

基于UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS成分分析、网络药理学与实验验证桑菊饮治疗急性肺损伤作用机制

何梓龙¹, 任睿楠¹, 汪芳¹, 赵国安¹, 朱珍珍¹, 陈爱灵², 牛旭东², 姚怡草¹, 毛安迪¹, 张鸿飞¹, 李宇², 孟娜娜², 王天阳^{1*}, 林松^{2*}

1. 齐齐哈尔医学院 药学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161000

2. 齐齐哈尔医学院 基础医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161000

摘要: 目的 研究桑菊饮治疗急性肺损伤 (ALI) 的作用机制。方法 采用超高效液相色谱-电喷雾串联四极杆飞行时间质谱法 (UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS) 快速鉴别桑菊饮的入血成分, 使用 Swiss Target Prediction 和 GeneCards 等数据库筛选桑菊饮入血成分关联靶点与 ALI 相关靶点, 并通过 Venny 确认桑菊饮抗 ALI 潜在靶点。使用 Metascape 对交集靶点进行基因本体 (GO) 注释及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 通过 String 数据库与 Cytoscape 软件构建并分析蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络。基于分子对接对重要成分和靶点间相互作用进行验证, 并进一步采用脂多糖 (LPS) 致 ALI 大鼠模型, 借助实时荧光半定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 明确桑菊饮对 ALI 大鼠重要靶点 (TNF、EGFR、STAT3、PTGS2) 的调控作用。结果 共检测出 38 个桑菊饮入血成分, 获得 220 个药物潜在靶点、3 758 个 ALI 治疗潜在靶点和 145 个交集靶点, 筛选出 10 个核心成分 (芦丁、苦杏仁苷、甘草苷等)。KEGG 通路富集分析揭示桑菊饮可能通过影响花生四烯酸代谢、PI3K-Akt 信号通路等多种生命过程, 发挥抗 ALI 作用。分子对接结果表明, 芦丁、苦杏仁苷、甘草苷等核心成分与 TNF、EGFR、STAT3 等关键靶点具有良好亲和力。qRT-PCR 结果进一步显示桑菊饮可显著回调 ALI 导致的 EGFR、TNF、STAT3、PTGS2 等 mRNA 表达量的改变 ($P < 0.01$)。结论 桑菊饮可能通过甘草苷、芦丁、苦杏仁苷等多成分干预 TNF、EGFR、STAT3、PTGS2 等多靶点, 进而调节花生四烯酸代谢和 PI3K-Akt 等信号通路发挥治疗 ALI 作用。

关键词: 桑菊饮; 急性肺损伤; 成分分析; 网络药理学; 芦丁; 苦杏仁苷; 甘草苷

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 10-2227-14

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.10.004

Mechanism of Sangju Yin in treatment of acute lung injury based on component analysis of UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS, network pharmacology and experimental verification

HE Zilong¹, REN Ruinan¹, WANG Fang¹, ZHAO Guoan¹, ZHU Zhenzhen¹, CHEN Ailing², NIU Xudong², YAO Yicao¹, MAO Andi¹, ZHANG Hongfei¹, LI Yu², MENG Nana², WANG Tianyang¹, LIN Song²

1. School of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161000, China

2. Basic Medical Science College, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161000, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Sangju Yin in the treatment of acute lung injury (ALI). **Methods** The ultra-high performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS) was used to quickly identify the components of Sangju Yin absorbed in plasma. Swiss Target Prediction and GeneCards were used to screen the related targets of Sangju Yin's plasmatic components and ALI-related targets, and the potential

收稿日期: 2024-02-03

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82405233); 黑龙江省自然科学基金联合引导项目 (LH2021H124); 黑龙江省大学生创新训练计划项目 (S202211230035, 202111230032, S202211230055); 齐齐哈尔市科技计划联合引导项目 (LHYD-2021011); 齐齐哈尔医学科学院重点培育项目 (2022-ZDPY-004, 2023-ZDPY-001); 齐齐哈尔医学科学院青年博士专项科研基金项目 (QM-SI2021B-03); 齐齐哈尔医学科学院博士滚动项目 (QMSI2023E-01)

第一作者: 何梓龙, 本科生, 研究方向为中药药效物质基础与作用机制。E-mail: 784761115@qq.com

***共同通信作者:** 王天阳, 博士, 讲师, 主要从事急性肺损伤、中药药效物质基础与作用机制研究。E-mail: tanya.sunny@163.com

林松, 博士, 副研究员, 主要从事中药经典名方现代化、心脑血管疾病的发病机制研究。E-mail: linsong0228@163.com

targets of Sangju Yin's anti-ALI were confirmed by Venny. Metascape was used to analyze the pathway of gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) at the intersection target, and the protein-protein interaction network (PPI) was constructed and analyzed by String database and Cytoscape software. Based on molecular docking, the interactions between important components and targets were validated. The LPS-induced ALI rat model was conducted to clarify the regulatory effects of Sangju Yin on key targets (TNF, EGFR, STAT3, and PTGS2) in rats, using real-time fluorescent semi-quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results** A total of 38 plasmatic components of Sangju Yin were detected, and 220 drug potential targets, 3 758 ALI treatment potential targets and 145 intersection targets were obtained, and 10 core components (rutin, amygdalin, liquiritin, etc.) were screened out. KEGG pathway enrichment analysis revealed that Sangju Yin may play the anti-ALI role by affecting arachidonic acid metabolism, PI3K-Akt signaling pathway and other life processes. The results of molecular docking showed that the core components such as rutin, amygdalin and liquiritin had good affinities with key targets such as TNF, EGFR and STAT3. The results of qRT-PCR further showed that Sangju Yin could significantly reverse the changes of mRNA expression of *EGFR*, *TNF*, *STAT3* and *PTGS2* induced by ALI ($P < 0.01$). **Conclusion** Sangju Yin may interfere with TNF, EGFR, STAT3, PTGS2 and other targets through glycyrrhizin, rutin, amygdalin and other components, then regulate arachidonic acid metabolism and PI3K-Akt signal pathways to play the crucial role in treating ALI.

