

【实验研究】

基于网络药理学的急支糖浆治疗咳嗽的作用机制研究及实验验证

黄琪¹, 朱依玲¹, 余捷¹, 李亚娜¹, 张巍², 郭利伟^{1*}

1. 长江大学, 湖北 荆州 434025

2. 农业部畜禽细菌病防治制剂创制重点实验室, 湖北 武汉 430064

摘要: **目的** 运用网络药理学的方法挖掘中药复方急支糖浆治疗咳嗽的有效成分、关键靶点以及潜在作用通路。**方法** 分别利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)和Genecards数据库筛选急支糖浆的活性成分作用靶点和咳嗽的疾病靶点, 两者靶点取交集后利用Cytoscape软件构建成分-靶点网络, String数据库构建蛋白质相互作用(PPI)网络, 拓扑分析获取关键靶点和成分。通过David数据库进行基因本体论(GO)生物学功能富集分析及京都基因和基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析。通过分子对接技术进一步佐证网络药理学结果的可靠性, 通过小鼠咳嗽模型进行实验验证。**结果** 急支糖浆中共筛选出活性成分163种, 可干预咳嗽相关靶点154个, GO富集586个, KEGG通路119条。其中, 槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇等可能为急支糖浆治疗咳嗽的关键成分, CXCL8、MAPK8、STAT3、TNF等为潜在靶点, GO富集分析的生物学功能涉及到细胞增殖、血管生成、炎症反应等, KEGG通路富集分析涉及到TNF、PI3K-Akt、FoxO、HIF-1等信号通路。超过90%的分子对接结果均具有一定的结合活性。使用流式细胞术、实时荧光定量PCR(qRT-PCR)、酶联免疫吸附(ELISA)的方法验证了急支糖浆对咳嗽小鼠淋巴细胞分化、炎症因子和部分关键靶点表达的影响。**结论** 急支糖浆治疗咳嗽的作用机制是通过多种活性成分作用于多靶点、多通路产生了调控炎症过程、调节免疫功能、促进细胞增殖、修复受损机体等综合效果, 该结果为进一步研究急支糖浆有效成分和作用机制奠定基础。

关键词: 网络药理学; 急支糖浆; 咳嗽; 炎症反应; 槲皮素; 山柰酚; β -谷甾醇**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2022)06-1029-10**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.06.003**Mechanism of Jizhi Syrup for treatment of cough based on network pharmacology and experimental verification**HUANG Qi¹, ZHU Yiling¹, YU Jie¹, LI Yana¹, ZHANG Wei², GUO Liwei¹

1. Yangtze University, Jingzhou 434025, China

2. Key Laboratory of Prevention and Control Agents for Animal Bacteriosis (Ministry of Agriculture), Wuhan 430064, China

Abstract: Objective To explore effective ingredients, key targets, and potential pathways of traditional Chinese medicine compound Jizhi Syrup for treatment of cough by method of network pharmacology. **Methods** TCMSP and genecards databases were used to screen active component action targets of Jizhi Syrup and disease targets of cough. After intersection of two targets, the component target network was constructed by Cytoscape software, and the protein-protein interaction network (PPI) was constructed by string database. The key targets and components were obtained by topological analysis. Gene Ontology (GO) biological function enrichment analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) signal pathway enrichment analysis were carried out through David database. The reliability of network pharmacological results was further confirmed by molecular docking technology, and verified by mouse cough model. **Results** A total of 163 active ingredients were selected from Jizhi Syrup, which could intervene 154 cough related targets, 586 GO enrichment and 119 KEGG pathways. Quercetin, kaempferol β -sitosterol may be the key components of Jizhi Syrup in treatment of cough. CXCL8, MAPK8, STAT3 and TNF are potential targets. The biological functions of GO enrichment analysis involve cell proliferation, angiogenesis and inflammatory response. KEGG pathway

收稿日期: 2021-12-23

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(31602099)

第一作者: 黄琪(1996—),男,硕士,现主要从事中兽医学及中药药理学方面的研究工作。E-mail: 302694015@qq.com

*通信作者: 郭利伟(1983—),女,博士,副教授,现主要从事中兽医学及中药药理学方面的研究工作。E-mail: guolw@yangtzeu.edu.cn

enrichment analysis involves TNF, PI3K-Akt, FOXO, HIF-1 and other signal pathways. More than 90% of the molecular docking results have certain binding activity. The effects of Jizhi Syrup on lymphocyte differentiation, inflammatory factors and the expression of some key targets in cough mice were verified by flow cytometry, real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Conclusion** The mechanism of Jizhi Syrup in treatment of cough is that multiple active components act on multiple targets and pathways, resulting in comprehensive effects of regulating inflammatory process, regulating immune function, promoting cell proliferation and repairing damaged body. The results lay a foundation for the further study of the effective components and mechanism of Jizhi Syrup.

Key words: network pharmacology; Jizhi Syrup; cough; inflammatory response; quercetin; kaempferol; β -sitosterol

咳嗽是由气管、支气管黏膜或胸膜受炎症、异物、物理或化学性刺激引起的1种常见的呼吸道症状,具有清除呼吸道异物和分泌物的保护性作用。但长期咳嗽会引起如胸闷、咽痒、喘气等并发症,给患者带来极大的痛苦。

急支糖浆处方源自上海医科大学沈自尹院士,收录于《中国药典》2020年版,列入2018年国家基本药物目录、2020年国家医保目录。该方由鱼腥草、金荞麦、四季青、麻黄、紫菀、前胡、枳壳、甘草8味中药组成,具有清热化痰、宣肺止咳的功效,用于外风热致的咳嗽,症见发热、恶寒、胸膈满闷、咳嗽咽痛;急性支气管炎、慢性支气管炎急性发作见上述证候者^[1]。目前,针对急支糖浆的文献报道多为其用于治疗小儿肺炎的临床观察以及主要成分的定量分析研究^[2-4],而关于其发挥宣肺止咳功效的药效物质基础及其多成分、多靶点、多途径的网络调节机制尚未见报道。

网络药理学是基因组学、拓扑学、计算组学等多学科、多技术的结合运用,在方法学上具有整体、动态、分析于一体的特点,与中药复方通过君臣佐使多味中药协同作用有异曲同工之妙,强调系统性和整体性^[5-6]。网络药理学在阐明中药及其复方制剂的药效成分及作用机制方面具有传统方法无法比拟的优势。因此,本研究利用网络药理学方法,对急支糖浆中多个化合物进行了作用靶点和通路预测,通过构建化合物-靶点-通路-药理作用-功效网络探讨急支糖浆治疗咳嗽的机制。

