

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2025.11.006

罗洁伦, 胡昌华, 刘雪梅. 枇杷核来源的苦杏仁苷干预肺气肿的作用机制研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2025, 47(11): 73-87.

枇杷核来源的苦杏仁苷干预肺气肿的作用机制研究

罗洁伦, 胡昌华, 刘雪梅

西南大学药学院, 重庆 400715

摘要: 为加强对枇杷核资源的综合开发利用, 基于网络药理学探究枇杷核来源的苦杏仁苷干预肺气肿的可能机制。整合疾病靶点与枇杷核 6 种成分作用靶点筛选结果, 最终聚焦于苦杏仁苷; 通过超声辅助提取枇杷核中苦杏仁苷并完成含量测定; 通过构建 PPI 网络, GO/KEGG 富集分析筛选出核心靶点, 并进行分子对接, 采用体外实验验证靶点机制与信号通路, 最终测得枇杷核中苦杏仁苷的提取率为 $(1.59 \pm 0.14)\%$; 网络药理学筛选出苦杏仁苷与肺气肿交集靶点共 181 个, 核心靶点包括 AKT1、CASP3、PIK3CD 等; 富集分析结果显示苦杏仁苷能够通过调控蛋白磷酸化及水解, 从而影响 PI3K/AKT 通路和凋亡通路, 影响肺气肿的发展, 核心靶点分子对接结合能均小于 -7 kcal/mol。体外研究表明: 苦杏仁苷能够抑制香烟烟雾提取物(CSE)诱导的肺癌人类肺泡基底上皮细胞(A549)的凋亡与氧化应激, 并直接阻断 AKT 磷酸化及 PI3K/AKT 通路激活。综合表明: 苦杏仁苷能够通过抑制细胞凋亡、氧化应激及 PI3K/AKT 通路干预肺气肿的发生发展。

关键词: 枇杷核; 苦杏仁苷; 肺气肿; 网络药理学; 分子对接

中图分类号: S667.3; R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1673-9868(2025)11-0073-15

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Study of the Mechanisms of Amygdalin from Loquat Seed in Intervention of Pulmonary Emphysema

LUO Jielun, HU Changhua, LIU Xuemei

College of Pharmacy, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: To strengthen the comprehensive development and utilization of loquat kernel resources, this

收稿日期: 2025-07-10

基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFD1600803-9)。

作者简介: 罗洁伦, 硕士研究生, 主要从事分子药理学研究。

通信作者: 刘雪梅, 教授。

study explored the potential mechanism of amygdalin derived from loquat kernels in treating pulmonary emphysema based on network pharmacology combined with molecular docking. Disease targets and targets of six loquat kernel components were integrated, with a focus on amygdalin. Amygdalin was extracted by ultrasound from loquat kernels and the content was determined. Core targets were screened via PPI network construction, GO/KEGG enrichment analyses, and molecular docking. Key mechanisms and signaling pathways were validated through in vitro experiments. The content of amygdalin in loquat kernels was about $(1.59 \pm 0.14)\%$. Network pharmacology identified 181 intersection targets of amygdalin and pulmonary emphysema, including core targets (AKT1, CASP3, PIK3CD). Enrichment analyses revealed that amygdalin modulates protein phosphorylation/hydrolysis, impacts the PI3K/AKT and apoptosis pathways, and influences emphysema progression. Molecular docking confirmed strong binding (all binding energies < -7 kcal/mol) to core targets. In vitro studies demonstrated that amygdalin suppresses CSE-induced apoptosis and oxidative stress in A549 cells, and directly inhibits AKT phosphorylation and PI3K/AKT pathway activation. In summary, amygdalin can intervene the occurrence and development of pulmonary emphysema by inhibiting apoptosis, oxidative stress, and the PI3K/AKT pathway.

Key words: loquat seed; amygdalin; pulmonary emphysema; network pharmacology; molecular docking

枇杷是一种传统中药材,富含黄酮类、三萜酸类、多酚类等多种药用活性成分。以枇杷为主要原料的中成药(如川贝枇杷胶囊^[1]、半夏枇杷糖浆^[2]、强力枇杷露^[3]、川贝枇杷膏^[4]等)具有改善气道炎症性水肿、扩张支气管、改善呼吸不畅等作用,常被用于缓解肺气肿。枇杷核作为枇杷的种子,富含苦杏仁苷、总黄酮、挥发油、三萜酸、多酚等活性成分,其中,苦杏仁苷是多种蔷薇科类中药材种子部位(杏仁、桃仁等)的重要药效成分,并且在枇杷核中含量远高于其他成分,约为 2.11% ^[5-6]。枇杷核常作为枇杷果肉的加工产物被废弃,因此,开发利用枇杷核中的活性成分有着很高的经济和药用价值。

苦杏仁苷是广泛存在于蔷薇科植物果仁(杏仁、桃仁、枇杷核等)中的一种氰苷类化合物,有着抗癌、抗炎、抗氧化应激、抗器官纤维化^[7]、促血管修复^[8]、免疫调节等药理作用^[9-10]。目前苦杏仁苷入药的多种复方中药材被用于缓解肺气肿,例如麦杏补肺汤^[11]、厚朴麻黄汤^[12]、清肺化痰汤^[13]、杏苏止咳颗粒^[14]等,具有降气化痰、清肺止咳等功效,能够改善患者咳嗽、咳痰、喘息、胸闷、乏力等症状,证明含有苦杏仁苷的中药复方对肺气肿有着潜在的疗效,但具体作用机制尚不清晰。本研究采用网络药理学和分子对接手段,针对枇杷核中 6 种代表性组分治疗肺气肿的可能靶点进行预测,最终聚焦于苦杏仁苷,通过超声辅助提取枇杷核中的苦杏仁苷并完成含量测定,再通过体外实验验证,阐明苦杏仁苷干预肺气肿的作用机制,为枇杷核药用资源的开发利用提供可能的方向。

1 材料与方法

1.1 肺气肿的靶点筛选

分别对枇杷核中的代表成分苦杏仁苷、槲皮素、山奈酚、熊果酸、绿原酸、阿魏酸进行靶点预测。通过 PubChem 数据库获取 2D 结构文件,并采用 SwissTargetPrediction、PharmMapper、SuperPred 数据库进行预测,将结果以 Probability 大于 0 和 Norm Fit 超过中位数作为条件进行筛选,经整合去重后得到药物靶点;以“Emphysema”为关键词,在 CTD、GeneCards 数据库中搜集与肺气肿相关的疾病靶点。GeneCards 数据库结果去除重复值和无 UniProt ID 的项目,并以 Relevance Score 超过中位数作为筛选条件;CTD 数据库以 Inference Score 超过 40 为筛选条件,将结果整合去重后得到肺气肿的预

测靶点。相关网站及数据库如表 1。

表 1 靶点预测所用数据库

数据库名称	网址
PubChem ^[15]	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/
SuperPred ^[16]	https://prediction.charite.de/
SwissTargetPrediction ^[17]	http://www.swisstargetprediction.ch/
PharmMapper ^[18]	https://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/
GeneCards ^[19]	https://www.genecards.org/
Uniprot ^[20]	https://www.uniprot.org/
bioDBnet ^[21]	https://biodbnet-abcc.ncifcrf.gov/
CTD ^[22]	https://ctdbase.org/
DAVID ^[23]	https://david.ncifcrf.gov/home.jsp
微生信 ^[24]	https://www.bioinformatics.com.cn/
AlphaFold ^[25]	https://alphafold.com/
STRING ^[26]	https://cn.string-db.org/

1.2 靶点整合及蛋白互作网络的构建

将预测得到的苦杏仁苷和肺气肿的交集靶点上传至 STRING 数据库中, 将目标生物类别设置为“智人 (Homo Sapiens)”, 置信度设置为“high confidence(0.700)”, 输出结果后导入 Cytoscape 3.7.1 软件中, 通过 Cyto NCA 插件对结果进行拓扑学分析, 计算节点度, 构建交集靶点的蛋白互作网络图, 并以节点度由大到小进行排序, 得到前 20 个核心靶点。

1.3 GO 和 KEGG 富集分析

采用 DAVID 数据库完成 GO 和 KEGG 富集分析, 并通过微生信在线作图平台绘制 GO 和 KEGG 富集分析柱状图和气泡图。

1.4 分子对接

使用分子对接模拟苦杏仁苷与核心靶点之间的潜在关系, 首先从 AlphaFold 数据库中获得靶点蛋白的 3D 结构文件, 再从 PubChem 数据库中获得苦杏仁苷的 3D 结构文件, 通过 Open Babel GUI 软件对格式进行转换后, 导入 AutoDockTools 1.5.7 中, 分别进行去水、加氢、检查扭转键等操作后, 通过 vina 插件进行全分子对接, 将对接结果导入 PyMOL 2.2.0 软件进行可视化分析。

