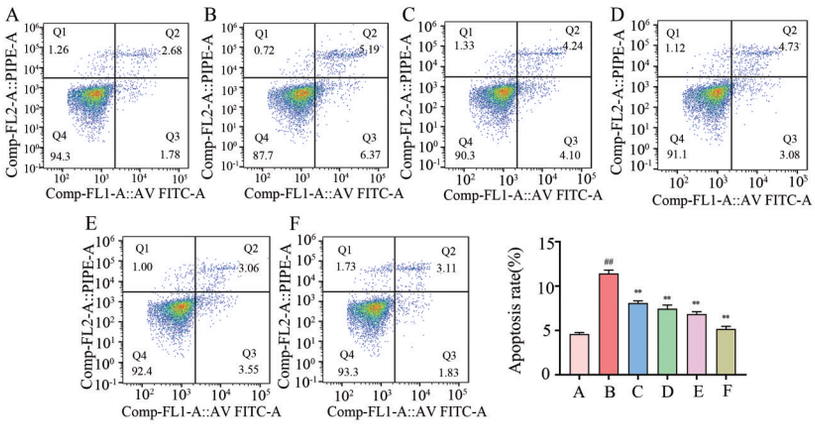
图4　各组大鼠肺组织细胞凋亡情况

Fig 4　Apoptosis of lung tissue cells in each group of rats

2.3.3　升降平喘止咳丸对各组大鼠BALF中细胞凋亡的影响　流式细胞术显示:与空白组比较,模型组大鼠BALF中凋亡率升高($P<0.01$),与模型组比较,升降平喘止咳丸各治疗组凋亡率下降($P<0.01$);阳性对照组和高剂量组中凋亡率相近($P>0.05$),见图5。

2.3.4　升降平喘止咳丸对各组大鼠BALF中细胞分类含量的影响　瑞士-吉姆萨染色显示:空白组背景清晰,无明显细胞碎片,偶见少量的细胞。与空白组比较,模型组大鼠BALF中的细胞总数量增多、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、中性粒细胞增多($P<0.001$);与模型组比较,升降平喘止咳丸中、高剂量组和阳性对照组中的细胞总数、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞数量减少($P<0.001$),见图6。

2.3.5　升降平喘止咳丸对各组大鼠肺组织Bax、Bcl-2蛋白表达的影响　免疫组化结果显示:与空白组比较,模型组中Bax蛋白阳性表达升高,染色强度增加,在支气管周围和肺泡间隔可见大量的棕黄色颗粒,Bax蛋白高表达($P<0.001$),Bcl-2蛋白仅少量散在的淡黄色阳性区域,抗凋亡蛋白Bcl-2低表达($P<0.01$);与模型组比较,Bax蛋白表达在升降平喘止咳丸中、高剂量组和阳性对照组棕黄色阳性区域减少,密度降低,剂量依赖性的着色变淡,提示

