

【实验研究】

基于“网络药理学-分子对接-实验验证”的儿童清咽解热口服液抗上呼吸道感染分子机制研究

张英睿¹, 周霖^{2*}, 苟晓玲¹, 张艺¹

1. 成都中医药大学 药学院, 四川 成都 611137

2. 郑州大学第一附属医院 药学部, 河南 郑州 450052

摘要: 目的 探讨儿童清咽解热口服液治疗上呼吸道感染的潜在机制。方法 分别从TCMSP和Swiss Target Prediction数据库中提取儿童清咽解热口服液组方药物的潜在生物活性成分和相应的靶点, 疾病靶点从GeneCards数据库中获取。通过Cytoscape软件构建“中药材-化合物-靶点”网络, 并通过STRING web平台分析蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络。在DAVID平台上进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)功能富集分析, 利用Maestro软件进行分子对接。采用RAW264.7细胞进行体外Western blotting和免疫荧光实验验证。结果 共筛选儿童清咽解热口服液组方药材含有的41种有效化合物, 177种成分和疾病的共同靶点。其中, 黄芩苷、柴胡皂苷、槲皮素、鱼腥草素等是重要的活性化合物。PI3K、Akt、EGFR、MAPK3、GRB2、PIK3R1等是关键靶点。PI3K/Akt信号通路、HIF-1信号通路和FOXO信号通路被认为是3条重要的信号通路。相关成分、靶点和通路与抗炎、抗病毒和免疫调节有关。分子对接结果提示, 筛选的12个关键靶点可与大多数主要活性化合物紧密结合。Western blotting和免疫荧光实验结果显示, 儿童清咽解热口服液可以抑制PI3K和Akt的蛋白表达, 与网络药理学的预测结果一致。结论 儿童清咽解热口服液主要通过调节PI3K/Akt等信号通路发挥治疗儿童急性上呼吸道感染的作用。

关键词: 儿童清咽解热口服液; 儿童上呼吸道感染; 网络药理学; 黄芩苷; 柴胡皂苷; 槲皮素; 鱼腥草素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)03-0477-13

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.03.004

Molecular mechanism prediction of Ertong Qingyan Jiere Oral Liquid against upper respiratory tract infection based on network pharmacology, molecular docking and experimental validation

ZHANG Yingrui¹, ZHOU Lin², GOU Xiaoling¹, ZHANG Yi¹

1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Abstract: Objective To investigate the potential mechanism of Ertong Qingyan Jiere Oral Liquid (EQJOL) in the treatment of upper respiratory tract infection (URTI). **Methods** The active ingredients and their corresponding targets were extracted from the TCMSP and Swiss Target Prediction databases, respectively, and the disease targets were obtained from the GeneCards database. Then, Cytoscape software was used to construct the "Chinese medica-compound-target" network, and the protein-protein interaction(PPI) network was analyzed by STRING web platform. Gene Ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway functional enrichment analysis were performed on DAVID platform, and then molecular docking was performed using Maestro software. Finally, RAW264.7 cells were used for *in vitro* Western blotting and immunofluorescence verification. **Results** A total of 41 effective compounds and 177 common targets of drugs and diseases were found to be associated with URTI. Among them,

收稿日期: 2023-10-19

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ20210283)

第一作者: 张英睿, 女, 博士研究生, 研究方向为中药化学。E-mail: yingruizhang0328@163.com

*通信作者: 周霖, 博士研究生, 主管药师, 研究方向为中药药理学。E-mail: fcczhoul@zzu.edu.cn

张艺, 男, 教授, 研究方向为民族药学。E-mail: zhangyi@cdutcm.edu.cn

baicalin, saikosaponin, quercetin and houttuynin are important active compounds. PI3K, Akt, EGFR, MAPK3, GRB2 and PIK3R1 are the key targets. PI3K/Akt signaling pathway, HIF-1 signaling pathway and FOXO signaling pathway are considered to be three important signaling pathways. Relevant components, targets and pathways are related to anti-inflammatory, antiviral and immune regulation. Molecular docking results suggested that these 12 key targets could bind tightly to most of the major active compounds. Western blotting and immunofluorescence results showed that EQJOL inhibited the expression of PI3K and Akt, which was consistent with the prediction of network pharmacology. **Conclusions** EQJOL has a therapeutic effect in children with acute URTI mainly by regulating the PI3K/Akt signaling pathway.

Key words: Ertong Qingyan Jiere Oral Liquid; upper respiratory tract infections in children; network pharmacology; baicalin; saikosaponin; quercetin; houttuynin

上呼吸道感染可定义为上呼吸道的自限性刺激和肿胀,我国每年约有1 000万人次的上呼吸道感染患者门诊就诊。其中急性上呼吸道感染常表现为急性咽炎、急性扁桃体炎等,是小儿常见的高发疾病,儿童患病风险和发生率明显高于成人,造成了巨大的经济负担^[1-2]。上呼吸道感染可由多种病毒和细菌引发,其中鼻病毒是最常见的病毒之一。长期临床实践证明,中药治疗上呼吸道感染安全有效,是治疗儿童上呼吸道感染的首选考虑药物^[3-4]。

儿童清咽解热口服液由柴胡、黄芩苷、紫花地丁、人工牛黄、苣荬菜、鱼腥草、芦根、赤小豆组成,具有清热解毒、消肿利咽的功效。临床上用于小儿急性咽炎(急喉痹)属肺胃实热证,证见:发热、咽痛、咽部充血,或咳嗽、口渴等^[5-6]。近年来,儿童清咽解热口服液治疗急性上呼吸道感染的临床效果也已得到证实^[7-9]。儿童清咽解热口服液临床疗效确切,然而,其治疗上呼吸道感染的潜在活性成分和作用机制尚不清楚,不利于药物的推广使用及二次开发。近年来,网络药理学作为探索药物、成分和靶点之间相互作用关系的有效手段发展迅速,这与中药多成分、多靶点的特点高度一致^[10-11]。分子对接是预测配体与靶点结合亲和力的有效计算方法,可用于验证网络药理学的筛选结果。因此,本研究拟采用网络药理学和分子对接的方法,探索儿童清咽解热口服液抗上呼吸道感染的可能药效成分、靶点和分子机制,最后进行实验验证。

1 材料

RAW264.7细胞(批号CL-0190)购自普诺赛生物科技有限公司;CCK-8试剂盒(批号C0037)购自碧云天生物科技有限公司;一氧化氮(NO)检测试剂盒(批号K252-200)购自艾美捷生物科技有限公司;白细胞介素6(IL-6)试剂盒(批号F01310)购自上海西唐生物科技有限公司;RIPA细胞裂解试剂盒(批号SL1010)购自北京蓝博斯特生物技术有限公司;

磷脂酰肌醇激酶(PI3K-p85,批号bs-0736R)、磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)抗体(批号bs-20399R)、蛋白激酶B(Akt)抗体(批号bs-4572R)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶抗体(GAPDH,批号bs-10412R)、二抗山羊抗兔均购自北京博奥森生物技术有限公司;聚偏二氟乙烯膜(Merck Millipore, Billerica);儿童清咽解热口服液(产品批号220471)购自亚宝药业四川制药有限公司;脂多糖(LPS,批号BS904)购自白鲨生物科技有限公司。

2 方法

2.1 儿童清咽解热口服液抗上呼吸道感染机制网络药理学研究

2.1.1 儿童清咽解热口服液活性物质的筛选 基于中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)以儿童清咽解热口服液组方中药中文全称关键词进行检索,筛选儿童清咽解热口服液的潜在生物活性成分,并以口服生物利用度(OB)≥30%和类药性(DL)≥0.18为筛选条件^[12],筛选有效成分。

2.1.2 儿童清咽解热口服液有效成分相应靶点的选择 利用PubChem数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)和ChemDraw软件获取儿童清咽解热口服液有效成分的SMILES结构。将收集到的SMILES结构输入Swiss Target Prediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>),搜索儿童清咽解热口服液有效成分的潜在靶点,对可能性>0的潜在靶点进行汇总。如果化学成分的靶点不在数据库中,则从TCMSP数据库中获取。

