

基于数据挖掘、网络药理学及实验验证探讨中药治疗变应性鼻炎的用药规律及相关药理分析

王笑雨¹, 王 召¹, 曹利华¹, 贺红娟¹, 王真真¹, 李秀敏², 苗明三^{1*}

¹河南中医药大学中医药科学院, 郑州 450046; ²纽约医学院 微生物和免疫学科, 纽约 10595

摘要: 基于中国知网、万方、维普数据库, 以“中药+变应性鼻炎”“中药+过敏性鼻炎”“中药+鼻渊”为主题, 选取2000年1月至2022年2月公开发表的期刊文献, 按照纳入与排除标准筛选临床治疗AR的中药方剂, 统计高频药物的用药频次、剂量、药味、药性、归经、功效等, 并进行关联规则和系统聚类分析, 共筛选符合标准的中药方剂有252首, 共223味中药, 其中用药频次 ≥ 30 的高频中药有21种, 以解表药和补虚药为主, 药性以辛温为主, 关联规则挖出21对频次 ≥ 64 的药物组合, 其中黄芪-辛夷药对出现频次最高。利用网络药理学对黄芪-辛夷药对的活性成分、靶点蛋白和通路等进行分析, 结果显示黄芪-辛夷药对共有48个有效成分, 对应的潜在靶点共306个, 包括PTGS2、HSP90、CALM1、NOS2、CHRM1等; GO富集和KEGG通路分析显示核心靶点参与对外源性刺激的反应、氧化还原酶活性等多项进程, 并通过神经活性配体-受体相互作用通路、钙离子信号通道等通路作用于AR, 分子对接结果显示黄芪-辛夷可能通过细辛素、芒柄花素、山奈酚、槲皮素作用于PTGS2、CHRM1、CYP1B1等靶点发挥治疗AR的作用。基于上述结论进行体内实验验证, 结果证实黄芪-辛夷药对能够有效降低AR小鼠血清、肺泡灌洗液以及鼻腔灌洗液中组胺、总IgE、RW特异性IgE、TNF- α 和IL-6等炎性因子的水平, 升高抗炎因子IL-10的水平, 抑制炎症反应的发展, 显著改善AR小鼠挠鼻和喷嚏症状, 并降低肺组织中PTGS2、HSP90、NOS2蛋白的表达水平。因此, 本研究表明黄芪-辛夷药对可能是通过抑制HSP90/PTGS2/NOS2通路进而抑制炎症反应、缓解AR小鼠的症状从而发挥治疗AR的作用。

关键词: 变应性鼻炎; 用药规律; 关联规则; 网络药理学; 分子对接; 体内实验验证

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)1-0137-18

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.1.016

Medication rule analysis and pharmacological analysis of traditional Chinese medicine treating allergic rhinitis based on data mining, network pharmacology and experimental validation

WANG Xiao-yu¹, WANG Zhao¹, CAO Li-hua¹,
HE Hong-juan¹, WANG Zhen-zhen¹, LI Xiu-min², MIAO Ming-san^{1*}

¹Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

²Microbiology and Immunology, New York Medical College, New York 10595, USA

Abstract: The full-text search was conducted with “traditional Chinese medicine (TCM) + allergic rhinitis” theme in CNKI, Wanfang and VIP database. The literature published from January 2000 to February 2022 were selected, and clinical TCM prescriptions for AR were collected under “inclusion and exclusion” criteria. The statistics processing of drug frequency, dosage, flavor, property, channel tropism, efficacy and association rule analysis were carried out. A total of 252 TCM prescriptions were obtained, including 223 different Chinese medicines. And there were 21 Chinese medicines used in the treatment of AR with high frequency ≥ 30 , mainly with exterior-releasing and supplementing efficacies. Warm and pungent were main flavors among high-frequency TCM. In association rule analysis, 21 combinations of TCM with high frequency ≥ 64 were found out;

收稿日期: 2023-04-19 接受日期: 2023-11-24

基金项目: 河南省重大公益专项(201300310100); 河南省药品监督管理局科技计划(2020DB050-55); 河南省博士后科研项目(202103093); 河南省高等学校重点科研项目(23A360016)

*通信作者 Tel: 86-371-65962546; E-mail: miaomingsan@163.com

among them, Huangqi-Xinyi drug pair was utilized in the highest frequency. The network pharmacological analysis indicated that Huangqi-Xinyi has 48 active compounds and 306 corresponding protein targets, including PTGS2, HSP90, CALM1, NOS2, and CHRMI. Go and KEGG analysis revealed that core targets predominantly effected on AR by responding to xenobiotic stimulus, oxidoreductase activity, neuroactive ligand-receptor interaction and calcium signaling pathway. Molecular docking results showed that Huangqi-Xinyi drug pair probably treated AR by acting on PTGS2, CHRMI, CYP1B1 targets through asarinin, formononetin, kaempferol and quercetin. *In vivo* experiment showed that Huangqi-Xinyi drug pair effectively decreased the level of histamine, total IgE, RW-specific IgE, TNF- α and IL-6 in serum, nasal lavage fluid and bronchoalveolar lavage fluid of AR mice, and increased the level of anti-inflammatory factor IL-10 in above-mentioned serum and fluids. Also, Huangqi-Xinyi drug pair significantly decreased rubbing and sneezing times of AR mice and inhibited the protein expression of PTGS2, HSP90 and NOS2. Thus, this study clarified that Huangqi-Xinyi drug pair had a therapeutic effect on AR by inhibiting HSP90/PTGS2/NOS2 pathway, thereby inhibited inflammation and relieved rubbing and sneezing symptoms of AR mice.

Key words: allergic rhinitis; medication rule; association rule; network pharmacology; molecular docking; *in vivo* experiment

变应性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 又称过敏性鼻炎, 在特异性个体暴露于致敏原后, 由免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE) 介导的以炎性因子 (组胺、白三烯、前列腺素和血小板活化因子等) 释放、并由多种免疫活性细胞和免疫因子共同参与的鼻黏膜慢性非感染性炎症^[1]。炎性因子对鼻局部黏膜产生水肿渗出刺激鼻感觉神经, 从而产生阵发性及反复性鼻痒、打喷嚏、清水样涕等典型症状, 也可伴有鼻塞、嗅觉减退、哮喘等症状^[2]。AR 除了过敏原以外, 还与遗传因素、地区气候、空气污染、神经和精神因素、社会经济因素密切相关^[3]。AR 属于中医学“鼻鼽”的范畴, 中医认为此病为内外因共同作用的结果, 内因多为脏腑虚损、正气不足, 外因多为风邪、寒邪或异气侵袭, 邪正相搏, 肺气不宣, 发为鼻鼽^[4]。临床上主要采用抗组胺药、鼻用糖皮质激素等治疗 AR, 但是长期使用疗效差, 且易反复发作。中医则通过口服、鼻腔冲洗中药汤剂或穴位贴敷、中药熏蒸、雾化等方法治疗 AR^[5,6]。本文采用数据挖掘的方法分析中药治疗 AR 的用药规律, 并运用网络药理学及体内药理学验证的方法对高频中药药对治疗 AR 的潜在作用机制进行预测和验证, 为其临床治疗 AR 提供合理化参考和科学理论依据。

1 资料与方法

1.1 数据挖掘

1.1.1 数据来源

以中国知识资源总库 (CNKI)、万方、维普三大数据库为数据来源, 以“中药”、“变应性鼻炎”、“过敏性鼻炎”和“鼻鼽”为主题进行全文搜索, 时间选取范围是 2000 年 1 月至 2023 年 2 月, 共检索到 9 442 篇期刊文献。

1.1.2 纳入与排除标准

剔除实验研究、综述、联合用药、使用重复方剂、

无具体药物组成等文献, 排除加减方、序贯治疗方, 舍去单味药机制研究的文献, 仅选择中药复方治疗 AR 的临床研究文献共 252 篇。

1.1.3 数据处理

按照纳入与排除标准, 最终筛选出符合标准的 252 首中药方剂, 并录入 Excel 2016 处理, 以此建立中药复方治疗 AR 的数据库。根据《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》) 2020 版^[7] 和人卫版“十三五”规划教材《中药学》^[8] 上述中药名称、分类、性味归经及功效进行统一, 如“川弓”“川穹”统一为“川芎”, “北芪”统一为“黄芪”, “白芥子”统一为“芥子”, “元胡”统一为“延胡索”, “辛夷花”“辛荇”统一为“辛夷”, “制附子”统一为“附子”, “苍耳”统一为“苍耳子”等。

1.1.4 统计分析

采用 Excel 2016 软件 252 首复方所含单味中药的药物类型、四气五味归经进行用药频次统计分析; 采用 IBM SPSS Modeler 18.0 软件对高频中药进行关联规则分析, 挖掘单味中药间的潜在关联; 利用 GraphPad Prism 8.0 软件对高频中药的用药剂量进行统计分析。使用 IBM SPSS Statistics 23.0 软件对高频中药进行系统聚类分析。

1.2 网络药理学

1.2.1 活性成分筛选及靶点预测

根据数据挖掘结果分析, 将最高频药对组合作为研究对象, 进行网络药理学分析。使用中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP 数据库, <http://tcmsp.com/tcmsp.php>) 及文献补充获取药对组合的化学成分, 利用 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 OpenBabel 2.4.1 软件获取成分 SMILES 号, 再通过 TCMSP 数据库、Swis-

sTargetPrediction 数据库 (swisstargetprediction. ch/)、SEA 数据库 (sea. bkslab. org/)、PubChem 数据库 (pubchem. ncbi. nlm. nih. gov/) 和 DrugBank 数据库 (<https://www.drugbank.com/>) 获取成分的靶点信息。

1.2.2 获取疾病靶点并构建“成分-靶点-疾病网络”

以“allergic rhinitis”作为关键词,从 TTD 数据库 (db. idrblab. net/ttd/)、DisGeNet 数据库 (disgenet. org/)、GAD 数据库 (geneticassociationdb. nih. gov/) 及 DrugBank 数据库中检索与 AR 相关发病机制靶点,合并、去重后与成分靶点取交集即得该药对组合治疗 AR 的潜在疾病靶点。利用 Uniprot 数据库对上述获取的成分靶点及疾病靶点进行基因名称标准化处理,利用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“成分-靶点-疾病”可视化网络。

1.2.3 富集分析

利用 Metascape 数据库 (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>) 对潜在疾病靶点进行 GO (Gene Ontology) 和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 的富集分析,并通过微生信网站 (<http://www.bioinformatics.com.cn>) 进行可视化展示。

1.2.4 构建“成分-靶点-通路-疾病”网络

通过 KEGG 富集分析结果,分析关键通路、核心靶点蛋白及核心成分之间的关系,利用 Cytoscape 3.7.2 软件,构建“成分-靶点-通路-疾病”可视化网络。