1 材料与方法

1.1 急支糖浆活性成分筛选及其靶点的获取

通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://www.tcmsp-e.com/>)预测急支糖浆中鱼腥草、金荞麦、四季青、麻黄、紫菀、前胡、枳壳、甘草8味中药中总化学成分的吸收、分布和代谢。依据文献,设置生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 和类药性(DL) ≥ 0.18 为筛选标准^[7],并去除重复的化合物,筛选

出高活性化合物。

1.2 急支糖浆有效成分靶点标准化

依据筛选出的关键化合物通过TCMSP获取相应的靶点,设置物种为Homo sapiens,再通过Uniprot数据库(<https://www.uniprot.org>)和Drugbank数据库(<https://go.drugbank.com>)联合搜索获取靶点的Symbol简称。

1.3 咳嗽疾病相关靶点获取并筛选与药物共有靶点

以“Cough”为关键词,搜索Genecards数据库(<https://www.genecards.org>),获得咳嗽疾病相关靶点。将筛选出的药物靶点和疾病靶点绘制韦恩图。

1.4 蛋白质相互作用(PPI)网络及拓扑分析

将药物疾病共有靶点输入String数据库(<https://www.string-db.org>)进行PPI的构建,生物背景设定为Homo sapiens,得到PPI网络,并将PPI网络导入Cytoscape中,使用Network Analyzer工具进行拓扑分析,并构建有效成分-共有靶点网络图。

1.5 基因本体论(GO)生物学功能富集分析及京都基因和基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析

将药物治疗疾病潜在靶点导入David数据库(<https://david.ncifcrf.gov>),设置生物背景为Homo sapiens,进行GO生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)、细胞组分(cell component, CC)富集分析;根据KEGG数据库进行通路富集分析,并绘制柱状图和气泡图。

1.6 分子对接验证

根据网络药理学分析结果,随机选取部分成分-靶点网络的核心靶点和PPI网络的核心靶点,与成分-靶点网络的核心成分中度中心性较高的前10种化合物,并分别在PDB数据库(<http://www.rcsb.org/>)获取相应的靶点蛋白3D模型和Pubchem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取药物分子3D模型,使用SYBYL-X软件进行分子对接,获

取总分数(total score)值,分值高低表示靶点蛋白与小分子化合物的结合活性,当分值 ≥ 4.25 ,说明分子与靶点具有一定的结合活性;得分 ≥ 5.0 ,说明有较好的结合活性^[8]。

1.7 急支糖浆治疗咳嗽的体内验证实验

1.7.1 材料与仪器 急支糖浆(每瓶180 mL,批号:20210140),太极集团重庆涪陵制药厂有限公司;氨水(批号:20200708),国药集团化学试剂有限公司;AP-MN-MS-RNA-250(批号:25017KD1),Axygen Scientific Inc;TB Green Premix Ex Taq™ II(批号:AL31518A)、PrimeScript™ RT Master Mix,(批号:AL11871A),Takara Bio Inc;SEKM-0002(批号:20210425),SEKM-0007(批号:20210425),SEKM-0034(批号:20210425),北京索莱宝科技有限公司;BD Pharmingen™ FITC Hamster Anti-Mouse CD3e(批号:9087972)、BD Horizon™ BB700 Rat Anti-Mouse CD4(批号:9080819)和BD Pharmingen™ PE Rat Anti-Mouse CD8a(批号:9092979),BD Biosciences Company Co., Ltd. Milli-Q IQ7010超纯水仪,Millipore, Bedford MA Co., Ltd.;FACSCalibur流式细胞仪,BD Biosciences Company Co., Ltd.;5430R低温高速离心机,Eppendorf AG Co., Ltd.;CXT96 Touch荧光定量PCR仪,Bio-Rad Laboratories Co., Ltd.;N60微量分光光度计,Implen GmbH Co., Ltd.

1.7.2 试验方案 选用平均体质量为(25.0 \pm 1.3)g的BALB/c雄性小鼠[购自三峡大学实验动物中心,动物生产许可证号SCXK(鄂)2017-0012],饲养于实验动物房,温度为(25 \pm 2) $^{\circ}$ C,湿度为(55 \pm 5)%,光照/黑暗周期为12 h,1周适应环境,正常饮水饮食。动物实验通过长江大学医学院伦理委员会审批。分为对照组、模型组、急支糖浆组,每组10只。对照组、模型组给予同等体积纯水,急支糖浆组给予1:6稀释的急支糖浆,300 μ L \cdot d⁻¹,急支糖浆剂量依据产品说明书儿童每日用量换算。连续给药9 d后,使用氨水刺激,制备咳嗽模型成功后2 h解剖,取肺脏、血清、肺灌洗液备用。

小鼠咳嗽模型的制备方法:氨气(396 mm \times 215 mm \times 172 mm鼠笼滴加0.75 mL氨水,待氨水自然挥发)刺激1~2 min,小鼠出现惊厥、大口吸气等症状后导入新鲜空气,10~20 min内小鼠3~4次呼吸间伴随1~2次剧烈呼吸,视为造模成功。

取肺脏组织,研磨、过筛、抗体染色后,使用流式细胞仪检测,FlowJo软件提取数据。取肺灌洗

液,使用ELISA试剂盒,检测白细胞介素(IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量。取肺脏组织超声破碎,提取总RNA,逆转录合成cDNA,进行实时荧光半定量PCR(qRT-PCR)检测。引物设计见表1。

表1 qRT-PCR反应引物
Table 1 Primers used in qRT-PCR

引物	序列(3'-5')
β -actin-F	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAA
β -actin-R	TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC
VEGFA-F	AGACAGTGCTCCAGCCG
VEGFA-R	CCTGGGACCACTTGGCA
STAT3-F	GTGCCAATTGTGATGCCTCC
STAT3-R	ACAGGATTGATGCCCAAGCA
AKT1-F	CCGCCTGATCAAGTTCTCTCT
AKT1-R	ATGATCCATGCGGGGCTTCT

1.7.3 统计学分析 试验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计分析采用 t 检验,比较两组间差异。所有的统计分析均使用SPSS 25.0软件进行。GraphPad软件作图。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 急支糖浆活性成分筛选及其靶点的获取

利用TCMSP获取急支糖浆的总成分,其中鱼腥草50种、金荞麦61种、四季青38种、麻黄363种、紫菀91种、前胡101种、枳壳17种、甘草280种化合物,依据生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 和类药性(DL) ≥ 0.18 为标准,并去除重复化合物,共获得163种高活性关键化合物,对应了275个靶点。