1.5 实验仪器与耗材

电子天平, 梅特勒—托利多; 超净工作台, 苏州净化设备有限公司; 电泳及转膜装置、qPCR 仪, Bio-rad; 荧光倒置显微镜, 奥林巴斯; 酶标仪, Molecular Devices; 高速低温离心机、细胞恒温培养箱、微量分光光度计, Thermo; PVDF 膜, Millipore; 苦杏仁苷, 源叶; SC79(AKT 激活剂)、Hoechst 3258、活性氧检测试剂盒、RIPA 变性裂解液, 碧云天; PMSF, Solarbio; DMSO, MP biomedical; Tween-20, Biosharp; 1.5 M Tris-HCl, Solarbio; SDS, Biofroxx; 磷酸化蛋白酶抑制剂, Servicebio; Trizol、Evo M-MLV RT Kit with、gDNA Clean Premix Pro Taq HS qPCR Kit, 艾科瑞; 胎牛血清, Adamas; Ham's F-12k 培养基, Gibco 等。

1.6 枇杷核中苦杏仁苷的提取及含量测定

1.6.1 苦杏仁苷的提取

选择西南大学华白一号枇杷的新鲜种子作为研究对象, 去除表皮杂质, 粉碎并过 100 目筛后置于

100 ℃灭活酶 3 min; 再加入 4 倍体积的正丁烷, 脱脂搅拌 3 h, 室温挥干溶剂; 最后置于 55 ℃烘箱中干燥 30 min 得枇杷核粉末。采用超声辅助提取苦杏仁苷: 以 60% 乙醇为提取溶剂, 按 1:20 料液比进行投料, 50 ℃、40 kHz 提取 45 min, 待反应结束, 7 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤即为样品溶液, 等待上机检测。

1.6.2 苦杏仁苷含量的测定

精密称取 10 mg 苦杏仁苷标准品, 甲醇溶解并定容至 10 mL, 即为 1 mg/mL 苦杏仁苷母液, 分别稀释至 500、250、125、25、5 μg/mL 梯度溶液。色谱柱选用 C18 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相选择 20% 甲醇溶液等度洗脱, 流速设置为 1 mL/min, 柱压 30 mPa, 检测波长为 208 nm, 以 x 为杏仁苷标准品的质量浓度(mg/mL), y 为峰面积绘制标准曲线。按照上述方法测定样品溶液, 将峰面积代入标准曲线, 计算得到苦杏仁苷的质量浓度(μg/mL)。

1.7 体外实验方法

1.7.1 香烟烟雾提取物(CSE)的制备

为了模拟临床肺气肿, 本研究采用香烟烟雾提取物刺激肺癌人类肺泡基底上皮细胞(A549)构建肺气肿细胞模型^[27]。取 50 mL 包氏管, 左接蠕动泵, 右接云烟牌香烟(每支焦油 8 mg、烟碱 0.8 mg、一氧化碳 7 mg, 使用前去除滤嘴), 内部为 20 mL Ham's F-12k 完全培养基。点燃香烟, 蠕动泵流速调节至 30 mL/min, 使烟雾通过导管沉降并逐渐溶于培养基中, 总共抽吸 5 支香烟, 过程可见培养基溶液颜色由粉色逐渐变为黄色, 伴有不溶性碎屑。抽吸完毕, 静置 30 min, 调整 pH 值为 7.2~7.4, 经 0.22 μm 水系微孔滤膜过滤, 高效液相色谱法(HPLC)测得提取液中烟碱质量浓度为 1 675.29 μg/mL, 记为 100% CSE, 分装后暂存于-20 ℃冰箱中, 于 1 个月内使用完毕。

1.7.2 MTT 法检测苦杏仁苷和 CSE 对 A549 细胞活性的影响

A549 细胞由中国科学院细胞库提供。将 A549 细胞以每孔 3 000 个铺至 96 孔板中, 加 Ham's F-12k 100 μL 培养至贴壁后, 加入梯度浓度的苦杏仁苷或 CSE, 分别培养 24、48、72 h; 培养结束后, 每孔加入 20 μL MTT 试剂, 37 ℃孵育 4 h, 吸出孔内溶液, 每孔加入 150 μL 二甲基亚砜(DMSO), 充分振荡 10 min 使沉淀充分溶解, 于 490 nm 处检测每孔吸光度值(OD), 并计算细胞存活率($R_{存活}$)。选取抑制细胞 50% 活力的 CSE 浓度作为造模浓度, 保留细胞 80% 以上活力的苦杏仁苷浓度作为安全浓度进行后续实验。

$$R_{存活} = \frac{OD_{实验组} - OD_{调零组}}{OD_{对照组} - OD_{调零组}} \times 100 \quad (1)$$

式中: $OD_{实验组}$ 代表经苦杏仁苷或 CSE 处理后的培养孔吸光度值; $OD_{对照组}$ 代表未经药物处理的培养孔吸光度值; $OD_{调零组}$ 代表调零组(Ham's F-12k 100 μL+MTT 20 μL+DMSO 150 μL)吸光度值。

1.7.3 Hoechst33258 染色检测 CSE 和苦杏仁苷对 A549 细胞凋亡的影响

将 A549 细胞铺至 6 孔板, 培养至一定密度后, 加入低、高浓度的苦杏仁苷, 培养 2 h 后加入 CSE, 继续培养至 48 h, 每孔加入 Hoechst33258 染色试剂 1 mL, 于 37 ℃培养箱中孵育 20 min, 弃去培养基, PBS 清洗后于荧光显微镜下观察并拍照。

1.7.4 DCFH-DA 探针检测 CSE 和苦杏仁苷对 A549 细胞总活性氧(ROS)水平的影响

将 A549 细胞铺至 6 孔板, 培养至一定密度后, 加入低、高浓度的苦杏仁苷, 培养 2 h 后加入 CSE, 继续培养至 48 h, 每孔加入 DCFH-DA 试剂 1 mL, 于 37 ℃培养箱中孵育 20 min, 弃去培养基, PBS 清洗后于荧光显微镜下观察并拍照。

1.7.5 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)

采用 Trizol 法提取 A549 细胞的总 RNA, 去除基因组 DNA, 并将其反转录为 cDNA, 设计并合成引物, 按照相应体系和程序进行 qRT-PCR 反应, 结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析并作图。

1.7.6 蛋白免疫印迹实验(Western Blot, WB)

总蛋白的提取全程于冰上进行。采用 RIPA 裂解液混合体系(RIPA 裂解液、PMSF、磷酸化蛋白酶抑制剂比例为 98 : 1 : 1)裂解细胞后, 离心取上清液, 即为总蛋白溶液。采用 BCA 法对蛋白进行定量后, 加入相应比例的 Loading Buffer 后进行蛋白煮样。通过 SDS-PAGE 分离蛋白, 采用湿转法将蛋白样品转移至 PVDF 膜上, 浸泡于 5% 脱脂蛋白摇床 2 h 以封闭非特异性位点, 将膜浸泡于一抗中, 4 °C 恒温摇床孵育过夜; 将膜取出浸泡于对应二抗中, 摇床孵育 1~2 h 后显影, 通过 Image J 分析蛋白条带灰度值。

1.7.7 免疫荧光染色实验(IF)

将 A549 细胞铺至 12 孔板, 培养至一定密度后, 分别加入苦杏仁苷、苦杏仁苷联合 SC79 溶液(AKT 激活剂), 培养 2 h 后加入 CSE 并继续培养 24 h; 每孔加入 1 mL 4% 多聚甲醛, 室温固定 30 min; 每孔加入 1 mL Triton X-100, 室温通透 30 min; 每孔加入 1% BSA, 室温封闭 1 h; 每孔加入 150 μ L 一抗, 4 °C 湿盒孵育过夜, 回收一抗, 避光条件下每孔加入 200 μ L 荧光二抗, 孵育 1.5 h; 每孔加入 1 mL DAPI, 避光染色 5 min, 于荧光显微镜下观察拍摄, 通过 Image J 分析荧光强度。

1.8 数据处理与分析

结果均为 3 次以上独立重复实验所得, 数据采用 SPSS 21.0 进行统计分析, GraphPad Prism 9.5 作图, 单因素方差分析(one-way ANOVA)比较多组间差异, $p < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