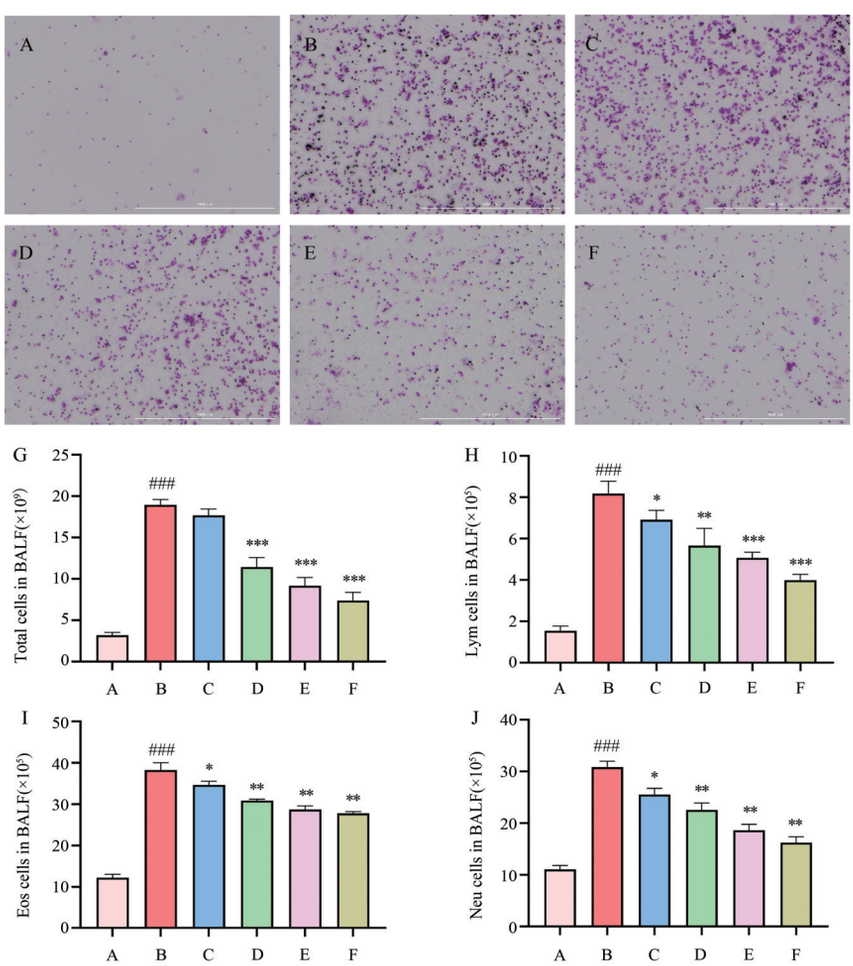


与空白组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{**}P<0.01$

A：空白组；B：模型组；C：低剂量组；D：中剂量组；E：高剂量组；F：阳性对照组

图5　各组大鼠BALF细胞凋亡率

Fig 5　Apoptosis rate of BALF cells in each group of rats



与空白组比较，$^{\#\#\#}P<0.001$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$

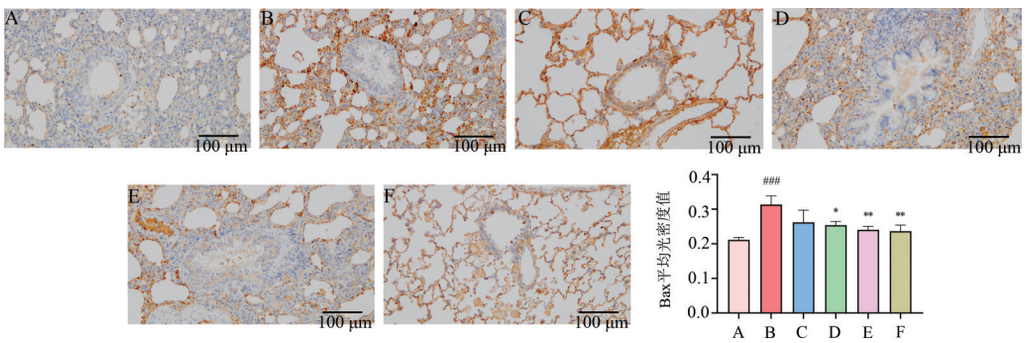
A：空白组；B：模型组；C：低剂量组；D：中剂量组；E：高剂量组；F：阳性对照组；G：BALF中总细胞；H：淋巴细胞；I：嗜酸性粒细胞；J：中性粒细胞计数