2.2 疾病靶点

查询上述163种高活性化合物的275个靶点信息,通过Uniprot数据库和Drugbank数据库联合搜索获取到基因的Symbol名和UniprotID。在Genecard数据库以“Cough”为关键词获取到咳嗽相关靶点共计4 400个,与药物高活性化合物交集的靶点共计154个。

2.3 高活性成分-疾病药物共有靶点网络关系图

将高活性成分、疾病药物共有靶点导入Cytoscape软件中,设置节点与边线将其互作关系绘制成可视化成分-靶点网络图(图1)。使用Network Analyzer工具进行网络分析,依据度中心性(degree)、接近中心性(closeness centrality)、中介中心性(betweenness centrality)大于等于其中位数,平均最短路径长度(average shortest path length)小

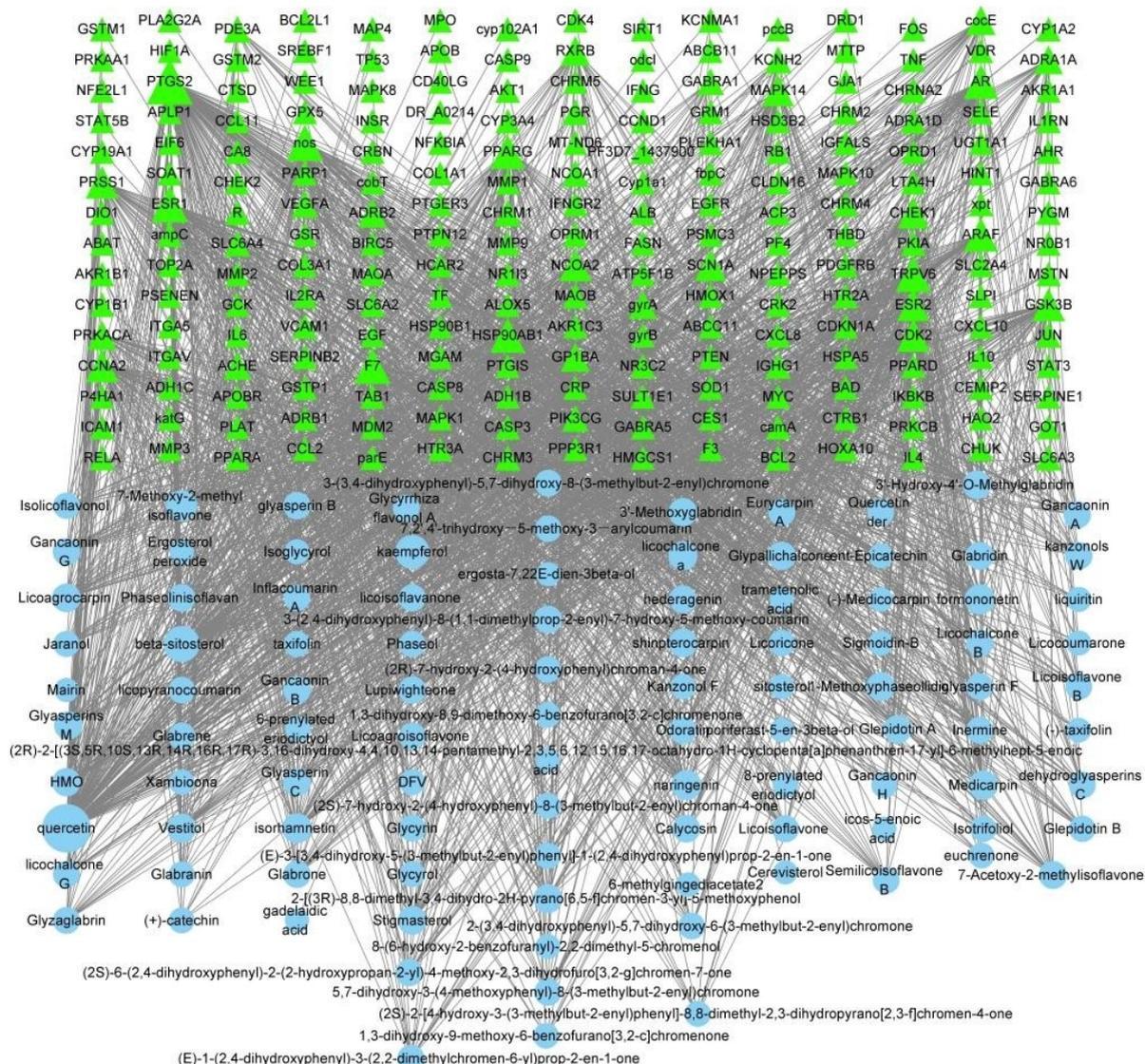


图1 急支糖浆治疗咳嗽成分-靶点网络

Fig. 1 Compound-target network of Jizhi Syrup for cough

于等于其中位数的规则筛选核心成分和核心靶点，核心成分有51个，包含有槲皮素(queretin)、山柰酚(kaempferol)、β-谷甾醇(beta-sitosterol)、木犀草素(luteolin)、异鼠李素(isorhamnetin)、柚皮素(naringenin)等，核心靶点有96个，包含有PTGS2、HSP90AB1、NOS、F7、PPARG、PTGS1、TRPV6、ESR1、AR、NCOA2等。

2.4 PPI网络构建

将疾病药物共有靶点导入String数据库，设置生物背景为Homo sapiens，筛选评分 ≥ 0.9 的蛋白互作关系，建立PPI网络，除去没有互作关系的蛋白(图2)。该网络包含145个节点，1123条互作关系。其中评分 ≥ 0.99 的互作关系有95条，包含AR-NCOA2、BAD-BCL2L1、BCL2L1-TP53、BCL2L1-

CASP8、CASP3-CASP8、CASP7-CASP8、CCNA2-CDK4、CCNA2-CDK2、CCNA2-CDKN1A、CCND1-CDKN1A等。数据导入Cytoscape软件并使用Network Analyzer工具进行网络分析，依据度中心性、接近中心性、中介中心性大于等于其中位数，平均最短路径长度小于等于其中位数的规则筛选出核心靶点，共计54个，包括CXCL8、VEGFA、JUN、MAPK8、STAT3、TNF、IL6、AKT1、MAPK1、TP53等。

2.5 GO富集分析

将疾病药物共有靶点导入David数据库，设置生物背景为Homo sapiens，进行GO的BC、MF、CC富集分析，筛选 P 值 ≤ 0.05 的项目，得到432项BC、56项MF、98项CC，选取各部分 P 值最小的前10项绘制柱状图(图3)。

