基于网络药理学及实验验证探讨益气利湿方调控 HIV 感染 CD4$^+$ T 细胞凋亡的机制*

袁硕阳[1,2]，刘真[1,3]，邓博文[1,3]，李鹏宇[1,3]，桑锋[1,3]，杨瑶瑶[1,3]，李杰[1,3]，张清燕[1,3]，李强[1,3]

1. 河南中医药大学第一附属医院，河南 郑州 450000；2. 河南中医药大学，河南 郑州 450046；
3. 河南省病毒性疾病中医药防治重点实验室，河南 郑州 450000

摘要：目的：采用网络药理学和细胞实验探讨益气利湿方调控 HIV_{NL4-3} 感染 CD4$^+$ T 细胞凋亡的作用机制。方法：通过中药系统药理学数据库与分析平台（Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform，TCMSP）筛选益气利湿方的活性成分和靶点，采用 GeneCards、OMIM 数据库筛选 HIV/AIDS 的靶点，借助 Venny 2.1.0 获取两者的交集靶点。通过 STRING 数据库构建蛋白质－蛋白质相互作用（protein－protein interaction，PPI）网络，根据节点度值筛选核心靶点。利用 DAVID 数据库进行基因本体（Gene Ontology，GO）和京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）富集分析。采用 MOE 软件对关键成分与核心靶点进行分子对接。将 50 只 SD 大鼠随机平均分为空白组、益气利湿方组（9.45 g·kg^{-1}），每天灌胃 1 次，连续 7 d，制备空白血清和含药血清。建立 HIV_{NL4-3} 假病毒侵染 MT－4 细胞模型，将细胞分为对照组、模型组、5% 益气利湿方含药血清组（YQLS－L）、10% 益气利湿方含药血清组（YQLS－M）及 15% 益气利湿方含药血清组（YQLS－H）。采用 CCK－8 法检测细胞存活率，流式细胞术检测细胞凋亡，qPCR 法和 Western blot 法检测细胞 *BCL2L1*、*MAPK1*（*ERK*）、*Caspase－3*、*Caspase－9* 基因和蛋白表达水平。结果：益气利湿方活性成分 97 种，作用靶点 582 个。HIV/AIDS 靶点 2 017 个，两者的交集靶点 237 个。益气利湿方治疗 HIV/AIDS 的关键成分包括槲皮素、木犀草素、β－谷甾醇、茯苓酸 C 等，核心靶点包括丝裂原活化蛋白激酶 1（mitogen－activated protein kinase 1，MAPK1）、胱氨酸蛋白酶（Caspase）－3、Caspase－9、BCL2L1 等。分子对接显示，关键成分与核心靶点具有较好的结合活性。与对照组比较，模型组细胞早期凋亡率、晚期凋亡率及总凋亡率升高（$P<0.01$）。与模型组比较，YQLS－L 组、YQLS－M 组、YQLS－H 组细胞存活率升高，晚期凋亡率和总凋亡率降低（$P<0.01$）。与对照组比较，模型组细胞 *BCL2L1* mRNA 水平降低，*Caspase－3* mRNA、*MAPK1* mRNA 水平升高（$P<0.01$）。与模型组比较，YQLS－L 组、YQLS－M 组、YQLS－H 组细胞 *BCL2L1* mRNA 水平升高，*MAPK1* mRNA 水平降低（$P<0.01$）。与模型组比较，YQLS－L 组、YQLS－M 组细胞 *Caspase－3* mRNA 水平降低（$P<0.01$）。与模型组比较，YQLS－L 组细胞 *Caspase－9* mRNA 水平降低（$P<0.05$）。与对照组比较，模型组细胞 BCL2L1 蛋白表达水平降低，Cleaved－Caspase－3、p－MAPK1（p－ERK）蛋白表达水平升高（$P<0.01$）。与模型组比较，YQLS－L 组、YQLS－M 组、YQLS－H 组细胞 BCL2L1 蛋白表达水平升高（$P<0.05$），Cleaved－Caspase－3、p－MAPK1（p－ERK）蛋白表达水平降低（$P<0.01$）。结论：益气利湿方可能通过调节 PI3K/AKT 信号通路，从而抑制 CD4$^+$ T 细胞凋亡。

关键词：益气利湿方；HIV/AIDS；CD4$^+$ T 细胞；免疫重建；网络药理学；分子对接
DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2025.03.102
中图分类号：R285.5；R51.91　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1674－8999（2025）03－0617－11

Mechanism of CD4$^+$ T Cell Apoptosis Induced by HIV Infection Regulated by Yiqi Lishi Formula Based on Network Pharmacology and Experimental Validation

YUAN Shuoyang[1,2]，LIU Zhen[1,3]，DENG Bowen[1,3]，LI Pengyu[1,3]，SANG Feng[1,3]，
YANG Yaoyao[1,3]，LI Jie[1,3]，ZHANG Qingyan[1,3]，LI Qiang[1,3]

* **基金项目：**国家自然科学基金项目（82274474，82104559）；河南省科技攻关项目（232102311207，232102310462，242102310519，242102310314）；河南省卫生健康委员会国家中医临床研究基地科研专项项目（2022JDZX019）

1. The First Affiliated Hospital to Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou Henan China 450000; 2. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou Henan China 450046; 3. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for Prevention and Treatment of Viral Diseases of Henan Province, Zhengzhou Henan China 450000

Abstract: Objective: To explore the action mechanism of Yiqi Lishi Formula in regulating the apoptosis of HIVNL4 - 3 infected $CD4^+$ T cells by using network pharmacology and cellular experiments. Methods: We screened the active ingredients and targets of Yiqi Lishi Formula by Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), and GeneCards, OMIM database to screen the targets of HIV/AIDS, and Venny. 1.0 to obtain the intersection targets of the two. The protein - protein interaction (PPI) network was constructed by STRING database, and the core targets were screened according to the node degree value. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses were performed using the DAVID database. MOE software was used for molecular docking of key components to core targets. Fifty SD rats were randomly and equally divided into blank group and Yiqi Lishi Formula group ($9.45\ g \cdot kg^{-1}$) by gavage once a day for 7 d. Blank serum and drug - containing serum were prepared. A model of MT - 4 cells infested with HIVNL4 - 3 pseudovirus was established, and the cells were divided into the control group, the model group, the 5% Yiqi Lishi Formula containing medicated serum group (YQLS - L), the 10% Yiqi Lishi Formula containing medicated serum group (YQLS - M) and the 15% Yiqi Lishi Formula containing medicated serum group (YQLS - H). The cell viability was detected by CCK - 8 assay, apoptosis by flow cytometry, and the gene and protein expression levels of BCL2L1, MAPK1 (ERK), Caspase - 3, and Caspase - 9 by qPCR and Western blot. Results: There were 97 active ingredients in Yiqi Lishi Formula, with 582 active targets, 2017 HIV/AIDS targets, and 237 intersecting targets. The key ingredients of Yiqi Lishi Formula for the treatment of HIV/AIDS included quercetin, lignans, β - sitosterol, Porinic acid C, etc., and the core targets included mitogen - activated protein kinase 1 (MAPK1), cystathionine protease (Caspase - 3, Caspase - 9, BCL2L1, etc. Molecular docking showed that the key components had better binding activity to the core targets. Compared with the control group, the early apoptosis rate, late apoptosis rate and total apoptosis rate were elevated in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the cell survival rate of YQLS - L, YQLS - M and YQLS - H groups was increased, and the late apoptosis rate and total apoptosis rate decreased ($P < 0.01$). Compared with the control group, the *BCL2L1* mRNA expression of cells in the model group decreased, and the *Caspase - 3* mRNA and *MAPK1* mRNA expression increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the *BCL2L1* mRNA expression of cells in YQLS - L, YQLS - M, and YQLS - H groups was increased, and the *MAPK1* mRNA expression decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, cellular *Caspase - 3* mRNA expression decreased in YQLS - L group and YQLS - M group ($P < 0.01$). Compared with the model group, cellular *Caspase - 9* mRNA expression was reduced in YQLS - L group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the BCL2L1 protein expression of cells in the model group decreased, and the Cleaved - Caspase - 3 and p - MAPK1 (p - ERK) protein expression increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the BCL2L1 protein expression of cells in YQLS - L, YQLS - M, and YQLS - H groups increased ($P < 0.05$), and the Cleaved - Caspase - 3, p - MAPK1 (p - ERK) protein expression decreased ($P < 0.01$). Conclusion: Yiqi Lishi Formula may inhibit $CD4^+$ T cell apoptosis by regulating PI3K/AKT signaling pathway.