1.2.5 分子对接

首先,通过“成分-靶点-通路-疾病”网络分析,选取度值 ≥ 5 的靶点作为受体,通过 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载其分子结构,利用 Py-mol 软件去水去残基,再使用 Autodock 软件加氢处理后另存为 pdbqt 文件。其次,从 PubChem 数据库下载核心成分的分子结构,通过 Chem3D 软件转换为 mol2 文件,再利用 Autodock 软件处理后另存为 pdbqt 文件。最后,使用 Autodock Vina 软件对蛋白受体与核心成分小分子配体进行分子对接结合能分析。根据分析结果,选择结合能最低的靶点蛋白-小分子配体复合物作为最优选择,进行分子对接可视化展示。

1.3 体内验证实验

1.3.1 实验动物

4 ~ 6 周雌性 Balb/c 小鼠 (合格证号: 20230512Zbzz0619000975), 体重 16 ~ 18 g, 共 45

只,采购自浙江维通利华实验动物技术有限公司 (许可证号 SCXK(浙)2019-0001), 环境温度 (21 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 环境相对湿度 30% ~ 70%, 正式实验前适应性饲养 7 d, 给予自由饮食和交替 12 h 光照。小鼠适应良好,毛色健康,四肢及大小便正常,体重稳定增长。河南中医药大学实验动物福利伦理委员会已对本课题所涉及的动物实验予以批准 (批准编号: DWLLGZR202303189)。

1.3.2 试剂及药品

豚草花粉 (ragweed, RW) (批号: 366782, 美国 Stallergenes Greer 公司); 免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、白介素-6 (interleukin 6, IL-6)、白介素-10 (interleukin 10, IL-10) ELISA 试剂盒 (批号: 3815-1H-6、3511-1A-20、3361-1A-6、3432-1A-6, 瑞典 Mabtech 公司); 组胺 ELISA 试剂盒 (批号: MM-0548M1, 江苏酶免实业有限公司); PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (批号: 03655300, 上海雅酶生物医药科技有限公司); 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白浓度试剂盒 (批号: PC0020, 北京索莱宝科技有限公司); 小鼠 GAPDH 抗体 (批号: AB0037, 上海泊湾生物科技有限公司); 前列腺素-内过氧化物合成酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、热休克蛋白 (heat shock protein 90, HSP90)、诱导型一氧化氮合成酶 (nitric oxide synthase 2, NOS2) 抗体 (批号: bs-10411R、bsm-61215M、bs-20601R, 北京博奥森生物科技有限公司); 氯雷他定片 (loratadine, LT, 批号: 2106027, 扬子江药业集团上海海尼药业有限公司)。

中药黄芪 (批号: 230603) 和辛夷 (批号: 230601-2) 购买于河南张仲景大药房股份有限公司。参考《中国药典》2020 版^[7], 黄芪: 辛夷 (3: 1) 浸泡过夜后用 75% 乙醇加热回流三次, 收集滤液用旋转蒸发器减压浓缩, 置于 -20°C 冷冻过夜, 随后在冷冻干燥机中进行冷冻干燥至恒质量, 即得黄芪-辛夷醇提物, 得率为 30.44%。

1.3.3 造模及分组

将小鼠随机分为 5 组, 每组 9 只: 正常对照组 (C)、模型组 (M)、氯雷他定阳性对照组 (1.7 mg/kg, LT), 黄芪-辛夷醇提物高剂量组 (3.04 g/kg, HQ-XYG), 黄芪-辛夷醇提物低剂量组 (1.52 g/kg, HQ-XYD)。除 C 组外, 其余各组小鼠在第 1、8 d 腹腔注射 (*i. p.*) 豚草花粉溶液 II (500 μL 含 200 μg RW 和

2.5 mg Alum 的 PBS 溶液)各一次;第 15、22、29~33 d, C 组小鼠给予鼻腔滴注(*i. n.*) PBS 10 μ L 各一次,其余组小鼠给予鼻腔滴注(*i. n.*)豚草花粉溶液 II (10 μ L 含 500 μ g RW 的 PBS 溶液)各一次;第 15 d 开始,各给药组灌胃给予相应剂量的相应药物, C 组和 M 组以相同给药方式给予 0.9% 生理盐水,共给药 18 d。

1.3.4 指标检测

1.3.4.1 小鼠行为学观察

从造模开始的第 29~33 d,每次豚草花粉鼻腔激发及给药后,立刻观察并记录各组小鼠 15 min 内小鼠挠鼻次数和打喷嚏次数。

1.3.4.2 ELISA 法检测小鼠血浆中组胺的水平

小鼠末次激发后眼球取血 1~2 滴置于 EDTA 抗凝离心管中,将全血与抗凝剂充分混合,4 $^{\circ}$ C、10 800 r/min 离心 20 min,取上清液即为血浆,利用 ELISA 法检测血浆中组胺含量,详细操作步骤参照试剂盒说明。

1.3.4.3 ELISA 法检测小鼠血清中总 IgE、RW 特异性 IgE、TNF- α 和 IL-10 水平

小鼠末次激发后眼球取血,室温下静置 2 h,4 $^{\circ}$ C、10 800 r/min 离心 20 min,取上清液即为血清,利用 ELISA 法检测血清中总 IgE、RW 特异性 IgE、TNF- α 和 IL-10 水平,详细操作步骤参照试剂盒说明书。

1.3.4.4 ELISA 法检测小鼠肺泡灌洗液和鼻腔灌洗液中 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 水平

小鼠末次激发处死后,解剖暴露气管,分别用 1 mL 无菌生理盐水分三次灌洗肺部和冲洗小鼠前鼻腔,分别得肺泡灌洗液和鼻腔灌洗液,并于 4 $^{\circ}$ C 3 000 r/min 离心 5 min,取上清于-20 $^{\circ}$ C 冻存。利用 ELISA 法检测肺小鼠泡灌洗液和鼻腔灌洗液中 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 水平,详细操作步骤参照试剂盒说明书。

1.3.4.5 免疫印迹法检测肺组织中 PTGS2、HSP90

和 NOS2 蛋白表达

每组随机取 3 只小鼠肺组织,按照 15 mg/ μ L 加入组织裂解液进行总蛋白的提取,使用 BCA 试剂盒检测总蛋白含量。通过上样、聚丙烯酰胺凝胶电泳、PVDF 转膜、脱脂奶粉封闭后,加入按比例稀释后的一抗 PTGS2、HSP90、NOS2 和 GAPDH 抗体,4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜;TBST 溶液清洗 3 次后,加入稀释后的 HRP 标记的羊抗兔二抗摇床孵育 1 h,洗膜 3 次后使用超灵敏发光检测试剂盒显色后显影,利用 Image J 软件分析条带灰度值。

1.3.4.6 统计学分析

利用 Graphpad prism 8.0 软件进行统计学分析,结果均以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析统计, $P < 0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 数据挖掘

2.1.1 单味药用药频次分析

将录入的 252 首中药方剂中的全部中药进行排序,统计得出共有 223 味中药,累计频率 2 473 次,其中用药频次 ≥ 30 的高频中药共 21 种,累计出现 1 598 次,占比 64.62%,其中以辛夷、黄芪、防风、甘草、苍耳子等的使用频次相对较高(见表 1)。

2.1.2 高频中药性味分析

依据《中国药典》2020 年版和《中药学》分类标准,对纳入标准的高频中药(用药频次 ≥ 30)进行性味的统计分析。将同一味中药的不同性味分别统计入内。统计结果表明,药味涉及辛(868 次,38.70%),甘(767 次,34.20%),苦(309 次,13.78%),酸(129 次,5.75%),微苦(49 次,2.18%),涩(48 次,2.14%),淡(40 次,1.78%)和咸(33 次,1.47%),见图 1A;药性涉及温(852 次,53.32%),微温(292 次,18.27%),平(254 次,15.89%)寒(126 次,7.88%),凉(44 次,2.75%)和微寒(30 次,1.88%),结果见图 1B。

表 1 频次 ≥ 30 的单味中药
Table 1 TCM with frequency ≥ 30

中药名称 Drug name	频次 Count	中药名称 Drug name	频次 Count
辛夷 Magnoliae Flos	172	乌梅 Mume Fructus	48
黄芪 Astragali Radix	154	黄芩 Scutellariae Radix	47
防风 Saposhnikoviae Radix	138	蝉蜕 Cicadae Periostracum	46

续表 1 (Continued Tab. 1)

中药名称 Drug name	频次 Count	中药名称 Drug name	频次 Count
甘草 Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	129	薄荷 Menthae Haplocalycis Herba	44
苍耳子 Xanthii Fructus	117	川芎 Chuanxiong Rhizoma	40
白术 Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	115	茯苓 Poria	40
细辛 Asari Radix et Rhizoma	113	党参 Codonopsis Radix	37
白芷 Angelicae Dahuricae Radix	106	地龙 Pheretima	33
桂枝 Cinnamomi Ramulus	57	芥子 Sinapis Semen	32
五味子 Schisandrae Chinensis Fructus	51	白芍 Paeoniae Radix Alba	30
麻黄 Ephedrae Herba	49		

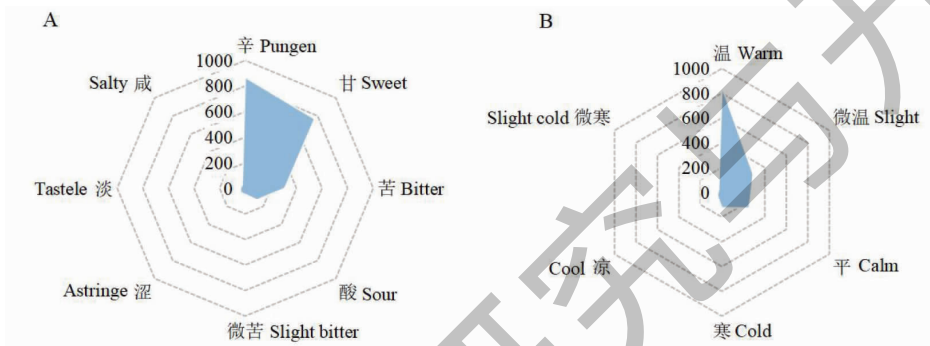


图 1 中药治疗 AR 单味药药味 (A) 及药性 (B) 分析

Fig. 1 Drug flavor (A) and property (B) of TCM in AR treatment

2.1.3 高频中药归经分析

依据《中国药典》2020 年版和《中药学》分类标准,对纳入标准的高频中药(用药频次 ≥ 30)进行归经的统计分析。将同一味中药的不同归经分别统计入内。统计结果显示,高频中药归经涉及肺(1