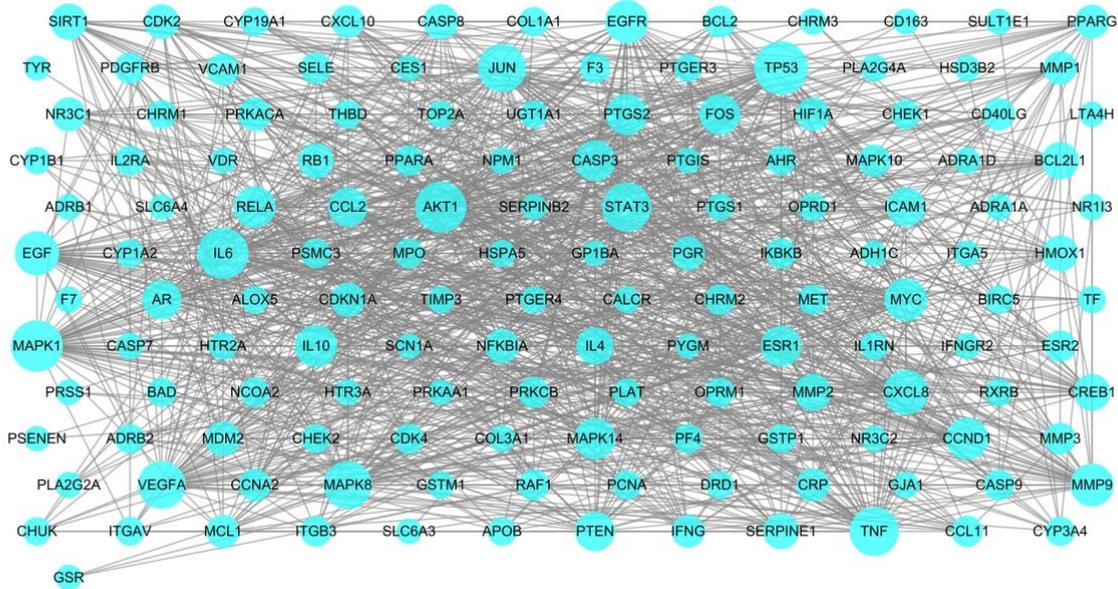


图2 急支糖浆治疗咳嗽靶点PPI网络
Fig. 2 PPI network of cough target treated with Jizhi Syrup

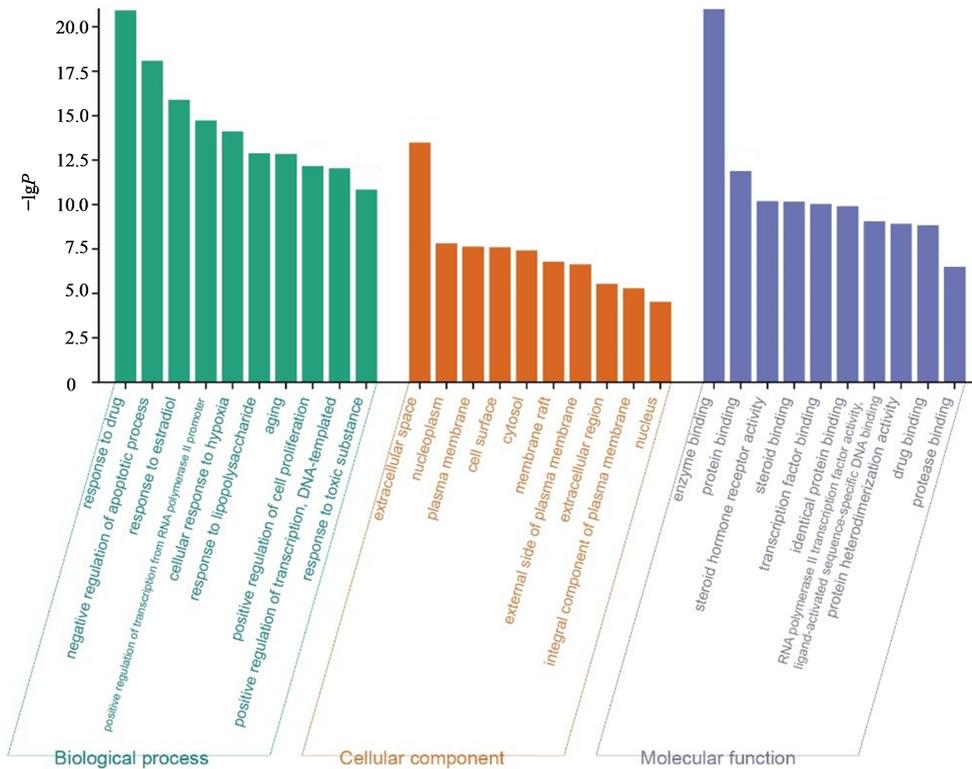


图3 急支糖浆治疗咳嗽靶点GO富集分析结果
Fig. 3 GO function enrichment analysis of cough target treated with Jizhi Syrup

2.6 KEGG通路富集

将疾病药物共有靶点导入David数据库,设置生物背景为Homo sapiens,进行KEGG通路富集分析,筛选 P 值 ≤ 0.05 的项目,共计富集到119条信号通路,选取 P 值最小的前30项绘制气泡图(图4)。

2.7 分子对接结果

根据网络药理学分析结果,随机选取部分成分-靶点网络的核心靶点和PPI网络的核心靶点CXCL8、VEGFA、MAPK8、STAT3、TNF、IL6、AKT1、MAPK1、TP53P、TGS2、ESR1、AR,与成分-