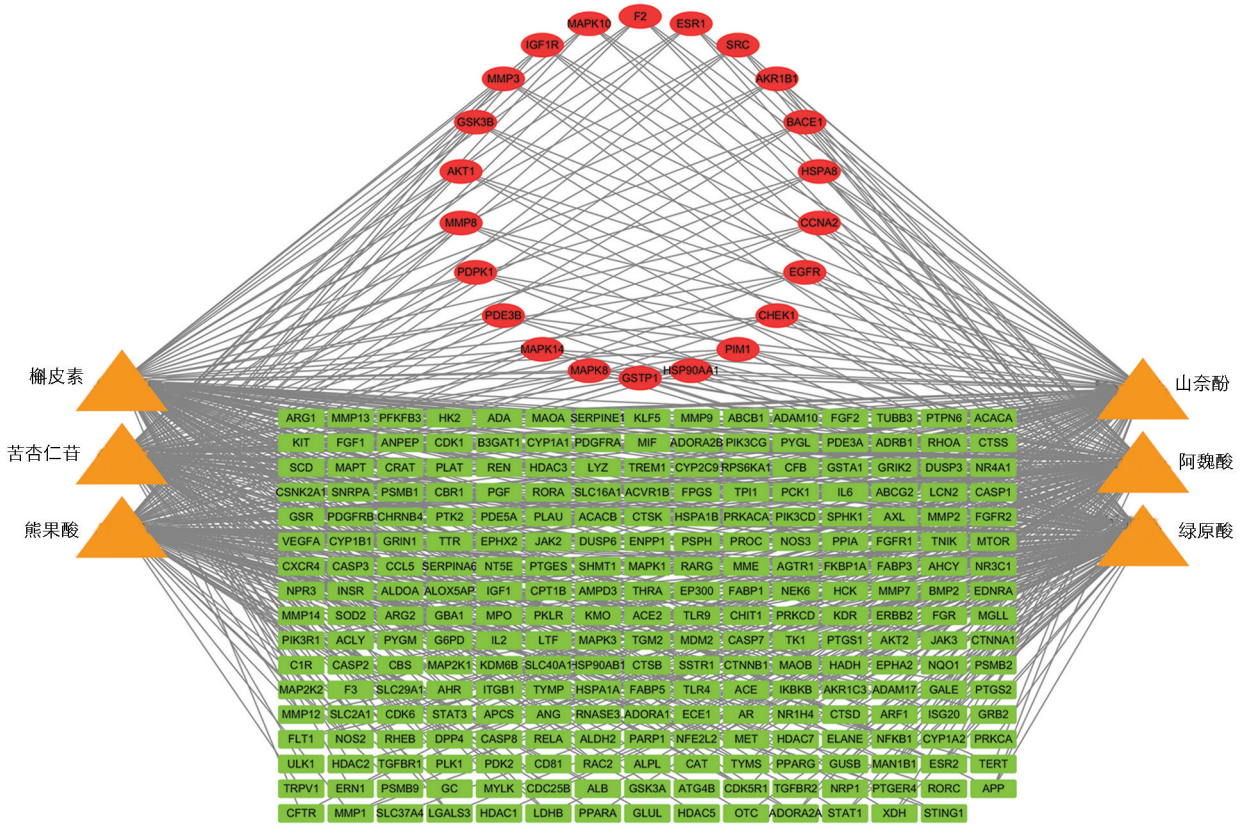
2.1 枇杷核活性成分靶点及肺气肿靶点预测

为了探究枇杷核中化学成分与肺气肿发生发展之间的可能关联, 采用 SwissTargetPrediction、PharmMapper、SuperPred 数据库, 对枇杷核中的苦杏仁苷、槲皮素、山奈酚、熊果酸、绿原酸和阿魏酸共 6 种主要成分进行靶点预测, 取并集后分别得到了 250、316、218、282、316、278 个活性成分靶点; 随后, 采用 GeneCards、CTD 数据库对肺气肿进行靶点预测, 经筛选整合得到 3 010 个肺气肿靶点。

将 6 种活性成分靶点与肺气肿靶点取交集, 共得到 181、131、100、119、141、136 个交集靶点, 并绘制活性成分靶点网络图(图 1), 其中, 6 种活性成分的共同作用靶点有 22 个, 包括 GSTP1、HSP90AA1、EGFR、HSPA8、SRC、ESR1、AKT1、MMP8、MAPK14 等, 涉及 EGFR、PI3K/AKT、MAPK 等信号通路。考虑到枇杷核中苦杏仁苷的含量远高于其他组分, 在开发利用枇杷核过程中价值更高, 因此, 本研究选择了苦杏仁苷作为后续研究对象。

2.2 蛋白质互作网络(PPI)的构建及核心靶点的筛选

将苦杏仁苷与肺气肿的靶点取交集, 共得到 181 个可能靶点。将结果导入 STRING 数据库中, 选择高置信度(0.700), 输出并导入 Cytoscape 3.7.1 软件, 去除独立蛋白, 计算靶点节点度并从大到小排序, 以红—橙—黄色节点区分优先级, 绘制蛋白互作网络图(图 2)。其中, 节点度排名前 20 的蛋白包括 AKT1、EGFR、HSP90AA1、SRC、TLR4、ESR1、MAPK8、MAPK1、CASP3、PIK3CD 等(表 2), 这些蛋白在网络中起枢纽作用, 具有成为苦杏仁苷治疗肺气肿核心靶点的潜力。



橘色节点：6 种枇杷核中有效成分；红色节点：6 种成分的共同作用靶点；绿色节点：6 种成分的所有作用靶点。

图 1 枇杷核活性成分靶点网络图

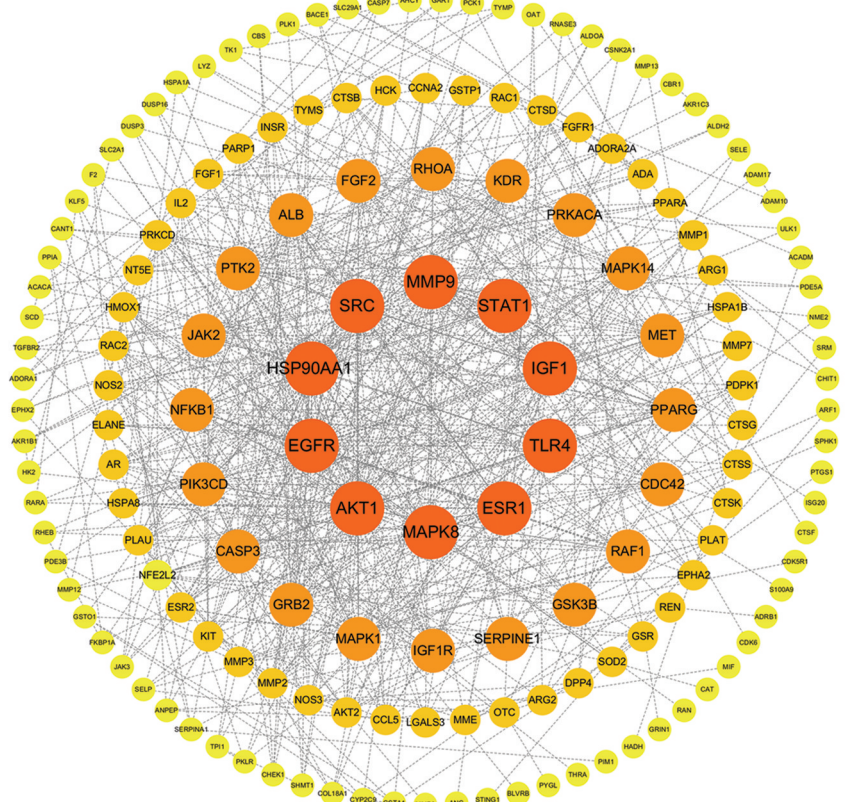


图 2 苦杏仁苷与肺气肿的关键靶点互作网络图

表 2 前 20 个核心靶点的节点度

序号	靶点	节点度	序号	靶点	节点度
1	AKT1	47.0	11	MAPK1	23.0
2	EGFR	41.0	12	GRB2	22.0
3	HSP90AA1	39.0	13	CASP3	22.0
4	SRC	36.0	14	PIK3CD	21.0
5	MMP9	33.0	15	NFKB1	21.0
6	STAT1	25.0	16	JAK2	20.0
7	IGF1	24.0	17	PTK2	19.0
8	TLR4	24.0	18	ALB	19.0
9	ESR1	23.0	19	FGF2	19.0
10	MAPK8	23.0	20	MET	18.0