Key words: Sangju Yin; acute lung injury; component analysis; network pharmacology; rutin; amygdalin; liquiritin

急性肺损伤(ALI)是一种急性呼吸系统疾病,临床常表现为肺部水肿、低氧血症、弥漫性炎症和呼吸窘迫,具有发病率高和死亡率高的特点,一直是基础医学和危重症医学研究的焦点之一^[1-2]。目前,ALI临床治疗手段主要以机械通气、支气管扩张剂、激素和抗生素等支持性疗法为主,仍存在患者耐受性差、不良反应多等问题,具有一定局限性^[2]。因此,深入探究ALI的发生发展机制,并在此基础上进一步开发抗ALI药物及治疗策略,对ALI的临床治疗十分重要。

中医药是中华民族的传统瑰宝,在治疗疾病方面具有不良反应低、资源丰富、成本低、整体调控机体等优势,此外还有多成分-多靶点-多通路调节的治疗优势^[3-5]。桑菊饮出自《温病条辨》(清代医学家吴鞠通著),由菊花、桑叶、苦杏仁、薄荷、芦根、连翘、桔梗、甘草组成,具有疏风清肺、宣肺抗炎的作用^[6]。现代药理学研究表明,桑菊饮对ALI等呼吸系统疾病具有良好的疗效^[7]。如张天柱等^[8]发现桑菊饮能通过显著减低小鼠肺泡灌洗液中的白细胞、炎症因子含量,提高超氧化物歧化酶(SOD)含量,降低丙二醛(MDA)含量并改善小鼠病理改变,进而降低肺组织中P38MAPK和NF- κ B P65蛋白水平从而改善ALI。另有研究表明,桑菊饮可能通过柚皮素、槲皮素等活性成分改善细胞免疫状态、炎症反应,发挥抗炎、抗病毒感染等作用^[9]。另一方面,桑菊饮可改善患者症状,加速支原体IgM(MP-IgM)抗体转阴时间,促进患者康复^[10]。然而,桑菊饮治疗ALI的活性成分与作用机制尚未阐明。

本研究旨在通过多种技术手段探究桑菊饮治

疗ALI的药效物质基础和作用机制。采用UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS技术,快速检测大鼠血浆中桑菊饮治疗ALI入血成分;采用网络药理学方法,构建“药物-成分-靶点”调控网络、蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络、基因本体(GO)注释及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,筛选桑菊饮治疗ALI的核心成分并揭示其潜在作用机制;通过分子对接技术验证其核心成分与关键靶点间的相互作用,这些工作将为临床应用桑菊饮治疗ALI提供实验数据,并为中药复方现代化研究提供策略。

1 材料

1.1 动物

健康雄性Wistar大鼠(体质量220~250 g),由辽宁长生生物技术股份有限公司提供[生产许可证号:2015-00011],饲养于齐齐哈尔医学院SPF级动物研究所,实验前在12 h昼夜交替的动物房内适应性饲养7 d(室温20~25 °C、湿度50%~55%,室内保持通风),自由进食饮水。本研究经齐齐哈尔医学院医学实验动物伦理委员会评审通过(批准号QMU-AECC-2021-86)。

1.2 药材与试剂

桑叶、菊花、苦杏仁、薄荷、芦根、连翘、桔梗、甘草均购于齐齐哈尔同仁堂大药房,经齐齐哈尔医学院中药教研室王文豹副教授鉴定,分别为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶、菊科植物菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 的干燥头状花序、蔷薇科植物杏 *Prunus armeniaca* L. 的干燥成熟种子、唇形科植物薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq. 的干

燥地上部分、禾本科植物芦苇 *Phragmites communis* Trin. 的新鲜或干燥根茎、木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实、桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 的干燥根、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎。

芹菜素、芦丁、苦杏仁苷、甘草苷、松脂醇、刺槐素、柚皮素、甘草酸、异甘草素、甘草素, 购于成都曼思特生物有限公司, 质量分数均 $\geq 98\%$ 。甲醇、乙腈均为质谱级, 购自美国 Thermo Fisher 公司。TransZol-Up 试剂、EasyScript[®] One-Step gDNA Removal & cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒和 PerfectStart[®] Fast Green qPCR SuperMix 试剂盒均购于 TransGen Biotech 公司(中国北京); 脂多糖(LPS, *Escherichia coli* 055:B5) 购买自德国默克公司。

1.3 仪器

LC-20A 岛津液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司); AB Sciex Triple TOF 4600 质谱仪(美国 Thermo Scientific 公司); 万分之一分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); 3-30K 微量高速离心机(德国 Sigma 公司); LC-RE-5299 旋转蒸发仪(上海力辰邦西仪器科技有限公司)。

2 方法

2.1 桑菊饮入血成分分析

2.1.1 桑菊饮供试品溶液的制备 取桑叶 7.5 g、菊花 3 g、苦杏仁 6 g、连翘 5 g、薄荷 2.5 g、桔梗 6 g、甘草 2.5 g、芦根 6 g, 加入纯水(1:8)浸泡 30 min, 2次煎煮(每次 20 min), 合并 2次提取物, 离心(3 500 r·min⁻¹、10 min), 取上清液至旋蒸仪, 浓缩, 即得桑菊饮供大鼠给药溶液, 生药质量浓度 9 g·mL⁻¹。

2.1.2 大鼠分组、给药及样本采集 将 12 只大鼠随机分为对照组和桑菊饮组, 给药前 12 h 大鼠禁食不禁水。桑菊饮组 ig 给予桑菊饮(4 g·kg⁻¹, 临床等效剂量^[11]), 对照组给予等体积的 0.9% 氯化钠溶液。于给药后 0.5、1.0、2.0、4.0 h, 采用内眦静脉取血置于 1 mL 涂有肝素钠的 EP 管中, 静置, 离心(3 500 r·min⁻¹、4 °C、10 min), 即得血浆样本。

2.1.3 血浆样本处理 取大鼠血浆 100 μ L, 加甲醇 300 μ L, 涡旋 1 min, 离心(12 000 r·min⁻¹、4 °C、10 min), 取上清液, 过 0.22 μ m 微孔滤膜, 进样分析。

2.1.4 液质联用条件 色谱条件: ACQUITY UPLC[®] HSS C₁₈ 柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m), 柱温 30 °C, 体积流量 0.4 mL·min⁻¹, 进样量 5 μ L。流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1% 甲酸乙腈(B), 桑菊

饮入血成分快速鉴定梯度洗脱程序为: 0~2 min, 5%B; 2~15 min, 5%~98%B; 15~22 min, 98%B。

质谱条件: 采取电喷雾离子源(ESI), 前级离子高分辨全扫描-信息关联采集-碎片离子高分辨扫描(ToF-MS-IDA-MS/MS)模式, 动态背景扣除功能(DBS)为 IDA 触发 MS/MS 扫描的条件。正、负离子模式均进行采集。雾化气及其余辅助气体均为氮气。其他条件见表 1。

表 1 质谱条件

Table 1 Mass spectrometry condition

参数	正离子模式	负离子模式
喷雾电压(ISVF)/V	5 500	-4 500
离子化温度(TEM)/°C	550	550
去簇电压(DP)/V	100	-80
碰撞电压(CE)/eV	30	-10
雾化气(Gas1)/psi	50	50
辅助气(Gas2)/psi	50	50
气帘气(Curtain gas)/psi	30	30

1 psi=6.895 kPa

2.1.5 桑菊饮入血成分快速鉴定 基于 Web of Science (<https://www.webofscience.com>)、Chemspider (<http://www.chemspider.com/>)、NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和中国学术期刊全文数据库(<http://www.cnki.net>)等数据库, 结合系统检索相关文献信息, 整理成分的名称、结构式、化学式、相对分子质量与特征碎片等信息, 建立化学成分数据库。将数据库中的成分列表导入 MasterView 软件并赋予一定的加和形式, 建立目标成分的筛选列表。依靠 MasterView 软件将采集得到的桑叶质谱数据信息导入, 结合 IDA 模式采集二级数据进行匹配, 根据文献报道、对比分析得分与网络质谱数据库的二级信息为标准, 对桑菊饮入血成分进行初步鉴定。