242 次,29.86%)、脾(771 次,18.53%)、胃(522 次,12.55%)、心(390 次,9.38%)、肝(379 次,9.11%)、膀胱(277 次,6.66%)、肾(204 次,4.90%)、大肠(201 次,4.83%)、胆(87 次,2.09%)、小肠(47 次,1.13%)和心包(40 次,0.96%)(见表 2)。

表 2 中药治疗 AR 单味药归经分析

Table 2 Channel tropism of TCM in AR treatment

归经 Channel tropism	频次 Count	百分比 Percent(%)	归经 Channel tropism	频次 Count	百分比 Percent(%)
肺 Lung	1 242	29.86	肾 Kidney	204	4.90
脾 Spleen	771	18.53	大肠 Large intestine	201	4.83
胃 Stomach	522	12.55	胆 Biliary	87	2.09
心 Heart	390	9.38	小肠 Small intestine	47	1.13
肝 Liver	379	9.11	心包 Pericardium	40	0.96
膀胱 Bladder	277	6.66			

2.1.4 高频中药功效分析

将 21 味高频中药(用药频次 ≥ 30)参考《中药学》进行功效分类规范,共涵盖了 9 种功效分类,涉及解表药(725 次,45.37%)、补虚药(465,29.10%)、祛风湿药(117 次,7.32%)、收涩药(99

次,6.20%)、清热药(47 次,2.94%)、活血化瘀药(40 次,2.5%)、利水渗湿药(40 次,2.5%)、平肝熄风药(33 次,2.07%)和化痰止咳平喘药(32 次,2%)(见图 2)。

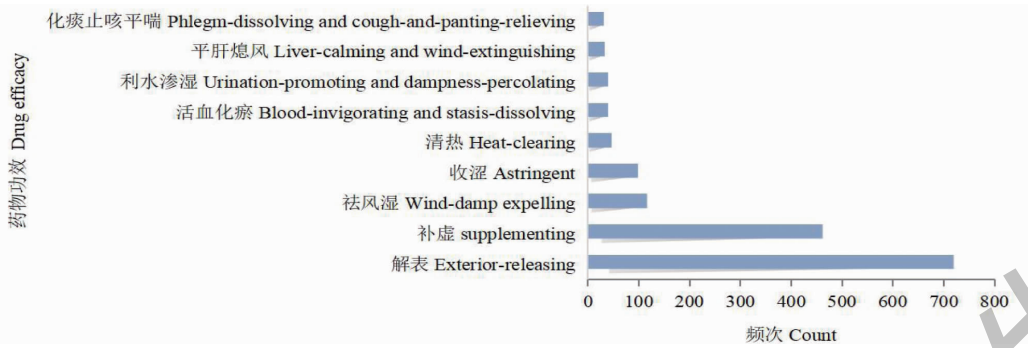


图2 中药治疗 AR 功效分析

Fig. 2 Efficacy analysis of TCM in AR treatment

2.1.5 高频中药关联规则分析

使用 IBM SPSS Modeler 18.0 软件对高频中药 (用药频次 ≥ 30) 进行关联规则分析, 建立“数据 \rightarrow 类型 \rightarrow 网络”的关联规则数据流, 设置“弱链接上

限”为 15, “强链接下限”为 45, 得到频数 ≥ 60 的药物组合 21 种 (见表 3), 并将高频中药间的关联网络图进行可视化展示 (见图 3)。设置支持度为 12%, 置信度为 95%, 提升度 ≥ 1 , 最大前项数为 5, 利用

表 3 中药方剂中频次 ≥ 60 的药物组合

Table 3 Drug combinations with frequency ≥ 60

序号 No.	药物组合 Drug combination	频次 Count	序号 No.	药物组合 Drug combination	频次 Count
1	黄芪-辛夷	121	12	防风-甘草	79
2	黄芪-防风	117	13	甘草-白术	75
3	辛夷-防风	106	14	苍耳子-防风	73
4	黄芪-白术	104	15	苍耳子-甘草	71
5	苍耳子-辛夷	101	16	辛夷-细辛	69
6	辛夷-甘草	99	17	黄芪-白芷	68
7	防风-白术	96	18	黄芪-细辛	66
8	黄芪-甘草	90	19	苍耳子-白芷	65
9	辛夷-白术	89	20	苍耳子-白术	64
10	辛夷-白芷	86	21	防风-白芷	64
11	苍耳子-黄芪	79			

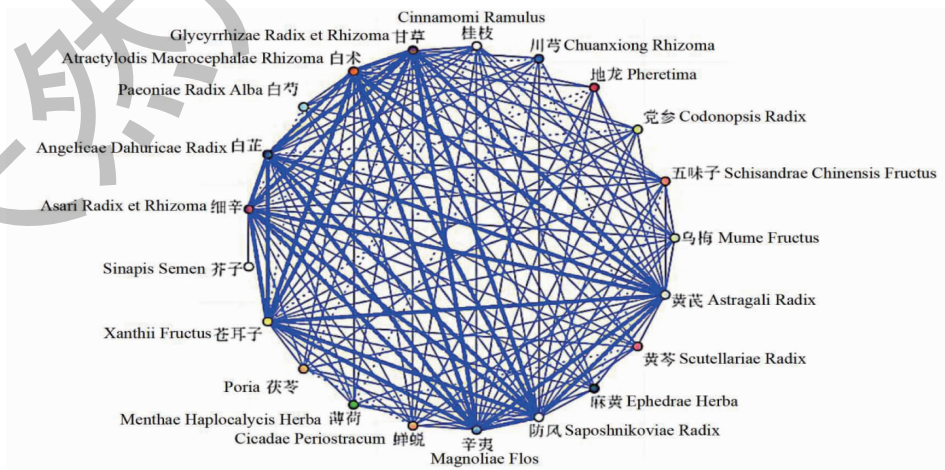


图3 中药治疗 AR 高频中药关联网络

Fig. 3 Association network of high-frequency TCM in AR treatment

注: 线条粗细程度表示不同药物之间关联度的强弱。Note: Thickness of the lines indicates the strength of the correlation between different drugs.

Apriori 建模进一步挖掘个高频中药之间的配伍关系,结果得到 11 对核心药物组合(见表 4)。

表 4 高频中药治疗 AR 关联规则分析

Table 4 Association rule of high-frequency TCM in AR treatment

后项 Consequent	前项 Antecedent	支持度 Support (%)	置信度 Confidence (%)	提升度 Lift (%)
黄芪	白术 + 防风 + 辛夷	28.97	95.89	1.57
黄芪	苍耳子 + 白术 + 防风	21.03	96.23	1.57
黄芪	白芷 + 白术 + 辛夷	18.25	95.65	1.57
黄芪	苍耳子 + 白术 + 防风 + 辛夷	17.86	95.56	1.56
黄芪	白芷 + 白术 + 防风	17.46	97.73	1.60
黄芪	白芷 + 白术 + 防风 + 辛夷	15.48	97.44	1.59
黄芪	五味子 + 防风	14.68	97.30	1.59
防风	蝉蜕 + 白术	13.49	97.06	1.77
黄芪	乌梅 + 防风 + 辛夷	12.70	96.88	1.59
白术	桂枝 + 防风 + 黄芪	12.70	96.88	2.12
防风	蝉蜕 + 白术 + 黄芪	12.30	96.77	1.77

2.1.6 高频中药剂量分析

利用 Graphpad Prism 8.0 软件对 21 味高频中药(用药频次 ≥ 30)进行剂量统计分析。结果显示在高频药物剂量使用中,常用剂量除五味子、蝉蜕和薄

荷超出外,其余高频药物均在《中国药典》规定用量范围之内,详见图 4。图中以药物中文名称首字母缩写代表相应中药。

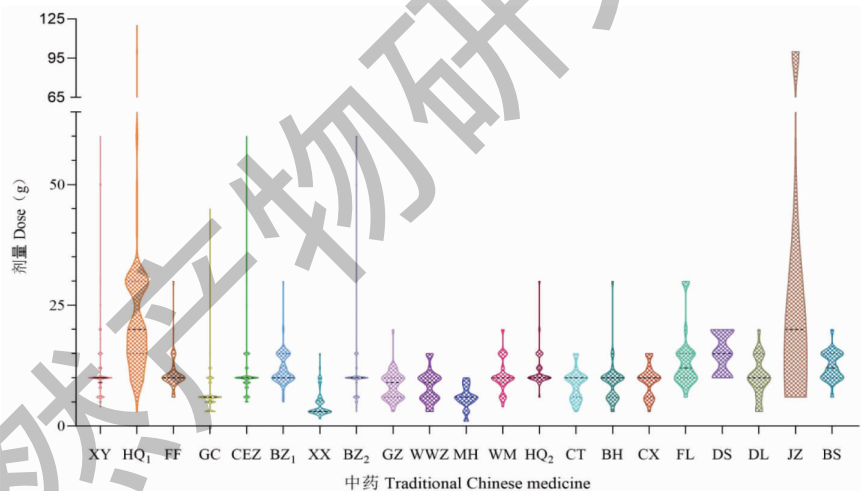


图 4 高频中药治疗 AR 的剂量分析

Fig. 4 Dose analysis of high-frequency TCM in AR treatment

注:XY:辛夷;HQ₁:黄芪;FF:防风;GC:甘草;CEZ:苍耳子;BZ₁:白术;XX:细辛;BZ₂:白芷;GZ:桂枝;WWZ:五味子;MH:麻黄;WM:乌梅;HQ₂:黄芩;CT:蝉蜕;BH:薄荷;CX:川芎;FL:茯苓;DS:党参;DL:地龙;JZ:芥子;BS:白芍。Note:XY: Magnoliae Flos; HQ₁: Astragali Radix; FF: Saposhnikoviae Radix; GC: Glycyrrhizae Radix et Rhizoma; CEZ: Xanthii Fructus; BZ₁: Atractylodis Macrocephalae Rhizom; XX: Asari Radix et Rhizoma; BZ₂: Angelicae Dahuricae Radix; GZ: Cinnamomi Ramulus; WWZ: Schisandrae Chinensis Fructus; MH: Ephedrae Herba; WM: Mume Fructus; HQ₂: Scutellariae Radix; CT: Cicadae Periostracum; BH: Menthae Haplocalycis Herba; CX: Chuanxiong Rhizoma; FL: Poria; DS: Codonopsis Radix; DL: Pheretima; JZ: Sinapis Semen; BS: Paeoniae Radix Alba.