Key words: Yiqi Lishi Formula; HIV/AIDS; $CD4^+$ T cell; immune reconstitution; network pharmacology; molecular docking

抗逆转录病毒疗法(antiretroviral therapy, ART)能够抑制人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)复制,使艾滋病(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)转化为可防可控的慢性传染病[1]。但 ART 尚无法彻底根除体内潜伏的 HIV[2]。这些潜伏病毒处于低水平复制状态,持续损伤机体的免疫系统,致使部分患者 $CD4^+$ T 细胞计数无法恢复到理想水平,这种现象被称为免疫重建不全。免疫重建不全患者发生艾滋病相关和非艾滋病相关临床事件的风险更高,预期寿命更低,这给艾滋病的治疗带来困难。

针对免疫重建不全的发生机制和各种因素,有研究团队采取了不同的干预措施,如骨髓移植、胸腺移植及细胞因子治疗等[3-4]。此外,近期研究发现中医药在促进免疫重建、提高患者生活质量等方面展现出显著疗效[5-6]。益气利湿方由黄芪、西洋参、淫羊藿等多味中药组成,经过多年临床应用发现,其在辅助治疗 HIV 感染中可显著升高患者体内 $CD4^+$ T 细胞计数,并有效缓解患者症状[7]。

网络药理学立足于系统层次和生物网络的整体角度,解析药物与治疗靶标的分子关联规律,被广泛应用于中药活性成分发掘、作用机制阐释、药物组合和方剂配伍规律探索等方面,为中药复杂体系研究提供了新方法[8]。因此,本研究利用网络药理学、分子对接技术结合细胞实验验证探讨益气利湿方调控 HIV 感染 $CD4^+$ T 细胞凋亡的作用机制,为益气

利湿方辅助治疗艾滋病的临床应用提供理论依据。

1　材料

1.1　实验动物　50 只 6 周龄 SPF 级 SD 雄性大鼠，购于郑州市惠济区华兴实验动物养殖场，许可证号：SCXK（豫）2019－0002。大鼠饲养于河南中医药大学第一附属医院动物中心实验室，温度 20～25 ℃，相对湿度 50%～65%，自由进食与饮水。该实验经河南中医药大学第一附属医院动物伦理委员会批准，批号：YFYDW2023027。

1.2　细胞与质粒　MT－4 人急性淋巴母细胞白血病细胞由河南省病毒性疾病中医药防治重点实验室留存，HIV_{NL4-3}假病毒 pNL4－3－Luc 质粒由中国疾病预防控制中心赠送。

1.3　药物与试剂　益气利湿方包含黄芪、西洋参、茯苓、黄芩、当归、淫羊藿等药物，购自河南中医药大学第一附属医院，符合《中华人民共和国药典》（2020 年版）规定。CCK－8 试剂盒（批号：GK10001，上海宏叶生物有限公司）；流式细胞凋亡试剂盒（批号：AK13200，武汉伊莱瑞特生物科技有限公司）；总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、PCR 荧光定量试剂盒（批号：7E752J、7E742J、Q711－0，南京诺唯赞生物科技有限公司）；BCL2L1 抗体、Cleaved－Caspase－3 抗体、MAPK1（ERK）抗体、p－MAPK1 抗体（江苏亲科生物研究中心有限公司）；β－actin 抗体（美国 Genetex 公司）。

1.4　仪器　3111 型 CO_2 培养箱（美国 ThermoFisher Scientific 公司）；Mx3000P 全自动实时荧光定量 PCR 仪（美国 Stretegene 公司）；SpectraMax i3x 多功能酶标仪（美国 Molecular Devices 公司）；FACS Calibur 流式细胞仪（美国 BD Biosciences 公司）；Mini－PROTEAN 垂直电泳槽（上海 BioRad 公司）。

2　方法

2.1　网络药理学研究方法

2.1.1　益气利湿方活性成分及靶点筛选　通过中药系统药理学数据库与分析平台（Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform，TCMSP）分析筛选益气利湿方中黄芪、西洋参、茯苓、黄芩、当归、淫羊藿等药物的有效成分及靶点，以口服生物利用度（oral bioavailability，OB）≥30%、类药性（drug likeness，DL）≥0.18[9] 为筛选标准，并采用 Uniprot 数据库规范靶点名称。

2.1.2　疾病靶点获取　在 GeneCards 数据库、OMIM 数据库中分别以“AIDS”“HIV”为关键词检索疾病靶点。去除重复靶点后，用 Uniprot 数据库规范疾病靶点名称。

2.1.3　益气利湿方治疗 HIV/AIDS 关键成分筛选　将益气利湿方靶点与疾病靶点输入 Venny 2.1.0 在线作图工具，获得两者的交集靶点。将交集靶点与活性成分导入 Cytoscape 3.9.1 软件，构建活性成分－交集靶点的蛋白质－蛋白质相互作用（protein－protein interaction，PPI）网络，根据该网络中的节点度值（Degree 排名前 15 位）筛选益气利湿方治疗 HIV/AIDS 的关键成分。

2.1.4　益气利湿方治疗 HIV/AIDS 核心靶点筛选　将交集靶点输入 STRING 数据库，设置最小相互作用阈值为“Highest confidence＞0.900”，获得 PPI 网络图。将该网络图导入 Cytoscape 3.9.1 软件，根据节点度值（＞10）筛选益气利湿方治疗 HIV/AIDS 的核心靶点。