2.3 交集靶点的 GO 和 KEGG 富集分析结果

GO 和 KEGG 富集分析结果见图 3。

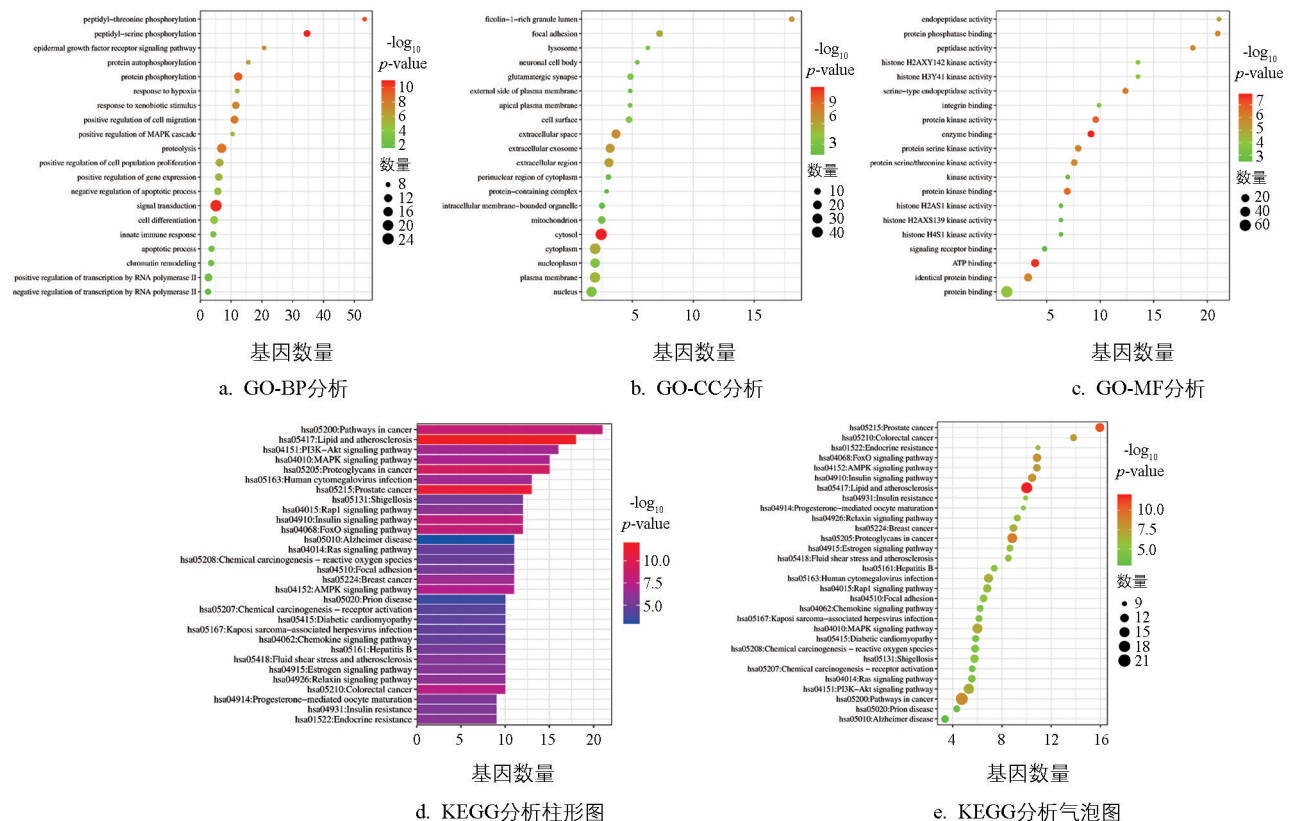


图 3 苦杏仁苷干预肺气肿的 GO 和 KEGG 富集分析图

苦杏仁苷干预肺气肿的生物过程 (Biological Process, BP) 主要涉及肽基丝氨酸磷酸化 (peptidyl-threonine phosphorylation)、蛋白质自磷酸化 (protein autophosphorylation)、蛋白水解 (proteolysis)、细胞增殖的正向调控 (positive regulation of cell population proliferation)、凋亡过程的负调控 (negative regulation of apoptotic process) 等; 细胞组分 (Cellular component, CC) 包括富含纤维胶凝蛋白-1 的颗粒管腔 (ficolin-1-rich granule lumen)、黏着斑 (focal adhesion)、谷氨酸能突触 (glutamatergic synapse)、细胞表面 (cell surface) 等; 分子功能 (Molecular function, MF) 包括内肽酶活性 (endopeptidase activity)、蛋白磷酸酶活性

(protein phosphatase binding)、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性 (protein serine/threonine kinase activity)、信号受体结合 (signaling receptor binding) 等(图 3a-3c)。KEGG 富集分析共富集到了 130 条信号通路, 综合基因数量、显著性和富集程度分析, 主要涉及癌症发病途径 (Pathways in cancer)、叉头框蛋白 O 信号通路 (FoxO signaling pathway)、脂质与动脉粥样硬化 (Lipid and atherosclerosis)、丝裂原活化蛋白激酶信号通路 (MAPK signaling pathway)、磷脂酰肌醇 3 激酶—蛋白激酶 B 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)、化学致癌—活性氧信号通路 (Chemical carcinogenesis-reactive oxygen species) 等(图 3d, 3e)。以上结果提示, 苦杏仁苷可能通过促进蛋白磷酸化、蛋白水解, 激活 PI3K/AKT 信号通路、抑制凋亡信号通路等机制干预肺气肿的发生与发展。

2.4 核心靶点分子对接结果

将苦杏仁苷分别与前 20 个核心靶点进行分子对接, 结果如表 3。以对接结合能为判断标准, 结合能小于 -5 kcal/mol 证明结合较稳定, 小于 -7 kcal/mol 证明结合很稳定。GO 和 KEGG 富集分析结果指出, 苦杏仁苷对 PI3K/AKT 和凋亡通路的影响较为突出, 并且苦杏仁苷与 AKT1、PIK3CD 和 CASP3 的对接结合能均小于 -7 kcal/mol (图 4), 因此, 苦杏仁苷很有可能通过上述靶点及信号通路影响肺气肿的发展。

表 3 苦杏仁苷与前 20 个核心靶点分子对接结果

靶点	结合能/($\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)	靶点	结合能/($\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)
AKT1	-7.8	MAPK1	-7.0
EGFR	-7.9	GRB2	-6.7
HSP90AA1	-7.8	CASP3	-8.1
SRC	-8.4	PIK3CD	-8.6
MMP9	-8.5	NFKB1	-5.7
STAT1	-6.0	JAK2	-7.1
IGF1	-5.9	PTK2	-4.9
TLR4	-6.5	ALB	-7.9
ESR1	-7.9	FGF2	-6.5
MAPK8	-8.5	MET	-6.4

2.5 枇杷核中苦杏仁苷的提取及含量测定

制得苦杏仁苷标准曲线为 $y = 7433x + 903.2$, $R^2 = 0.9991$ 。将样品峰面积代入标准曲线, 最终测得枇杷核中苦杏仁苷的提取率为 $(1.59 \pm 0.14)\%$, 如表 4。

表 4 枇杷核中苦杏仁苷的质量浓度与提取率测定结果

样品编号	质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	提取率/%
1	721.65	1.44
2	709.66	1.42
3	864.52	1.73
4	876.65	1.75
均值	793.12 ± 69.50	1.59 ± 0.14