2.1.7 高频中药治疗 AR 聚类分析

利用 IBM SPSS Statistics 23.0 软件对 21 味高频中药(用药频次 ≥ 30)进行“瓦尔德”聚类分析。取

类间距离 18,将药物分为四类,聚一类:1 组(黄芪、白术、防风、甘草、茯苓、党参),2 组(乌梅、蝉蜕、地龙),3 组(桂枝、白芍、五味子);聚二类:辛夷、苍耳

子、白芷、薄荷、黄芩、川芎;聚三类:细辛、芥子;聚四类:麻黄,详见图 5。

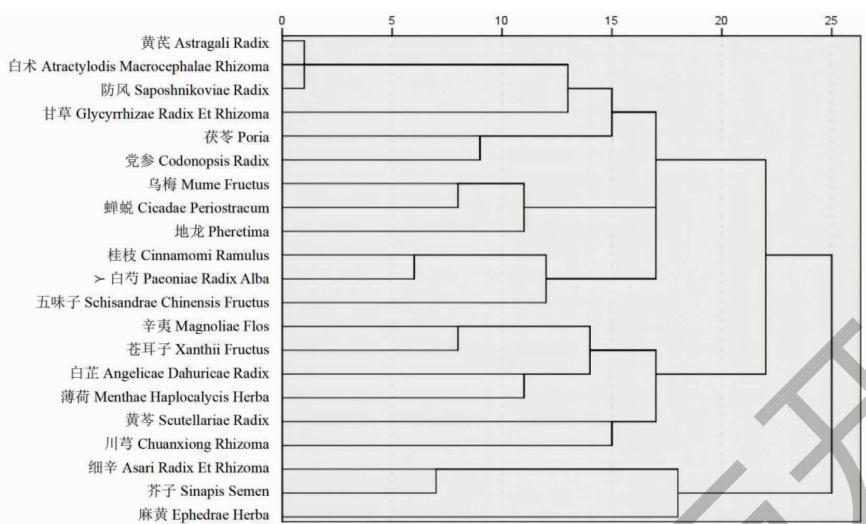


图 5 中药治疗 AR 聚类分析

Fig. 5 Cluster analysis of traditional Chinese medicine in AR treatment

2.2 网络药理分析

根据数据挖掘结果显示,黄芪-辛夷(HQ-XY)药对是中药临床治疗 AR 使用频率最高的药物组合,出现频次为 121 次,为进一步探讨黄芪-辛夷药对治疗 AR 的分子作用机制,现运用网络药理学、分子对接等手段进行深层次分析。

2.2.1 黄芪-辛夷药对活性成分筛选及靶点预测

使用 TCMSP 数据库获取黄芪和辛夷的活性成分,并按照药动学参数(ADME)进行筛选,设置筛选标准为:口服生物利用度(oral bioavailability, OB) \geq

30%,类药性(drug-likeness, DL) \geq 0.18,并进一步通过文献补充未纳入的主要成分,共得到黄芪活性成分 24 个,辛夷活性成分 24 个,合并后共得到 48 个活性成分,相关信息详见表 5。其中,黄芪异黄酮苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素等是中药黄芪代表性成分,木脂素、玉兰花碱、辛夷脂素等为中药辛夷代表性成分。通过 TCMSP、SwissTargetPrediction、SEA、PubChem 和 DrugBank 数据库获取上述活性成分的靶点信息,合并、去重后共得到 306 个可能的活性靶点。

表 5 黄芪-辛夷药对的活性成分

Table 5 Active compounds of HQ-XY

化合物 ID Compound ID	MOL ID	化合物 Compound	OB(%)	DL	分子量 Molecular weight	中药 Traditional Chinese medicine
H1	MOL000387	联苯双脂 Bifendate ^[9]	31.10	0.67	418.38	黄芪
H2	MOL000033	β -谷甾醇 β -Sitosterol ^[9]	36.23	0.78	428.82	黄芪
H3	MOL000379	黄芪异黄酮苷 Methylnissolin-3-O-glucoside ^[10]	36.74	0.92	462.49	黄芪
H4	MOL000296	常春藤皂苷元 Hederagenin ^[11]	36.91	0.75	414.79	黄芪
H5	MOL000442	1,7-Dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene ^[12]	39.05	0.48	314.31	黄芪
H6	MOL000374	5'-Hydroxyiso-muronulatol-2',5'-di-O-glucoside ^[13]	41.72	0.69	642.67	黄芪
H7	MOL000422	山奈酚 Kaempferol ^[10]	41.88	0.24	286.25	黄芪
H8	MOL000098	槲皮素 Quercetin ^[10]	46.43	0.28	302.25	黄芪
H9	MOL000417	毛蕊异黄酮 Calycosin ^[10]	47.75	0.24	284.28	黄芪
H10	MOL000439	Isomucronulatol-7,2'-di-O-glucosiole ^[13]	49.28	0.62	626.67	黄芪
H11	MOL000354	异鼠李素 Isorhamnetin ^[10]	49.60	0.31	316.28	黄芪
H12	MOL000239	华良姜素 Jaranol ^[14]	50.83	0.29	314.31	黄芪
H13	MOL000371	3,9-Di-O-methylnissolin ^[13]	53.74	0.48	314.36	黄芪

续表 5 (Continued Tab. 5)

化合物 ID Compound ID	MOL ID	化合物 Compound	OB(%)	DL	分子量 Molecular weight	中药 Traditional Chinese medicine
H14	MOL000211	白桦脂酸 Mairin ^[12]	55.38	0.78	456.78	黄芪
H15	MOL000380	3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀烷 Methylnissolin ^[10]	64.26	0.42	300.33	黄芪
H16	MOL000438	异微凸剑叶莎醇 Isomucronulatol ^[10]	67.67	0.26	302.35	黄芪
H17	MOL000433	叶酸 Folic acid ^[15]	68.96	0.71	441.45	黄芪
H18	MOL000392	芒柄花黄素 Formononetin ^[10]	69.67	0.21	268.28	黄芪
H19	MOL000378	7-O-甲基异微凸剑叶莎醇 7-O-Methylisomucronulatol ^[13]	74.69	0.30	316.38	黄芪
H20	MOL000398	异黄酮酮 Isoflavanone ^[10]	109.99	0.30	316.33	黄芪
H21	MOL000407	黄芪甲苷 Astragaloside IV ^[10]	22.5	0.15	785	黄芪
H22	MOL000401	黄芪皂苷 I Astragaloside I	46.79	0.11	869.17	黄芪
H23	MOL000403	黄芪皂苷 II Astragaloside II	46.06	0.13	827.13	黄芪
H24	MOL000405	黄芪皂苷 III Astragaloside III	31.83	0.1	785	黄芪
X1	MOL012123	Denudanolide A ^[16]	31.19	0.46	356.43	辛夷
X2	MOL009849	细辛脂素 Asarinin ^[16]	31.57	0.83	354.38	辛夷
X3	MOL012112	去甲檳榔碱 Kobusin ^[16]	34.73	0.73	370.43	辛夷
X4	MOL000315	山药素 Hancinone ^[16]	39.31	0.44	340.4	辛夷
X5	MOL001494	亚油酸乙酯 Mandenol ^[16]	42.00	0.19	308.56	辛夷
X6	MOL012137	木兰花碱 Magnolone ^[16]	50.56	0.55	388.45	辛夷
X7	MOL012126	Denudanolide D ^[16]	51.28	0.47	400.51	辛夷
X8	MOL012129	辛夷脂素 Fargesin ^[16]	55.61	0.73	370.43	辛夷
X9	MOL000313	Galgravin ^[16]	57.12	0.39	372.5	辛夷
X10	MOL000314	(+)-大木姜子素 Grandisin ^[17]	57.12	0.39	432.5	辛夷
X11	MOL007563	O,O-二甲基鹅掌楸树脂醇 B Yangambin ^[16]	57.53	0.81	446.54	辛夷
X12	MOL012120	Denudadione B ^[16]	58.79	0.41	340.4	辛夷
X13	MOL012130	望春花酮 B Fargesone B ^[16]	59.37	0.51	372.45	辛夷
X14	MOL012136	Machilin G ^[16]	60.11	0.45	356.45	辛夷
X15	MOL012131	异二氢风藤奎醇 A Isodihydrofutoquinol A ^[16]	60.54	0.36	356.45	辛夷
X16	MOL000310	玉兰脂 B Denudatin B ^[16]	61.47	0.38	356.45	辛夷
X17	MOL012119	Denudadione A ^[16]	61.56	0.36	356.45	辛夷
X18	MOL012125	Denudanolide C ^[16]	62.56	0.39	370.48	辛夷
X19	MOL012124	Denudanolide B ^[16]	100.06	0.36	356.45	辛夷
X20	MOL006765	芍药素 Peonidin ^[16]	26.92	0.27	301.29	辛夷
X21	MOL000254	丁香酚 Eugenol ^[16]	56.24	0.04	164.22	辛夷
X22	MOL000124	柠檬醛 Citral ^[16]	22.52	0.02	152.26	辛夷
X23	MOL000122	1,8-桉叶素 1,8-Cineole ^[16]	39.73	0.05	153.28	辛夷
X24	MOL000764	木兰碱 Magnoflorine ^[16]	26.69	0.55	342.4	辛夷

2.2.2 获取 AR 疾病靶点并“成分-靶点-疾病”网络的构建

从 TTD、DisGeNet、GAD 及 DrugBank 数据库中

检索与 AR 相关发病机制靶点,合并、去重后得到 AR 疾病靶点 321 个。将 306 个黄芪-辛夷成分靶点和 321 个疾病靶点取交集得到 63 个黄芪-辛夷药对

治疗 AR 的潜在疾病靶点。利用 Uniprot 数据库对上述获取的成分靶点及疾病靶点进行基因名称标准化处理,利用 Cytoscape 3. 7. 2, 软件构建“成分-靶点-疾病”可视化网络,详见图 6。该网络包含 35 个活性成分节点,63 个靶点蛋白节点和 347 条边(注:有 13 个活性成分未找到对应靶点,故网络中只显示

35 个有效成分节点)。

2.2.3 GO 基因功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

将 63 个潜在作用靶点在线导入 Metascape 网站,限定物种为人,设定阈值为 $P < 0.05$, 进行 GO 和 KEGG 富集分析。

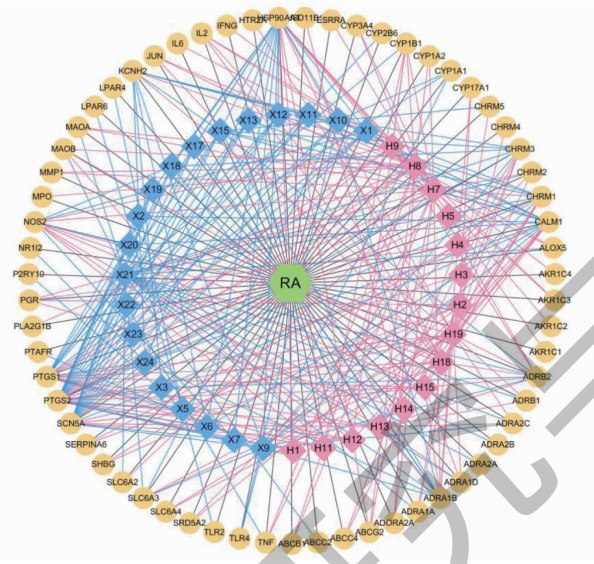


图 6 黄芪-辛夷药对治疗 AR 的“成分-靶点-疾病”网络

Fig. 6 “Compounds-targets-disease” network of HQ-XY drug pair for treatment of AR

注:绿色六边形表示变应性鼻炎;蓝色和粉色菱形分别表示辛夷和黄芪活性成分,黄色圆形表示靶点;蓝色和粉色线分别表示辛夷和黄芪活性成分与相应靶点的连接,黑线表示变应性鼻炎与相应靶点的连接。Note:Green hexagon is allergic rhinitis;blue,pink diamonds indicate active compounds from Xinyi and Huangqi respectively,yellow circles represent potential targets;blue,pink lines represent target interactions with Xinyi and Huangqi separately;black lines stand for target relationships with allergic rhinitis.