2.1.5　基因本体（Gene Ontology，GO）和京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）富集分析　将交集靶点导入 DAVID 数据库，进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。将富集结果按 P 值从小到大排序，排名前 20 位的结果通过微生信网站进行可视化分析。

2.1.6　分子对接　从 RCSB Protein Data Bank（RCSB PDB）数据库中下载核心靶点的蛋白结构，在 PyMOL 3.0 软件中前处理，作为受体。从 PubChem 数据库获取益气利湿方关键成分的 2D 结构，通过 MOE 软件使能量最优化，作为配体。在 MOE 软件中进行分子对接及结果可视化分析，筛选标准为结合能＜－5 kJ·mol^{-1}。

2.2　细胞实验方法

2.2.1　含药血清制备　将 50 只大鼠随机平均分为空白组、益气利湿方组，每天灌胃 1 次，连续 7 d。益气利湿方组大鼠的给药剂量按照正常成人临床等效剂量折算为 9.45 g·kg^{-1}，空白组大鼠每日灌胃等剂量蒸馏水。取血前 1 日大鼠禁食，末次给药 1 h 后麻醉，腹主动脉取血。室温静置 30 min 后，4 ℃离心 10 min，取上层血清 56 ℃水浴 30 min，滤膜过滤，－80 ℃保存，即可制备空白血清和含药血清[10]。

2.2.2　HIV_{NL4-3}感染 MT－4 细胞模型构建　将 MT－4 细胞接种至 96 孔培养板，每孔 1×10^4 个细

胞，HIV_{NL4-3} 以 2、4、8、16、32、64 倍稀释后侵染细胞，设空白孔与对照孔（control）。培养 48 h 后，每孔加入 10 μL CCK－8 溶液，2 h 后用多功能酶标仪检测 450 nm 处的光密度（optical density，OD）值。

2.2.3　分组及干预　MT－4 细胞以 4×10^5 个·mL^{-1} 接种于细胞培养瓶，置 37 ℃的 CO_2 培养箱中培养 24 h。加入 4 倍稀释的 HIV_{NL4-3} 假病毒，培养 24 h，构建 HIV_{NL4-3} 感染 MT－4 细胞模型。将细胞分为对照组（10% 空白血清）、模型组（HIV_{NL4-3} 侵染＋10% 空白血清）、5% 益气利湿方含药血清组（YQLS－L 组，HIV_{NL4-3} 侵染＋5% 益气利湿方含药血清）、10% 益气利湿方含药血清组（YQLS－M 组，HIV_{NL4-3} 侵染＋10% 益气利湿方含药血清）及 15% 益气利湿方含药血清组（YQLS－H 组，HIV_{NL4-3} 侵染＋15% 益气利湿方含药血清）。

2.2.4　CCK－8 法检测细胞活性　HIV_{NL4-3} 感染 MT－4 细胞 48 h 后，按照“2.2.3”项进行分组和干预。给药 48 h 后，每孔加入 10 μL CCK－8 溶液。2 h 后用多功能酶标仪检测 450 nm 处各孔的 OD 值，计算各组细胞存活率。

2.2.5　流式细胞术检测细胞凋亡情况　按照上述实验方案构建 HIV_{NL4-3} 模型，干预 48 h 后，收集各组细胞并计数。按照流式细胞凋亡试剂盒说明书操作后，用流式细胞仪分析，FlowJo10.8.1 软件分析结果。

2.2.6　qPCR 法检测细胞 PI3K/AKT 通路中关键基因表达量　采用总 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA，按照反转录试剂盒说明书合成 cDNA，进行 PCR 扩增。qPCR 反应条件：预变性 95 ℃ 30 s；95 ℃ 3～10 s，60 ℃ 10～30 s，40 个循环；95 ℃ 15 s，60 ℃ 60 s，95 ℃ 15 s。反应体系：2×ChamQ Universal SYBR Qpcr Master Mix 10 μL，正向和反向引物各 0.4 μL，Template DNA/cDNA 1 μL，加 ddH_2O 至 20 μL。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量，以 *GAPDH* 为内参基因，引物序列见表 1。

表 1　引物序列

基因	上游引物（5′－3′）	下游引物（5′－3′）
GAPDH	CCATGGGTGGAATCATATTGGA	TCAACGGATTTGGTCGTATTGG
BCL2L1	GAGCTGGTGGTTGACTTTCTC	TCCATCTCCGATTCAGTCCCT
Caspase－3	AGAGGGGATCGTTGTAGAAGTC	ACAGTCCAGTTCTGTACCACG
Caspase－9	CTCAGACCAGAGATTCGCAAAC	GCATTTCCCCTCAAACTCTCAA
MAPK1	TACACCAACCTCTCGTACATCG	CATGTCTGAAGCGCAGTAAGATT

2.2.7　Western blot 法检测细胞 PI3K/AKT 通路中关键蛋白表达量　按照上述实验方案构建 HIV_{NL4-3} 模型，给药 48 h 后，收集各组细胞并计数。PBS 清洗，加 RIPA 细胞裂解液和 PMSF（100∶1）提取总蛋白，BCA 法测定蛋白浓度。制备 SDS－PAGE 凝胶电泳分离蛋白，转至 PVDF 膜，5% 脱脂奶粉封闭 1 h，一抗 BCL2L1、MAPK1（ERK）、Cleaved－Caspase－3、p－MAPK1、β－actin 在 4 ℃孵育过夜。洗膜 3 次后，加二抗，室温孵育 1 h，1×TBST 溶液洗膜 3 次，每次 10 min。增强化学发光（enhanced chemiluminescence，ECL）成像，Bio－Rad 成像系统拍照。Image J 软件分析蛋白条带的灰度值，并计算目的蛋白的相对表达量。

2.2.8　统计学方法　采用 SPSS 22.0 统计学软件进行分析，计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。若数据符合正态分布，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 *LSD* 检验；若不符合正态分布，采用非参数检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3　结果

3.1　网络药理学及分子对接结果

3.1.1　益气利湿方治疗 HIV/AIDS 的作用靶点　从 TCMSP 中获取益气利湿方活性成分 97 种，对应靶点 582 个，见表 2。通过 GeneCards 与 OMIM 数据库获得 HIV/AIDS 相关靶点 2 017 个。将益气利湿方靶点与 HIV/AIDS 靶点绘制韦恩图，得到交集靶点 237 个，见图 1。