图6　各组大鼠BALF中细胞含量

Fig 6　The effect on the cell content in BALF of rats in each group

Bax蛋白表达呈下调趋势（$P<0.05$），Bcl-2蛋白棕黄色的阳性细胞明显增多（$P<0.05\sim0.01$），见图7、8。

2.3.6　升降平喘止咳丸对PI3K/AKT/NFκB通路相关蛋白表达的影响　Western blot结果显示：与空白组

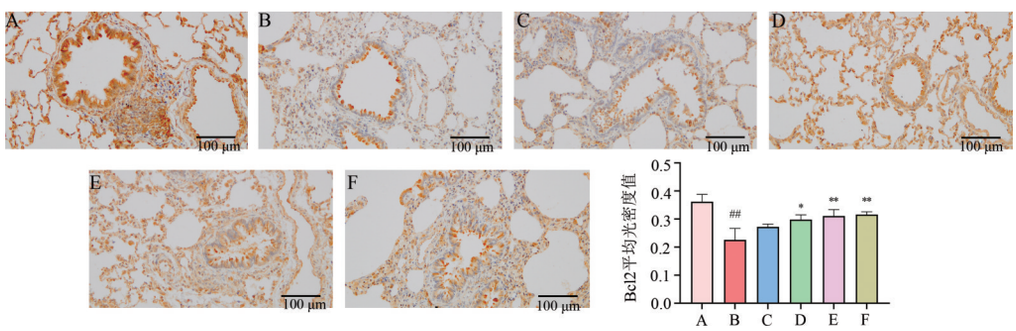


与空白组比较，$^{###}P<0.001$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

A：空白组；B：模型组；C：低剂量组；D：中剂量组；E：高剂量组；F：阳性对照组

图7　各组大鼠肺组织Bax蛋白表达

Fig 7　Expression of Bax protein in lung tissues of rats in each group



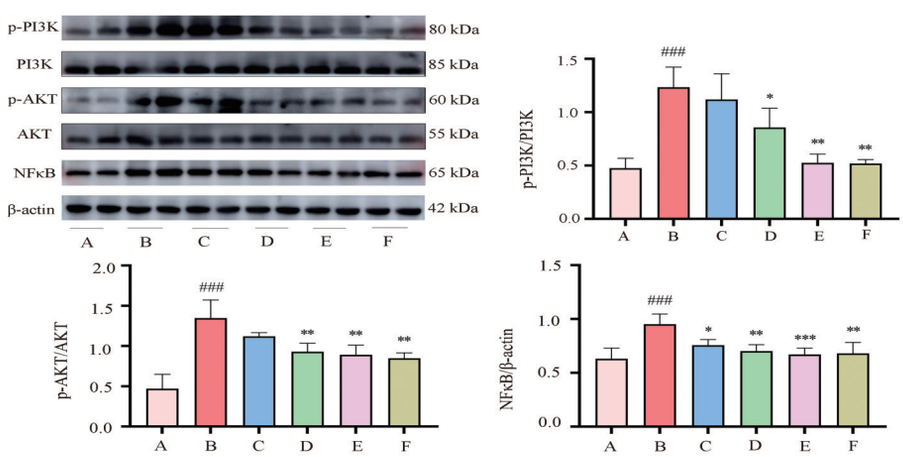
与空白组比较，$^{##}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

A：空白组；B：模型组；C：低剂量组；D：中剂量组；E：高剂量组；F：阳性对照组

图8　各组大鼠肺组织Bcl2蛋白表达

Fig 8　Expression of Bcl2 protein in lung tissues of rats in each group

比较，模型组大鼠肺组织中p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、NFκB蛋白表达上调（$P<0.001$）；与模型组比较，升降平喘止咳丸中、高剂量组大鼠肺组织中p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、NFκB蛋白表达下调（$P<0.05$），见图9。



与空白组比较，$^{###}P<0.001$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$

A：空白组；B：模型组；C：低剂量组；D：中剂量组；E：高剂量组；F：阳性对照组

图9　各组大鼠肺组织PI3K/AKT/NFκB通路蛋白表达

Fig 9　Expression of PI3K/AKT/NFκB pathway proteins in lung tissues of rats in each group

3　讨论

BA属中医哮证和喘证的范畴。《医学正传·哮喘》曰：“大抵哮以声响名，喘以气息言[13]”《杂病证治准绳》提出：“哮必兼喘，而喘未必兼哮者[17]”解释

了哮证和喘证的关系。《类证治裁·喘证》云："肺为气之主，肾为气之根"阐明肺主气，肾纳气的协同作用是维持正常呼吸功能的关键；赵献可《医贯》中"真元损耗，喘出于肾，气之上奔"的论述，进一步强调肾气虚损、摄纳无力是BA迁延不愈的重要原因。复方升降平喘止咳丸以《升降散》为基础加减化裁，其配伍体系严格遵循"肺肾同治"理论：以鹿角、丁香为君药，鹿角温补肝肾、益精养血，丁香温肾助阳、散寒理气，共奏温肾纳气之效；以蝉蜕、僵蚕、柴胡为臣药，蝉蜕疏散风热、宣肺利咽，僵蚕祛风化痰、散结通络，柴胡疏肝解郁、调畅气机，三者协同以宣肺理气、化痰平喘，针对肺之标证；以黄芪、白术、防风、紫苏叶为佐药，黄芪补中益气、固表止汗，白术健脾益气、燥湿利水，防风祛风解表，三者合用取"玉屏风散"之意，通过健脾补肺以固护正气；以黄精为使药，黄精补气养阴、健脾益肾，既能助君药补肾，又能佐黄芪、白术健脾，起到调和诸药、兼顾肺脾肾三脏的作用。全方升降相宜、内外通和，既温肾纳气以固根本，又宣肺化痰以治其标，充分体现了中医"标本兼治"的配伍方法。