2.2 网络药理学预测

2.2.1 靶点收集 运用 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)将得到的桑菊饮入血成分转换为对应的 SMILES 结构式, 将其导入 Swiss TargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)平台预测潜在靶点。根据预测靶点的相关性进行排序, 选取前 15 位作为入血成分的靶点, 最后通过 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)对靶蛋白名称进行标准化处理。通过人类基因数据库(<http://www.Genecards.org/>), 以 Relevance score ≥ 5 为条件,

以急性肺损伤为关键词检索,获取相关蛋白。利用 Venny2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/>) 网站,在线获取药物与疾病的交集靶点并进行整理。

2.2.2 “药物-成分-靶点”网络图构建 将桑菊饮的 8 味药材与得到的桑菊饮入血成分及桑菊饮抗 ALI 交集靶点制作成“药物-成分-靶点”网络,并将其导入 Cytoscape 3.7.2 进行可视化处理。

2.2.3 PPI 网络构建及关键靶点的筛选 将共有靶点导入 String 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 进行分析,隐藏游离节点并导出结果文件;将文件导入 Cytoscape 3.9.1 进行可视化处理并构建 PPI 网络。

2.2.4 GO 与 KEGG 通路富集分析 运用 Metascape (<http://metascape.org/>) 数据库以 $P < 0.01$ 作为标准进行 GO 与 KEGG 通路富集分析,并对结果进行可视化处理。

2.3 分子对接

将桑菊饮抗 ALI 核心成分与关键靶点基因进行分子对接,进一步验证桑菊饮对 ALI 的干预作用, PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 检索 Resolution 最小、结合率最高的蛋白结构, Pubchem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中下载化学成分的 Mol2 结构,在受体和配体优化后,利用 CB-Dock2 软件 (<http://www.lephar.com>) 分子对接, PyMOL、Discovery Studio 软件进行 3D、2D 结果可视化。STAT3、EGFR、TNF 和 PTGS2 的 PDB ID 为: 6njs、5gnk、5m2j 和 5ikr。

2.4 体内实验验证

2.4.1 造模与分组 将 18 只大鼠随机分为对照组、模型组、桑菊饮组,每组 6 只。对照组与模型组 ig 等体积的 0.9% 氯化钠溶液,桑菊饮组 ig 给予“2.1.1”项中制备的桑菊饮 ($4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),连续给药 7 d。第 8 天采用戊巴比妥钠 ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 麻醉后,对照组经气管插管给予等体积的 0.9% 氯化钠溶液,其余组分别向气管内滴注 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 进行造模。造模 6 h 内,每 2 h 观察大鼠状态 1 次。取材前 12 h,立即禁食,自由饮水,造模 6 h 后,对大鼠施行安乐死,取材。计算肺脏指数。

肺脏指数 = 肺脏质量 / 大鼠体质量

2.4.2 表皮生长因子受体 (EGFR)、肿瘤坏死因子 (TNF)、信号转导和转录激活因子 3 (STAT3)、环氧化酶 2 (PTGS2) mRNA 表达检测 取适量大鼠肺组织,按照 TransZol-Up 试剂说明书提取总 RNA。随后按试剂盒说明书进行反转录和荧光定量操作。qRT-PCR 引物由生工生物工程(上海)有限公司合

成,见表 2。使用 Quant Studio 3 PCR 系统对目的基因进行扩增,以 GAPDH 基因转录本作为内参,使用比较 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法,计算靶基因的相对表达水平。

表 2 qRT-PCR 引物序列
Table 2 qRT-PCR primer sequence

引物	序列(5'→3')
TNF-F	CCACGCTCTTCTGTCTACTG
TNF-R	GCTACGGGCTTGTCACCTC
EGFR-F	CCAAGGCACAAGTAACAGGC
EGFR-R	TTCCAAGTTTCCAAGGACCAC
STAT3-F	CATAGTGAGCCCTTGGAACG
STAT3-R	AGTGCAGTGACCAGGACAGAAT
PTGS2-F	TGCACTATGGTTACAAAAGCTGG
PTGS2-R	TCAGGAAGCTCCTTATTTCCCT
GAPDH-F	TGGAGAAACCTGCCAAGTATGATG
GAPDH-R	TATCCTTGCTGGGCTGGGTG

3 结果

3.1 体内入血成分鉴定

经 UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS 鉴定,得到桑菊饮入血化学成分共 38 个,包括黄酮类 15 个、黄酮醇类 1 个、二氢黄酮类 1 个、查尔酮类 2 个、有机酸类 2 个、氰苷类 1 个、苯并呋喃类 1 个、苯丙酸类 2 个、木脂素类 2 个、三萜皂苷类 2 个及其他类 9 个,详细数据见表 3。

3.2 网络药理学分析

3.2.1 “药物-成分-靶点”网络图构建 通过 PubChem 数据库将各入血成分的 SMILES 式导入 Swiss Target Prediction 数据库进行桑菊饮成分的作用靶点预测,去重后共获取 220 个成分作用靶点,与 3 758 个 ALI 靶点取交集,得到桑菊饮治疗 ALI 的 145 个靶点。利用 Cytoscape 构建“中药-活性成分-靶点”网络图(图 1),并用 Mcc 算法计算出各活性成分的排名,取前 10 名为核心成分,见表 4。

3.2.2 PPI 网络图构建 通过 Venny2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 网站获得 145 个桑菊饮与 ALI 的交叉靶点(图 2),将这 145 个靶点导入 String 数据库,设置置信度为 0.400 获得 PPI 网络图(图 3)。利用 Cytoscape 软件进行可视化处理。将各靶点按照度值排序,选取排名较高的作为关键靶点,其中平均度值为 18.8,最大值为 86,最小值为 1。移除 PPI 网络中与主要网络离散且边缘较少的节点后,最终呈现 143 个节点和 1 353 条边,

表3 桑菊饮中38个入血化学成分质谱信息

Table 3 Mass spectrum information of 38 plasmatic chemical components of Sangju Yin