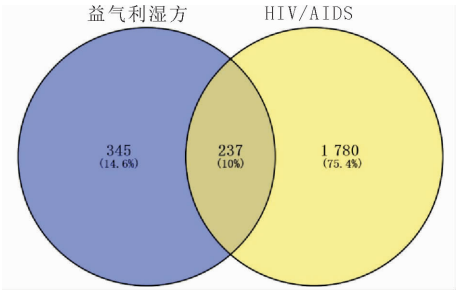


图 1　益气利湿方与 HIV/AIDS 交集靶点韦恩图

表 2　益气利湿方活性成分

中药	Mol ID	活性成分	OB/%	DL
茯苓	MOL000273	(2R) -2-[(3S,5R,10S,13R,14R,16R,17R) -3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-6-methylhept-5-enoic acid	30.93	0.81
茯苓	MOL000275	trametenolic acid	38.71	0.80
茯苓	MOL000276	7,9(11)-dehydropachymic acid	35.11	0.81
茯苓	MOL000279	cerevisterol	37.96	0.77
茯苓	MOL000280	(2R) -2-[(3S,5R,10S,13R,14R,16R,17R) -3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoic acid	31.07	0.82
茯苓	MOL000282	rrgosta-7,22E-dien-3beta-ol	43.51	0.72
茯苓	MOL000283	ergosterol peroxide	40.36	0.81
茯苓	MOL000285	(2R) -2-[(5R,10S,13R,14R,16R,17R) -16-hydroxy-3-keto-4,4,10,13,14-pentamethyl-1,2,5,6,12,15,16,17-octahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoic acid	38.26	0.82
茯苓	MOL000287	3beta-Hydroxy-24-methylene-8-lanostene-21-oic acid	38.70	0.81
茯苓	MOL000289	pachymic acid	33.63	0.81
茯苓	MOL000290	pricoic acid A	30.61	0.76
茯苓	MOL000291	poricoic acid B	30.52	0.75
茯苓	MOL000292	poricoic acid C	38.15	0.75
茯苓	MOL000300	dehydroeburicoic acid	44.17	0.83
黄芪	MOL000211	mairin	55.38	0.78
黄芪	MOL000239	jaranol	50.83	0.29
黄芪	MOL000033	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R) -10,13-dimethyl-17-[(2R,5S) -5-propan-2-yloctan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	36.23	0.78
黄芪	MOL000354	isorhamnetin	49.60	0.31
黄芪	MOL000371	3,9-di-O-methylnissolin	53.74	0.48
黄芪	MOL000378	7-O-methylisomucronulatol	74.69	0.30
黄芪	MOL000379	9,10-dimethoxypterocarpan-3-O-β-D-glucoside	36.74	0.92
黄芪	MOL000380	(6aR,11aR) -9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol	64.26	0.42
黄芪	MOL000387	bifendate	31.10	0.67
黄芪	MOL000392	formononetin	69.67	0.21
黄芪	MOL000398	isoflavanone	109.99	0.30
黄芪	MOL000417	calycosin	47.75	0.24
黄芪	MOL000433	FA	68.96	0.71
黄芪	MOL000438	(3R) -3-(2-hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl) chroman-7-ol	67.67	0.26
黄芪	MOL000439	isomucronulatol-7,2′-di-O-glucosiole	49.28	0.62
黄芪	MOL000442	1,7-Dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene	39.05	0.48
黄芩	MOL001689	acacetin	34.97	0.24
黄芩	MOL000173	wogonin	30.68	0.23
黄芩	MOL000228	(2R) -7-hydroxy-5-methoxy-2-phenylchroman-4-one	55.23	0.20
黄芩	MOL002714	baicalein	33.52	0.21
黄芩	MOL002908	5,8,2′-Trihydroxy-7-methoxyflavone	37.01	0.27
黄芩	MOL002909	5,7,2,5-tetrahydroxy-8,6-dimethoxyflavone	33.82	0.45
黄芩	MOL002910	carthamidin	41.15	0.24

续表 2　益气利湿方活性成分

中药	Mol ID	活性成分	OB/%	DL
黄芩	MOL002913	dihydrobaicalin_qt	40.04	0.21
黄芩	MOL002914	eriodyctiol（flavanone）	41.35	0.24
黄芩	MOL002915	salvigenin	49.07	0.33
黄芩	MOL002917	5,2′,6′－Trihydroxy－7,8－dimethoxyflavone	45.05	0.33
黄芩	MOL002925	5,7,2′,6′－Tetrahydroxyflavone	37.01	0.24
黄芩	MOL002926	dihydrooroxylin A	38.72	0.23
黄芩	MOL002927	skullcapflavone Ⅱ	69.51	0.44
黄芩	MOL002928	oroxylin a	41.37	0.23
黄芩	MOL002932	panicolin	76.26	0.29
黄芩	MOL002933	5,7,4′－Trihydroxy－8－methoxyflavone	36.56	0.27
黄芩	MOL002934	neobaicalein	104.34	0.44
黄芩	MOL002937	dihydrooroxylin	66.06	0.23
黄芩	MOL000525	norwogonin	39.40	0.21
黄芩	MOL000552	5,2′－dihydroxy－6,7,8－trimethoxyflavone	31.71	0.35
黄芩	MOL000073	ent－epicatechin	48.96	0.24
黄芩	MOL001458	coptisine	30.67	0.86
黄芩	MOL001490	bis[（2S）－2－ethylhexyl] benzene－1,2－dicarboxylate	43.59	0.35
黄芩	MOL001506	supraene	33.55	0.42
黄芩	MOL002879	diop	43.59	0.39
黄芩	MOL002897	epiberberine	43.09	0.78
黄芩	MOL008206	moslosooflavone	44.09	0.25
黄芩	MOL010415	11,13－eicosadienoic acid,methyl ester	39.28	0.23
黄芩	MOL012245	5,7,4′－trihydroxy－6－methoxyflavanone	36.63	0.27
黄芩	MOL012246	5,7,4′－trihydroxy－8－methoxyflavanone	74.24	0.26
黄芩	MOL012266	rivularin	37.94	0.37
西洋参	MOL011394	（2R,3S,4S,5R,6R）－2－（hydroxymethyl）－6－[（3S,5R,8R,9R,10R,12R,13R,14R,17S）－12－hydroxy－4,4,8,10,14－pentamethyl－17－（2S）－6－methyl－2－[（2S,3R,4S,5S,6R）－3,4,5－trihydroxy－6－（hydroxymethyl）oxan－2－yl]oxyhept－5－en－2－yl]－2,3,5,6,7,9,11,12,13,15,16,17－dodecahydro－1H－c	36.43	0.25
西洋参	MOL011435	PQ－2	36.74	0.19
西洋参	MOL011442	（8S,9S,10R,13R,14S,17R）－17－[（1R,4R）－4－ethyl－1,5－dimethylhexyl]－10,13－dimethyl－1,2,8,9,11,12,14,15,16,17－decahydrocyclopenta[a]phenanthren－7－one	43.87	0.75
西洋参	MOL011455	20－hexadecanoylingenol	32.70	0.65
西洋参	MOL005344	ginsenoside rh2	36.32	0.56
西洋参	MOL006774	stigmast－7－enol	37.42	0.75
西洋参	MOL006980	papaverine	64.04	0.38
西洋参	MOL008173	daucosterol_qt	36.91	0.75
西洋参	MOL008397	daturilin	50.37	0.77
淫羊藿	MOL001510	24－epicampesterol	37.58	0.71
淫羊藿	MOL001645	linoleyl acetate	42.10	0.20
淫羊藿	MOL001771	poriferast－5－en－3beta－ol	36.91	0.75
淫羊藿	MOL001792	DFV	32.76	0.18
淫羊藿	MOL003044	chryseriol	35.85	0.27
淫羊藿	MOL003542	8－isopentenyl－kaempferol	38.04	0.39