网络药理学筛选结果显示，复方升降平喘止咳丸中排名前3位的活性成分为山柰酚、槲皮素和木犀草素，属于天然黄酮类化合物，已被大量研究证实具有抗炎、抗氧化、免疫调节等药理活性[18]。山柰酚作为黄芪、丁香、柴胡等多味中药的共有成分，既往研究表明，其可以通过干扰肥大细胞中的信号转导和重组NOX4介导的自噬来抑制气道炎症和气道重塑[19]。本研究中，山柰酚与核心靶点AKT、TNF、IL-6的分子对接结合能分别达－10.1、－8.8、－8.1 kcal/mol，表明其可能通过与这些靶点稳定结合，直接调控炎症反应与细胞凋亡过程。槲皮素广泛存在于柴胡、黄芪、肉苁蓉等中药中，其核心作用机制与PI3K/AKT通路密切相关：已有研究证实，槲皮素可抑制AKT磷酸化水平，进而减少NF-κB核转位，降低IL-6、TNF-α等促炎细胞因子的转录与释放，同时调节Th1/Th2免疫平衡、减轻氧化应激损伤[20]。本研究体内实验结果显示，复方升降平喘止咳丸干预后，BA大鼠肺组织中p-AKT/AKT比值明显下调，BALF中IL-6含量降低，与槲皮素的已知作用机制一致，提示槲皮素可能是药物调控PI3K/AKT通路的关键成分之一。木犀草素主要来源于金沸草、紫苏子、紫苏叶，其抗哮喘效应集中于对中性粒细胞性炎症的抑制：以往报道，木犀草素可通过抑制IL-36γ分泌，阻断MAPK通路激活，减少中性粒细胞趋化与活化，从而减轻气道中性粒细胞浸润[21]。本研究中，木犀草素与IL-6的结合能达－8.4 kcal/mol，且药物干预后BA大鼠BALF中性粒细胞数量明显减少，进一步验证了木犀草素在抑制气道炎症中的重要作用。

在正常生理状态下，PI3K/AKT通路处于适度激活状态，通过调控下游凋亡相关蛋白（如Bcl-2、Bax）维持细胞凋亡平衡[22]：Bcl-2作为抗凋亡蛋白，可抑制线粒体膜电位下降及细胞色素C释放[23]；Bax作为促凋亡蛋白，其过度表达可触发线粒体凋亡通路激活[24,25]。OVA等过敏原刺激可导致PI3K异常激活，促使其下游分子AKT磷酸化（p-AKT水平升高），一方面通过下调Bcl-2、上调Bax表达，打破凋亡平衡，导致气道上皮细胞异常凋亡，破坏气道屏障完整性[26]，使气道暴露于更多过敏原与病原体，形成炎症循环；另一方面，磷酸化的AKT可促进NF-κB与抑制蛋白IκB解离，使NF-κB转入细胞核并与特定启动子结合[27]，明显增强IL-6、TNF-α等促炎细胞因子的转录活性，加剧气道炎症浸润。本研究体内实验结果与上述机制高度吻合：与空白组相比，模型组大鼠肺组织中p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT比值明显升高，NF-κB蛋白表达上调，同时Bax表达增加、Bcl-2表达降低，BALF中嗜酸性粒细胞、中性粒细胞等炎症细胞数量及细胞凋亡率明显升高，肺组织出现明显结构破坏与炎症浸润；而经复方升降平喘止咳丸干预后，中、高剂量组大鼠肺组织中p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、NF-κB表达明显下调，Bax表达降低、Bcl-2表达升高，BALF中炎症细胞数量与细胞凋亡率明显下降，肺组织病理损伤得到明显改善。这一结果表明，复方升降平喘止咳丸可通过抑制PI3K/AKT通路过度激活，一方面调节Bcl-2/Bax平衡以抑制气道上皮细胞异常凋亡，保护气道屏障；另一方面减少NF-κB核转位以降低促炎细胞因子释放，减轻气道炎症，最终实现对BA大鼠肺组织的保护作用。此外，本研究结果与既往相关研究结论一致，例如，Substance P及其受体NK1R通过激活PI3K/Akt/NF-κB信号通路，诱导细胞凋亡和炎症反应[28]。