2.1.3 上呼吸道感染疾病靶点的获得 以“upper respiratory tract infection”为关键词,从GeneCards(<https://www.genecards.org>)数据库中检索到与上呼吸道感染相关的靶点列表。

2.1.4 “药材-成分-靶点”网络构建 通过绘制韦恩图将儿童清咽解热口服液与上呼吸道感染的共同靶点进行交叉筛选。然后利用Cytoscape 3.6.0软

件,围绕药材、交集靶点反向对应的活性成分以及交集靶点构建“药材-成分-靶点”网络。数据导入后,由网络分析器模块获取各数据元素的关联程度。

2.1.5 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建 利用儿童清咽解热口服液与上呼吸道感染之间的共同靶点,通过STRING数据库(<https://string-db.org/>)组成PPI网络,最小交互评分要求 ≥ 0.9 。随后,将PPI网络以TSV格式输出,并导入到Cytoscape 3.6.0中进行后续分析。

2.1.6 PPI网络中筛选关键靶点 使用Cytoscape网络分析器模块筛选PPI网络中的关键靶点,筛选出同时满足3个拓扑参数条件[介度(betweenness) $\geq$ 介度中位数、紧密度(closeness) $\geq$ 紧密度中位数、度(degree)值 $\geq$ 度值中位数]^[3]的靶点作为中心节点。拓扑值越高的节点被认为是网络中更关键的节点。

2.1.7 共同靶点的基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析 为了进一步明确儿童清咽解热口服液抗上呼吸道感染的潜在机制,将获得的共同靶点上传到DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>)进行功能富集分析,包括GO和KEGG。GO过程包括生物过程(BP)、细胞成分(CC)和分子功能(MF)。分析后选择BP、CC、MF前10项和KEGG通路前20项进行可视化呈现。

2.2 分子对接分析

对通过PPI网络分析筛选出的度值排在前10位的活性化合物与关键靶点的结合能力进行分子对接分析。首先,从RCSB PDB在线平台(<http://www.rcsb.org/>)导出与关键靶点相关的3D蛋白结构。然后,从PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载活性化合物的3D结构,并以SDF格式存储。随后,将其导入Maestro 11.5软件中。通过Ligprep模块对化合物进行优化。蛋白质通过蛋白质制备模块进行水去除和能量最小化。分别通过受体网格生成(Receptor Grid Generation)和配体对接模块(Ligand docking module)鉴定蛋白质与化合物之间的结合位点和对接能力。最终,利用对接得分来衡量蛋白质与化合物的对接能力。

2.3 细胞实验验证

2.3.1 细胞培养 RAW264.7细胞在添加10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的dulbecco改良培养基中培养,条件设置为37℃、5% CO₂。每天更换培养基,然后将细胞重新收集到新瓶中传代。

2.3.2 细胞活力测定 将对数生长期的RAW264.7细胞在96孔板上接种(1×10^5 个 mL^{-1} ,每孔100 μL)培养12 h后,除对照组外,其他各组用1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的LPS刺激1 h,之后给药组用不同稀释比(口服液原液的0.1%、0.2%、0.4%、0.8%、1.6%、3.2%)的儿童清咽解热口服液(分别对应生药质量浓度2.21、4.42、8.84、17.68、35.36、70.72 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)处理24 h,对照组和模型组加等量培养基。随后每孔添加10 μL CCK-8试剂,37℃孵育2 h。使用微孔板读取器(Thermo, Waltham)在450 nm处测量每孔的吸光度(A)值。同样方法考察不同稀释比(口服液原液的0.1%、0.2%、0.4%、0.8%、1.6%、3.2%)的儿童清咽解热口服液对正常RAW264.7细胞活力的影响。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{对照}}) / A_{\text{对照}}$$

2.3.3 NO释放检测 将RAW264.7细胞置于6孔板(1×10^5 个 mL^{-1})中培养12 h。除对照组外,其余各组用1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS刺激1 h,随后给药组每孔注入不同稀释比0.1%、0.2%、0.4%的儿童清咽解热口服液,对照组和模型组加等量培养基,24 h后按照NO检测试剂盒说明书检测细胞上清液中NO水平,在540 nm处用酶标仪测定 A 值。

2.3.4 白细胞介素-6(IL-6)释放的检测 细胞分组刺激及给药操作同“2.3.3”项,随后使用IL-6酶联免疫吸附试验试剂盒检测收集的细胞上清液。根据标准曲线和从酶标仪读取的 A 值,获得IL-6浓度。

2.3.5 免疫印迹法测定相关蛋白表达 细胞分组刺激及给药操作同“2.3.3”项,使用RIPA裂解试剂盒裂解细胞,添加苯甲磺酰氟。通过BCA蛋白测定试剂盒测定细胞裂解液的总蛋白浓度。同样数量的总蛋白在10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳上分离,随后电泳转移到聚偏二氟乙烯膜上。用5%牛血清白蛋白在室温下阻断膜2 h,用一抗在4℃下孵育过夜,一抗包括PI3K-p85、p-Akt、Akt(1:1 000稀释)和GAPDH(1:1 500稀释)。然后用酶标山羊抗兔IgG(1:1 000稀释)在室温下孵育2 h,用ECL试剂盒显示蛋白条带。

2.3.6 免疫荧光染色 细胞分组刺激及给药操作同“2.3.3”项,随后RAW264.7细胞用PBS洗涤3次,然后用4%多聚甲醛固定15 min,阻断内在过氧化物酶活性,用PBS洗涤3次。随后,将细胞用含有5%山羊血清和0.5% Triton™X-100的PBS处理1 h,丢弃阻断液。细胞与一抗PI3K-p85和p-Akt(1:1 000稀释)在4℃下孵育过夜。PBS洗涤3次后,用Alexa flu488标记的0.2%山羊抗兔

IgG (H+L) 在 PBS (1:500) 中室温孵育 1.5 h, 用 PBS 洗涤 3 次。引入 Hoechst 33342, 在 37 °C 下对细胞核染色 10 min。用 PBS 洗涤 3 次后, 利用倒置荧光显微镜观察荧光。

2.4 数据统计分析

定量数据至少重复 3 次, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 GraphPad Prism 8.0.2 进行单因素方差分析检验和 Tukey's 多重比较检验, 在所有统计分析中, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 儿童清咽解热口服液的有效成分

从 TCMS 数据库中筛选出 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 的 41 个有效成分, 其中柴胡 17 种、牛黄 4 种、菝葜菜 13 种、鱼腥草 6 种、赤小豆 7 种、芦根 1 种、紫花地丁 0 种。此外, 柴胡中还含有黄芩苷, 而豆甾醇、异鼠李素、山柰酚和槲皮素是多种药材的共有成分。有效成分的具体情况见表 1。

3.2 有效成分与疾病交集靶点

共筛选出儿童清咽解热口服液活性化合物相关靶点 534 个, 从 GeneCards 数据库中收集到上呼吸道感染靶点 2 106 个。Venn 图(图 1)显示, 儿童清咽解热口服液治疗上呼吸道感染的交叉靶点数量为 177 个。

3.3 “药材-成分-靶点”网络构建

构建的儿童清咽解热口服液与上呼吸道感染之间的“药材-成分-靶点”网络, 共包含 225 个节点(7 种药材、41 个成分和 177 个靶点)和 842 条边。利用 Cytoscape 软件中的 Network Analyzer 模块获取每个节点的度参数。节点大小反映度值, 即度值越高, 节点越大(图 2)。根据网络分析结果, 发现每个靶点平均与 4.8 个化合物相互作用, 而每个化合物平均与 20.5 个靶点相互作用, 说明药物中的多种成分可以通过作用于多个靶点来发挥协同作用。