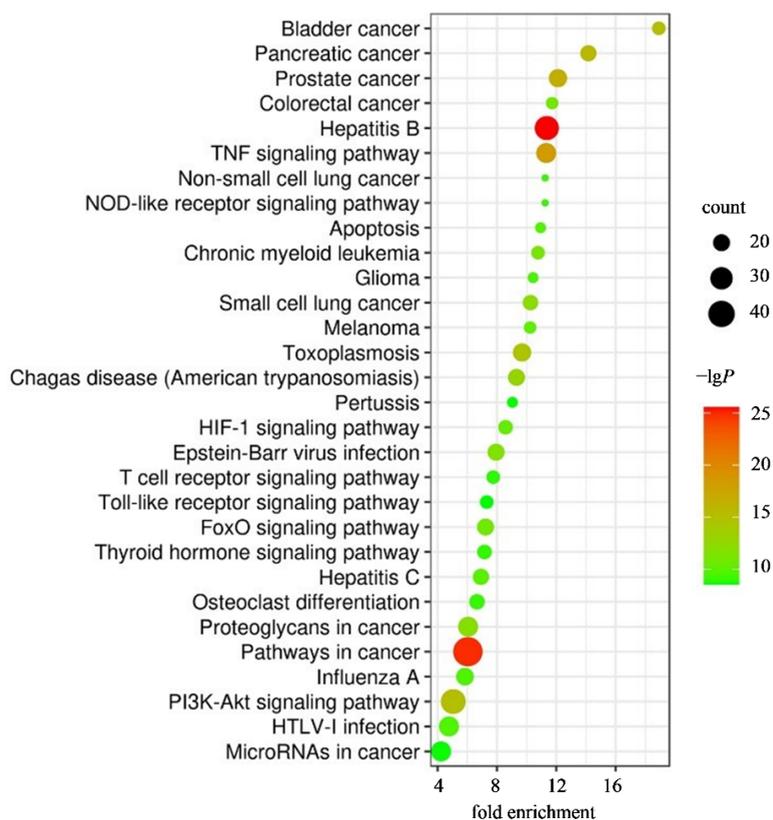


图4 急支糖浆治疗咳嗽潜在靶点的KEGG信号通路富集分析

Fig. 4 Enrichment analysis of KEGG signaling pathway of potential targets of cough target treated with Jizhi Syrup

靶点网络的核心成分中度中心性较高的前10个成分山柰酚、槲皮素、异鼠李素、β-谷甾醇、木犀草素、豆甾醇(stigmasterol)、柚皮素、高良姜素(galangin)、丹参酮II_A(tanshinone II_A)、川陈皮素(nobiletin)进行分子对接,结果绘制热图(图5)。总共进行了120次分子对接,其中分值<4.25的占10.8%;分值≥4.25

且<5.0的占11.8%;分值≥5.0的占78.4%。选取的超过90%的靶点蛋白与化合物分子都具有一定的结合活性,进一步佐证了基于网络药理学辨识有效成分的可靠性。

2.8 体内验证实验结果

流式细胞术检测结果见图6。模型组小鼠肺脏

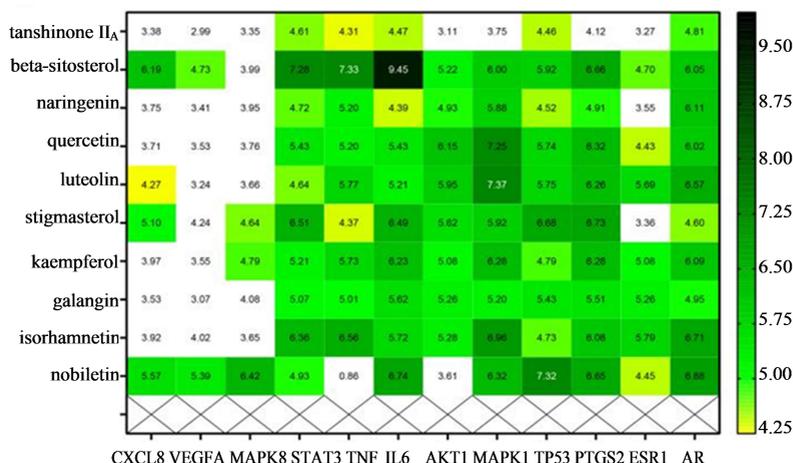
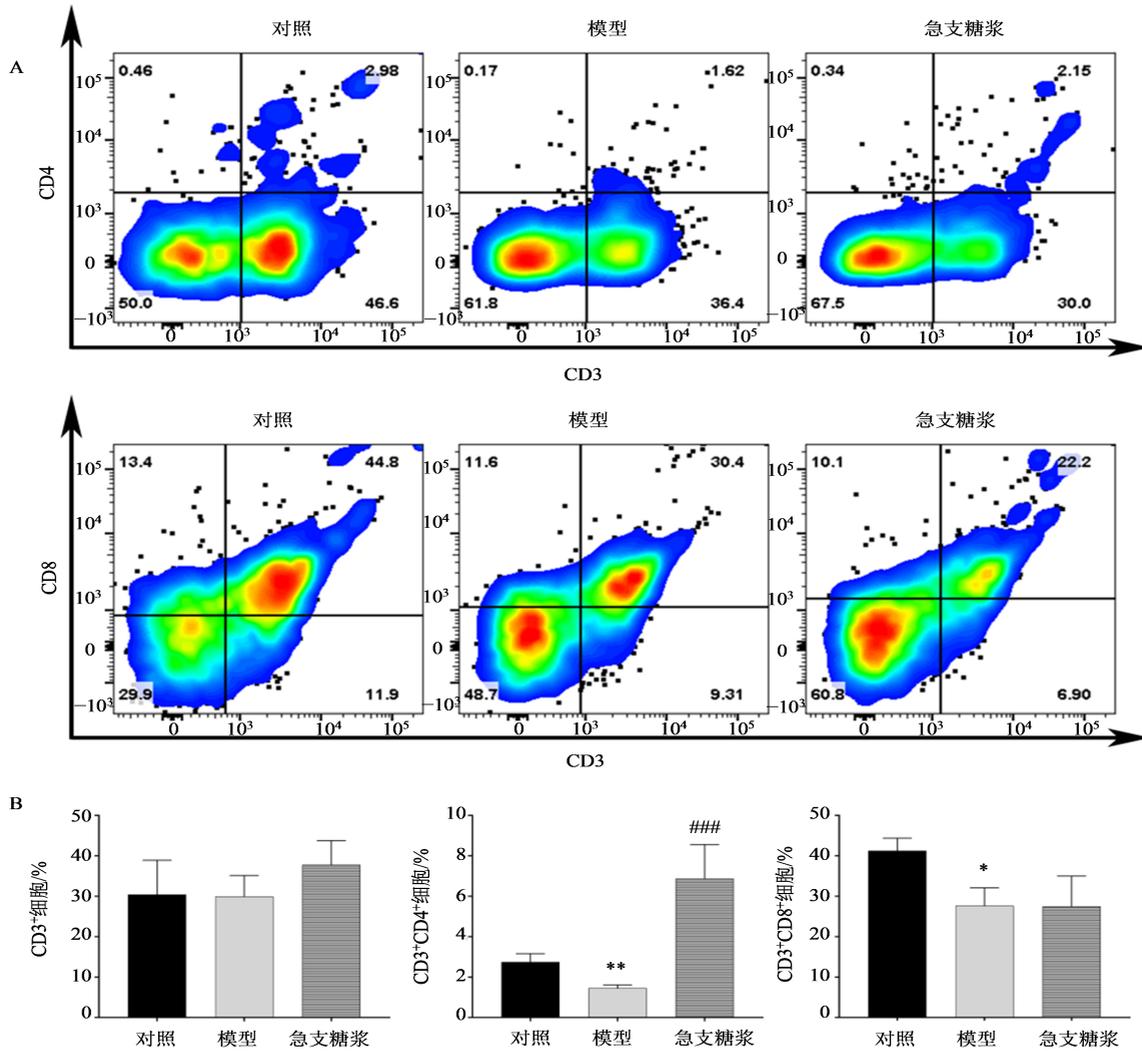