续表 2　益气利湿方活性成分

中药	Mol ID	活性成分	OB/%	DL
淫羊藿	MOL004367	olivil	62.23	0.41
淫羊藿	MOL004373	anhydroicaritin	45.41	0.44
淫羊藿	MOL004380	C－homoerythrinan,1,6－didehydro－3,15,16－trimethoxy－,(3. beta.)－	39.14	0.49
淫羊藿	MOL004382	yinyanghuo A	56.96	0.77
淫羊藿	MOL004384	yinyanghuo C	45.67	0.50
淫羊藿	MOL004386	yinyanghuo E	51.63	0.55
淫羊藿	MOL004388	6－hydroxy－11,12－dimethoxy－2,2－dimethyl－1,8－dioxo－2,3,4,8－tetrahydro－1H－isochromeno[3,4－h]isoquinolin－2－ium	60.64	0.66
淫羊藿	MOL004391	8－(3－methylbut－2－enyl)－2－phenyl－chromone	48.54	0.25
淫羊藿	MOL004394	Anhydroicaritin－3－O－alpha－L－rhamnoside	41.58	0.61
淫羊藿	MOL004396	1,2－bis(4－hydroxy－3－methoxyphenyl)propan－1,3－diol	52.31	0.22
淫羊藿	MOL004425	icariin	41.58	0.61
淫羊藿	MOL004427	icariside A7	31.91	0.86
淫羊藿	MOL000006	luteolin	36.16	0.25
淫羊藿	MOL000622	magnograndiolide	63.71	0.19
当归、黄芩、西洋参	MOL000358	beta－sitosterol	36.91	0.75
当归、黄芩	MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76
茯苓、黄芪	MOL000296	hederagenin	36.91	0.75
黄芩、淫羊藿	MOL000359	sitosterol	36.91	0.75
黄芪、淫羊藿	MOL000422	kaempferol	41.88	0.24
黄芪、淫羊藿	MOL000098	quercetin	46.43	0.28

3.1.2　益气利湿方治疗 HIV/AIDS 的关键成分

将 237 个交集靶点与益气利湿方活性成分导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化分析，见图 2。该网络包含 324 个节点和 1 493 条边。由图可知，一种成分可作用于不同靶点，不同成分可作用于同一靶点，表明益气利湿方通过多成分、多靶点发挥治疗 HIV/AIDS 的效果。将网络中度值排名前 15 位的活性成分作为益气利湿方治疗 HIV/AIDS 的关键成分，主要包括 MOL000098(196)、MOL000422(80)、MOL000358(51)、MOL000438(47)、MOL000285(47)、MOL000006(46)、MOL002908(42)、MOL000287(39)、MOL000398(39)、MOL000280(35)、MOL000300(33)、MOL000173(32)、MOL000276(29)、MOL000292(27)、MOL000392(26)。

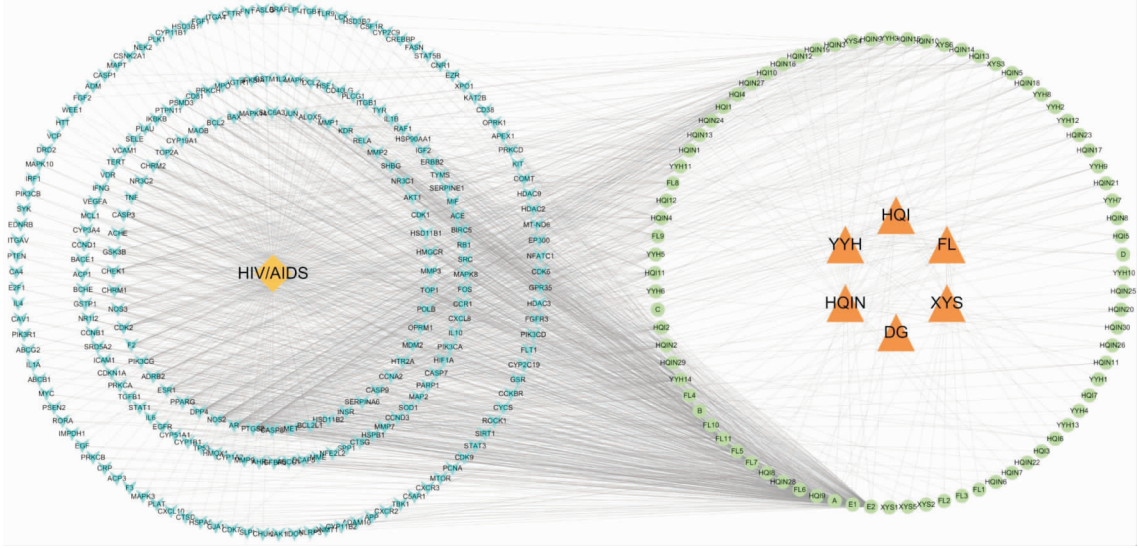


图 2　活性成分－交集靶点 PPI 网络图

3.1.3　益气利湿方治疗 HIV/AIDS 的核心靶点

将 237 个交集靶点输入 STRING 数据库，构建 PPI 网络，见图 3。该网络共有 216 个节点和 1 048 条边。将网络中度值 > 10 的靶点作为益气利湿方治疗 HIV/AIDS 的核心靶点，主要包括肿瘤蛋白 p53（tumor protein 53，TP53，61）、AKT1（45）、表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR，28）、白细胞介素 - 6（interleukin - 6，IL - 6，27）、MAPK1（26）、MAPK3（25）、PIK3R1（26）、BCL2（22）、BCL2L1（13）、CASP3（23）、CASP9（10）。

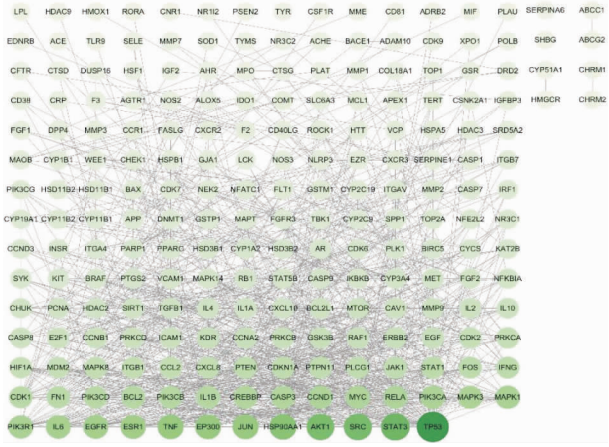


图 3　交集靶点 PPI 网络图

3.1.4　GO 与 KEGG 富集分析结果

GO 分析结果表明，益气利湿方治疗 HIV/AIDS 的生物过程（biological process，BP）主要富集于对外源刺激的反应、基因表达的调控、细胞增殖的调节、凋亡过程的调控、蛋白质磷酸化、RNA 聚合酶Ⅱ启动子的转录等；细胞组分（cellular component，CC）主要富集于复杂大分子、细胞质、膜筏、核浆、细胞表面、胞质等；分子功能（molecular function，MF）主要富集于酶结合、相同蛋白结合、蛋白激酶活性、蛋白结合、蛋白磷酸酶结合等，见图 4。