在 GO 分析富集中,共得到生物过程 (biological progress, BP) 条目共 656 个,细胞组分 (cellular components, CC) 条目 36 个,分子功能 (molecular functions, MF) 条目共 122 个。GO 分析结果表明,相关靶点主要涉及对外源性刺激的反应 (response to xenobiotic stimulus)、血液循环调节 (regulation of blood circulation)、血管直径维持 (blood vessel diameter maintenance) 以及管径调节功能 (regulation of tube diameter) 等生物过程,参与 G 蛋白偶联胺受体活性 (G protein-coupled amine receptor activity)、氧化还原酶活性 (oxidoreductase activity)、肾上腺素受体活性 (adrenergic receptor activity) 和血红素结合 (heme binding) 等分子功能,与膜筏 (membrane raft)、膜微区 (membrane microdomain)、突触膜 (synaptic membrane)、顶端质膜外侧 (external side of apical plasma membrane) 及等离子体膜筏 (plasma membrane raft) 等细胞组分密切相关。筛选 BP、CC、MF 的前 10 位

做成柱状图 (见图 7A) 进行展示。

KEGG 富集分析 $P < 0.05$ 的目录有 92 个,将显著性最高的前 20 个通路做成气泡图 (见图 7B) 进行展示。结果表明,辛夷-黄芪药对治疗 AR 的主要靶点重点涉及神经活性配体-受体相互作用通路 (neuroactive ligand-receptor interaction)、钙离子信号通道 (calcium signaling pathway)、类固醇激素生物合成通路 (steroid hormone biosynthesis)、癌症通路 (pathways in cancer)、脂质与生物合成通路 (lipid and atherosclerosis)、化学致癌-受体活化通路 (chemical carcinogenesis-receptor activation) 和 cAMP 信号通路等信号通路 (cAMP signaling pathway) 等。

2.2.4 构建“成分-靶点-通路-疾病”网络

通过 KEGG 富集分析发现,有四个关键通路的潜在靶点蛋白个数超过 10 个,分别是神经活性配体-受体相互作用通路 (P1, 19 个)、钙离子信号通道 (P2, 14 个)、类固醇激素生物合成通路 (P3, 11 个)

和癌症通路(P4,11个);四条关键通路共涉及39个关键靶点蛋白和34个活性成分,利用Cytoscape 3.7.2软件,构建“成分-靶点-通路-疾病”可视化网络(见图8),图中节点大小和颜色深浅与网络中的靶点度值呈正相关。结果显示,黄芪-辛夷药对活性成分主要通过作用于PTGS2、HSP90AA1、CALM1、

NOS2、ADRA1B、CHRM1、ADRB2、CHRM3、CYP1B1等靶点调控上述四条通路实现对AR的治疗作用。

2.2.5 分子对接验证

分析四条关键通路,39个潜在靶点蛋白(度值 ≥ 8)及34个对应化合物的相互关系(见表6),选择度值较高的PTGS2(P4)、CHRM1(P1,2)、CYP1B1

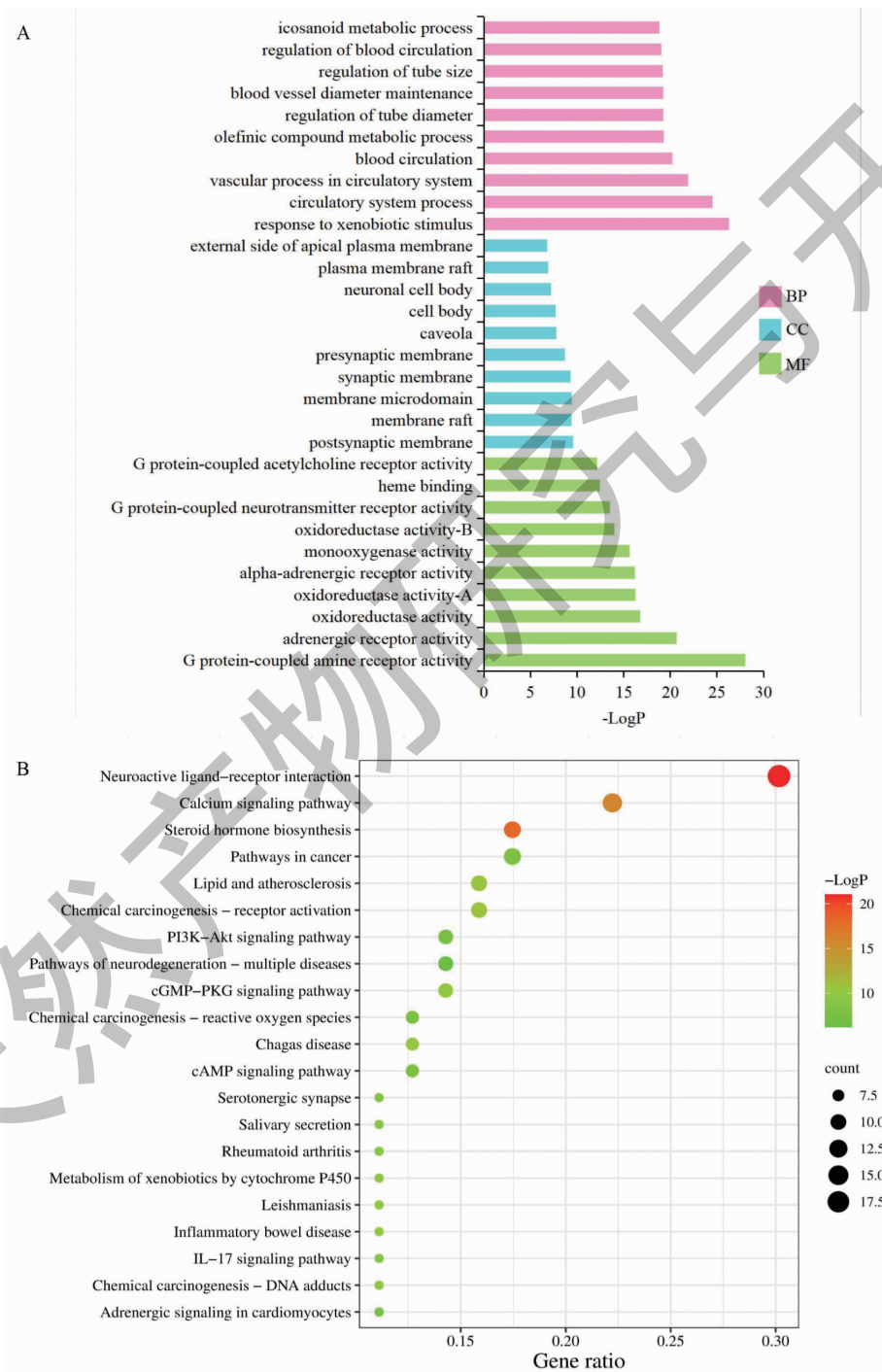


图7 黄芪-辛夷药对治疗AR核心靶点的GO基因功能富集分析(A)和KEGG通路富集分析(B)

Fig. 7 GO (A) and KEGG (B) analysis of potential targets for AR treatment by HQ-XY drug pair

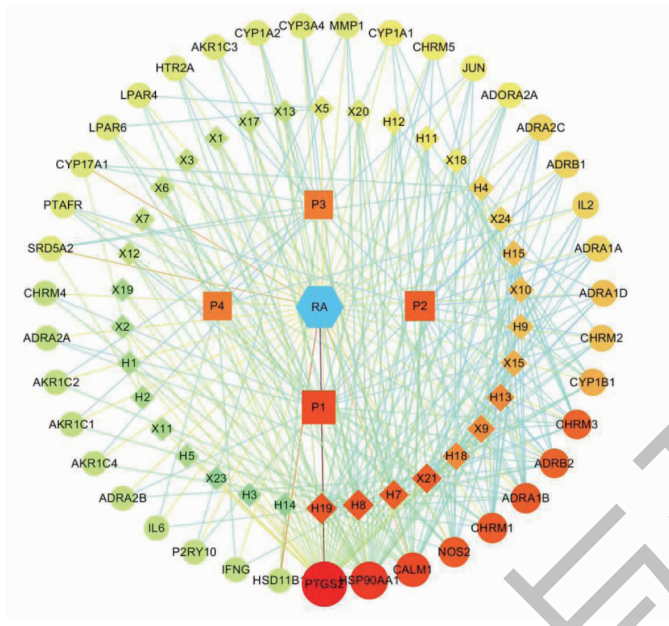


图 8 黄芪-辛夷药对“成分-靶点-通路-疾病”网络

Fig. 8 “Compounds-targets-pathways-disease” network of HQ-XY drug pair for treatment of AR

注:六边形表示变应性鼻炎;方形代表调控变应性鼻炎的关键通路;菱形和圆形分别代表有效成分和潜在靶点蛋白;颜色从红到绿代表节点度值由大到小。Note:Hexagon is allergic rhinitis;Squares indicate key pathways regulating AR;diamonds and circles represent active compounds and potential targets respectively;colors (red→yellow→green) and size (large→small) represent degrees of nodes.