图5 急支糖浆治疗咳嗽关键成分和靶点分子对接分析

Fig. 5 Analysis of docking of key components and target molecules of Jizhi Syrup in treatment of cough



A-流式细胞仪检测结果; B-半定量分析; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$
 A-flow cytometry results; B-semi quantitative analysis; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group
图6 急支糖浆对咳嗽小鼠肺组织 CD3⁺CD4⁺细胞和 CD3⁺CD8⁺细胞比例的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 6 Effect of Jizhi Syrup on proportion of CD3⁺CD4⁺ cells and CD3⁺CD8⁺ cells in lung tissue of cough mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

中 CD3⁺CD4⁺细胞和 CD3⁺CD8⁺细胞的比例均显著低于对照组 ($P < 0.05, 0.01$); 急支糖浆组小鼠肺脏中 CD3⁺CD4⁺细胞的比例显著高于模型组 ($P < 0.001$), 但 CD3⁺CD8⁺细胞的比例与模型组相比, 无显著变化。

qRT-PCR 检测结果见图7。与对照组比较, 模型组小鼠肺组织中血管内皮生长因子A(VEGFA)的 mRNA 表达量显著上调 ($P < 0.001$), 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(AKT1)的 mRNA 表达量有上调趋势。与模型组比较, 急支糖浆组肺组织中 VEGFA 的 mRNA 表达量显著下调 ($P < 0.001$), 信号转导和转录激活因子3(STAT3)的 mRNA 表达量显著上调 ($P < 0.05$)。

ELISA 检测结果见图8。与对照组比较, 模型

组小鼠肺灌洗液中 TNF- α 水平显著提高 ($P < 0.01$), IL-1 β 和 IL-6 水平有提高的趋势。与模型组比较, 急支糖浆组肺灌洗液中 IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.05$), TNF- α 水平极显著降低 ($P < 0.001$), IL-6 水平有降低的趋势。

3 讨论

急支糖浆为治风寒外感、肺卫郁热或风热犯肺、痰热蕴毒之证而设, 具有“宣、清、利、豁”四大药用特点, 广泛使用于临床, 有望培育成年销售破5亿的中药大品种^[9]。但急支糖浆现有药理研究基础薄弱, 急需以急支糖浆处方为研究对象, 展开物质基础与作用机制研究, 同时建立两者的关联性, 寻找药物的作用靶点, 进而寻找代谢途径、信号通道。又可以结合作用机制, 论证有效物质基础, 从而使

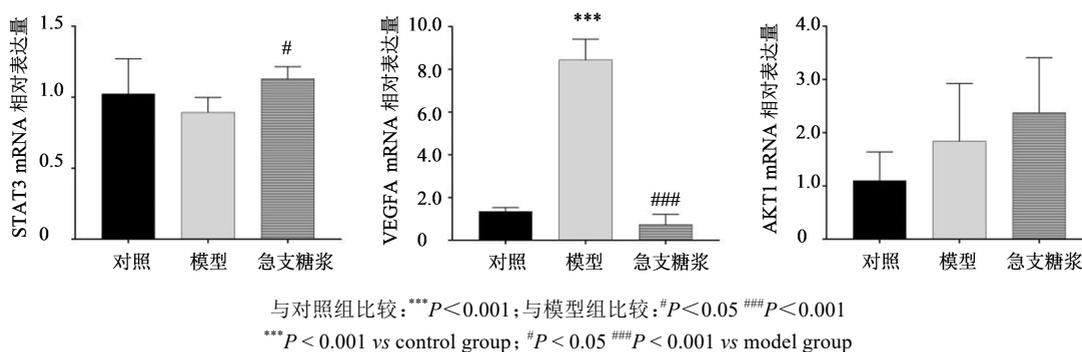


图7 急支糖浆对咳嗽小鼠肺组织STAT3、VEGFA和AKT1 mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 7 Effect of Jizhi Syrup on mRNA expression of STAT3, VEGFA and AKT1 in lung tissue of cough mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

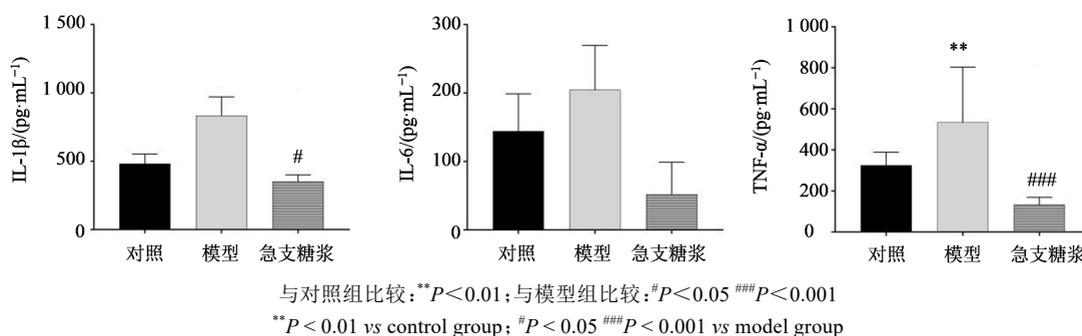


图8 急支糖浆对咳嗽小鼠肺灌洗液中IL-1β、IL-6和TNF-α水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 8 Effect of Jizhi Syrup on levels of IL-1β, IL-6, and TNF-α in alveolar lavage fluid of cough mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