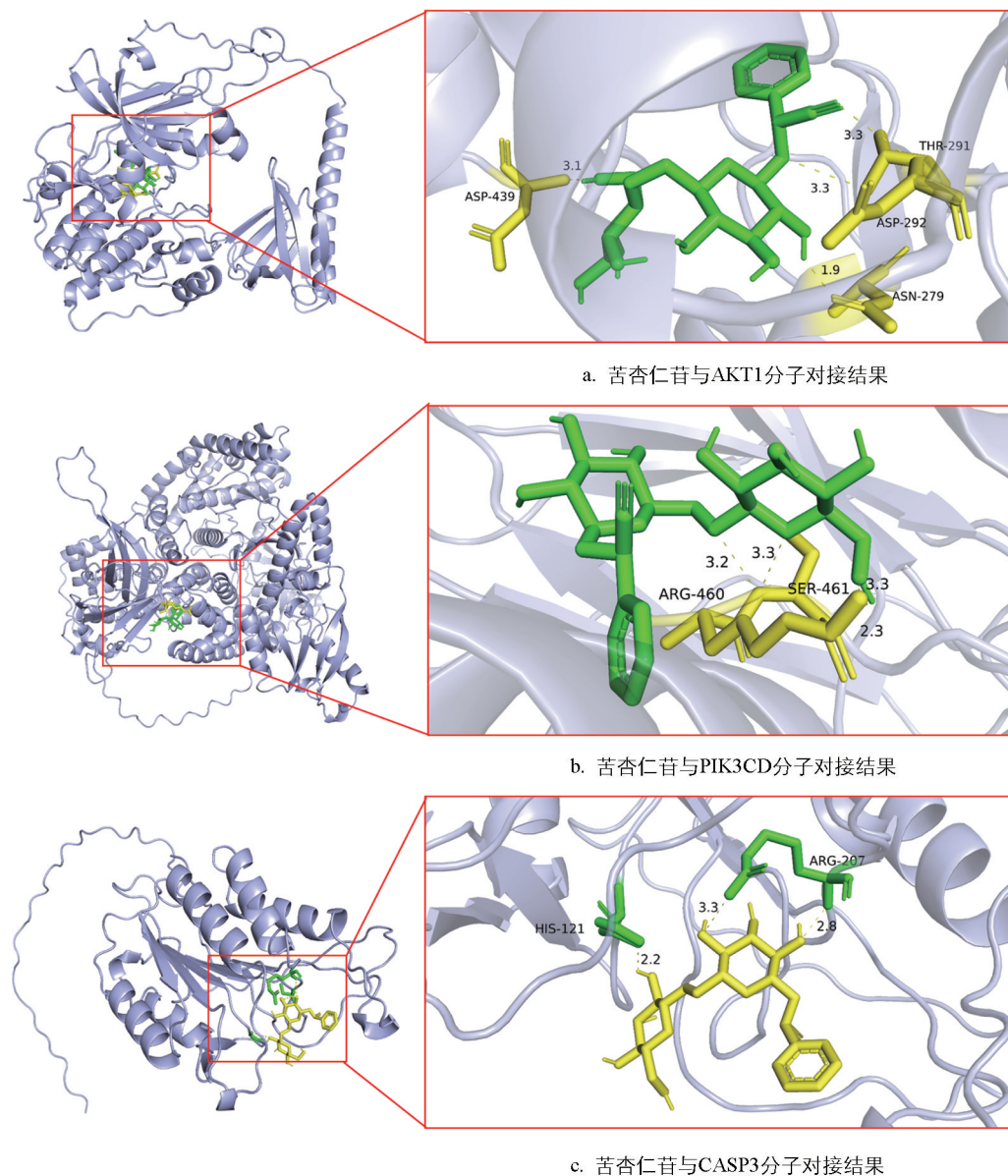
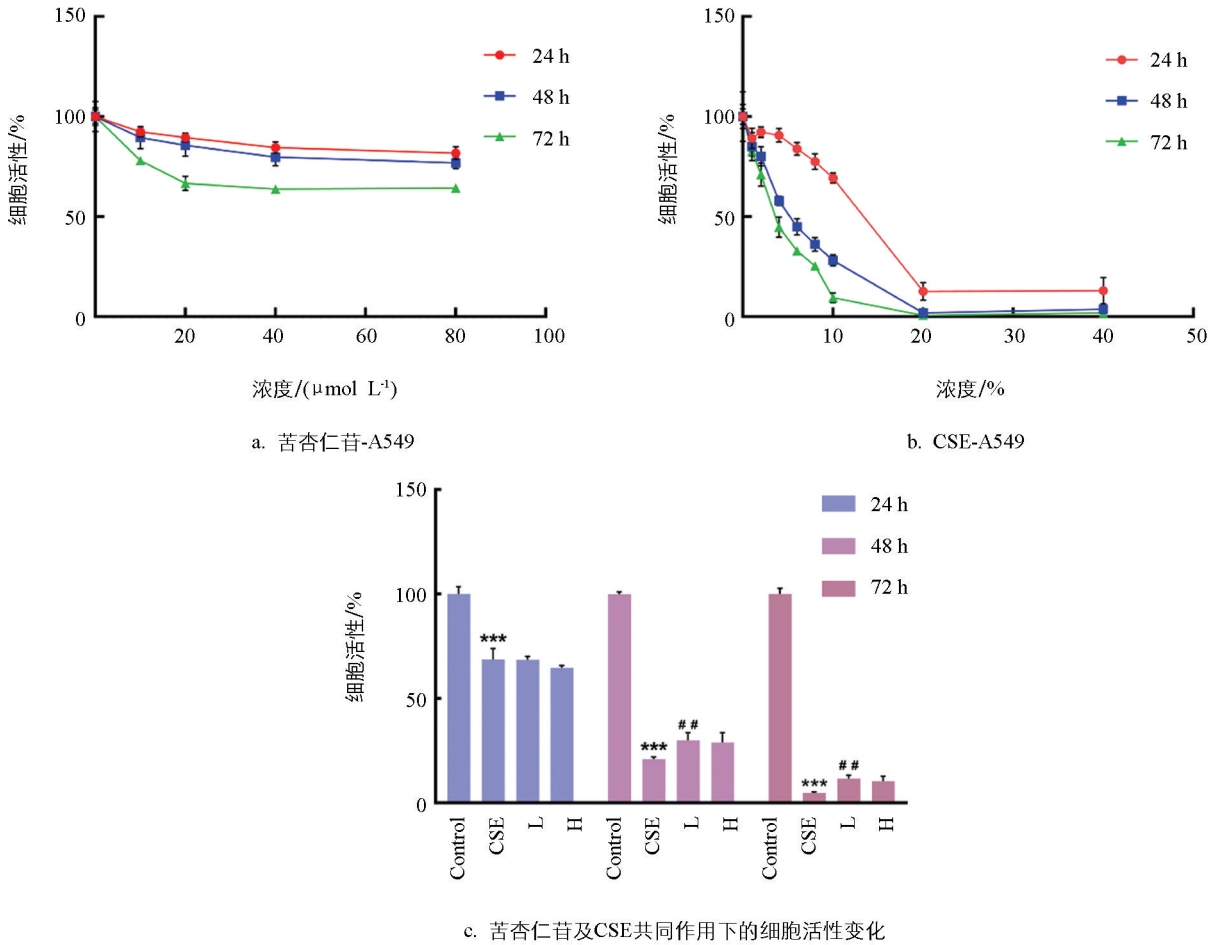


图 4 苦杏仁苷与核心靶点分子对接结果可视化

2.6 MTT 法检测香烟烟雾提取物(CSE)和苦杏仁苷对 A549 细胞增殖活性的影响

为保证后续实验结果稳定且可控,我们采用市售苦杏仁苷标准品进行活性探究。使用 MTT 法评估 CSE 和苦杏仁苷对 A549 细胞活力的影响。由图 5 可知,随着 CSE 和苦杏仁苷浓度的增大, A549 细胞的活性降低;其中, 12.09% CSE 作用 24 h,能够抑制 50%的细胞活性,而浓度低于 20 $\mu\text{mol/L}$ 的苦杏仁苷作用 24 h, A549 存活率仍大于 90%。为兼顾 CSE 的效用和 A549 细胞的活性,后续研究采用 10% CSE 作为刺激浓度;为保证苦杏仁苷的安全性,采用 20 $\mu\text{mol/L}$ 作为苦杏仁苷的最大给药浓度。

为了进一步观察苦杏仁苷对香烟烟雾提取物引起的细胞活性降低的干预作用,实验分别设置对照组(Control),模型组(10% CSE)、低浓度干预组(10% CSE+10 $\mu\text{mol/L}$ 苦杏仁苷, L)和高浓度干预组(10% CSE+20 $\mu\text{mol/L}$ 苦杏仁苷, H)。A549 细胞经苦杏仁苷预处理 2 h,再加入 CSE 共同作用 24、48 和 72 h,结果如图 5c。相较于对照组,模型组的细胞活性显著降低($p < 0.001$),苦杏仁苷作用 48 h 后细胞活性显著上升($p < 0.01$),提示苦杏仁苷能够减轻 CSE 对 A549 细胞的毒性作用。