本研究虽初步阐明了复方升降平喘止咳丸干预BA的机制，但网络药理学筛选存在一定虚拟性，虽通过分子对接验证了核心成分与靶点的结合能力，但未对药物实际入血成分进行鉴定，无法排除非入血成分对筛选结果的干扰。课题组未来将结合UPLC-MS/MS等技术鉴定复方升降平喘止咳丸的入血成分，进一步缩小核心活性成分范围，提高机制研究的精准性；同时，开展长期动物实验与临

床研究，评估药物的长期疗效与安全性，为临床合理用药提供更充分的理论支持。

作者贡献度说明：

吴桐：论文撰写，实验动物饲养，分子生物学实验检测；赵思超：统计实验数据；白敏：实验指导；鲁宝堂：文献查询；王成娟、何腾飞：文本校审；张常喜、段永强：提供实验思路，设计实验。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Zhu Y, Sun D, Liu H, et al. Bixin protects mice against bronchial asthma though modulating PI3K/Akt pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 101: 108266.

2 郑慧漪. 多元化药学服务对支气管哮喘患儿用药依从性及病情控制的影响[J]. 中国医药科学, 2020, 10(22): 163-166.
Zheng HQ. The impact of diversified pharmaceutical services on medication compliance and disease control in children with bronchial asthma [J]. Chin Med Sci, 2020, 10(22): 163-166.

3 解明辉. 多索茶碱与氨茶碱治疗支气管哮喘临床疗效的对比观察[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(89): 82.
Xie MH. Comparative observation on the clinical efficacy of doxofylline and aminophylline in the treatment of bronchial asthma [J]. World Latest Med Informat Abstracts, 2016, 16(89): 82.

4 朱子钰, 赵霞, 纪建建等. 呼吸道合胞病毒感染诱导哮喘发病机制及中医药防治进展[J]. 南京中医药大学学报, 2024, 40(8): 855-863.
Zhu ZY, Zhao X, Ji JJ, et al. Pathogenesis of asthma induced by respiratory syncytial virus Infection and progress in the prevention and treatment with traditional Chinese medicine [J]. J Nanjing Univ Chin Med, 2024, 40(8): 855-863.

5 Peter ME, Heufelder AE, Hengartner MO. Advances in apoptosis research [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997,94(24): 12736-12737.

6 Ren Y, Wang R, Weng S, et al. Multifaceted role of redox pattern in the tumor immune microenvironment regarding autophagy and apoptosis[J]. Mol Cancer, 2023, 22(1): 130.

7 AnvariFar H, Amirkolaie AK, Miandare HK, et al. Apoptosis in fish: Environmental factors and programmed cell death[J]. Cell Tissue Res, 2017,368(3): 425-439.

8 Chen L, Fan Z, Chang J, et al. Sequence-based drug design as a concept in computational drug design[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 4217.

9 Li X, Xiong Q, Yang Q, et al. PTPRO inhibits LPS-induced apoptosis in alveolar epithelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2024, 23, 150083.

10 Bodansky A, Vazquez SE, Chou J, et al. NFKB2 haploinsufficiency identified *via* screening for IFN-α2 autoantibodies in children and adolescents hospitalized with SARS-CoV-2 - related complications[J]. J Allergy Clin Immunol, 2023, 151(4): 926-930.e2.

11 Venkatesan P.2023 GINA report for asthma[J]. Lancet Respir Med, 2023, 11(7): 589.

12 Lommatzsch M, Brusselle GG, Levy ML, et al. A2BCD: A concise guide for asthma management[J]. Lancet Respir Med, 2023, 11(6): 573-576.