急支糖浆成分明确、药效可靠、机制清楚,阐明止咳、化痰的科学内涵。

成分-靶点网络分析结果显示,急支糖浆治疗咳嗽是其中多种活性成分协同作用的结果。如槲皮素、山柰酚、β-谷甾醇、木犀草素、柚皮素等,这与目前基础及临床研究的结果相似,证明了本研究预测结果的可靠性。Lesjak等^[10]研究发现,槲皮素在体内被高效代谢,生成一系列衍生物,槲皮素及其6个衍生物异鼠李素、柞柳黄素(tamarixetin)等均有良好的抗氧化和抗炎活性。山柰酚是姜科山柰属植物根茎中主要黄酮苷提取物,有着良好的抗氧化和抗炎活性^[11-12]。β-谷甾醇有着良好的抗氧化和抗炎活性,Yin等^[13]的研究表明β-谷甾醇及其衍生物显著降低了天冬氨酸氨基转移酶(AST)和丙氨酸氨基转移酶(ALT)的血清活性,显著降低了TNF-α、IL-1β、IL-6的水平,显著提高了超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)表达,并抑制了丙二醛(MDA)的表达。木犀草素广泛存在于不同植物中,具有良好的抗氧化和抗炎活性^[14-15]。柚皮素是急支糖浆主要质量检测成分之一^[1]。柚皮素在慢性呼吸道炎症疾病中表现出良好的抗炎活性和显著的治疗效果,并且有着良好的抗病毒活

性,如登革热病毒、塞卡病毒、丙肝病毒^[16-19]等。

在PPI的分析中CXCL8、VEGFA、MAPK8、STAT3、TNF、IL6、AKT1、MAPK1、TP53等被预测为关键靶点。CXCL8主要由炎症相关的免疫细胞和癌细胞的一部分选择表达,主要介导炎症反应以及促进与肿瘤发生有关的增殖、血管生成和侵袭^[20]。VEGFA属于血管内皮生长因子(VEGF),能调节血管和淋巴管的增殖、迁移及分化,也参与了部分疾病^[21]。MAPK1和MAPK8都属于丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族,与细胞增殖、凋亡、应激以及炎症反应、癌症发生进展等过程有关^[22]。STAT3属于信号传导与转录激活因子(STAT)家族,研究发现STAT3对于伤口愈合和组织修复起着重要作用^[23],同时有研究发现STAT3能影响TP53以及TNF^[24-25]。

GO富集分析显示,生物学功能除了如对药物(GO:0042493)和毒物(GO:0009636)反应等这类正常应激外,主要涉及到如血管生成(GO:0001525)和收缩正向调节(GO:0045766)、正向调控细胞增殖(GO:0008284)、平滑肌细胞增殖(GO:0048661)、凋亡负调节(GO:0043066)等这类对机体损伤修复性调节,以及如炎症反应(GO:0006954)、促进一氧化氮合成(GO:0045429)、影响了机体对雌二醇的反

应(GO:0032355)、对TNF的反应(GO:0071356)、对糖皮质激素的反应(GO:0051384)、对白细胞介素的反应(GO:0071347)等这类对炎症过程的调控。

KEGG分析显示,急支糖浆治疗咳嗽主要涉及到的通路有TNF信号通路(hsa04668)、PI3K-Akt信号通路(hsa04151)、FoxO信号通路(hsa04068)、HIF-1信号通路(hsa04066)等。TNF信号通路涉及到细胞凋亡、炎症反应、调节免疫等^[26-28]。PI3K-Akt信号通路,Lu等^[29]的研究发现,槲皮素可以调节活性氧水平,抑制PI3K-Akt信号通路所调控的Caspase-3和NF- κ B激活,控制炎症反应和细胞凋亡,进而改善高果糖喂养小鼠的动脉粥样硬化的发展;同时有文献报道,槲皮素可以抑制PI3K-Akt信号通路来治疗肺纤维化疾病^[30]。五味子素通过调节Akt-FoxO1等信号通路减轻细胞损伤并激活细胞再生来减轻脂多糖诱导的肺内皮和上皮损伤^[31]。HIF-1信号通路参与调节VEGF、EPO和糖酵解酶的表达^[32]。

T细胞总值(CD3⁺)及其亚群(CD4⁺、CD8⁺)的相对比例可以反映机体的免疫能力^[33]。在本研究中,流式细胞术的结果显示,急支糖浆可以提高CD3⁺CD4⁺细胞的占比,影响T细胞向诱导性T细胞或辅助性T细胞分化。IL-1 β 、IL-6、TNF- α 是促炎因子,介导炎症疾病的发生^[34]。在验证实验中,ELISA的结果显示,氨水刺激引发了肺部炎症,使用急支糖浆处理后,则炎症得到了缓解。STAT3对于组织修复起着重要作用^[23]。在验证实验中,qRT-PCR的结果显示,急支糖浆显著上调了STAT3的表达,加快了组织修复。VEGFA主要由肺泡I型细胞表达,促进局部肺泡血管生成^[35]。在验证实验中,qRT-PCR的结果显示,使用急支糖浆小鼠肺部有着更低VEGFA表达量,使用急支糖浆小鼠肺损伤程度可能更低。

综上所述,通过网络药理学的方法分析急支糖浆治疗咳嗽的作用机制是通过多种活性成分作用于多靶点、多通路产生了调控炎症过程、调节免疫功能、促进受损机体修复、降低肺损伤等综合效果,该结果为后续进一步研究急支糖浆治疗咳嗽的药理机制提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2020:1372-1273. Pharmacopoeia of the People's Republic of China[S]. Volume I. 2020:1372-1273.
- [2] 刘启洁,何善辉,唐建军,等.急支糖浆联合阿奇霉素治疗小儿支原体肺炎的疗效及对炎症因子水平的影响[J].药物评价研究,2019,42(6):1164-1167.
- [3] Liu Q J, He S H, Tang J J, et al. Improvement of inflammatory factors in children with *Mycoplasma pneumoniae* and curative effect analysis of azithromycin and fast acting syrup [J]. Drug Eval Res, 2019, 42(6): 1164-1167.
- [3] 陈延军,郝东伟,杨立波.急支糖浆或抗生素治疗单纯急性气管-支气管炎的随机对照临床研究[J].中药药理学与临床,2015,31(1):262-264.
- [4] Chen Y J, Hao D W, Yang L B. A random controlled clinical study of Jizhi syrup or antibiotic in treating simple acute trachitis-bronchitis [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2015, 31(1): 262-264.
- [4] 沃武杰.急支糖浆治疗慢性支气管炎疗效观察[J].新中医,2015,47(9):57-58.
- [5] Wo W J. Observation on therapeutic effect of Jizhi Syrup on chronic bronchitis [J]. J New Chin Med, 2015, 47(9): 57-58.
- [5] 牛明,张斯琴,张博,等.《网络药理学评价方法指南》解读[J].中草药,2021,52(14):4119-4129.
- [6] Niu M, Zhang S Q, Zhang B, et al. Interpretation of Network Pharmacology Evaluation Method Guidance [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [6] 时悦,姚瓊珈,蔺莹,等.基于网络药理学的开心散治疗阿尔茨海默病的作用机制分析[J].药学报,2018,53(9):1458-1466.
- [7] Shi Y, Yao Y J, Lin Y, et al. Mechanism of Kai Xin San in the treatment of Alzheimer's disease based on network pharmacology [J]. Acta Pharm Sin, 2018, 53(9): 1458-1466.
- [7] 王琮,李小江,杨银莉,等.基于网络药理学的黄芩治疗鼻咽癌分子机制研究[J].药物评价研究,2021,44(3):537-544.
- [8] Wang C, Li X J, Yang Y L, et al. Network pharmacology-based strategy for predicting therapy targets of *Scutellariae Radix* on nasopharyngeal carcinoma [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(3): 537-544.
- [8] 钟仁兴,丁子禾,杨燕妮,等.基于网络药理学分析的橘红痰咳液主治"痰、咳、喘"的药效物质基础与作用机制研究[J].药学报,2020,55(9):2134-2144.
- [9] Zhong R X, Ding Z H, Yang Y N, et al. Study on the pharmacodynamic material basis and mechanisms of Ju-Hong Tan-Ke liquid for the treatment of "phlegm, cough, and asthma" based on network pharmacology [J]. Acta Pharm Sin, 2020, 55(9): 2134-2144.
- [9] 张娅.急支糖浆研究概述[J].亚太传统医药,2019,15(8):182-184.
- [10] Zhang Y. Systematic review on study of Jizhi Syrup [J]. Asia Pac Tradit Med, 2019, 15(8): 182-184.
- [10] Lesjak M, Beara I, Simin N, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives [J]. J Funct Foods, 2018, 40: 68-75.