与对照组相比, * * * 表示 $p < 0.001$; 与模型组相比, # # 表示 $p < 0.01$, 差异有统计学意义。

图 5 苦杏仁苷对 CSE 刺激下 A549 细胞活性的影响

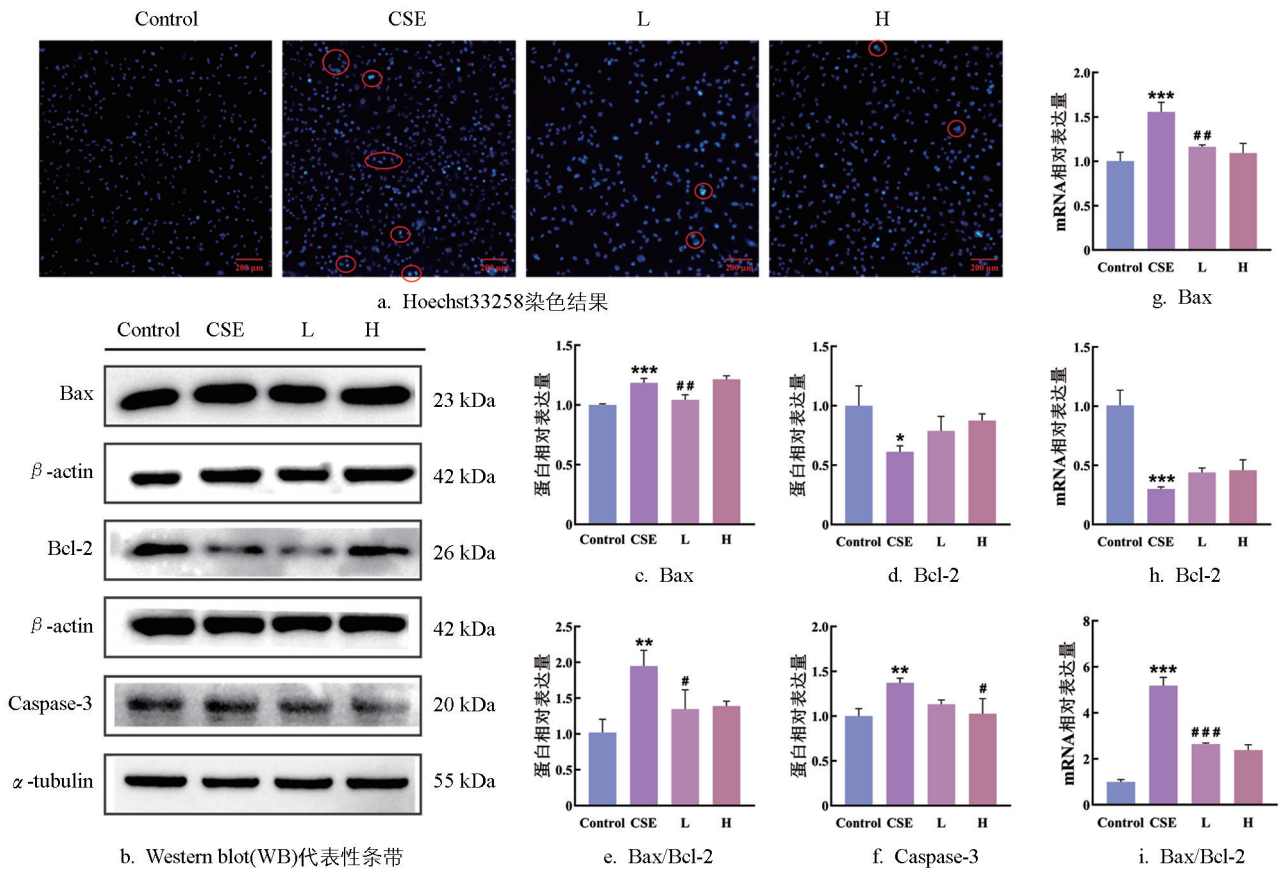
2.7 苦杏仁苷对 CSE 刺激下 A549 细胞凋亡的影响

靶点筛选和富集分析结果显示,苦杏仁苷可能通过影响细胞凋亡及相关信号通路干预肺气肿,因此,利用 Hoechst33258 染色探究苦杏仁苷和 CSE 对细胞凋亡的影响,结果如图 6。对照组细胞核形态规整,呈现圆形或椭圆形;CSE 处理 48 h 后,A549 细胞内出现染色质浓缩、核碎裂等现象,荧光变亮;苦杏仁苷处理 48 h 后有所减轻,证明苦杏仁苷能够减轻 CSE 诱导的 A549 细胞凋亡。

基于 Hoechst33258 染色结果,进一步采用 WB 和 qRT-PCR 实验,探究苦杏仁苷和 CSE 对凋亡通路的影响。WB 结果显示,相较于对照组,模型组的 Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($p < 0.05$),Bax ($p < 0.001$)、Caspase-3 蛋白 ($p < 0.01$) 表达和 Bax/Bcl-2 比值 ($p < 0.01$) 显著上升;在苦杏仁苷的干预下,Bax 蛋白 ($p < 0.01$),Caspase-3 蛋白 ($p < 0.05$) 表达和 Bax/Bcl-2 比值 ($p < 0.05$) 显著降低(图 6b-6f)。qRT-PCR 结果显示,相较于对照组,模型组的 Bcl-2 转录水平显著降低 ($p < 0.001$),而 Bax 的转录水平和 Bax/Bcl-2 比值显著上升 ($p < 0.001$);苦杏仁苷干预下 Bax 转录水平 ($p < 0.01$)、Bax/Bcl-2 比值 ($p < 0.001$) 显著降低(图 6g-6i)。综合表明,苦杏仁苷能够通过抑制线粒体的凋亡通路,减轻 CSE 诱导的细胞凋亡。

2.8 苦杏仁苷抑制 CSE 激活的 PI3K/AKT 信号通路

靶点筛选和富集分析结果显示,苦杏仁苷可能通过影响 PI3K/AKT 信号通路干预肺气肿的发展,因



与对照组相比, * 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$, *** 表示 $p < 0.001$; 与模型组相比, # 表示 $p < 0.05$, ## 表示 $p < 0.01$, ### 表示 $p < 0.001$, 差异有统计学意义。

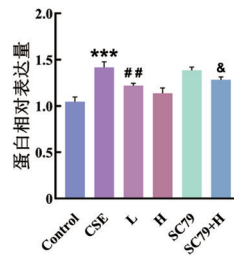
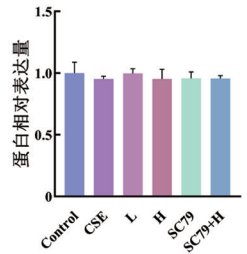
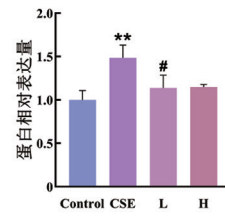
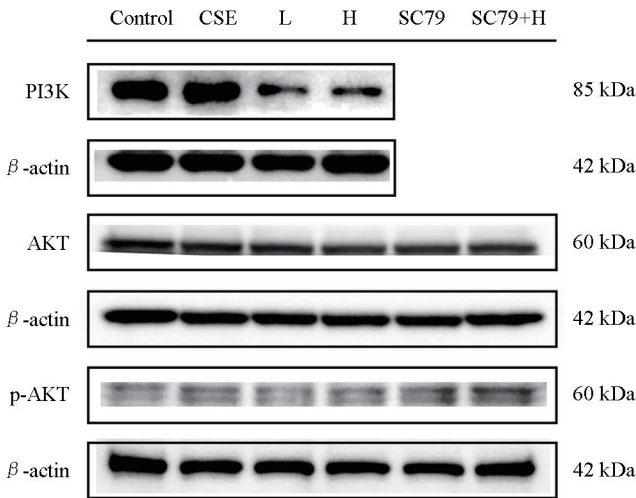
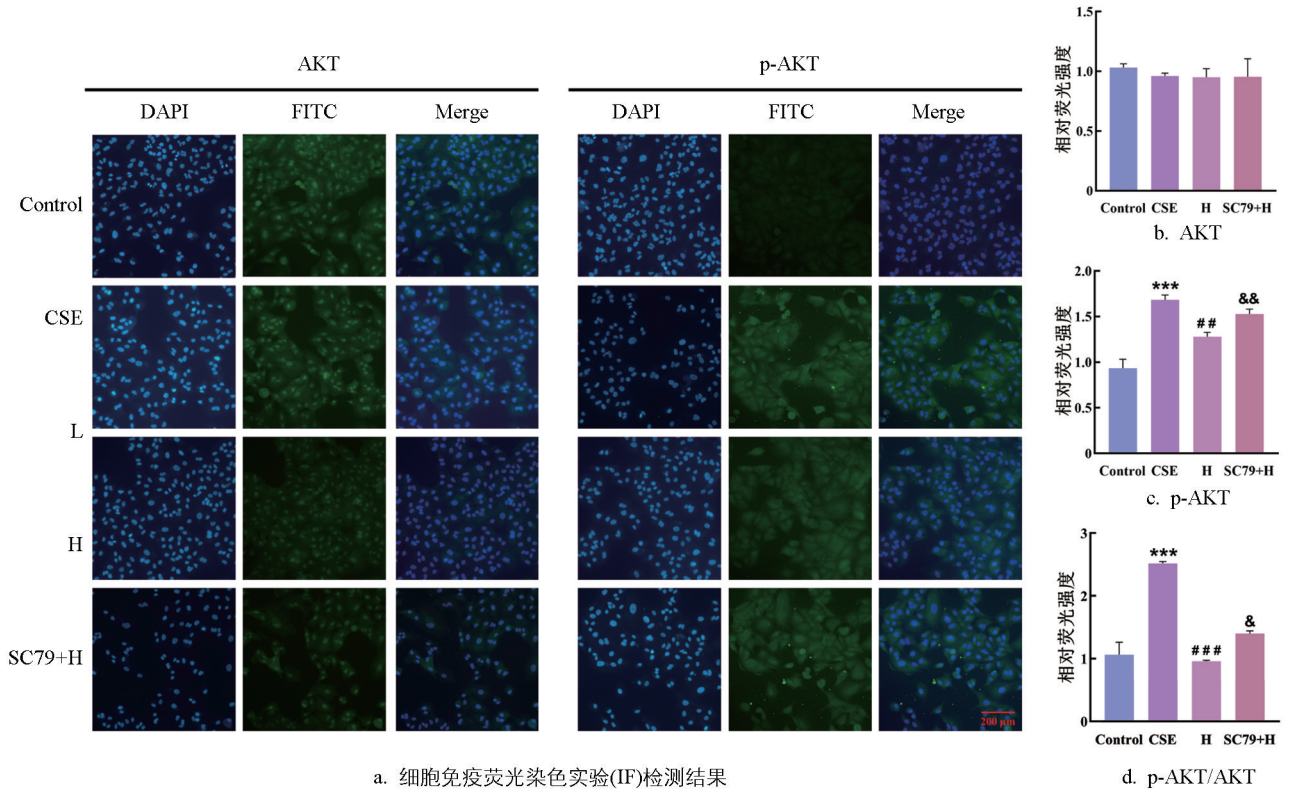
图 6 苦杏仁苷对 CSE 刺激下 A549 细胞凋亡及信号通路的影响