3.4 PPI 网络构建与关键靶点识别

将儿童清咽解热口服液和上呼吸道感染的 177 个交集靶点输入 STRING 在线服务平台, 获取 PPI 网络的基本信息(图 3、4)。然后将 PPI 网络数据导入 Cytoscape 3.6.0 软件中。PPI 网络图由 152 个节点和 765 条边组成。在以介度、紧密度和度值的中位数为筛选标准的基础上, 进行了 3 次筛选, 获得关键靶点。第 1 次筛选的基础为: 介度 $\geq 0.003\ 373\ 105$, 紧密度 $\geq 0.360\ 383\ 915$, 度值 ≥ 6 , 随后构建了包含 52 个节点和 375 条边的网络。然后, 将介度 $\geq 0.006\ 757\ 085$ 、紧密度 $\geq 0.566\ 666\ 67$ 、度值 ≥ 14 应用于第 2 次筛选

阈值。建立了 1 个包含 23 个节点和 151 条边的新网络。为了探索 PPI 网络中最关键的靶点, 以介度 $\geq 0.016\ 581\ 4$ 、紧密度 $\geq 0.733\ 333\ 33$ 、度值 ≥ 14 作为最终筛选的标准。最终得到 STAT3、SRC、PIK3CA、MAPK3、GRB2、PIK3R1、MAPK1、ESR1、LCK、MAPK14、RELA 和 EGFR 作为 PPI 网络的关键靶点, 并根据度值将其节点按大小和颜色降序排列。

3.5 GO 和 KEGG 富集分析

为了进一步解释儿童清咽解热口服液抗上呼吸道感染的机制, 将 177 个交叉靶点导入到 DAVID 6.8 中进行 GO 和 KEGG 富集分析, 保留 $P \leq 0.05$ 的项目。在 GO 分析中, 有 664 个显著结果, 包括 476 个 BP、76 个 CC 和 112 个 MF。可视化结果见图 5。在 BP 类别中, 靶点主要富集在药物应答、凋亡过程负调控和细胞增殖正调控等过程。在 CC 类别中, 靶点主要富集在细胞质分类中。在 MF 类别中, 靶点主要富集在蛋白酪氨酸激酶活性、酶结合、蛋白结合等方面。KEGG 富集分析结果显示, 共富集到 120 条通路, 如 PI3K/Akt 信号通路、HIF-1 信号通路、FOXO 信号通路等, 所选择的关键靶点大多与上述 3 条通路相关。按 P 值从小到大排序的前 20 条 KEGG 通路, 如图 6 所示。

3.6 分子对接

为了验证网络分析中潜在的化合物-靶点相互作用, 通过 Maestro11.5 软件中的 Glide 模块进行分子对接, 计算主要活性成分与关键靶点之间的结合亲和力。选择度值前 10 位的化合物进行分子对接。对接得分越低, 表明化合物与靶点的结合能力越强。各靶点对应的 PDB ID 见表 2, 具体得分见表 3。化合物与 MAPK3、ESR1、LCK、RELA 的最高对接分数接近甚至高于这些靶点与相应配体的对接分数。得分最高的 4 组分子对接结果如图 7 所示。

3.7 儿童清咽解热口服液对 LPS 处理的 RAW264.7 细胞释放 NO 和 IL-6 的影响

为了进一步验证网络药理学结果, 本研究通过 LPS 刺激 RAW264.7 细胞构建体外炎症模型, 并使用儿童清咽解热口服液进行干预, 观察效果^[13]。从图 8-A 和图 8-B 可以看出, 稀释比例为 0.1%~1.6% 的儿童清咽解热口服液对 RAW264.7 细胞没有明显的细胞毒性, 对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞增殖有抑制作用。与对照组相比, LPS 刺激 24 h 可显著促进细胞增殖 ($P < 0.01$), 而稀释比例为 0.1%~0.4% 儿童清咽解热口服液与模型组相比, 轻微逆转 LPS 的促增殖作用。因此, 选择儿童清咽解热口服

表 1 儿童清咽解热口服液有效成分信息
Table 1 Information of effective ingredients of Ertong Qingyan Jiere Oral Liquid

MOL ID	化合物	来源药材	OB/%	DL
MOL001645	乙酸芳樟酯(linoleyl acetate)	柴胡	42.10	0.20
MOL002776	黄芩苷(baicalin)	柴胡	40.12	0.75
MOL004598	3,5,6,7-tetramethoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl) chromone	柴胡	31.97	0.59
MOL004609	茵陈黄酮(arcapillin)	柴胡	48.96	0.41
MOL013187	葎澄茄素(cubebin)	柴胡	57.13	0.64
MOL004624	longikaurin A	柴胡	47.72	0.53
MOL004628	羟基羽扇豆烷宁(octalupine)	柴胡	47.82	0.28
MOL004644	驴食草素(sainfuran)	柴胡	79.91	0.23
MOL004648	曲克芦丁(troxaerutin)	柴胡	31.6	0.28
MOL004653	(+)-川白芷内酯[(+)-anomalin]	柴胡	46.06	0.66
MOL004702	saikosaponin c_qt	柴胡	30.50	0.63
MOL004718	α -菠菜甾醇(α -spinasterol)	柴胡	42.98	0.76
MOL000490	矮牵牛素(petunidin)	柴胡	30.05	0.31
MOL008845	胆汁酸(deoxycholic acid)	牛黄	40.72	0.68
MOL008846	ZINC01280365	牛黄	46.38	0.49
MOL000953	CLR	牛黄	37.87	0.68
MOL001689	刺槐素(acacetin)	菖荑菜	34.97	0.24
MOL004564	山柰素(kaempferide)	菖荑菜	73.41	0.27
MOL003044	金圣草黄素(chrysoeiol)	菖荑菜	35.85	0.27
MOL000006	木犀草素(luteolin)	菖荑菜	36.16	0.25
MOL001790	蒙花苷(linarin)	菖荑菜	39.84	0.71
MOL000359	谷甾醇(sitosterol)	菖荑菜	36.91	0.75
MOL003344	β -香树脂醇乙酸酯(β -amyrin acetate)	菖荑菜	42.06	0.74
MOL006696	α -香树脂醇乙酸酯(α -amyrin acetate)	菖荑菜	42.70	0.74
MOL003851	异热马酮(isoramanone)	鱼腥草	39.97	0.51
MOL004345	1-methyl-2-nonacosyl-4-quinolone	鱼腥草	31.54	0.50
MOL004350	ruvoside_qt	鱼腥草	36.12	0.76
MOL004355	菠菜甾醇(spinasterol)	鱼腥草	42.98	0.76
MOL000004	原花青素 B1(procyanidin B1)	赤小豆	67.87	0.66
MOL000492	(+)-儿茶素[(+)-catechin]	鱼腥草	54.83	0.24
MOL000073	表儿茶素(ent-epicatechin)	鱼腥草	48.96	0.24
MOL007840	azukisaponin_qt	鱼腥草	36.70	0.76
MOL000096	(-)-儿茶素[(-)-catechin]	鱼腥草	49.68	0.24
MOL004576	二氢槲皮素(taxifolin)	鱼腥草	57.84	0.27
MOL000449	豆甾醇(stigmasterol)	柴胡、芦根	43.83	0.76
MOL000354	异鼠李素(isorhamnetin)	柴胡、菖荑菜	49.60	0.31
MOL000422	山柰酚(kaempferol)	柴胡、菖荑菜、鱼腥草	41.88	0.24
MOL000098	槲皮素(quercetin)	柴胡、菖荑菜、鱼腥草、赤小豆	46.43	0.28

液稀释比例为 0.1%、0.2%、0.4% 进行后续实验。

通过评估细胞 NO 释放和 IL-6 水平作为检测细胞炎症反应状态的标准。结果如图 9 所示,与对照组相比,LPS 处理的模型组细胞 NO 和 IL-6 水平显著升高($P<0.01$)。与模型组相比,稀释比例为 0.1%~0.4% 的儿童清咽解热口服液对 NO 释