- [11] Suchal K, Malik S, Khan S I, et al. Molecular pathways involved in the amelioration of myocardial injury in diabetic rats by kaempferol [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (5): 1001.
- [12] Nascimento A M, Maria-Ferreira D, dal Lin F T, et al. Phytochemical analysis and anti-inflammatory evaluation of compounds from an aqueous extract of *Croton cajucara* Benth [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 145: 821-830.
- [13] Yin Y X, Liu X F, Liu J P, et al. Beta-sitosterol and its derivatives repress lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute hepatic injury by inhibiting the oxidation and inflammation in mice [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28(9): 1525-1533.
- [14] Kang K A, Piao M J, Ryu Y S, et al. Luteolin induces apoptotic cell death via antioxidant activity in human colon cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2017, 51(4): 1169-1178.
- [15] Boeing T, de Souza P, Specca S, et al. Luteolin prevents irinotecan-induced intestinal mucositis in mice through antioxidant and anti-inflammatory properties [J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177(10): 2393-2408.
- [16] Chin L H, Hon C M, Chellappan D K, et al. Molecular mechanisms of action of naringenin in chronic airway diseases [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 879: 173139.
- [17] Frabasile S, Koishi A C, Kuczera D, et al. The *Citrus* flavanone naringenin impairs dengue virus replication in human cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41864.
- [18] Cataneo A H D, Kuczera D, Koishi A C, et al. The *Citrus* flavonoid naringenin impairs the *in vitro* infection of human cells by Zika virus [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 16348.
- [19] Jia B L, Yu D S, Yu G, et al. Naringenin improve hepatitis C virus infection induced insulin resistance by increase PTEN expression via p53-dependent manner [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 746-754.
- [20] Ha H, Debnath B, Neamati N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 axis in cancer and inflammatory diseases [J]. *Theranostics*, 2017, 7(6): 1543-1588.
- [21] Apte R S, Chen D S, Ferrara N. VEGF in signaling and disease: Beyond discovery and development [J]. *Cell*, 2019, 176(6): 1248-1264.
- [22] Braicu C, Buse M, Busuioc C, et al. A comprehensive review on MAPK: A promising therapeutic target in cancer [J]. *Cancers*, 2019, 11(10): 1618.
- [23] Huynh J, Chand A, Gough D, et al. Therapeutically exploiting STAT3 activity in cancer - using tissue repair as a road map [J]. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19(2): 82-96.
- [24] Pham T H, Park H M, Kim J, et al. STAT3 and p53: Dual target for cancer therapy [J]. *Biomedicines*, 2020, 8 (12): 637.
- [25] Iwashima T, Kudome Y, Kishimoto Y, et al. *Aronia* berry extract inhibits TNF- α -induced vascular endothelial inflammation through the regulation of STAT3 [J]. *Food Nutr Res*, 2019, doi: 10.29219/fnr.v63.3361.
- [26] Wong J, Garcia-Carbonell R, Zelic M, et al. RIPK₁ mediates TNF-induced intestinal crypt apoptosis during chronic NF- κ B activation [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2020, 9(2): 295-312.
- [27] Webster J D, Vucic D. The balance of TNF mediated pathways regulates inflammatory cell death signaling in healthy and diseased tissues [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 365.
- [28] Presicce P, Cappelletti M, Senthamaraikannan P, et al. TNF-signaling modulates neutrophil-mediated immunity at the fetomaternal interface during LPS-induced intrauterine inflammation [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 558.
- [29] Lu X L, Zhao C H, Yao X L, et al. Quercetin attenuates high fructose feeding-induced atherosclerosis by suppressing inflammation and apoptosis via ROS-regulated PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85: 658-671.
- [30] Hohmann M S, Habel D M, Coelho A L, et al. Quercetin enhances ligand-induced apoptosis in senescent idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts and reduces lung fibrosis *in vivo* [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019, 60(1): 28-40.
- [31] Sun K, Huang R, Yan L, et al. Schisandrin attenuates lipopolysaccharide-induced lung injury by regulating TLR-4 and Akt/FoxO1 signaling pathways [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 1104.
- [32] Jain T, Nikolopoulou E A, Xu Q B, et al. Hypoxia inducible factor as a therapeutic target for atherosclerosis [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 183: 22-33.
- [33] Venturini E, Lodi L, Francolino I, et al. CD3, CD4, CD8, CD19 and CD16/CD56 positive cells in tuberculosis infection and disease: Peculiar features in children [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2019, 33: 2058738419840241.
- [34] Wang Q, Liang J X, Brennan C, et al. Anti-inflammatory effect of alkaloids extracted from *Dendrobium aphyllum* on macrophage RAW 264.7 cells through NO production and reduced IL-1, IL-6, TNF- α and PGE2 expression [J]. *Int J Food Sci Technol*, 2020, 55(3): 1255-1264.
- [35] Vila Ellis L, Cain M P, Hutchison V, et al. Epithelial vegfa specifies a distinct endothelial population in the mouse lung [J]. *Dev Cell*, 2020, 52(5): 617-630.e6.