编号	成分名称	分子式	离子模式	t_R / min	误差/(\times 10^{-6})	碎片离子 m/z	归属/分类
1(H5)	泛酸(pantothenic acid)	$C_9H_{17}NO_5$	$[M+H]^+$	3.4	5.4	220.118 5、202.108 5、 184.098 1、90.055 6	⑥,⑦/有机 酸类
		$C_9H_{17}NO_5$	$[M-H]^-$	4.2	3.7	218.301 1、146.200 3、 88.201 5	
2(D8)	绿原酸(chlorogenic acid)	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	4.8	6.4	353.070 4、191.053 7、 179.031 9、173.043 0	①,②/苯丙 酸类
		$C_{16}H_{18}O_9$	$[M+H]^+$	5.6	7.3	355.001 7、163.000 8、 162.002 1	
3(GC4)	甘草素(liquiritigenin)	$C_{15}H_{12}O_4$	$[M+H]^+$	4.9	4.1	257.080 4、239.069 9、 147.043 9、137.023 2	⑦/黄酮类
4(E6)	苦杏仁苷(amygdalin)	$C_{20}H_{27}NO_{11}$	$[M+Na]^+$	5.0	2.4	480.148 2	①,③/氰苷 类
		$C_{20}H_{27}NO_{11}$	$[M-H]^-$	5.6	1.7	457.153 5、323.098 0、 161.046 9、101.023 9	
5(SY2)	玉叶金花苷酸(mussaenosidic acid)	$C_{16}H_{24}O_{10}$	$[M-H]^-$	5.4	6.1	375.129 0	①/有机酸 类
6(C5)	苯乙基 β -D-吡喃葡萄糖苷(phenylethyl β -D-glucopyranoside)	$C_{14}H_{20}O_6$	$[M+NH_4]^+$	5.8	7.0	302.164 5	①,②,⑤/ 其他类
7(GC13)	芹糖甘草苷(liquiritin apioside)	$C_{26}H_{30}O_{13}$	$[M-H]^-$	5.8	5.7	528.582 0、255.065 2、 153.018 3、135.008 6	⑦/黄酮类
		$C_{26}H_{30}O_{13}$	$[M+NH_4]^+$	6.0	7.7	568.262 4、259.087 6、 258.084 8、136.746 4	
8(G1)	芦丁(rutin)	$C_{27}H_{30}O_{16}$	$[M+H]^+$	5.9	5.9	611.001 3、610.002 1、 304.002 2、302.001 4	①,②,④, ⑤,⑦/黄酮 醇类
		$C_{27}H_{30}O_{16}$	$[M-H]^-$	6.0	3.4	609.146 5、463.078 6、 301.035 2、300.025 2	
9(B5)	槲皮素3-O-葡萄糖苷酸(quercetin 3-O-glucuronide)	$C_{21}H_{18}O_{13}$	$[M+H]^+$	6.1	4.4	477.069 4、302.038 6、 301.033 1、151.001 7	①,②,⑦/ 黄酮类
		$C_{21}H_{18}O_{13}$	$[M-H]^-$	6.8	12.6	479.082 6、303.050 5、 285.039 9、273.039 9	
10(E8)	灯盏花素(brevi-scipine)	$C_{21}H_{18}O_{12}$	$[M+H]^+$	6.2	5.2	463.087 7	②,⑦/黄酮 类
11(F5)	甘草苷(liquiritin)	$C_{21}H_{22}O_9$	$[M+H]^+$	6.2	7.9	419.133 0、257.080 7、 147.043 8、137.022 7	③,⑦/黄酮 类
12(GC5)	柚皮素查尔酮(naringenin chalcone)	$C_{15}H_{12}O_5$	$[M+H]^+$	6.8	0.7	273.076 4	⑦/查尔酮 类
13(JH1)	地艾普内酯(loliolide)	$C_{11}H_{16}O_3$	$[M+H]^+$	6.9	7.1	197.117 8、179.107 2、 135.117 4、57.070 4	②/苯并呋 喃类
14(B6)	芹菜素7-葡萄糖苷(apigenin)	$C_{21}H_{20}O_{10}$	$[M+H]^+$	7.0	3.6	433.113 6	①,②,⑦/ 黄酮类
15(G4)	橙皮苷(hesperidin)	$C_{28}H_{34}O_{15}$	$[M+H]^+$	7.2	5.3	611.384 0、301.291 5、 174.838 9、150.062 4	②,⑤/二氢 黄酮(醇)类
		$C_{28}H_{34}O_{15}$	$[M-H]^-$	7.9	5.7	609.182 7、303.078 8、 301.072 3	

表3(续)

编号	成分名称	分子式	离子模式	t_R / min	误差/(\times 10^{-6})	碎片离子 m/z	归属/分类
16(D5)	刺槐素(acacetin)	$C_{16}H_{12}O_5$	$[M-H]^-$	7.7	3.2	283.059 6、268.038 2、 240.042 1、211.038 2	②,③,⑤, ⑥/黄酮类
		$C_{16}H_{12}O_5$	$[M+H]^+$	8.5	4.7	285.076 4	
17(D4)	柚皮素(naringenin)	$C_{15}H_{12}O_5$	$[M+H]^+$	7.8	5.8	273.001 1、147.002 4、 135.000 8、121.001 4	②,⑤,⑦/ 黄酮类
18(GC12)	芒柄花素 7-O-葡萄糖 苷(formononetin 7-O- glucoside)	$C_{22}H_{22}O_9$	$[M+H]^+$	7.9	5.6	431.134 3	⑦/异黄酮 类
19(GC6)	芒柄花素(formononetin)	$C_{16}H_{12}O_4$	$[M+H]^+$	7.9	8.5	269.078 1、253.0493、 226.063 0、197.059 3	⑦/异黄酮 类
		$C_{16}H_{12}O_4$	$[M-H]^-$	8.5	3.0	267.066 4、253.046 7、 252.043 7、251.036 0	
20(A2)	阿魏酸(ferulic acid)	$C_{10}H_{10}O_4$	$[M+H-H_2$ $O]^+$	8.1	8.3	177.000 9、176.001 2、 152.002 4、144.003 1	①,④,⑦/ 苯丙酸类
21(GC2)	大豆黄酮(daidzein)	$C_{15}H_{10}O_4$	$[M+H]^+$	8.5	6.2	254.860 9、198.870 2、 180.910 2、136.871 3	⑦/异黄酮 类
22(G2)	蒙花苷(linarin)	$C_{28}H_{32}O_{14}$	$[M+H]^+$	8.6	7.6	593.187 7、447.126 2、 287.075 3、285.025 7	②,③,⑤/ 黄酮类
		$C_{28}H_{32}O_{14}$	$[M+FA-H]^-$	9.1	4.5	637.197 3	
23(D3)	异甘草素(isoliquiritigenin)	$C_{15}H_{12}O_4$	$[M+H]^+$	8.7	7.0	257.079 8、211.076 8、 147.043 9、137.022 1	③,⑦/查尔 酮类
24(LQ8)	连翘酯苷 A(forsythoside A)	$C_{29}H_{36}O_{15}$	$[M-H]^-$	9.4	1.2	623.195 9、461.165 1、 443.153 8、315.107 6	④/苯乙醇 苷类
		$C_{29}H_{36}O_{15}$	$[M+NH_4]^+$	10.5	7.8	642.237 3、479.153 2、 325.091 0、163.038 4	
25(LQ2)	松脂醇(pinoresinol)	$C_{20}H_{22}O_6$	$[M+H-H_2$ $O]^-$	9.5	5.5	341.102 5、327.123 2、 191.070 8、161.045 0	④/木脂素 类
26(E9)	木犀草素 7-葡萄糖醛酸 苷(luteolin 7-glucuronide)	$C_{21}H_{18}O_{12}$	$[M-H]^-$	10.5	5.4	461.064 7、286.045 2、 285.039 9	②,③,④,⑤, ⑥/黄酮类
27(C7)	芹菜素(apigenin)	$C_{15}H_{10}O_5$	$[M+H]^+$	10.5	7.3	271.054 9、153.015 2、 145.024 3、19.047 3	①,②,③, ⑤/黄酮类
		$C_{15}H_{10}O_5$	$[M-H]^-$	10.9	1.9	269.052 1、151.008 3、 149.029 2、117.038 6	
28(JH2)	3-氧代愈创木脂-4,11(13)-二 烯-12,8 β -内酯(achalensolide)	$C_{15}H_{18}O_3$	$[M+H]^+$	11.2	3.2	247.133 5	②/其他类
29(F2)	紫云英苷(astragaln)	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M-H]^-$	11.8	7.0	447.093 4、285.040 1、 284.032 4	①,④,⑦/ 黄酮类
30(G5)	3-羟基齐墩果-12-烯-29-酸(3- hydroxyolean-12-en-29-oic acid)	$C_{30}H_{48}O_3$	$[M+H-H_2$ $O]^+$	12.3	1.9	439.353 0	①,③/其他 类
31(E7)	芹菜素 7-葡萄糖醛酸 苷(apigenin 7-glucuronide)	$C_{21}H_{18}O_{11}$	$[M-H]^-$	12.4	5.8	445.076 3、269.045 5、 175.024 5、113.024 4	②,③,⑤/黄 酮类
32(GC3)	7,4'-二羟基黄酮(7,4'- dihydroxyflavone)	$C_{15}H_{10}O_4$	$[M-H]^-$	14.2	2.4	253.050 1、227.034 4、 211.039 5、135.008 2	⑦/黄酮类