此, 可通过 WB 和 IF 实验探究苦杏仁苷和 CSE 对 PI3K/AKT 信号通路的影响。IF 结果显示, 相较于对照组, 模型组的 p-AKT 和 p-AKT/AKT 蛋白表达水平均显著上升 ($p < 0.001$), 苦杏仁苷干预下显著降低 ($p < 0.01$), 联用 SC79 后显著回升 ($p < 0.05$) (图 7a-7d)。WB 结果显示, 相较于对照组, 模型组的 PI3K ($p < 0.01$)、p-AKT 蛋白表达 ($p < 0.001$) 和 p-AKT/AKT 比值 ($p < 0.001$) 均显著升高, 而苦杏仁苷干预下显著降低 ($p < 0.05$); 在此基础上, 加入 AKT 激活剂 SC79 (SC79+H: $10 \mu\text{mol/L}$ SC79+10% CSE+ $20 \mu\text{mol/L}$ 苦杏仁苷) 则表现出 p-AKT 蛋白表达和 p-AKT/AKT 比值显著回升 ($p < 0.05$) (图 7e-7i)。综合表明, 苦杏仁苷可能通过抑制 AKT 磷酸化, 抑制 PI3K/AKT 信号通路。

2.9 苦杏仁苷降低 CSE 刺激下 A549 细胞的总 ROS 水平

氧化应激是肺气肿的重要发病因素之一, KEGG 富集分析结果指出苦杏仁苷可能通过影响 ROS 水平干预肺气肿, 因此, 可采用 DCFH-DA 探针染色检测苦杏仁苷和 CSE 对细胞总 ROS 水平的影响, 如图 8a 和图 8b。相较于对照组, 模型组的总 ROS 水平显著上升 ($p < 0.001$), 苦杏仁苷治疗下显著降低 ($p < 0.01$), 证明苦杏仁苷能够降低细胞的总 ROS 水平, 减轻低氧化应激。

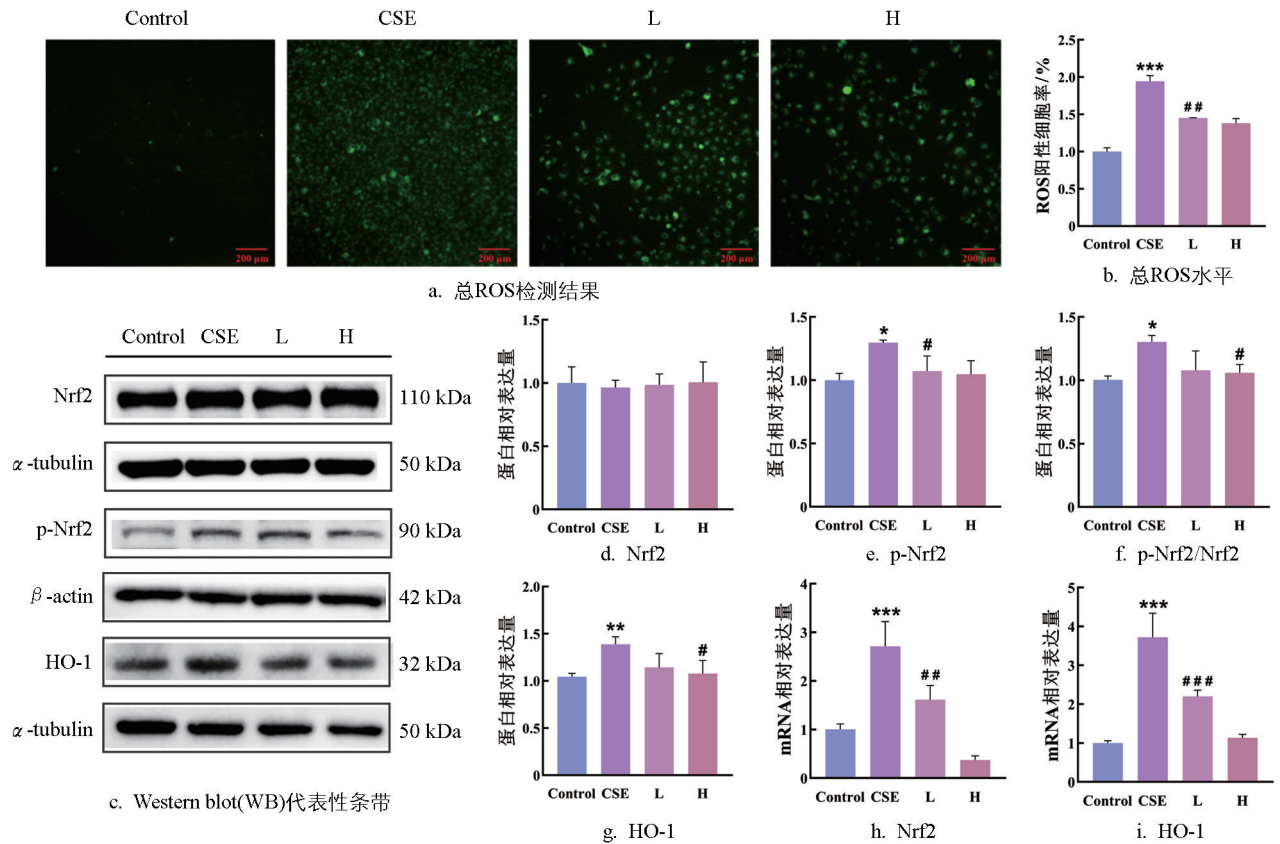
Nrf2/HO-1 是参与调控氧化应激的关键信号通路, 通过 WB 和 qRT-PCR 实验探究苦杏仁苷和 CSE 对 Nrf2/HO-1 信号通路的影响, 如图 8c-8g。相较于对照组, 模型组的 p-Nrf2 ($p < 0.05$)、HO-1 蛋白表



与对照组相比, ** 表示 $p < 0.01$, *** 表示 $p < 0.001$; 与模型组相比, # 表示 $p < 0.05$, ## 表示 $p < 0.01$; 与 H 组相比, & 表示 $p < 0.05$, && 表示 $p < 0.01$, 差异有统计学意义。

图 7 苦杏仁苷对 CSE 刺激下 A549 细胞 PI3K/AKT 信号通路的影响

达 ($p < 0.01$) 和 p-Nrf2/Nrf2 比值 ($p < 0.05$) 显著上升, 苦杏仁苷干预下显著降低 ($p < 0.05$)。qRT-PCR 结果显示, 相较于对照组, 模型组的 Nrf2 和 HO-1 转录水平显著上升 ($p < 0.001$), 苦杏仁苷干预下表达显著降低 ($p < 0.01$) (图 8h、8i)。综合表明, 苦杏仁苷可能通过抑制 Nrf2/HO-1 信号通路的过度激活, 减轻 CSE 诱导的氧化应激。



与对照组相比, * 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$, *** 表示 $p < 0.001$; 与模型组相比, # 表示 $p < 0.05$, ## 表示 $p < 0.01$, ### 表示 $p < 0.001$, 差异有统计学意义。

图 8 苦杏仁苷对 CSE 刺激下 A549 细胞的总 ROS 水平及相关信号通路的影响

3 讨论与结论

本研究通过网络药理学和分子对接技术对枇杷核中的有效成分进行了初步分析, 聚焦苦杏仁苷并探究其干预肺气肿的可能靶点和分子机制。网络药理学结果显示, 苦杏仁苷潜在作用靶点包括 AKT1、HSP90AA1、CASP3、PIK3CD 等, 通过分子对接验证苦杏仁苷与核心靶点之间的结合能力, 并最终聚焦于 AKT1、PIK3CD 和 CASP3, 涉及 PI3K/AKT 信号通路和线粒体凋亡通路。通过 WB、qRT-PCR 和免疫荧光等实验, 证明 CSE 刺激下的 A549 细胞表现出肺气肿中典型的凋亡和氧化应激现象, 而苦杏仁苷能够减轻 CSE 诱导的细胞凋亡和氧化应激, 其分子机制可能与抑制 AKT 磷酸化, 影响 PI3K/AKT 信号通路有关。