放和 IL-6 分泌有显著的抑制作用($P<0.05$ 、0.01)。

3.8 儿童清咽解热口服液对 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达的影响

基于网络药理学和 KEGG 富集分析结果,发现 PI3K/Akt 信号通路可能是儿童清咽解热口服液治

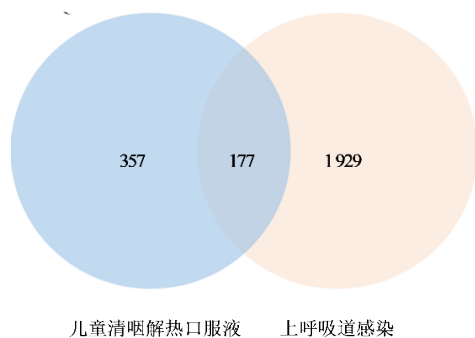


图1 儿童清咽解热口服液有效成分靶点与上呼吸道感染疾病靶点韦恩图
Fig. 1 Venn diagram of intersection targets of Ertong Qingyan Jiere Oral Liquid and upper respiratory tract infection

疗上呼吸道感染的重要机制之一。因此,本实验采用 Western blotting 方法评估 PI3K、Akt 和 p-Akt 的表达水平,以验证药物的作用机制。同时,利用免疫荧光染色进一步验证儿童清咽解热口服液对 PI3K/Akt 信号通路的调控作用。结果如图 10 和 11 所示,与对照组相比,LPS 刺激后,PI3K、p85 和 p-Akt 的表达显著上调($P<0.01$)。儿童清咽解热口服液组与模型组相比,PI3K、p85、p-Akt 的表达显著降低($P<0.01$)。

4 讨论

病毒感染是上呼吸道感染的主要致病因素,中药治疗上呼吸道感染不仅能直接抑制或杀灭病毒,起到解热、抗炎的作用,还能通过调节机体的特异性和非特异性免疫功能,增强抗感染能力,从而改

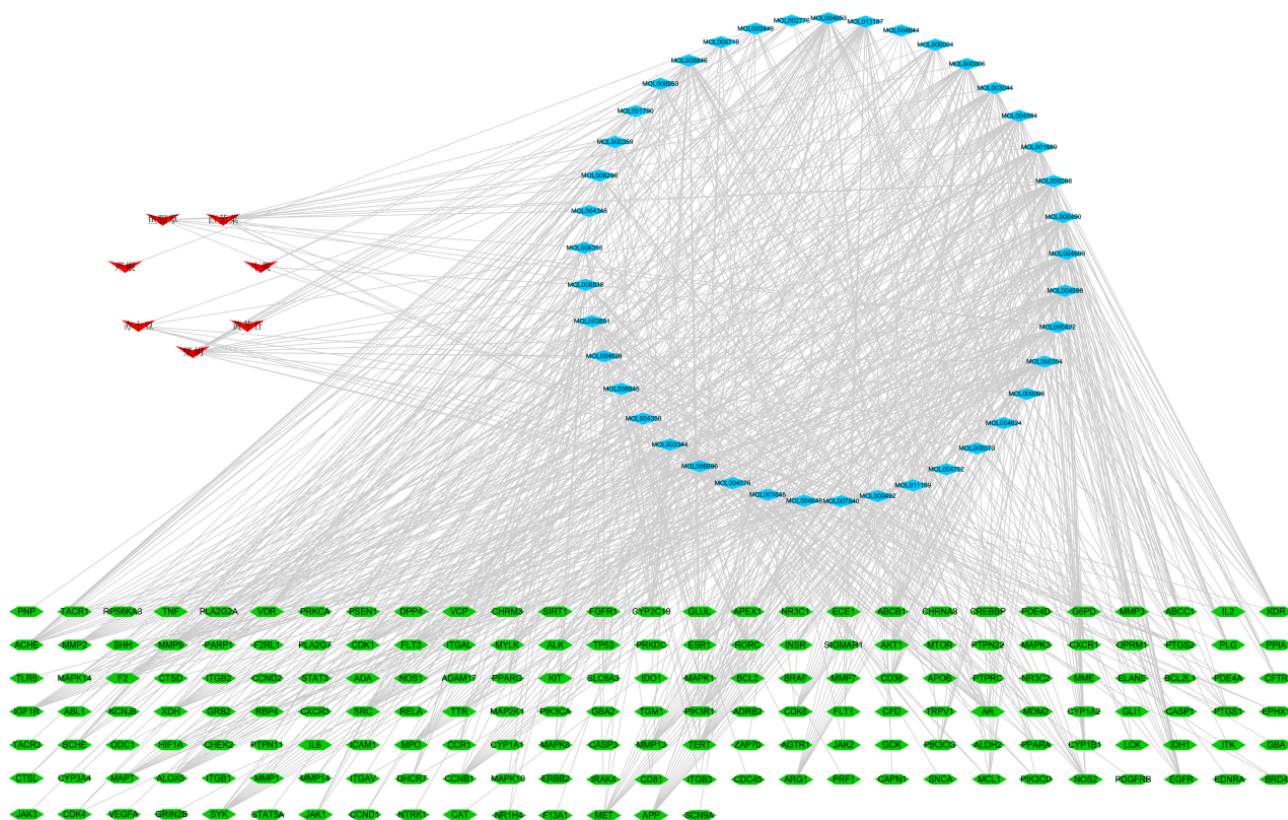


图2 儿童清咽解热口服液抗上呼吸道感染的“药材-成分-靶点”网络
Fig. 2 “herb-compound-targets” network of Ertong Qingyan Jiere Oral Liquid and upper respiratory tract infection

善临床症状,缩短病程,减少并发症,提高临床疗效。儿童清咽解热口服液多由寒性药物组成,具有清热解毒、消肿润咽的作用,可用于治疗风热型上呼吸道感染。值得注意的是,小儿具有脾虚的生理特点,再加上本方中寒凉药较多,可能造成脾阳损伤,进一步影响脾的运化。因此,应用该类方药治疗儿童上呼吸道感染可能导致腹泻。而赤小豆性温,具有药食同源的特点,它具有健脾利尿的作用,从而在一定程度上缓解处方中其他寒凉药物引起

的腹泻,这是儿童清咽解热口服液相对于其他同类型药物的优势。

本研究通过网络药理学成功构建了儿童清咽解热口服液治疗上呼吸道感染的“药材-成分-靶点”网络。基于网络分析结果,发现度值靠前的几种药效成分具有显著的抗病毒、抗菌、抗炎、抗氧化等作用,可能是药物治疗疾病的主要药效物质基础。其中,有研究报道,黄芩苷具广谱抗菌、抗病毒活性,对多种细菌、真菌、病毒有抑制作用,可通过降低

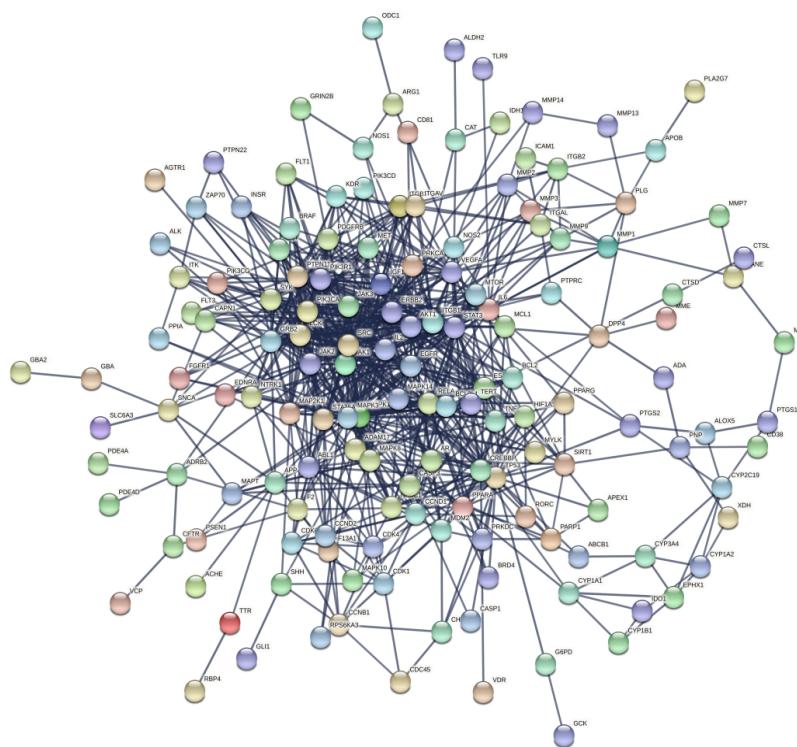


图 3 交集靶点 PPI 网络

Fig. 3 PPI network of common targets of Ertong Qingyan Jiere Oral Liquid and upper respiratory tract infection