表3 (续)

编号	成分名称	分子式	离子模式	t_R / min	误差/(\times 10^{-6})	碎片离子 m/z	归属/分类
33GC14)	甘草次酸(glycyrrhetic acid)	$C_{30}H_{46}O_4$	$[M+H]^+$	14.6	0.6	471.346 7、407.328 7、 235.168 5、189.163 6	⑦/三萜皂 苷类
		$C_{30}H_{46}O_4$	$[M+H-H_2$ $O]^+$	14.9	0.2	453.303 8、428.351 6、 427.349 2、426.346 7	
34GC15)	甘草酸(glycyrrhizic acid)	$C_{42}H_{62}O_{16}$	$[M+H]^+$	14.6	1.0	823.410 3、647.377 1、 471.348 3、453.335 9	⑦/三萜皂 苷类
35(LQ6)	连翘苷(phillyrin)	$C_{27}H_{34}O_{11}$	$[M-H]^-$	15.4	7.7	821.396 2、351.055 7	④/木脂素 类
		$C_{27}H_{34}O_{11}$	$[M+FA-H]$ $H]^-$	15.1	5.7	579.228 2	
36(LQ4)	汉黄芩苷(wogonoside)	$C_{22}H_{20}O_{11}$	$[M-H]^-$	15.8	2.9	459.092 6	④/黄酮类
37(E5)	氢化奎尼丁(hydroquinidine)	$C_{20}H_{26}N_2O_2$	$[M-H]^-$	21.1	3.9	325.191 5	①,②/其他 类
38(JG1)	6a-乙酰氧基-17(21)-戊烯[6a- acetoxy-17(21)-hopene]	$C_{32}H_{52}O_2$	$[M+H]^+$	21.7	1.4	469.404 7	⑥/其他类

①-桑叶;②-菊花;③-苦杏仁;④-连翘;⑤-薄荷;⑥-桔梗;⑦-甘草;⑧-芦根。

①-Mori Folium ; ②-Chrysanthemi Flos ; ③-Armeniaca Semen Amarum ; ④-Forsythiae Fructus ; ⑤-Menthae Haplocalycis Herba ; ⑥-Platycodonis Radix ; ⑦-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma ; ⑧-Phragmitis Rhizoma.

表4 核心成分
Table 4 Core component

排名	Mcc评分	成分	编号
1	20	芹菜素	C7
2	18	芦丁	G1
3	17	苦杏仁苷	E6
4	17	甘草苷	F5
5	16	刺槐素	D5
6	16	柚皮素	D4
7	15	松脂醇	LQ2
8	13	甘草酸	GC15
9	12	异甘草素	D3
10	11	甘草素	GC4

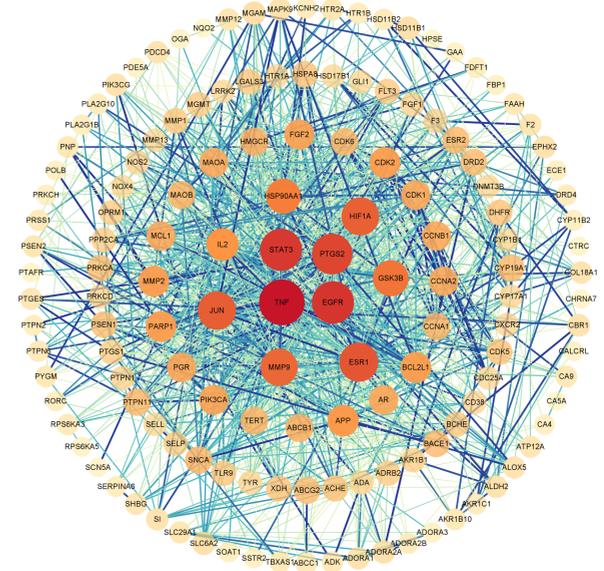


图3 桑菊饮治疗ALI靶点的PPI网络图

Fig. 3 PPI network plot of targets of Sangju Yin in treatment of ALI

其中主要的有TNF、EGFR、STAT3、PTGS2、ESR1、JUN、HIF1A等(表5),表明这些靶点可能与桑菊饮入血成分有较高的结合性,提示这些靶点可能是桑菊饮抗ALI的关键靶点。

3.2.3 GO功能及KEGG通路富集分析 将桑菊饮入血成分和ALI映射得到的145个靶点导入Metascape(<https://metascape.org/>)数据库,将阈值设置为 $P<0.01$ 进行GO、KEGG分析。通过GO功能

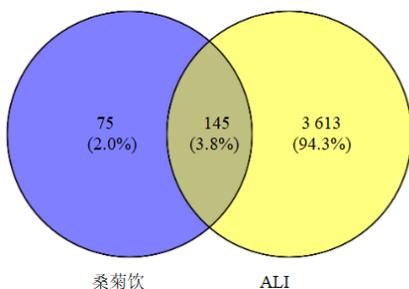


图2 桑菊饮活性成分靶点与ALI靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of target of active component of Sangju Yin and target of ALI