(P3)代表四条关键通路,与相应化合物进行分子对接结合能分析,结果见图9。根据结合能越低活性分子与靶点蛋白结合稳定性越高、结合能力越强的原则,因此选择结合能最小的PTGS2-X2(-10.2 kcal/mol)、PTGS2-H18(-9.5 kcal/mol)、CHRM1-H7(-9.2 kcal/mol)、CYP1B1-H8(-10.5 kcal/mol)和CYP1B1-H7(-9.9 kcal/mol)进行分子对接可视化展

示,如图10结果显示黄芪-辛夷药对中的活性成分山柰酚、槲皮素、芒柄花黄素和细辛素在治疗AR中发挥重要作用。

2.3 体内实验验证

2.3.1 各组小鼠AR症状观察及比较

观察连续鼻腔激发5d的小鼠行为学变化:与C组相比,M组小鼠的挠鼻和喷嚏次数呈现显著增

表 6 关键通路、潜在靶点蛋白及有效化合物的关系表格

Table 6 Relationship of key pathways, potential targets and active compounds

关键通路 Key pathway	潜在靶点蛋白 Potential target	PDB ID	度值 Degree	对应化合物 Corresponding compound
P4	PTGS2	5IKV	33	H1, H3, H5, H7 ~ H9, H1 ~ H13, H15, H18, H19; X1 ~ X3, X5 ~ X7, X9 ~ X13, X15, X17 ~ X21, X23, X24
P4	HSP90AA1	-	24	H1, H5, H7, H8, H9, H11, H12, H18, H19; X1, X6, X7, X9, X10, X12, X13, X15, X17 ~ X20, X24
P2,4	CALM1	-	20	H7, H9, H11 ~ H13, H18, H19; X2, X3, X6, X9, X10, X11, X13, X15, X20, X24
P2,4	NOS2	-	15	H7, H9, H11 ~ H13, H15, H18, H19; X1, X7, X18, X20
P1,2	ADRA1B	-	15	H4, H7, H13, H15, H19; X9, X10, X15, X17, X18, X20, X24
P1,2	CHRM1	6ZfZ	15	H4, H7, H13, H15, H18, H19; X9, X10, X12, X15, X21, X24
P1,2	ADRB2	-	13	H8, H9, H13, H15, H18, H19; X3, X9, X15, X21
P1,2	CHRM3	-	13	H4, H13, H15, H19; X9, X10, X15, X18, X21, X24
P3	CYP1B1	3PM0	8	H7 ~ H9, H11, H12; X21

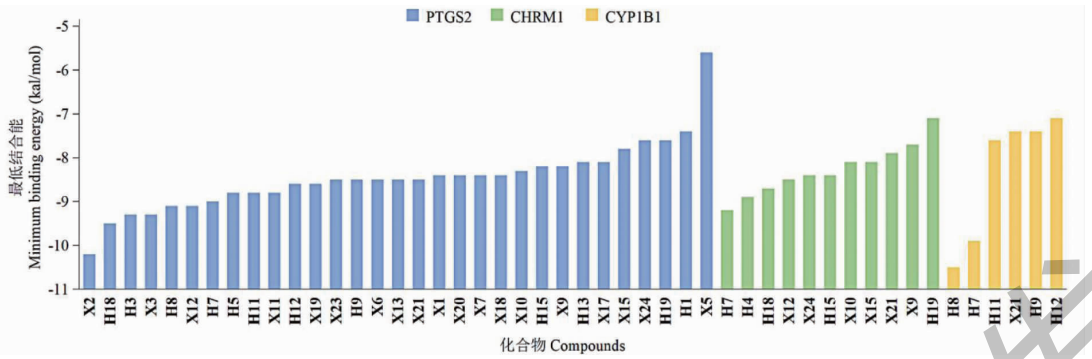


图9 核心靶点和相应化合物的最低结合能

Fig. 9 Minimum binding energy of core targets and corresponding compounds

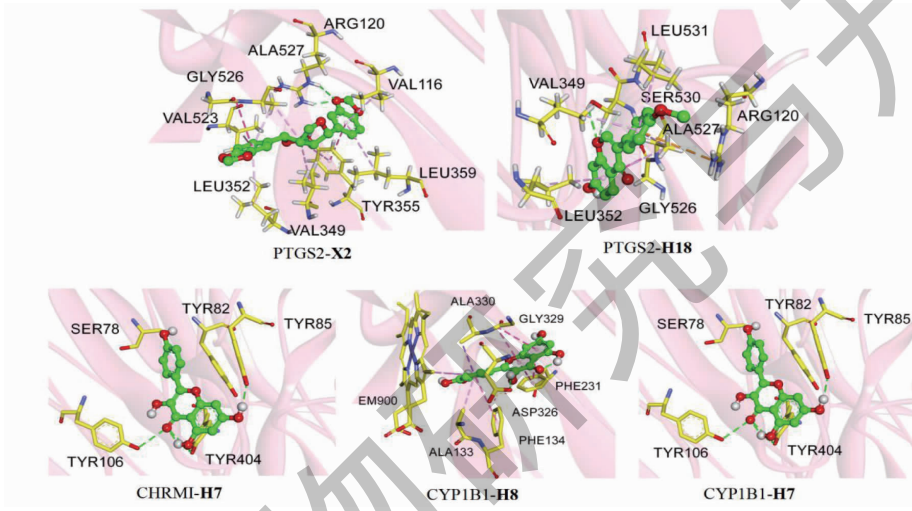


图10 分子对接模式

Fig. 10 Molecular docking mode

注: X2: 细辛脂素, H18: 芒柄花黄素, H7: 山奈酚, H8: 槲皮素。 Note: X2: Asarinin, H18: Formononetin, H7: Kaempferol, H8: Quercetin.

加趋势、并在末次激发后达到最高峰(平均挠鼻 64.2 次、喷嚏 16 次); LT 组小鼠挠鼻和喷嚏次数在连续激发的第 2~3 d 有所增加、但第 4~5 d 呈现明显下降趋势并在第 5 d 达到与对照组相当的水平(平均挠鼻 21.8 次、喷嚏 0.8 次); HQ-XYG 组小鼠的喷嚏和挠鼻次数一直稳定保持在与对照组相当的

水平(平均挠鼻 15.6 次、1.8 次); HQ-XYD 组小鼠的挠鼻和喷嚏次数分别在第 2 d 和第 3 d 呈现一个小高峰,但整体水平相比模型组呈现被抑制状态,最后一天的挠鼻和喷嚏次数呈现较低水平(平均挠鼻 26.4 次、喷嚏 6.4 次),详见图 11。

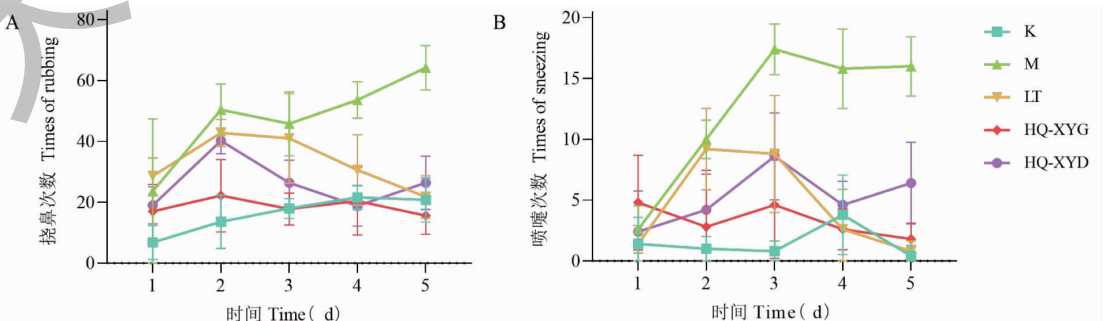


图11 连续5 d 每次激发后 15 min 内各组小鼠行为学观察

Fig. 11 Mice behavioral observation within 15 min after nasal-provocation for five consecutive days

2.3.2 各组小鼠血浆中组胺水平比较

与 C 组小鼠比较, M 组小鼠血浆中组胺水平显著上升($P < 0.001$)。与 M 组比较, LT 组、HQ-XYG 组和 HQ-XYD 组小鼠血浆中组胺水平显著下降($P < 0.001, P < 0.01$), 详见图 12。

2.3.3 各组小鼠血清中 IgE、RW 特异性 IgE、TNF- α 、IL-6 和 IL-10 水平比较

与 C 组小鼠比较, M 组小鼠血清中总 IgE、RW 特异性 IgE、TNF- α 水平显著上升($P < 0.001$), IL-10 水平显著下降($P < 0.001$)。与 M 组相比, LT 组、HQ-XYG 组和 HQ-XYD 组小鼠血清中总 IgE、RW 特异性 IgE、TNF- α 水平显著下降($P < 0.001$), IL-10 水平显著上升($P < 0.01, P < 0.001$) (见图 13)。

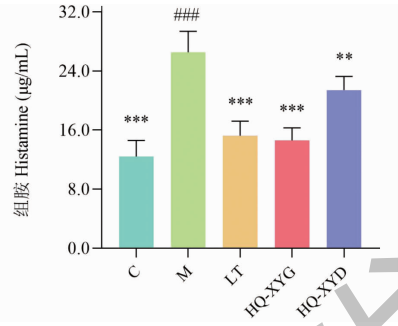


图 12 各组小鼠血浆中组胺水平比较

Fig. 12 Comparison of histamine level of each group

注:与对照组比较,### $P < 0.001$;与模型组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。Note:Compared with C group,### $P < 0.001$;

Compared with M group,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

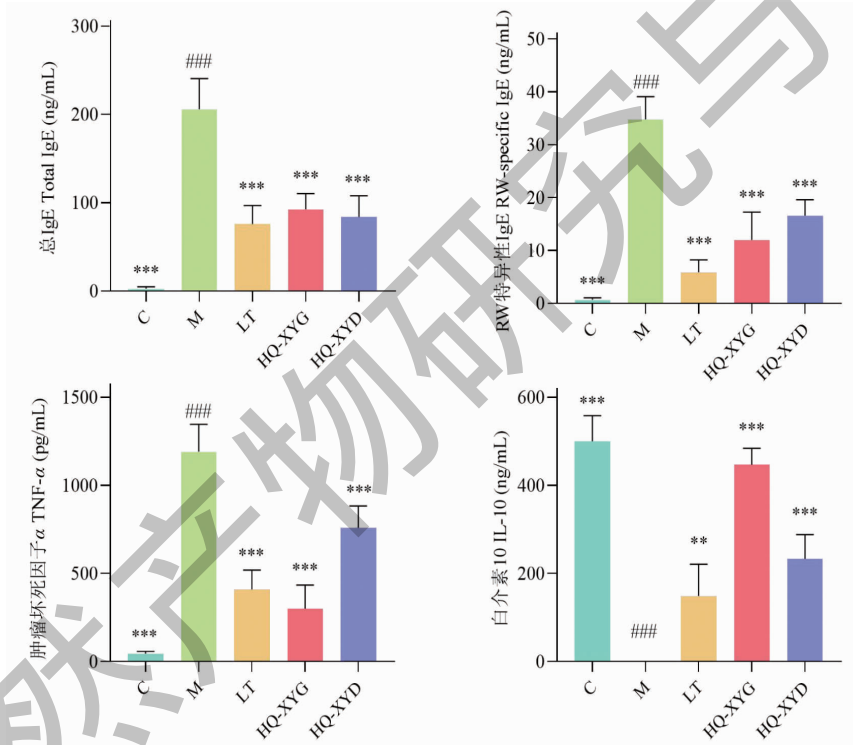


图 13 各组小鼠血清中总 IgE、RW 特异性 IgE、TNF- α 、IL-6 和 IL-10 水平比较。

Fig. 13 Comparison of serum total IgE, RW-specific IgE, TNF- α , IL-6 and IL-10 levels of each group.