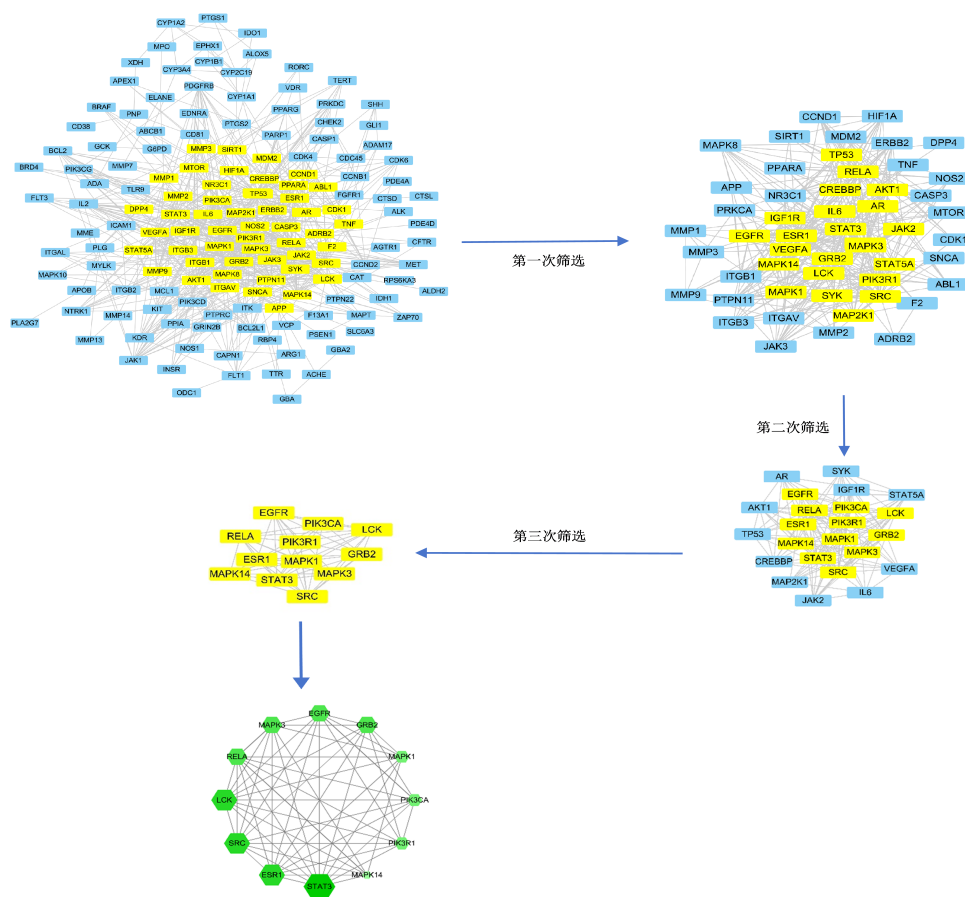


图 4 关键靶点的筛选过程

Fig. 4 Process of filtering key targets

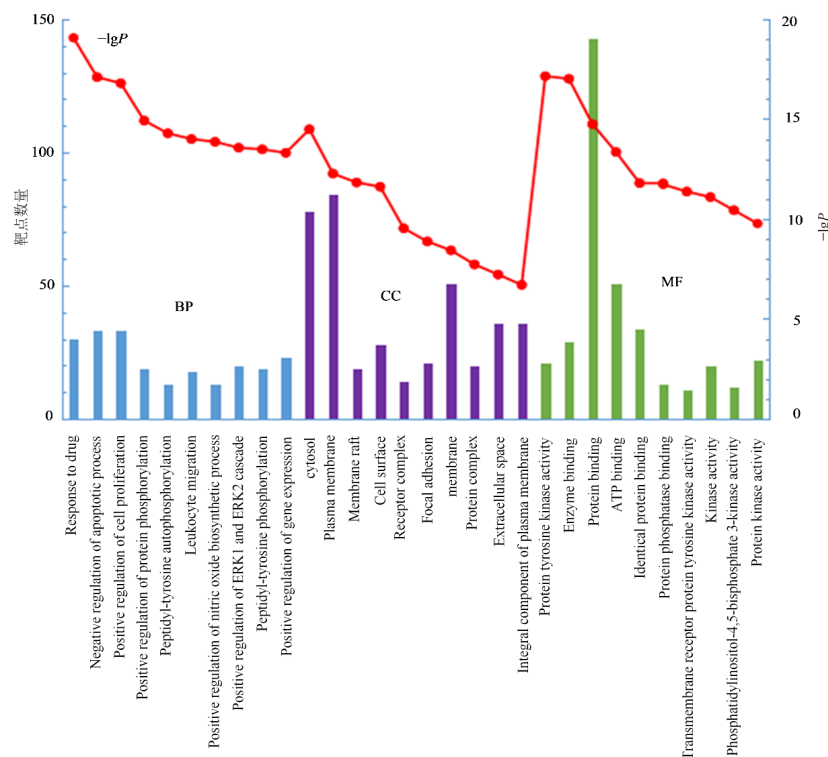


图 5 关键靶点的 GO 分析结果
Fig. 5 Results of GO enrichment analysis

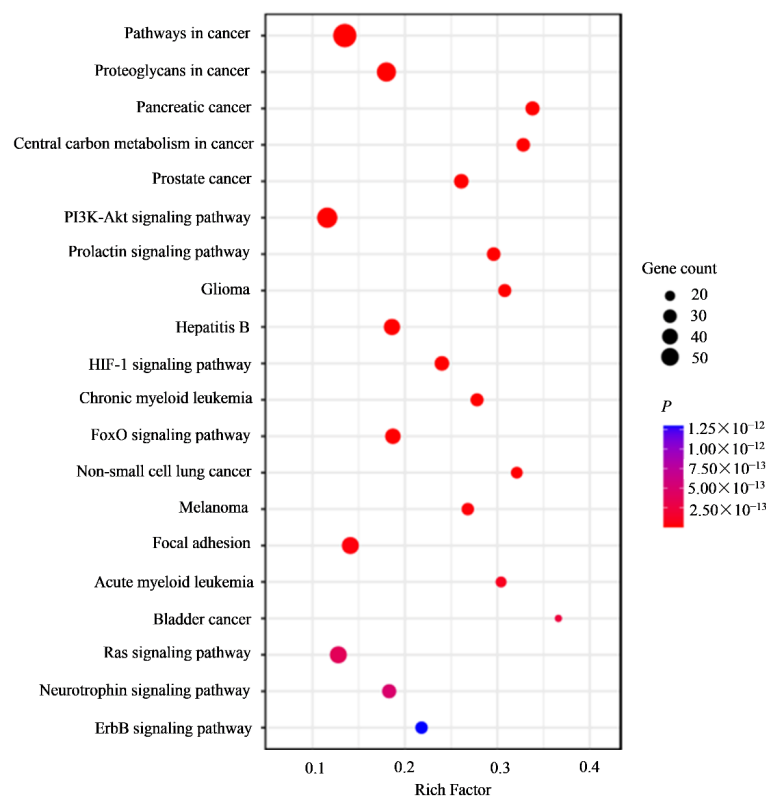


图 6 关键靶点的 KEGG 富集分析
Fig. 6 Results of KEGG enrichment analysis

表 2 分子对接靶点及对应 PDB ID
Table 2 Molecular docking targets and corresponding PDB ID

靶点	PDB ID	靶点	PDB ID
STAT3	6NJS	MAPK1	6SLG
SRC	1O43	ESR1	6SBO
PIK3CA	4JPS	LCK	1QPC
MAPK3	4QTB	MAPK14	3LFF
GRB2	3IN8	RELA	7O5O
PIK3R1	6PYR	EGFR	3POZ