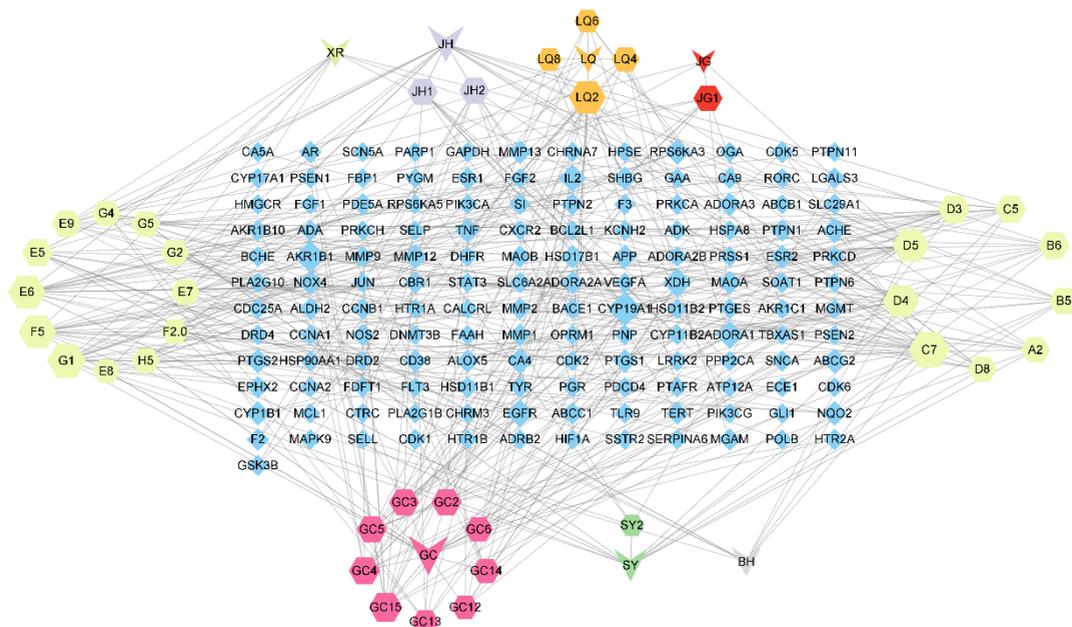


图 1 桑菊饮活性成分治疗 ALI“药物-成分-靶点”网络图

Fig. 1 Network diagram of “medicine-ingredients-targets” for treatment of active ingredients in ALI

表 5 关键靶点信息

Table 5 Information of key targets

基因	度中心性	中介中心性	接近中心性
<i>TNF</i>	80	2 164.60	0.68
<i>EGFR</i>	70	1 172.77	0.65
<i>STAT3</i>	69	1 171.99	0.64
<i>PTGS2</i>	65	1 407.51	0.63
<i>ESR1</i>	60	987.63	0.61
<i>JUN</i>	58	774.87	0.60
<i>HIF1A</i>	57	615.70	0.59

富集分析,分别筛选出相关性最高的前 10 条反应过程(图 4)。其中,生物过程(BP)主要涉及脱氧腺苷分解代谢过程、嘌呤脱氧核糖核苷酸分解代谢过程和 dAMP 分解代谢过程等;分子功能(MF)主要涉及 G 蛋白偶联腺苷受体活性、 α -1,4-葡萄糖苷酶活性、一氧化氮合酶(iNOS)调节活性等;细胞组分(CC)主要涉及细胞周期蛋白 A2-CDK2 复合物、核膜管腔、轴膜、细胞依赖性周期蛋白激酶全酶复合物等。表明桑菊饮可能通过参与多种生物调控过程发挥抗 ALI 活性。KEGG 通路富集分析(图 5)发现,与桑菊饮治疗 ALI 相关的通路有:花生四烯酸代谢(arachidonic acid metabolism)、类固醇激素的生物合成(steroid hormone biosynthesis)、化学致癌作用-活性氧(chemical carcinogenesis-reactive oxygen species)、PI3K-Akt 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)等。

3.3 分子对接

按照 Mcc 算法,将排名靠前的活性成分与 PPI 中按照度值排名靠前的关键靶点进行分子对接,以结合能数值大小作为评判对接效力标准,数值越小表明配体与受体有越好的结合活性。一般认为结合能 $< -20.9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 有较好的结合活性, $< -41.8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 有强烈的结合活性。本实验对接得分均 $\leq -27.17 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。苦杏仁苷、甘草苷与 STAT3 和芦丁与 EGFR 对接得分较高,部分可视化结果及对接结果见图 6 和表 6。

3.4 体内实验验证

3.4.1 大鼠一般状态观察 与对照组比较,模型组大鼠眼角分泌物增多、精神状态较差、自主活动少、不活跃、呼吸频率显著增加、呼吸困难伴肺部喘鸣音。与模型组相比,桑菊饮组大鼠状态有明显改善,自主活动较多、呼吸频率较缓、眼角分泌物较少。

3.4.2 大鼠肺脏指数 与对照组比较,模型组大鼠肺脏指数显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,桑菊饮组大鼠肺脏指数显著降低 ($P < 0.01$),说明桑菊饮可以改善 ALI 模型大鼠肺损伤,结果见图 7。

3.4.3 大鼠肺组织 *TNF*、*EGFR*、*STAT3*、*PTGS2* mRNA 表达 网络药理学预测 *TNF*、*EGFR*、*STAT3*、*PTGS2* 为桑菊饮治疗 ALI 的关键靶点,故检测 *TNF*、*EGFR*、*STAT3*、*PTGS2* mRNA 在大鼠肺组织中的表达水平。结果(图 8)表明,与对照组相比,模型组 *TNF*、*EGFR*、*STAT3*、*PTGS2* mRNA 表达均显著增

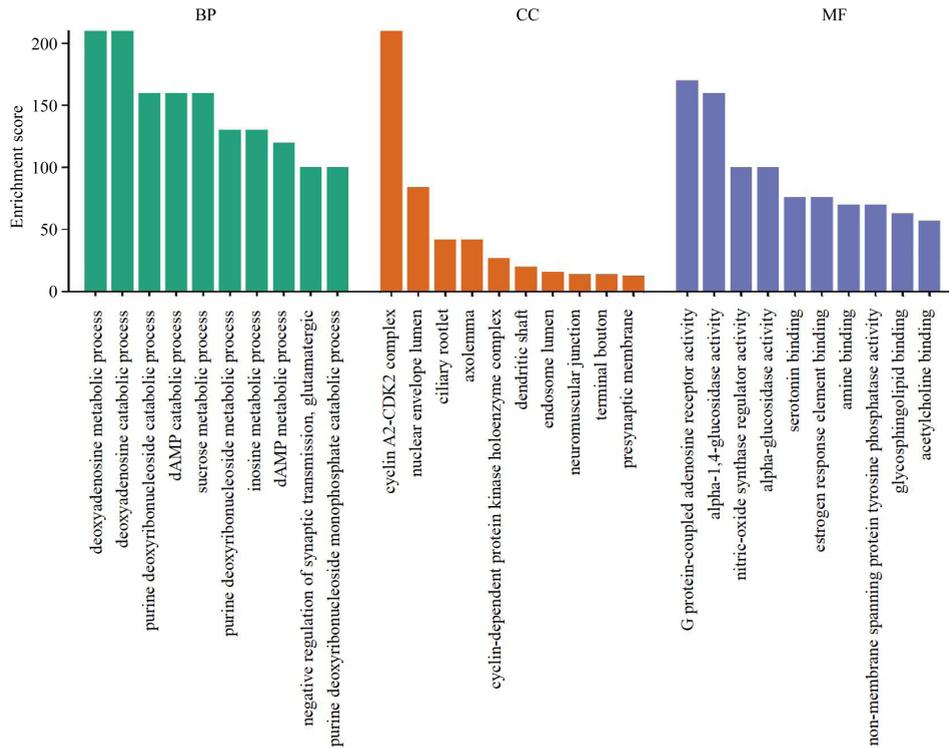


图4 桑菊饮入血成分治疗ALI关键靶点的GO富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis of key targets from Sangju Yin for treatment of ALI