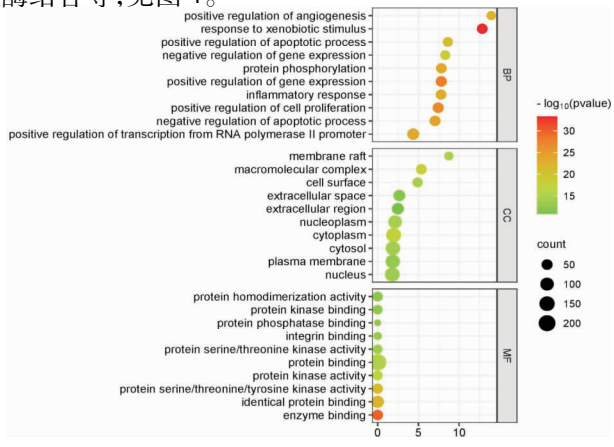


图 4　GO 富集分析气泡图

KEGG 分析结果表明，益气利湿方治疗 HIV/AIDS 主要与 PI3K/AKT 信号通路、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、人 T 细胞白血病病毒 1 感染等信号通路有关，见图 5。结合 KEGG 通路与文献分析，排除癌症等干扰通路，最终选择 PI3K/AKT 信号通路作为后续研究通路。

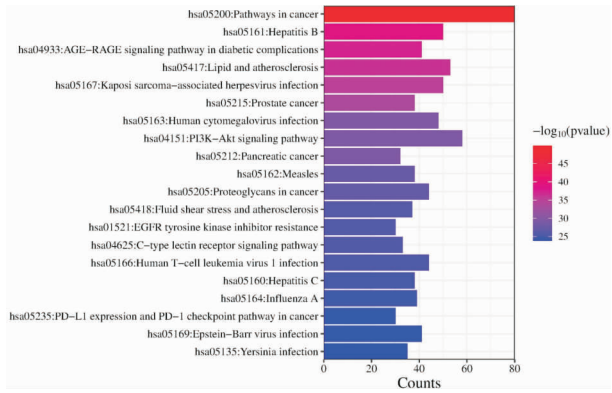


图 5　KEGG 富集分析条形图

3.1.5　分子对接结果

选择 PI3K/AKT 信号通路中与凋亡相关的 BCL2L1、Caspase - 3、Caspase - 9、MAPK1（ERK）4 个靶点和益气利湿方关键成分进行分子对接。对接结合能值越小说明配体和受体结合越稳定，小于 - 5 kcal · mol^{-1}时结合活性较好。结果显示，关键成分与核心靶点具有较好的亲和力和结合活性，见表 3。可视化分析模型见图 6。

表 3　关键成分与核心靶点的分子对接结果

配体	受体	结合能/kcal · mol^{-1}
人参皂苷 F2	BCL2L1	- 7.552
茯苓酸 C	BCL2L1	- 6.878
20（S）- 人参皂苷 Rh2	Caspase - 3	- 8.060
β - 谷甾醇	Caspase - 3	- 6.002
β - 谷甾醇	Caspase - 9	- 6.247
槲皮素	Caspase - 9	- 5.046
槲皮素	MAPK1（ERK）	- 5.198
木犀草素	MAPK1（ERK）	- 5.111

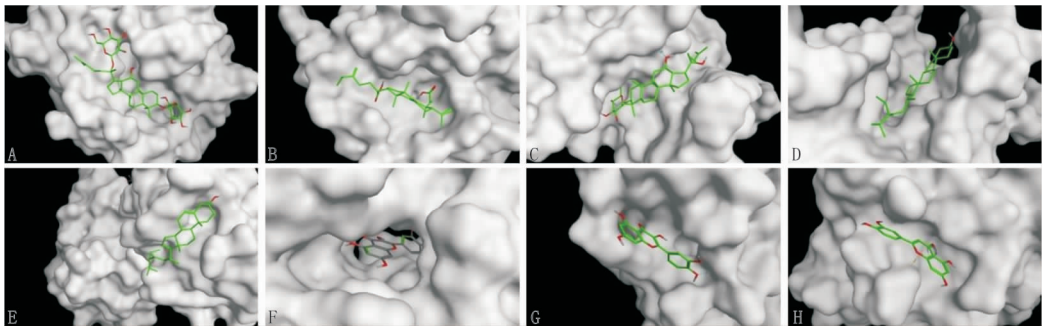
3.2　细胞实验验证结果

3.2.1　HIV_{NL4-3}感染 MT - 4 细胞模型建立

CCK - 8 检测显示，与 control 比较，在 HIV_{NL4-3}假病毒稀释 2 倍、4 倍、8 倍时，细胞的 OD 值显著降低（$P < 0.05$），见图 7。为保证 HIV_{NL4-3}感染成功后，MT - 4 细胞仍保留一定活性，后续实验选择 HIV_{NL4-3}稀释 4 倍。

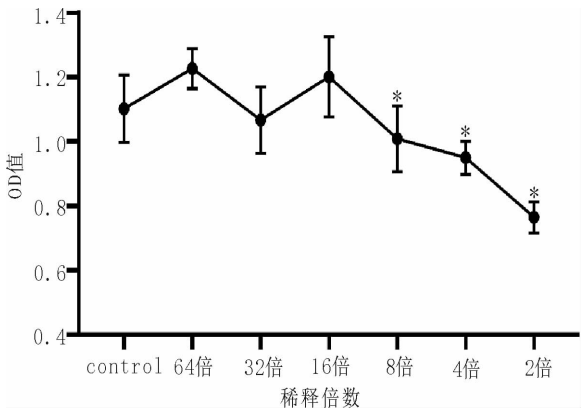
3.2.2　益气利湿方对 MT - 4 细胞活性的影响

与对照组比较，模型组细胞存活率降低（$P < 0.05$）。与模型组比较，YQLS - L 组、YQLS - M 组、YQLS - H 组细胞存活率升高（$P < 0.05$），见表 4。



注：A：BCL2L1 和 20(S)－人参皂苷 Rh；B：BCL2L1 和茯苓酸 C；C：Caspase－3 和 20(S)－人参皂苷 Rh；D：Caspase－3 和 β－谷甾醇；E：Caspase－9 和 β－谷甾醇；F：Caspase－9 和槲皮素；G：MAPK1(ERK)和槲皮素；H：MAPK1(ERK)和木犀草素。

图 6　分子对接可视化图



注：与 control 比较，$*P<0.05$。

图 7　不同稀释浓度 HIV_{NL4-3} 感染 MT－4 细胞活性比较

3.2.3　益气利湿方对 MT－4 细胞凋亡的影响

与对照组比较，模型组细胞早期凋亡率、晚期凋亡率及总凋亡率升高（$P<0.01$）。与模型组比较，YQLS－L 组、YQLS－M 组、YQLS－H 组细胞晚期凋亡率和总凋亡率降低（$P<0.01$），见图 8、表 5。