NF- κ B、p38 信号通路,减轻呼吸道合胞病毒感染的 Hep-2 细胞凋亡和炎症因子表达,从而起到治疗上呼吸道感染的效果^[14]。柴胡皂苷对于新型冠状病毒(SARS-CoV-2)宿主受体血管紧张素转化酶 2(ACEII)具有高亲和力,并可抑制 M 蛋白酶以发挥抗新型冠状病毒肺炎作用,同时还可通过减弱病毒的附着和侵入以显著抑制 HCoV-229E 病毒感染^[15]。槲皮素是一种抗氧化剂类黄酮,在与上呼吸道感染靶细胞和病原体一起培养时,槲皮素具有免疫调节作用和较强的抗病毒活性,其对呼吸道合胞病毒、

表 3 分子对接得分
Table 3 Molecular docking scores

化合物	对接得分(Docking score)											
	STAT3	SRC	PIK3CA	MAPK3	GRB2	PIK3R1	MAPK1	ESR1	LCK	MAPK14	RELA	EGFR
刺槐素	-3.803	-4.597	-7.952	-6.678	-4.210	-7.843	-6.159	-7.629	-7.245	-6.601	-5.621	-8.416
3',4',5',3,5,6,7-heptamethoxy-flavone	-3.880	-3.289	-8.608	-5.503	-4.198	-5.920	-5.637	—	-5.820	—	-4.662	-6.044
矮牵牛素	-4.483	-5.198	-8.852	-8.698	-5.846	-9.233	-7.822	-9.111	-8.108	-7.126	-5.909	-7.660
异鼠李素	-4.147	-4.454	-9.016	-8.178	-4.122	-8.947	-6.227	-7.008	-8.204	-6.986	-5.969	-8.633
槲皮素	-4.743	-4.879	-8.192	-7.773	-5.771	-8.327	-6.826	-6.804	-7.689	-6.930	-5.996	-8.812
(+)-川白芷内酯	-3.855	-2.449	-6.353	-5.756	-2.823	-3.874	-3.447	-4.663	-4.819	-2.204	-4.381	-5.092
茵陈黄酮	-4.825	-3.811	-8.763	-7.255	-4.070	-8.530	-6.464	-4.962	-8.099	-6.198	-5.248	-7.582
金圣草黄素	-3.843	-3.963	-8.837	-8.565	-4.535	-8.607	-6.129	-8.258	-8.381	-6.791	-6.294	-8.786
山柰酚	-4.193	-4.493	-7.987	-8.503	-5.448	-8.389	-6.213	-6.795	-8.116	-7.071	-5.789	-8.665
木犀草素	-4.730	-4.426	-8.291	-6.850	-4.791	-9.213	-6.684	-6.927	-7.600	-6.855	-6.447	-8.783
配体	-11.885	-6.240	-10.908	-7.812	-7.790	-10.530	-10.736	-9.944	-6.200	-10.298	-6.158	-12.546

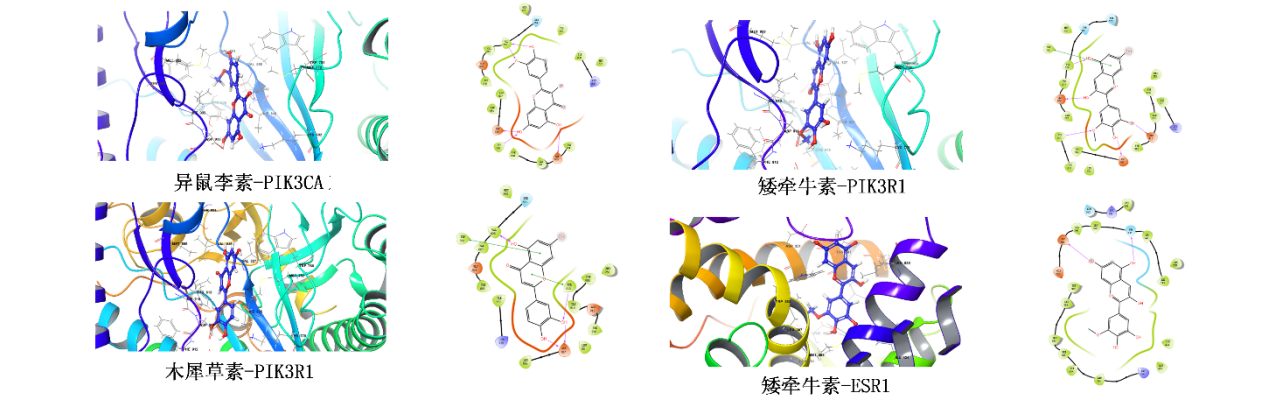
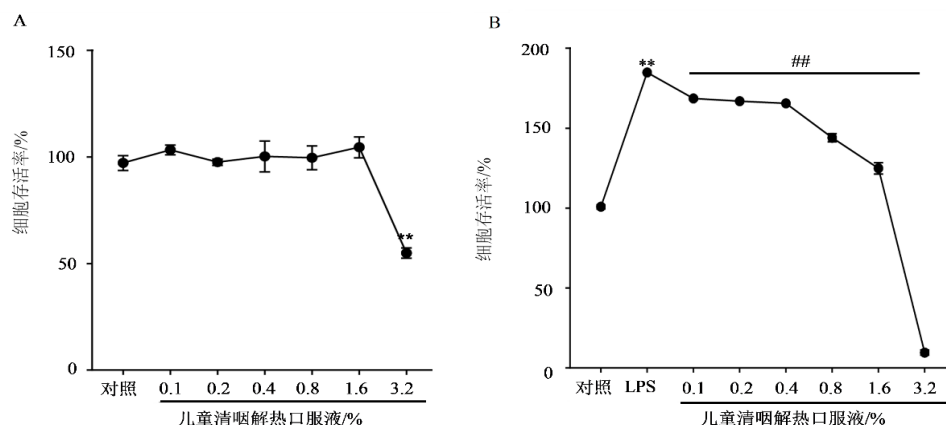


图 7 药效分子与关键靶点的分子对接可视化结果

Fig. 7 Visual results of molecular docking between pharmacodynamic molecules and key targets

甲型流感病毒、新型冠状病毒等常见呼吸道病毒有显著的抑制作用^[16]。鱼腥草素可以通过表面活性的方式改变铜绿假单胞菌的表面结构,增强小鼠和细胞的免疫系统,尤其是增强吞噬细胞的吞噬功能,下调相关炎症因子基因的表达,起到在体内抑

制和清除铜绿假单胞菌产生炎症的作用^[17]。此外,方中赤小豆中同样含有槲皮素。文献表明,槲皮素具有止泻功效,对感染性腹泻和分泌性腹泻均有治疗作用^[18-19]。这与儿童清咽解热口服液中的赤小豆可能对儿童腹泻有一定的缓解作用的

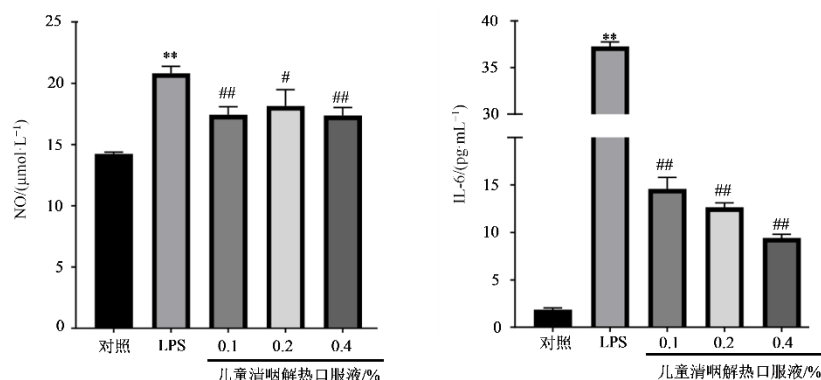


与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group.