13 冯艺，唐阿梅. 基于“培土生金”理论探讨支气管哮喘(缓解期)的防治[C]//南京康复医学会.第七届全国康复与临床药学学术交流会议论文集(二).贵州中医药大学第一附属医院，2024
Feng Y, Tang AM. Discussion on the prevention and treatment of bronchial asthma (Remission Stage) based on the theory of "Turning Earth into Gold" [C]// Nanjing Rehabilitation Medical Association. Proceedings of the 7th National Academic Exchange Conference on Rehabilitation and Clinical Pharmacy (Part Ⅱ). The First Affiliated Hospital of Guizhou University of Chinese Medicine，2024

14 何蒙. 僵蚕化学成分及抑菌活性研究[D]. 成都：西华大学，2022.
He M. Batryticated silkworm chemical composition and antibacterial activity of research [D]. Chenegdu: Xihua University, 2022.

15 Yu H, Huang X, Xie C, et al. Transcriptomics reveals apigenin alleviates airway inflammation and epithelial cell apoptosis in allergic asthma *via* MAPK pathway [J]. Phytother Res, 2023, 37(9): 4002-4017.

16 曹晓梅，朱慧志，杨磊，等. 阳和平喘颗粒对哮喘大鼠HMGB1相关信号通路蛋白及炎症因子的影响[J]. 中国中西医结合杂志，2023,43(6):712-721.
Cao XM, Zhu HZ, Yang L, et al. The effect of Yangheping Chuan Granules on HMGB1-related signaling pathway proteins and inflammatory factors in asthmatic rats [J]. Chin J Int Tradit Western Med，2023, 43(6):712-721.

17 杨颖，王博寒，巫善珩，等. 哮病伏饮病机理论源流考述[J]. 中华中医药杂志，2022,37(7):3765-3768.
Yang Y, Wang BH, Wu SH, et al. A study on the theoretical origin and development of the pathogenesis of croup and fuyin [J]. Chin J Traditional Chin Med，2022, 37(7):3765-3768.

18 Carrillo-Martinez EJ, Flores-Hernández FY, Salazar-Montes AM, et al. Quercetin, a flavonoid with great pharmacological capacity[J]. Molecules, 2024, 29(5): 1000.

19 Huang L, Kim M, Cho J. Immunopharmacological activities of luteolin in chronic diseases[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(3): 2136.

20 Qin Z, Chen Y, Liu N, et al. Mechanisms of bushenyiqi decoction in the treatment of asthma: An investigation based on network pharmacology with experimental validation[J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1361379.

21 Qiao X, Feng T, Zhang D, et al. Luteolin alleviated neutrophilic asthma by inhibiting IL-36γ secretion-mediated MAPK pathways[J]. Pharm Biol, 2023, 61(1): 165-176.

22 Aliyari M, Ghoflchi S, Hashemy SI, et al. The PI3K/Akt pathway: A target for curcumin's therapeutic effects[J]. J Diabetes Metab Disord, 2025, 24(1): 1-12.

23 Peng Z, Gillissen B, Richter A, et al. Enhanced apoptosis and loss of cell viability in melanoma cells by combined inhibition of ERK and Mcl-1 is related to loss of mitochondrial membrane potential, caspase activation and upregulation of proapoptotic Bcl-2 proteins[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(5): 4961.

24 Yan S, Bao S, Chen T, et al. Cinnamaldehyde alleviates aspirin-induced gastric mucosal injury by regulating pi3k/akt pathway-mediated apoptosis, autophagy and ferroptosis[J]. Phytomedicine, 2024, 132: 155791.

25 Ouyang Y, Hu S, Chang M, et al. Catecholamines-based myocardial injury after acute ischemic stroke and effects of Naoxintong capsule therapy[J]. Phytomedicine, 2024, 132: 155697.

26 Li X, Xiong Q, Yang Q, et al. PTPRO inhibits LPS-induced apoptosis in alveolar epithelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2024, 718: 150083.

27 Xin Y, Zou L, Lang S. 4-Octyl itaconate (4-OI) attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by suppressing PI3K/Akt/NF-κB signaling pathways in mice[J]. Exp Ther Med, 2021, 21(2): 141.

28 Li M, Zhong X, Xu WT. Substance P promotes the progression of bronchial asthma through activating the PI3K/AKT/NF-κB pathway mediated cellular inflammation and pyroptotic cell death in bronchial epithelial cells[J]. Cell Cycle, 2022, 21(20): 2179-2191.

[本文编辑] 朱 昊