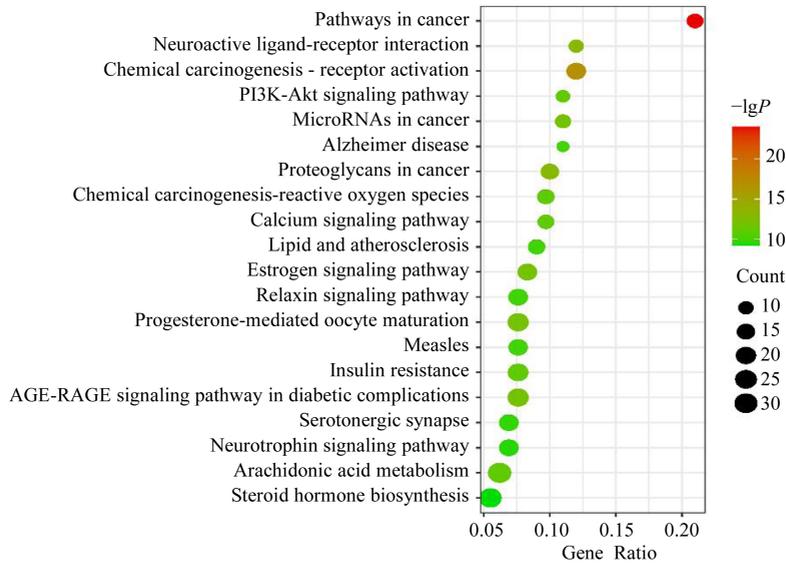


图5 桑菊饮入血成分治疗ALI关键靶点KEGG富集分析

Fig. 5 KEGG enrichment analysis of key targets from Sangju Yin in treatment of ALI

加($P < 0.01$)。与模型组相比,桑菊饮组 *TNF*、*EGFR*、*STAT3*、*PTGS2* mRNA 表达均显著下降($P < 0.01$)。

4 讨论

ALI是由肺炎、脓毒血症、吸入性肺损伤等多种致病因素引起的复杂的呼吸系统疾病,其发生和发展的根本原因在于炎症因子过度表达和失控性炎症反应^[1-2]。目前,大量研究表明,中药因其“多成分、多靶点、多通路”的优势,其中所含多种天然化

学成分能高度靶向至病灶,并且能通过协同减少炎症因子释放、抑制炎症通路、调控炎症介质等方式治疗ALI^[1]。桑菊饮作为传统的中医方剂广泛应用于临床,已有研究表明桑菊饮能够修复炎症损伤,改善多种肺系疾病^[9]。本研究采用液质联用技术全面鉴定桑菊饮治疗ALI的入血成分,并基于“多成分、多靶点、多通路”的研究特色,采用网络药理学技术筛选桑菊饮抗ALI关键靶点,同时,进一步辅

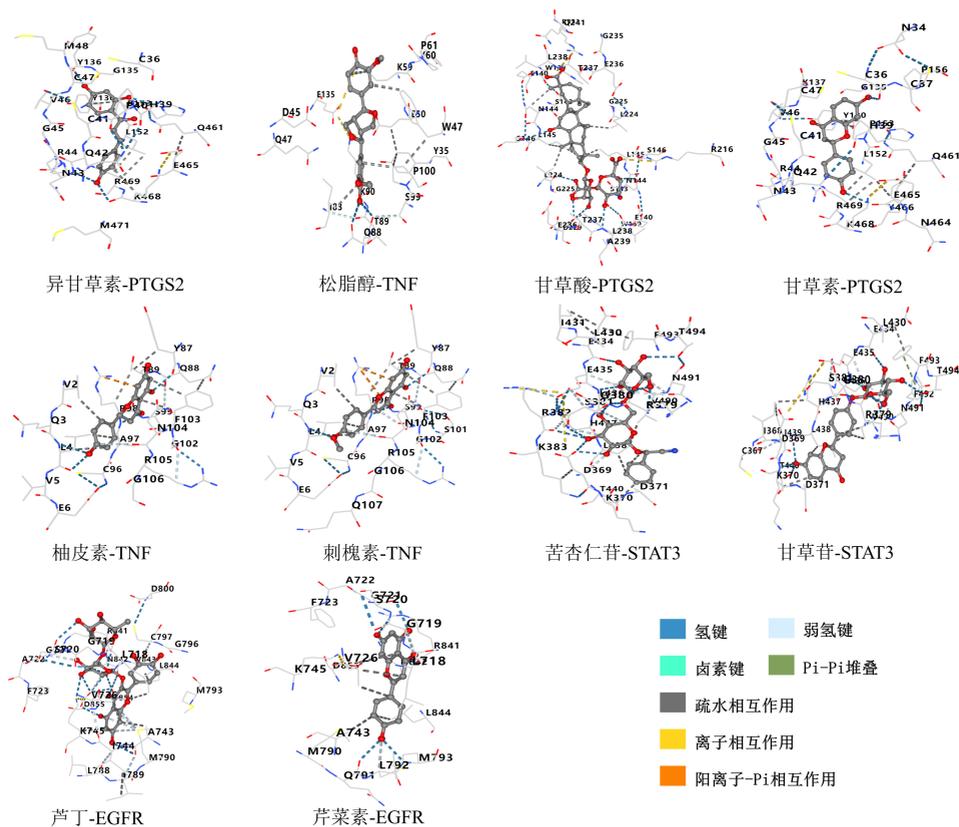


图 6 关键靶点-活性成分分子对接模式图

Fig. 6 Molecular docking pattern of target protein-active ingredient

分子对接和qRT-PCR技术深入阐明并验证其作用机制，为桑菊饮的药效物质基础与作用机制研究提供依据。

考虑到中药复方成分复杂，且药理活性的发挥依赖于成分吸收后随血液移行至病灶组织。因此，对桑菊饮的入血成分进行了深入研究，共检测出包含黄酮类、有机酸类、三萜皂苷类、苯丙素类等 38 个潜在活性成分。以芦丁、绿原酸和甘草苷为代表，对黄酮类、有机酸和二氢黄酮类等化合物的裂解规律进行解析。芦丁主要以 C 环上 3 位的糖苷键断裂为主要的裂解途径。在质谱负离子模式下进行检测，芦丁可由其一级质谱准分子离子峰([M-H]⁻)的 *m/z* 为 609.146 5 去除 C 环上 3 位羟基上的芸香糖分子(*m/z* 为 308.111 3)，进而生成 *m/z* 为 301.035 2 的碎片。而碎片离子 *m/z* 463.078 6 则由 *m/z* 609.146 5 去除鼠李糖所得，进一步 *m/z* 463.078 6 去除葡萄糖会得到苷元碎片 *m/z* 300.025 2 和 *m/z* 301.035 2。在负离子模式下，绿原酸的一级质谱准分子离子峰为 *m/z* 353.070 4。随着酰氧键断裂形成了 *m/z* 191.053 7 [M-caffeoyl-H]⁻ 与 *m/z* 179.031 9 的 [M-quinic-H]⁻ 的碎片离子。随后 *m/z* 191.053 7 碎片离子脱去一分子 H₂O，形成了 *m/z* 173.043 0 的碎片离子。在正离子条件下，甘草苷的准分子离子 [M+H]⁺ 为 *m/z*