注:与对照组比较,### $P < 0.001$,与模型组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。Note:Compared with C group,### $P < 0.001$;Compared with M group,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

2.3.4 各组小鼠肺泡灌洗液及鼻腔灌洗液中 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 水平

与 C 组小鼠比较, M 组小鼠肺泡灌洗液和鼻腔灌洗液中 TNF- α 和 IL-6 水平显著上升($P < 0.001$), IL-10 水平显著下降($P < 0.05, P < 0.01$)。与 M 组小鼠比较, LT 组、HQ-XYG 组和 HQ-XYD 组

小鼠肺泡灌洗液和鼻腔灌洗液中 TNF- α 和 IL-6 水平显著下降($P < 0.01, P < 0.001$), LT 组和 HQ-XYG 组小鼠肺泡灌洗液和鼻腔灌洗液中 IL-10 水平显著上升($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$), HQ-XYD 组小鼠肺泡灌洗液和鼻腔灌洗液中 IL-10 水平差异无统计学意义,详见图 14 和图 15。

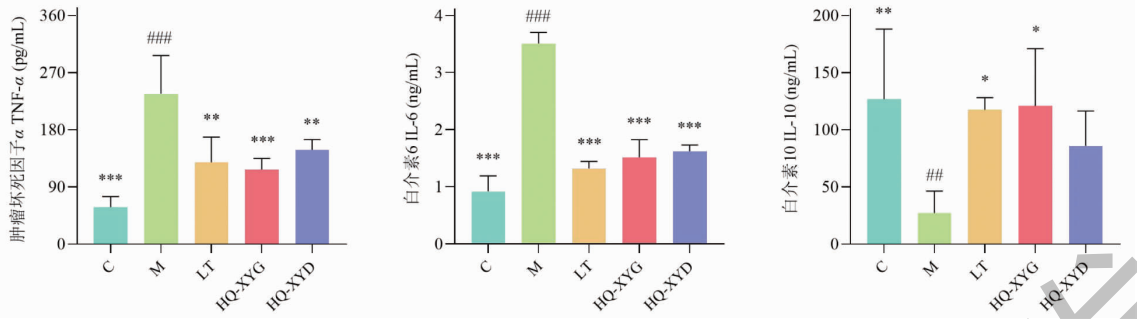


图 14 各组小鼠肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 水平比较。

Fig. 14 Comparison of TNF- α , IL-6 and IL-10 levels in bronchoalveolar lavage fluid of each group.

注:与对照组比较,### $P < 0.01$,#### $P < 0.001$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。Note:Compared with C group,### $P < 0.01$,#### $P < 0.001$;Compared with M group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

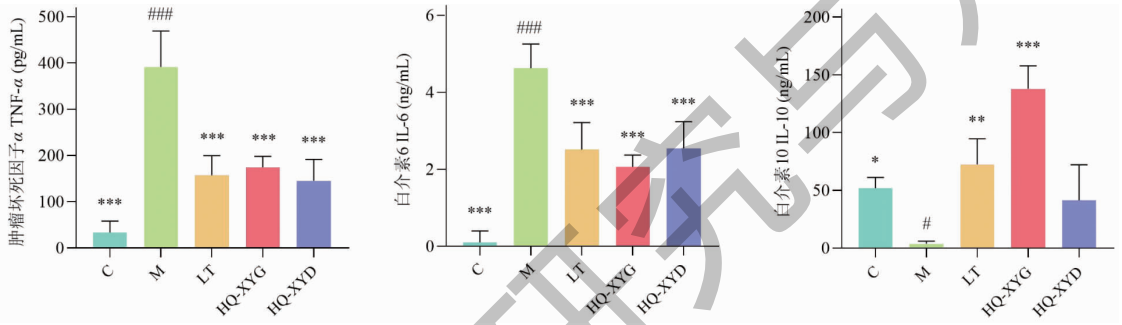


图 15 各组小鼠鼻腔灌洗液中 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 水平比较。

Fig. 15 Comparison of TNF- α , IL-6 and IL-10 levels in nasal lavage fluid of each group.

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,#### $P < 0.001$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。Note:Compared with C group,* $P < 0.05$,### $P < 0.001$;Compared with M group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

2.3.5 各组小鼠肺组织中 PTGS2、HSP90 和 NOS2 蛋白表达比较

与 C 组小鼠比较,M 组小鼠肺组织中 PTGS2、HSP90 和 NOS2 的蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$)。与 M 组小鼠比较,LT 组和 HQ-XYG 组小鼠肺组织中 PTGS2、HSP90 和 NOS2 蛋白表达水平显

著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$),HQ-XYD 组小鼠肺组织中 NOS2 蛋白表达水平显著降低($P < 0.001$),HQ-XYD 组小鼠肺组织中 PTGS2 和 HSP90 蛋白表达水平差异无统计学意义。详见图 16 和图 17。

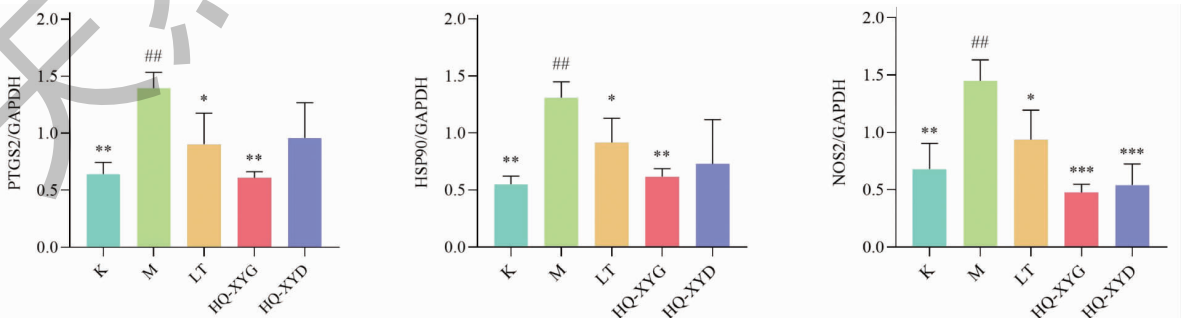


图 16 各组小鼠肺组织中 PTGS2、HSP90 和 NOS2 蛋白表达水平比较。

Fig. 16 Comparison of PTGS2, HSP90 and NOS2 protein levels in lung tissue of each group.

注:与对照组比较,## $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。Note:Compared with C group,## $P < 0.01$;Compared with M group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

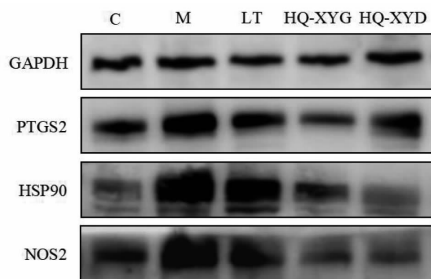


图 17 各组小鼠肺组织中 PTGS2、HSP90 和 NOS2 蛋白表达水平比较

Fig. 17 Comparison of PTGS2, HSP90 and NOS2 protein levels in lung tissue of each group

3 讨论与结论

治疗 AR 的中药用药频次分析中,使用频次最高的前五位中药为辛夷、黄芪、防风、甘草、苍耳子。辛夷作为用药频次最高的单味中药,性温,能散风寒、通鼻窍,主要成分为挥发油类、木脂素类及生物碱类化合物,具有保护黏膜、改善局部血液循环、抗炎、抗菌、抗过敏、抗氧化以及舒张平滑肌等广泛的药理作用^[18]。辛夷常作为君药用于治疗各种鼻炎及鼻部疾病的药剂中,如辛夷鼻炎丸、鼻炎康片、鼻渊丸、通窍鼻炎颗粒、辛芳鼻炎胶囊、辛夷散、辛夷丸、辛夷膏、鼻窦灌注液等。李时珍在《本草纲目》^[19]中也记载:“辛夷能温中,治头面目鼻九窍之病”。

经研究发现,在 252 首中药方剂中,药物分类主要以解表药(辛夷、防风、细辛、白芷、桂枝等)和补虚药(黄芪、甘草、白术、等)为主,药性大多集中于温,药味以辛、甘为主。温药具有温中祛寒、补火助阳的作用,辛味药能散风寒、行气血,甘味药有调和药性、补益和中的作用,药物归经多涉及肺经、脾经和肝经。综合分析,治疗 AR 的单味中药多为辛温解表药(辛夷、防风、苍耳子、细辛、白芷、桂枝等),主要用于恶寒发热、头痛、无汗、肢体酸痛、清涕、鼻塞、苔薄白、喉痒咳嗽、脉浮的风寒表现。

在关联规则分析中,支持度较高的核心药物组合为黄芪-白术-防风-辛夷、黄芪-苍耳子-白术-防风、黄芪-白芷-白术-辛夷、黄芪-苍耳子-白术-防风-辛夷、黄芪-白芷-白术-防风、黄芪-白芷-白术-防风-辛夷,由此可见,中药治疗 AR 多选用解表药、补虚药、祛风解湿药,符合中医对 AR 发病机制(肺气虚寒、脾气虚弱、肾阳亏虚以及风寒袭表)的理解。除五味子、蝉蜕和薄荷外,其余高频药物常用剂量均在

《中国药典》规定用量范围内。

在聚类分析中,聚一类中药以补虚药和解表药为主,其中一组黄芪的主要活性成分黄芪多糖可以缓解 AR 喷嚏、挠鼻和流涕等症状,能够通过上调 AR 大鼠鼻黏膜组织中 T-bet 和 IFN- γ mRNA 表达、下调 GATA-3 和 IL-4 mRNA 表达减轻 AR 大鼠鼻黏膜组织炎症情况^[20],并能够降低血清 IL-4、IL-6、IL-1 β 、IgE、TNF- α 等炎症因子的水平促进 AR 的痊愈^[21]。防风具有祛风解表、胜湿止痒的功效,防风多糖经体外实验证明有良好的抗过敏功效,防风醇提物能够通过降低体外细胞的 PAR-2 的表达发挥抗过敏作用^[22]。桂枝具有发汗解肌,温通经脉,助阳化气,散外感风邪的功效。聚二类苍耳子有散风寒、通鼻窍、祛风湿之功效,用于风寒头痛、鼻塞流涕、鼻鼾、鼻渊、风湿瘙痒、湿痹拘挛;苍耳子正丁醇萃取部位能够缓解 AR 豚鼠的鼻黏膜炎症反应,降低白细胞数、嗜酸粒细胞百分比、血清 SIgE 水平^[23];苍耳子水提物能够减轻 AR 豚鼠鼻黏膜脱落、组织水肿及炎症细胞浸润等症状,降低血清中炎症细胞因子 IgE、IL-4 和 IFN- γ 的表达水平^[24]。