图 8 儿童清咽解热口服液对正常(A)和LPS处理(B)的RAW264.7细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Effect of Ertong Qingyan Jiere Oral Liquid on cell viability of normal (A) and LPS-induced (B) RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

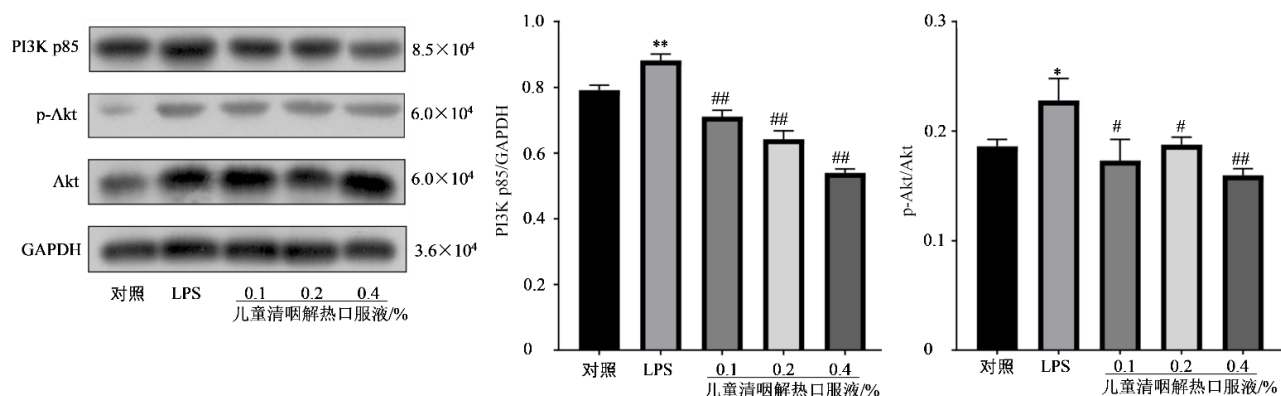
图 9 儿童清咽解热口服液对LPS处理的RAW264.7细胞释放NO和IL-6的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 Effect of Ertong Qingyan Jiere Oral Liquid on NO and IL-6 released by LPS-induced RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

推测一致,具体作用机制有待进一步研究。通过PPI网络分析,筛选出的靶点主要与炎症、氧化应激、细胞凋亡等有关。最近的研究表明,STAT3在炎症中起核心作用,其转录因子可以激活巨噬细胞和中性粒细胞,增强炎症^[20]。随后,对儿童清咽解热口服液和上呼吸道感染的177个共同靶点进行GO和KEGG富集分析。结果提示PI3K/Akt信号通路在儿童清咽解热口服液治疗上呼吸道感染中发挥重要作用。PI3K/Akt信号通路参与病毒进入细胞和免疫应答发生的各个方面^[21]。有报道称,PI3K/Akt信号通路的激活与炎症反应和氧化应激有关,并通过抑制细胞过早凋亡来支持病毒复制^[22]。因此,开发PI3K/Akt信号通路抑制剂可作为抗病毒感染的潜在手段。

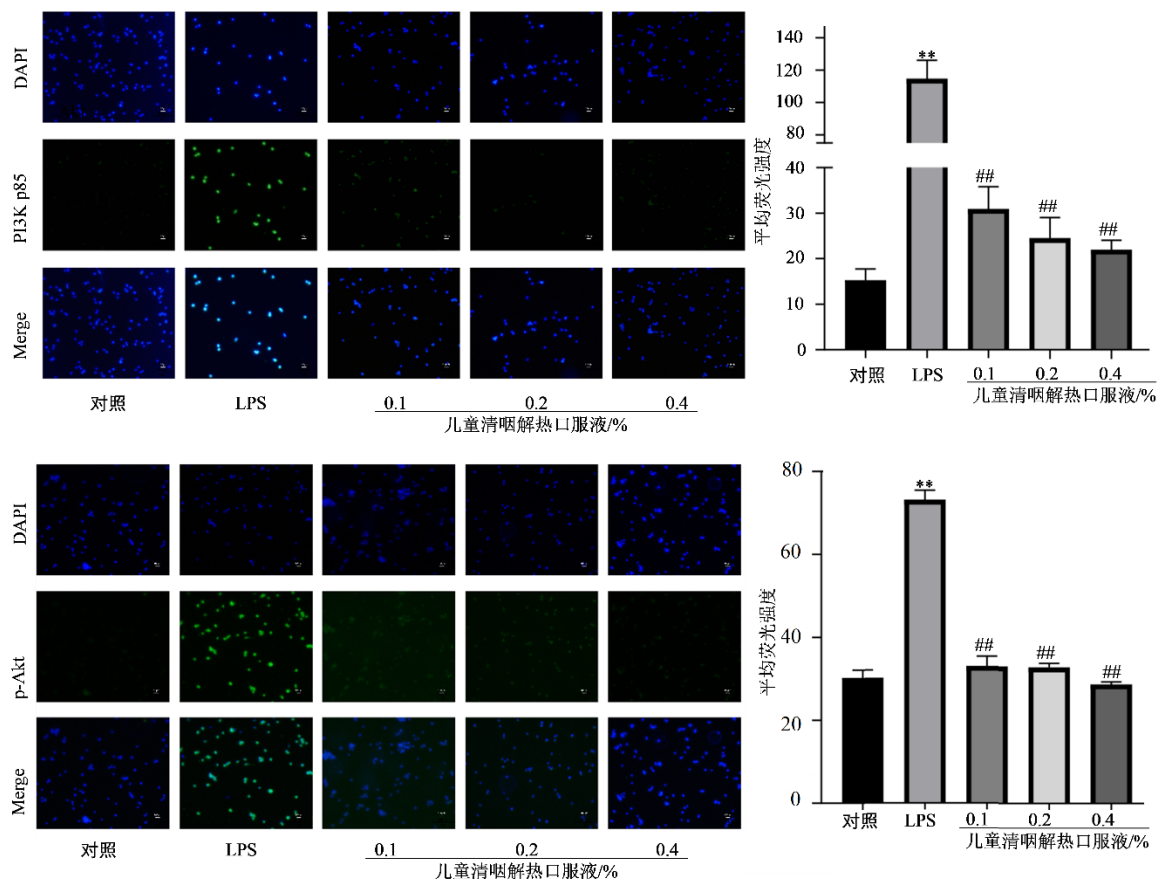
PI3Ks是一类磷酸化磷脂酰肌醇肌醇环3位羟基的酶。其中PI3K包含一个催化结构域P110和一个调节结构域P85。Akt也被称为蛋白激酶B,是一种丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶,在多种细胞过程中发挥重要作用^[23]。在本研究中,儿童清咽解热口服液作用于LPS刺激的RAW264.7细胞后,NO和IL-6的释放被有效抑制,炎症反应得到改善。同时PI3K p85和p-Akt的表达水平显著下调,说明儿童清咽解热口服液可能通过抑制PI3K/Akt信号通路发挥抗炎作用。

本研究旨在通过网络药理学和分子对接,揭示儿童清咽解热口服液抗儿童上呼吸道感染的分子机制。结果显示,药物通过多种活性成分如黄芩苷、柴胡皂苷、槲皮素、鱼腥草素等,作用于PI3K、



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

图 10 儿童清咽解热口服液对 LPS 处理的 RAW264.7 细胞 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 10 Effect of Ertong Qingyan Jierye Oral Liquid on expression levels of PI3K/Akt signaling pathway in LPS-induced RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group.