表 4　各组 MT－4 细胞存活率比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	细胞存活率/%
对照组	3	218.640±8.997▲▲
模型组	3	100
YQLS－L 组	3	180.520±16.629▲▲
YQLS－M 组	3	139.780±6.831▲▲
YQLS－H 组	3	125.100±18.213▲

注：与模型组比较，▲$P<0.05$，▲▲$P<0.01$。

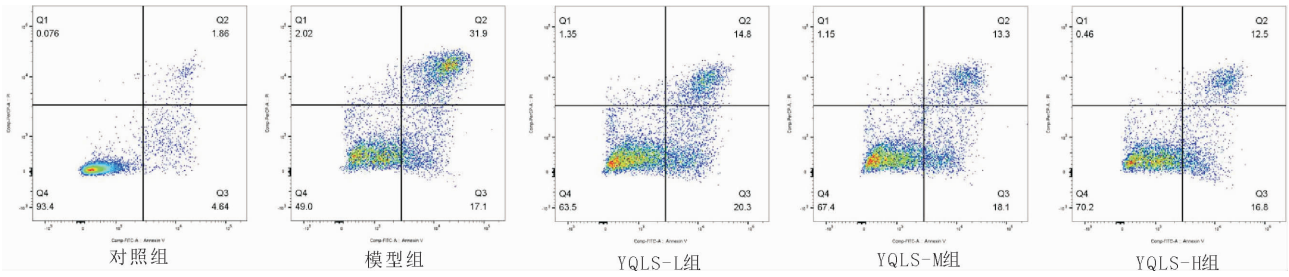


图 8　各组细胞凋亡流式图

表 5　各组 MT－4 细胞不同时期凋亡率比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	早期凋亡率/%	晚期凋亡率/%	总凋亡率/%
对照组	3	4.983±0.765	2.006±0.289	6.990±0.615
模型组	3	16.966±2.203＊＊	32.966±3.911＊＊	49.933±1.793＊＊
YQLS－L 组	3	21.800±4.349	12.133±3.478▲▲	33.933±1.850▲▲
YQLS－M 组	3	15.666±2.940	14.266±0.850▲▲	29.933±1.540▲▲
YQLS－H 组	3	19.000±2.030	8.290±3.646▲▲	27.290±1.867▲▲

注：与对照组比较，＊＊$P<0.01$；与模型组比较，▲▲$P<0.01$。

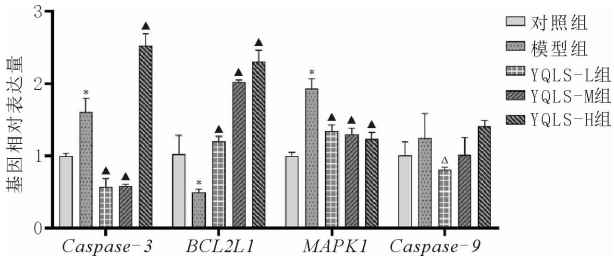
3.2.4　益气利湿方对 MT－4 细胞 PI3K/AKT 通路相关基因表达水平的影响

与对照组比较，模型组细胞 *BCL2L1* mRNA 水平降低，*Caspase－3* mRNA、*MAPK1* mRNA 水平升高（$P<0.01$）。与模型组比较，YQLS－L 组、YQLS－M 组、YQLS－H 组细胞 *BCL2L1* mRNA 水平升高，*MAPK1* mRNA 水平降低（$P<0.01$）。与模型组比较，YQLS－L 组、YQLS－M 组细胞 *Caspase－3* mRNA 水平降低（$P<0.01$），YQLS－H 组细胞 *Caspase－3* mRNA 水平升高（$P<0.01$）。与模型组比较，YQLS－L 组细胞 *Caspase－9* mRNA 水平降低（$P<0.01$），见图 9。

3.2.5　益气利湿方对 MT－4 细胞 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达水平的影响

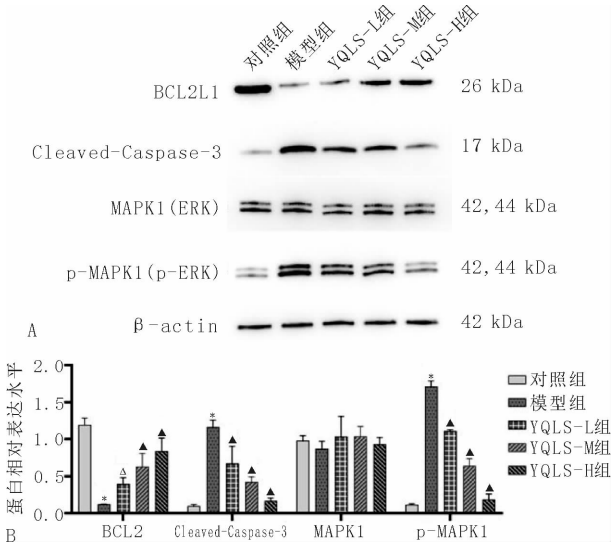
与对照组比较，模型组细胞 BCL2L1 蛋白表达水平降低，Cleaved－

Caspase－3、p－MAPK1（p－ERK）蛋白表达水平升高（$P < 0.01$）。与模型组比较，YQLS－L 组、YQLS－M 组、YQLS－H 组细胞 BCL2L1 蛋白表达水平升高（$P < 0.05$），Cleaved－Caspase－3、p－MAPK1（p－ERK）蛋白表达水平降低（$P < 0.01$），见图 10。



注：与对照组比较，＊$P < 0.01$；与模型组比较，▲$P < 0.01$。

图 9　各组 MT－4 细胞 *BCL2L1*、*Caspase－3*、*Caspase－9*、*MAPK1* 基因表达水平比较



注：A：蛋白条带图；B：蛋白表达水平比较；与对照组比较，＊$P < 0.01$；与模型组比较，▲$P < 0.01$，△$P < 0.05$。

图 10　各组 MT－4 细胞 BCL2L1、Cleaved－Caspase－3、MAPK1（ERK）、p－MAPK1（p－ERK）蛋白表达水平比较

4　讨论

HIV 感染的主要病理特征是 $CD4^+$ T 细胞数量进行性减少和功能受损，因此提高 $CD4^+$ T 细胞数量对促进艾滋病患者免疫重建至关重要[11]。益气利湿方由黄芪、黄芩、西洋参、淫羊藿、当归、茯苓等中药组成，方中黄芪健脾益气为君药，西洋参补气、茯苓渗湿为臣药，黄芩清热燥湿解毒、淫羊藿补肾壮阳除湿、当归补血活血共为佐药，全方共奏益气温阳、祛湿化瘀之功。现代药理研究表明，黄芪含有多糖类、皂苷类、黄酮类、氨基酸等有效成分，具有增强免疫力、抗肿瘤等药理作用。黄芪注射液可通过激活 PI3K/AKT 信号通路，改善肺结核大鼠的免疫功能，减轻炎症反应，同时抑制细胞自噬和凋亡[12]。西洋参含有人参皂苷、挥发油、氨基酸、蛋白质及多肽、糖类、聚炔类、无机盐类等多种活性成分[13－15]，不仅具有免疫调节、抗氧化等活性，还能协同调节其他药理活性。淫羊藿的主要活性化合物在调节免疫耐受过程中，不同化合物之间可能存在协同作用[16]。