本文通过 TCMS 数据库搜索及文献补充,共得到黄芪-辛夷药对中的有效成分共有 48 个,对应作用靶点 306 个,每个成分都多用于多个靶点,为进一步说明作用靶点与成分之间的关系,将成分靶点与疾病靶点取交集后构建“成分-靶点-疾病”网络,显示主要成分山柰酚、槲皮素与靶点关联度最高,可能是黄芪-辛夷治疗 AR 的关键成分,发挥重要的药理作用。有研究表明山柰酚能够通过改善肠道屏障的完整性降低肠道炎症的发生,且具有显著的抗高血糖、抗氧化作用^[25];槲皮素能够通过抑制 galectin-3 和 NLRP3 的结合显著降低动脉粥样硬化性炎症^[26]。进一步通过 KEGG 通路分析,发现神经活性配体-受体相互作用通路、钙离子信号通道、类固醇激素生物合成通路和癌症通路是黄芪-辛夷抗 AR 的主要作用通路,涉及 34 个活性成分和 39 个核心靶点,通过分析“成分-靶点-通路-疾病”关系,我们发现 PTGS2、HSP90、NOS2、CALM1、CHRM1、CYP1B1 等是通路中起主要作用的靶点蛋白。PTGS2 参与炎症或肿瘤等病理反应,是非甾体类抗炎药物的作用靶点,能够被促炎细胞因子和生长因子等高度诱导分泌炎症因子,引发炎症反应^[27]。HSP90 是一种 ATP 依赖性分子伴侣,能够协助客户蛋白完成正确的空间折叠并参与细胞周期调节,有

研究表明在机体生理应激状态下 HSP90 能够调控淋巴细胞的活化、促进淋巴细胞迁移至感染部位、促进局部炎症反应的发生^[28]。NOS2 是一种机体损伤后诱导表达的诱导型一氧化氮合成酶,能够利用一氧化氮的氧化应激作用参与机体的免疫调控和炎症反应。CALM1 是一种钙调蛋白,CALM1 过表达能异常激活细胞钙离子信号通道,最终引发机体炎症反应和一定程度的肝脏损伤。CHRM1 是一种副交感神经受体,有研究表明 CHRM1 激动剂能够通过增强细胞钙离子活性调控神经元分化^[29],在分子对接验证中与山柰酚结合能低、可通过调控激活钙离子通道引发细胞炎症因子的释放。CYP1B1 是类固醇激素合成通路的主要参与蛋白,类固醇激素具有显著的抗炎抗过敏等免疫调控作用,在分子对接验证中与槲皮素和山柰酚有良好稳定的结合能力。通过上述分析可以看出,黄芪-辛夷中主要成分可能通过 PTGS2、HSP90、NOS2、CALM1、CHRM1、CYP1B1 等靶点作用于神经活性配体-受体相互作用通路、钙离子信号通道、类固醇激素生物合成通路和癌症通路发挥治疗 AR 的作用。本研究为进一步验证上述预测结果的可靠性,构建豚草花粉诱导的 AR 小鼠模型展开体内实验验证,研究结果表明:黄芪-辛夷药对能够降低 AR 小鼠体内 PTGS2、HSP90、NOS2 的蛋白表达,抑制 AR 小鼠血清、鼻腔灌洗液和肺泡灌洗液中炎症因子组胺、IgE、TNF- α 和 IL-6 的表达水平,升高抗炎因子 IL-10 的表达,显著缓解 AR 小鼠挠鼻和打喷嚏症状,揭示了黄芪-辛夷药对可能通过抑制 HSP90/PTGS2/NOS2 通路,进而抑制炎症反应的发生发展,达到干预 AR 的效果。

综上所述,通过数据挖掘统计分析和网络药理学技术对临床治疗 AR 的用药规律进行总结,并深入研究高频药物组合黄芪-辛夷治疗 AR 的分子作用机制,分子对接模拟验证了黄芪-辛夷多成分、多靶点、多通路的作用特点,并通过体内实验验证了黄芪-辛夷药对可能是通过抑制 HSP90/PTGS2/NOS2 通路进而抑制炎症反应的发生、缓解小鼠 AR 症状、最终达到治疗 AR 的作用。本研究结果能够为辛夷-黄芪药对在临床上的合理用药提供科学的理论依据,进一步推动中药治在疗变应性鼻炎中的应用。

参考文献

1 Qiao J, Yang Y, Yu YM. Recent advances in pathogenesis and medicine of allergic rhinitis[J]. Chin Med Dig: Otorhi-

nolaryngol(中国医学文摘耳鼻喉喉科学),2021,36:166-168.

2 Mao DH, Li LL, Zhang F, et al. Clinical efficacy observation of prevention and recuperation with traditional Chinese medicine characteristics in treating allergic rhinitis[J]. J Emerg Tradit Chin Med(中国中医急症),2021,30:140-143.

3 Wang M, Zheng M, Wang XD, et al. Progress in epidemiological research on allergic rhinitis in China[J]. Chin Arch Otolaryngol Head Neck Surg(中国耳鼻咽喉头颈外科),2019,26:415-420.

4 Wu ZK, Zhu XH. Advances in correlation between obstructive sleep apnea hypopnea syndrome and allergic rhinitis[J]. J Chongqing Med(重庆医学),2019,48:3351-3354.

5 Lei CF, Zhai CM, Ma CY, et al. A clinical study on treating allergic rhinitis of Yangxu Feihan type with the Shuangxin Biqu powder[J]. Clin J Chin Med(中医临床研究),2020,12:11-16.

6 Hu Y. Observation on the therapeutic effect of traditional Chinese medicine acupoint application on allergic rhinitis[J]. Pract Clin J Integr Tradit Chin West Med(实用中西医结合临床),2020,20:99-100.

7 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I(中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015.

8 Gao XM, Zhong GS. Traditional Chinese Medicine[M]. Beijing: People's Medical Publishing House(人民卫生出版社),2013.

9 He ZQ, Wang BQ. Isolation and identification of chemical components in *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* [J]. Acta Pharm Sin(药学学报),1990,25:694-698.

10 Wang QX, Guo sheng, Shen KX. Chemical composition analysis and value evaluation of the stems and leaves of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2023,48:6600-6612.

11 Xie KH, Liu XH, Jia J, et al. Hederagenin ameliorates cisplatin-induced acute kidney injury via inhibiting long non-coding RNA A330074k22Rik/Axin2/ β -catenin signalling pathway[J]. Int Immunopharm,2022,112:109247.

12 Wang W, Chen HB, Wang WM, et al. Studies on flavonoid constituents of *Hedysarum multijugum*[J]. Acta Pharm Sin(药学学报),2002,37:196-198.

13 Subarnas A, Yoshiteru O, Hiroshi H. Isoflavans and a pterocarpan from *Astragalus mongholicus* [J]. Phytochemistry, 1991,30:2777-2780.

14 Zhang MJ, Liu J, Nie HJ, et al. Jaranol attenuating Ang II-induced HA-SMCs proliferation by inhibiting NOX4/ROS/NF- κ B pathway[J]. China Pharm(中国药师),2022,25:

- 1697-1702.
- 15 Guo L, Hua J, Luan Z, et al. Effects of the stems and leaves of *Astragalus membranaceus* on growth performance, immunological parameters, antioxidant status, and intestinal bacteria of quail[J]. *Anim Sci J*, 2009, 90:747-756.
- 16 Lim TK. Edible Medicinal and Non Medicinal Plants: Volume 8, Flowers[M]. Dordrecht: Springer, 2014: 236-242.
- 17 Kuroyanagi M, Yoshida K, Yamamoto A, et al. Bicyclo[3.2.1]octane and 6-Oxabicyclo[3.2.2]nonane type neolignans from *Magnolia denudata*[J]. *Chem Pharm Bull*, 2000, 48: 832-837.
- 18 Yuan L, Zhang J, Liu LM, et al. Effect of Chinese herbal extracts on biofilm formation of *Staphylococcus aureus*[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2022, 34: 1273-1280.
- 19 Qian YM. Essentials of the Compendium of Materia Medica (《本草纲目》精要)[M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press(广东科学技术出版社), 1988.
- 20 Xu JT, Zhang LJ, Xie SY, et al. Effect of *Astragalus* polysaccharides on Th1/Th2 immune balance in rats with allergic rhinitis[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2020, 31: 2613-2616.
- 21 Tian Y, Zhang F, Duan CX. The effect of astragaloside IV on HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway in mice with allergic rhinitis[J]. *Curr Immu* (现代免疫学), 2021, 41: 50-55.
- 22 Wu XB, Jin SR, Li SM, et al. Effect of *Saposhnikovia Radix* extract on PAR-2 Expression and related cytokine secretion of mast cells[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2016, 22: 123-126.
- 23 Xiao AJ, Yin MZ, Yu X, et al. Effect of n-butanol extract in *Fructus Xanthii* on the experimental allergic rhinitis[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2015, 31: 113-115.
- 24 Sun XC, Zhang Q, Zhang XM, et al. Effect of *Fructus Xanthii* water extract on nasal mucosal lesion and serum inflammatory cytokines in guinea pigs with allergic rhinitis[J]. *J Anhui Univ Tradit Chin Med* (安徽中医药大学学报), 2019, 38: 44-48.
- 25 Bian Y, Lei J, Zhong J, et al. Kaempferol reduces obesity, prevents intestinal inflammation, and modulates gut microbiota in high-fat diet mice[J]. *J Nutr Biochem*, 2022, 99: 108840.
- 26 Li H, Xiao L, He H, et al. Quercetin attenuates atherosclerotic inflammation by inhibiting galectin-3-NLRP3 signaling pathway[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2021, 65: 2000746.
- 27 Wang Y, Gao X, Li Y, et al. SFTPB regulates PTGS2 and inflammation in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Exp Physiol*, 2021, 106: 1303-1311.
- 28 Hallett ST, Pastok MW, Morgan RL, et al. Differential regulation of G1 CDK complexes by the Hsp90-Cdc37 chaperone system[J]. *Cell Rep*, 2017, 21: 1386-1398.
- 29 Li WP, Su XH, Hu NY, et al. Astrocytes mediate cholinergic regulation of adult hippocampal neurogenesis and memory through M1 muscarinic receptor[J]. *Biol Psychiatry*, 2022, 92: 984-998.