网络药理学与分子对接技术是现代药物研发中的重要工具, 本研究通过网络药理学, 筛选得到苦杏仁苷治疗肺气肿的可能靶点共 181 个; 分子对接结果显示, 苦杏仁苷能够与 AKT1、CASP3 和 PIK3CD 等核心靶点通过疏水、氢键等方式相互作用, 这证明苦杏仁苷可能作为潜在的多靶点药物对肺气肿的发生发展产生了干预作用。本研究通过超声辅助提取枇杷核中苦杏仁苷并完成含量测定, 结果显示苦杏仁苷提取率为 $(1.59 \pm 0.14)\%$ 。枇杷核来源苦杏仁苷的结构及功效与其他中药来源一致, 并且在枇杷核中含量远高于其他成分, 具有一定的开发价值。体外研究部分, 采用香烟烟雾提取物(CSE)刺激肺癌人类肺泡基底上皮细胞(A549)构建肺气肿细胞模型, 该模型表现出显著的氧化应激和凋亡效应, 与肺气肿临床发展中的氧化应激和肺组织损伤表现相对应。吸烟是肺气肿最重要的发病因素, 香烟烟雾中含有大量的活性氧、活性氮、自由基成分, 进入肺部后会直接刺激肺组织产生氧化应激和炎症反应, 并削弱肺泡壁弹性纤维功能, 加重

肺部组织的损伤^[28]。PI3K/AKT 信号通路与细胞转录、翻译、增殖、存活紧密相关,并参与了肺气肿的发生及发展^[29]。AKT 是该信号通路的核心枢纽因子,通过自身磷酸化发挥作用,一方面可直接调控下游凋亡通路,加重肺部气道上皮细胞的凋亡和肺组织的实质性损伤,削弱肺部屏障功能^[30];另一方面会诱使 Nrf2 过度激活,抗氧化因子过度表达,加重肺部氧化应激,同时促进炎症因子的表达,加剧肺部炎症反应^[31]。炎症与氧化应激、凋亡等机制互相影响,互相促进,加重蛋白酶/抗蛋白酶失衡,进而促进肺泡弹性纤维降解,肺泡弹性降低,呼气困难,促进肺气肿的发展。本研究采用苦杏仁苷干预后,细胞氧化应激和凋亡水平显著减轻,同时 PI3K/AKT 信号通路被显著抑制,证明苦杏仁苷能够通过抑制 AKT 磷酸化,干预 PI3K/AKT 信号通路,同时抑制凋亡和 Nrf2/HO-1 信号通路,减轻细胞凋亡和氧化应激。

本研究为枇杷核活性成分苦杏仁苷治疗肺气肿提供了一定理论依据,但仅采用了网络药理学单一工具筛选苦杏仁苷的可能作用靶点,得到的结论局限于细胞层面,未来将采用差异表达分析、组学分析等生信手段,全方位佐证苦杏仁苷的作用机制和靶点通路,并进一步探究苦杏仁苷在体内环境中对肺气肿的治疗作用,不断挖掘更多枇杷核活性成分的药用价值。

参考文献:

- [1] 李凯. 川贝枇杷胶囊联合噻托溴铵对 AECOPD 患者肺功能及炎症反应的影响 [J]. 内蒙古中医药, 2023, 42(4): 113-114.
- [2] 李小霞, 吴允华, 柳君君, 等. 半夏枇杷糖浆治疗痰湿蕴肺型感冒后咳嗽 196 例观察 [J]. 浙江中医杂志, 2020, 55(1): 25.
- [3] 王寸寸, 蒋亚林, 张孝飞, 等. 强力枇杷露对慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者的临床疗效及肺功能和 IL-6、CRP、PCT 水平的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2024, 41(3): 569-575.
- [4] 鲁利甫. 沙美特罗替卡松粉吸入剂联合京都念慈菴蜜炼川贝枇杷膏对肺气功能的影响 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(84): 175.
- [5] 林国荣, 沈高杨, 陈剑锋. HPLC 法测定枇杷核中苦杏仁苷含量 [J]. 海峡药学, 2007, 19(1): 41-42.
- [6] 林国荣. 枇杷核苦杏仁苷的醇提工艺及其药效学研究 [J]. 现代农业科技, 2007(18): 7-9.
- [7] ZHANG C C, ZHANG D Q, WANG Y L, et al. Pharmacokinetics and Anti-Liver Fibrosis Characteristics of Amygdalin: Key Role of the Deglycosylated Metabolite Prunasin [J]. Phytomedicine, 2022, 99: 154018.
- [8] TAN W, MA L, LI Y L, et al. Glycoside Components Promote Endothelial Progenitor Cell-Derived Exosomes Repairing Damaged Vascular Endothelium via the PI3K/AKT Signaling Pathway [J]. Phytomedicine, 2025, 141: 156694.
- [9] FIGUROVÁ D, TOKÁROVÁ K, GREIFOVÁ H, et al. Inflammation, It's Regulation and Antiphlogistic Effect of the Cyanogenic Glycoside Amygdalin [J]. Molecules, 2021, 26(19): 5972.
- [10] JASZCZAK-WILKE E, POLKOWSKA Z, KOPROWSKI M, et al. Amygdalin: Toxicity, Anticancer Activity and Analytical Procedures for Its Determination in Plant Seeds [J]. Molecules, 2021, 26(8): 2253.
- [11] 焦莉, 赵玲艳, 刘静. 麦杏补肺汤联合沙美特罗替卡松对慢性阻塞性肺疾病患者肺功能及炎症指标的影响 [J]. 淮海医药, 2024, 42(4): 414-417.
- [12] 王翔阳, 胡建国. 厚朴麻黄汤联合西药治疗慢性支气管炎合并肺气肿的临床效果 [J]. 世界复合医学(中英文), 2024, 10(5): 89-92.
- [13] 张一, 尹丽, 李路广, 等. 清肺化痰汤对 AECOPD 患者有效性及免疫功能、炎症因子影响分析 [J]. 承德医学院学报, 2025, 42(4): 294-298.
- [14] 李灿晖, 罗惠冬, 余绮钊, 等. 杏苏止咳颗粒与苏黄止咳胶囊治疗感冒咳嗽的疗效比较分析 [J]. 海峡药学, 2016, 28(1): 125-126.
- [15] KIM S, CHEN J, CHENG T J, et al. PubChem 2023 Update [J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(D1): 1373-1380.
- [16] GALLO K, GOEDE A, PREISSNER R, et al. SuperPred 3.0: Drug Classification and Target Prediction-A Machine

- Learning Approach [J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(W1): 726-731.
- [17] DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. Swiss Target Prediction: Updated Data and New Features for Efficient Prediction of Protein Targets of Small Molecules [J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(W1): 357-364.
- [18] WANG X, SHEN Y H, WANG S W, et al. Pharm Mapper 2017 Update: A Web Server for Potential Drug Target Identification with a Comprehensive Target Pharmacophore Database [J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(W1): 356-360.
- [19] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The Gene Cards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses [J]. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2016, 54(1): 1-30.
- [20] BATEMAN A, MARTIN M J, ORCHARD S, et al. UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2021 [J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(D1): 480-489.
- [21] MUDUNURI U, CHE A, YI M, et al. BioDBnet: The Biological Database Network [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(4): 555-556.
- [22] DAVIS A P, GRONDIN C J, JOHNSON R J, et al. Comparative Toxicogenomics Database (CTD): Update 2021 [J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(D1): 1138-1143.
- [23] SHERMAN B T, HUANG D W, TAN Q N, et al. DAVID Knowledgebase: A Gene-Centered Database Integrating Heterogeneous Gene Annotation Resources to Facilitate High-Throughput Gene Functional Analysis [J]. *BMC Bioinformatics*, 2007(8): 426.
- [24] TANG D D, CHEN M J, HUANG X H, et al. SRplot: A Free Online Platform for Data Visualization and Graphing [J]. *PLoS One*, 2023, 18(11): e0294236.
- [25] JUMPER J, EVANS R, PRITZEL A, et al. Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold [J]. *Nature*, 2021, 596(7873): 583-589.
- [26] SZKLARCZYK D, KIRSCH R, KOUTROULI M, et al. The STRING Database in 2023: Protein-Protein Association Networks and Functional Enrichment Analyses for any Sequenced Genome of Interest [J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(D1): D638-D646.
- [27] GUAN R J, YAO H W, LI Z Y, et al. Sodium Tanshinone IIA Sulfonate Attenuates Cigarette Smoke Extract-Induced Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress, and Apoptosis in Alveolar Epithelial Cells by Enhancing SIRT1 Pathway [J]. *Toxicological Sciences*, 2021, 183(2): 352-362.
- [28] SONG Q, CHEN P, LIU X M. The Role of Cigarette Smoke-Induced Pulmonary Vascular Endothelial Cell Apoptosis in COPD [J]. *Respiratory Research*, 2021, 22(1): 39.
- [29] LIU Y H, KONG H B, CAI H P, et al. Progression of the PI3K/Akt Signaling Pathway in Chronic Obstructive Pulmonary Disease [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2023, 14: 1238782.
- [30] WANG C X, ZHOU J D, WANG J Q, et al. Progress in the Mechanism and Targeted Drug Therapy for COPD [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2020, 5(1): 248.
- [31] MI Y, WANG Y P, LIU Y S, et al. Kellin Alleviates Cerebral Ischemic Injury by Inhibiting Ferroptosis via Targeting Akt-Mediated Transcriptional Activation of Nrf2 [J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155406.

责任编辑 周仁惠