本研究利用网络药理学方法筛选出益气利湿方治疗 HIV/AIDS 的重要通路和作用靶点，其中与 $CD4^+$ T 细胞凋亡有关的靶点 BCL2L1、Caspase－3、Caspase－9、MAPK1（ERK）均处于 PI3K/AKT 信号通路的下游。研究表明，PI3K/AKT 信号通路与细胞凋亡息息相关[17]。该通路下游 *Bcl－2* 基因是调控细胞内在凋亡的主要途径之一，可通过调节线粒体膜通透性[18－19]，导致细胞色素 C 释放，进而活化 Caspase－9。Caspase－9 可以激活下游 Caspase－3，引起下游级联反应，从而促进细胞凋亡[20]。MAPK1（ERK）作为 PI3K/AKT 通路的下游蛋白之一，能调控细胞增殖、凋亡、分化及肿瘤化等生物学反应，其激活后可调控多种凋亡因子的表达，进而诱导细胞凋亡[21]。BCL2 与 BCL2L1 也可通过拮抗促凋亡蛋白或隔离 Bcl－2 家族中的凋亡效应蛋白来减少细胞凋亡[22]。

研究显示，$CD4^+$ T 细胞计数低会影响艾滋病 ART 后免疫功能重建，免疫重建不全的基线危险因素也包括 $CD4^+$ T 淋巴细胞计数偏低[23－24]。本研究发现，益气利湿方可能通过调控 PI3K/AKT 信号通路及其下游靶点，进而抑制 $CD4^+$ T 细胞凋亡。AIDS 是一种复杂且治疗难度极高的疾病，为了提升患者的生活质量，未来仍需在药物筛选和临床试验等方面做出巨大努力。

参考文献：

[1] 张福杰，赵燕，马烨，等. 中国免费艾滋病抗病毒治疗进展与成就[J]. 中国艾滋病性病，2022，28（1）：6－9.

[2] LEDERMAN M M，FUNDERBURG N T，SEKALY R P，et al. Residual immune dysregulation syndrome in treated HIV infection[J]. Adv Immunol，2013，119：51－8.

[3] DURAND C M，CAPOFERRI A A，REDD A D，et al. Allogeneic bone marrow transplantation with post－transplant cyclophosphamide for patients with HIV and haematological malignancies：a feasibility study[J]. Lancet HIV，2020，7（9）：e602－e610.

[4]AKILIMALI N A,CHANG C C,MUEMA D M,et al. Plasma but not cerebrospinal fluid interleukin 7 and interleukin 5 levels pre – antiretroviral therapy commencement predict cryptococcosis – associated immune reconstitution inflammatory syndrome[J]. Clin Infect Dis,2017,65(9):1551 – 1559.
[5]王健,郭会军. 中医药治疗艾滋病进展及展望[J]. 中国艾滋病性病,2022,28(3):257 – 260.
[6]楼一方,蔡生兴,胡晓楠,等. 中医药治疗艾滋病免疫重建不良的临床研究证据分析[J]. 中国艾滋病性病,2024,30(3):253 – 258.
[7]贾皇超,刘学伟,金艳涛,等. 运用线性混合效应模型分析中医药对 HIV 感染者 $CD4^+$ T 淋巴细胞计数长期变化的影响[J]. 中国皮肤性病学杂志,2024,38(2):200 – 208.
[8]世界中医药学会联合会. 网络药理学评价方法指南[J]. 世界中医药,2021,16(4):527 – 5.
[9]邢炎华,张建,黄壮壮,等. 基于网络药理学和分子对接的补气通络颗粒抗心血管疾病作用机理研究[J]. 中国现代医药杂志,2024,26(1):11 – 16.
[10]国锦,高燕,赵渤年. 中药复方血清药理学研究方法进展[J]. 中华中医药杂志,2017,32(4):1656 – 1658.
[11]林耿辉,方桂真. 艾滋病确诊后 $CD4^+/CD8^+$ 动态变化的分析[J]. 中国城乡企业卫生,2023,38(10):145 – 147.
[12]侯良绢,李晓朋,赵春娥,等. 黄芪注射液对肺结核大鼠免疫功能、自噬和凋亡的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2022,38(10):1092 – 1096.
[13]尚金燕,李桂荣,邵明辉,等. 西洋参的药理作用研究进展[J]. 人参研究,2016,28(6):49 – 51.
[14]张浩. 人参活性成分蛋白质、氨基酸、有机酸及核苷类成分研究[D]. 长春:吉林大学,2016.
[15]DAI Z B,LIU Y,ZHANG X N,et al. Metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae for production of ginsenosides[J]. Metab Eng,2013,20:146 – 156.
[16]陈媛媛,李敏,崔树娜. 基于网络药理学的淫羊藿调节免疫耐受作用机制研究[J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版,2022,43(2):69 – 77.
[17]OSAKI M,OSHIMURA M,ITO H. PI3K – Akt pathway:Its functions and alterations in human cancer[J]. Apoptosis,2004,9(6):667 – 676.
[18]UREN R T,O′HELY M,IYER S,et al. Disordered clusters of Bak dimers rupture mitochondria during apoptosis[J]. eLife,2017,6:e19944.
[19]ELMORE S. Apoptosis:a review of programmed cell death[J]. Toxicol Pathol,2007,35(4):495 – 516.
[20]余孝海,刘国莹,钟明奎. 凋亡蛋白 Caspase – 9/Caspase – 3 在慢性间歇性低氧模型小鼠肝损伤中的作用[J]. 九江学院学报:自然科学版,2023,38(3):102 – 105,113.
[21]林思,秦慧真,邓玲玉,等. 芹菜素通过 PI3K/Akt 和 MAPK 信号通路诱导人大肠癌 CL187 细胞凋亡[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(19):97 – 104.
[22]王文芳,曲婷. 人参皂苷 RH2 通过 BCL2L1/PI3K/AKT 信号通路逆转环磷酰胺诱导的卵巢颗粒细胞损伤[J]. 实用药物与临床,2023,26(3):193 – 199.
[23]THAKER H K,SNOW M H. HIV viral suppression in the era of antiretroviral therapy[J]. Postgrad Med J,2003,79(927):36 – 42.
[24]王立洋. 艾滋病人基线 CMV 感染状态与 ART 后免疫重建不良的相关性研究[D]. 沈阳:中国医科大学,2018.

收稿日期:2024 – 11 – 20

作者简介:袁硕阳(1997 –),男,河南安阳人,硕士研究生,研究方向:中药临床药学。
通信作者:李强(1973 –),男,河南郑州人,主任药师,硕士研究生导师,研究方向:中药免疫调节。E – mail:hnaidstcmkl@163.com

编辑:刘凯歌