图 11 儿童清咽解热口服液对 PI3K/Akt 信号通路蛋白荧光表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 11 Effects of of Ertong Qingyan Jierye Oral Liquid on fluorescence expression of PI3K/Akt signaling in LPS-induced RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Akt、EGFR、MAPK3 等多种靶点,干预 PI3K/Akt 等信号通路从而发挥抗病毒、抗炎的效果。同时,在

细胞水平上应用 Western blotting 和免疫荧光技术对网络药理学结果进行了验证。此外,赤小豆中的槲

皮素等成分可以缓解处方中其他感冒药引起的腹泻。值得注意的是,本研究筛选出的一些活性化合物、靶基因和通路报道较少,这可能为进一步研究儿童清咽解热口服液治疗上呼吸道感染的机制提供参考依据。后续实验将注重网络药理学预测结果与临床实际相结合,进一步完善儿童清咽解热口服液治疗上呼吸道感染的作用机制,提高结果的严谨性和可信度。

本研究通过系统阐释儿童清咽解热口服液治疗儿童上呼吸道感染的作用机制,为下一步的药物二次开发奠定了扎实的前期基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Shahan B, Barstow C, Mahowald M. Respiratory Conditions: Upper respiratory tract infections [J]. FP Essent, 2019, 486: 11-18.
- [2] Aglipay M, Birken C S, Parkin P C, et al. Effect of high-dose vs standard-dose wintertime vitamin D supplementation on viral upper respiratory tract infections in young healthy children [J]. JAMA, 2017, 318(3): 245.
- [3] Wei Y, Ren S C, Wang R L, et al. Based on network pharmacology to explore the potential bioactive compounds and mechanisms of Zuojin Pill for the treatment of ulcerative colitis [J]. Evid Based Complementary Altern Med, 2021, 2021: 7567025.
- [4] 戎萍, 马融, 刘全慧, 等. 中成药治疗小儿急性上呼吸道感染研究述评 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(8): 1455-1466.
Rong P, Ma R, Liu Q H, et al. A commentary of literature research of traditional Chinese medicine for acute upper respiratory tract infection in children [J]. China J Chin Mater Med, 2017, 42(8): 1455-1466.
- [5] 王英萍. 儿童清咽解热口服液体外抗呼吸道合胞病毒(RSV)作用及其抗炎活性研究 [J]. 亚太传统医药, 2023, 19(8): 24-27.
Wang Y P. Study on the anti respiratory syncytial virus (RSV) effect and anti-inflammatory activity of Children Qingyan Jiere Oral Liquid *in vitro* [J]. Asia-Pacific Tradit Med, 2023, 19(8): 24-27.
- [6] 蔡秋晗, 胡思源, 刘颖, 等. 儿童清咽解热口服液治疗小儿急性咽炎(肺胃实热证)的药物经济学评价 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(4): 519-526.
Cai Q H, Hu S Y, Liu Y, et al. Pharmacoeconomic evaluation of Ertong Qingyan Jiere Oral Liquid for treatment of acute pharyngitis(lung-stomach excess-heat syndrome) [J]. Drug Eval Res, 2018, 41(4): 519-526.
- [7] 马永涛, 赵虹, 李婕, 等. 儿童清咽解热口服液联合头孢克肟治疗小儿急性咽炎的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2022, 37(3): 535-538.
Ma Y T, Zhao H, Li J, et al. Clinical study on Ertong Qingyan Jiere Oral Liquid combined with cefixime in treatment of acute pharyngitis in children [J]. Drugs Clin, 2022, 37(3): 535-538.
- [8] 冯娟. 儿童清咽解热口服液联合头孢克肟颗粒治疗小儿急性咽炎的临床效果 [J]. 临床医学研究与实践, 2023, 8(11): 114-117.
Feng J. Clinical effect of children's Qingyan antipyretic oral liquid combined with cefixime granules on acute pharyngitis in children [J]. Clin Res Pract, 2023, 8(11): 114-117.
- [9] 武建婷, 胡思源, 李新民, 等. 儿童清咽解热口服液治疗小儿急性咽炎(肺胃实热证)的有效性和安全性的多中心临床评价 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(6): 1006-1011.
Wu J T, Hu S Y, Li X M, et al. A multi-center clinical trial: Evaluation on effectiveness and safety of Ertong Qingyanjiere Oral Liquid in treatment of infantile acute pharyngitis with lung-stomach excess-heat syndrome [J]. Drug Eval Res, 2016, 39(6): 1006-1011.
- [10] 赵勉, 邱雨轩, 胡杨, 等. 基于网络药理学探讨复方鲜石斛颗粒防治酒精性肝病的作用机制及实验验证 [J]. 南京中医药大学学报, 2023, 39(9): 895-909.
Zhao M, Qiu Y X, Hu Y, et al. Exploring the mechanism of compound fresh *Dendrobium* granules in treating alcoholic liver disease based on network pharmacology and experimental verification [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2023, 39(9): 895-909.
- [11] 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.
Niu M, Zhang S Q, Zhang B, et al. Interpretation of Network Pharmacology Evaluation Method Guidance [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [12] 张英睿, 干志强, 刘紫轩, 等. 基于网络药理学和分子对接的清开灵注射液治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的作用机制探寻 [J]. 中草药, 2020, 51(12): 3201-3210.
Zhang Y R, Gan Z Q, Liu Z X, et al. Exploring mechanism of Qingkailing Injection in treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19) based on network pharmacology and molecular docking [J]. Acupunct Res, 2020, 51(12): 3201-3210.
- [13] 张新庄. 基于网络药理学研究思路探索热毒宁注射液治疗 URTI 的作用机制 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2013.
Zhang X Z. Network pharmacology-based study on mechanism of reduning injection for URTI [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2013.

- [14] 祁丽丽, 刘皎霞, 李永惠, 等. 黄芩苷对呼吸道合胞病毒感染 Hep-2 细胞凋亡和炎症因子表达的影响 [J]. 中华医院感染学杂志, 2023, 33(4): 485-488.
- Qi L L, Liu J X, Li Y H, et al. Effects of baicalin on apoptosis and expression of inflammatory factors in hep-2 cells infected by respiratory syncytial virus [J]. Chin J Nosocomiology, 2023, 33(4): 485-488.
- [15] 肖丽霞, 周辉年, 龙勃, 等. 柴胡皂苷 A 的药理活性和作用机制研究现状及进展 [J]. 生物医学转化, 2021, 2(4): 60-66.
- Xiao L X, Zhou H N, Long B, et al. Advances on the pharmacological activity and mechanism of saikosaponin A [J]. Biomed Transform, 2021, 2(4): 60-66.
- [16] 史俊薇, 朱城堡, 孙亚磊, 等. 槲皮素抗呼吸道病毒机制研究进展 [J]. 中医儿科杂志, 2023, 19(2): 96-100.
- Shi J W, Zhu C B, Sun Y L, et al. Research progress on the mechanism of quercetin against respiratory virus [J]. J Pediatr Tradit Chin Med, 2023, 19(2): 96-100.
- [17] 梅龙飞. 鱼腥草素钠以表面活性作用方式抑制铜绿假单胞菌感染的机制研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2021.
- Mei L F. Study on the mechanism of sodium houttuynfonate in inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* infection by surface active action [D]. Hefei: Anhui University of Chinese Medicine, 2021.
- [18] Ali M Z, Mehmood M H, Saleem M, et al. The use of *Euphorbia hirta* L. (Euphorbiaceae) in diarrhea and constipation involves calcium antagonism and cholinergic mechanisms [J]. BMC Complementary Med Ther, 2020, 20(1): 14.
- [19] Hirudkar J R, Parmar K M, Prasad R S, et al. Quercetin a major biomarker of *Psidium guajava* L. inhibits SepA protease activity of *Shigella flexneri* in treatment of infectious diarrhoea [J]. Microb Pathog, 2020, 138: 103807.
- [20] Hirano T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer [J]. Int Immunol, 2021, 33(3): 127-148.
- [21] Khezri M R. PI3K/AKT signaling pathway: A possible target for adjuvant therapy in COVID-19 [J]. Hum Cell, 2021, 34(2): 700-701.
- [22] Wei H W, Xue Q J, Sun L, et al. BRD4 inhibition protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by suppressing inflammation and oxidative stress through the PI3K/AKT signaling pathway [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2021, 78(6): 839-846.
- [23] Luo Y, Feng Y, Song L, et al. A network pharmacology-based study on the anti-hepatoma effect of *Radix Salviae Miltiorrhizae* [J]. Chin Med, 2019, 14(1): 27.

[责任编辑 刘东博]