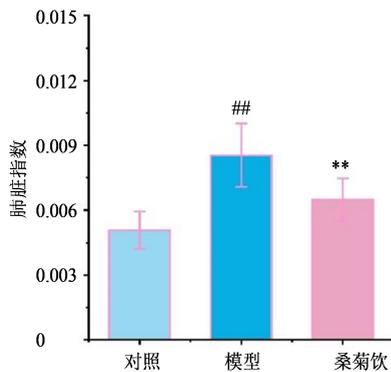
419.133 0。由于分子中失去了一个中性葡萄糖残基，产生了 *m/z* 257.080 7 的碎片离子。接着，此离子经历了 C-O 键的断裂，形成了 *m/z* 137.022 7 的碎片离子。

为了进一步探索桑菊饮中多种活性成分协同发挥治疗 ALI 作用的系统作用机制，基于 38 个桑菊饮入血成分，获得 220 个药物潜在靶点，进一步聚焦其抗 ALI 作用，将上述 220 个靶点继续与 3 758 个 ALI 潜在靶点取交集，构建“药物-成分-靶点”分析网络，依据 Mcc 算法筛选出排名前 10 的核心成分，包括 7 个黄酮类化合物(甘草苷、芦丁、刺槐素等)，1 个三萜皂苷类化合物(甘草酸)，1 个氰苷类化合物(苦杏仁苷)，以及松脂醇。另一方面，上述核心成分对 ALI 的治疗作用也得到了近年来研究的广泛证实。例如，黄酮类化合物广泛的存在于植物中，具有如抗氧化、抗炎、抗微生物等多种药用特性，黄酮类提取物可降低肿瘤坏死因子(TNF)-α、白细胞介素(IL)-6，同时提升干扰素(IFN)-γ 水平来调节炎症，对 ALI 的治疗贡献显著^[12-13]。甘草苷可以有效缓解 ALI 状态下的肺水肿症状，下调肺内 TNF-α 和 IL-6 水平，抑制 JNK/c-Jun 信号通路，从而抑制 LPS 诱导的 ALI 及其炎症反应^[14]。刺槐素可通过调节诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、环氧合酶 2(COX-2)、

表6 分子对接信息

Table 6 Information of molecular docking

活性成分	关键靶点	结合能/ (kJmol ⁻¹)	活性残基
苦杏仁苷	STAT3	-34.27	CYS367, ILE368, ASP369, LYS370, ASP371, ARG379, GLY380, SER381, ARG382, LYS383, PHE384, LEU430, ILE431, GLU434, GLU435, LEU436, HIS437, LEU438, ILE439, THR440, GLU455
甘草苷	STAT3	-32.60	CYS367, ILE368, ASP369, LYS370, ASP371, ARG379, GLY380, SER381, ARG382, LYS383, GLN416, CYS418, LEU430, GLU434, GLU435, LEU436, HIS437, LEU438, ILE439, THR440, GLU455, ASN818, LEU820, THR830, ASP831, LEU834
芦丁	EGFR	-51.83	LEU718, GLY719, SER720, GLY721, ALA722, PHE723, GLY724, VAL726, LYS728, ALA743, ILE744, LYS745, MET766, LEU788, ILE789, MET790, GLN791, LEU792, MET793, PRO794, PHE795, GLY796, CYS797, LEU799, ASP800, ARG803, ARG841, ASN842, VAL843, LEU844, THR854, ASP855
松脂醇	TNF	-28.84	GLY24, GLN25, LEU26, GLN27, TRP28, ASP45, ASN46, GLN47, TYR35, TRP47, GLU50, LYS59, TYR60, PRO61, SER99, PRO100
甘草酸	PTGS2	-44.30	TRP139, GLU140, SER143, ASN144, LEU145, SER146, ARG216, TRP139, GLU140, SER143, ASN144, LEU145, SER146, ARG216
异甘草素	PTGS2	-35.53	TRP323, GLN327, PRO542, ALA543, LYS546, ASN34, CYS36, CYS37, HIS39, PRO40, CYS41, GLN42, ASN43
甘草素	PTGS2	-37.62	GLU322, TRP323, GLY324, GLN327, PHE367, TYR373, PRO542, ASN34, PRO35, CYS36, CYS37, HIS39, PRO40, CYS41, GLN42
柚皮素	TNF	-33.02	TYR87, GLN88, THR89, GLN1, VAL2, GLN3, LEU4, VAL5, GLU6, TYR95, CYS96, ALA97, ARG98, SER99, SER101, GLY102, PHE103, ASN104, ARG105, GLY106, GLN107, GLY108, THR109
芹菜素	EGFR	-34.69	LEU718, GLY719, SER720, GLY721, ALA722, PHE723, GLY724, VAL726, ALA743, ILE744, LYS745, MET766, LEU777, LEU788, ILE789, MET790, GLN791, LEU792, MET793, PRO794, PHE795
刺槐素	TNF	-31.77	SER86, TYR87, GLN88, THR89, GLN1, VAL2, GLN3, LEU4, VAL5, GLU6, GLY26, PHE27, TYR32, CYS96, ALA97, ARG98, SER99, SER101, GLY102, PHE103, ASN104, ARG105, GLY106, GLN107



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.

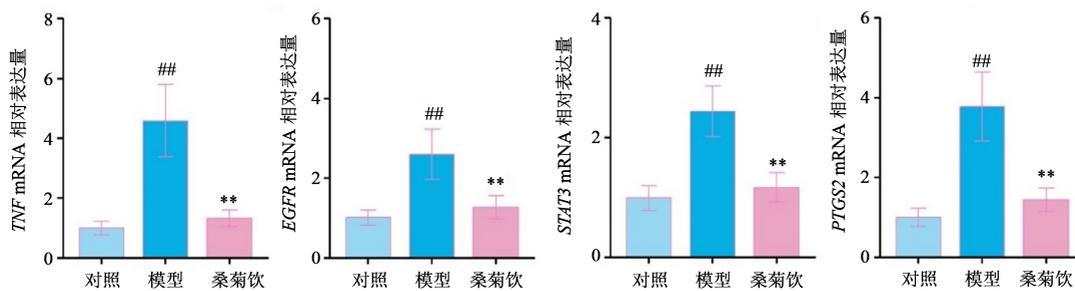
图7 各组大鼠肺脏指数($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 7 Lung index of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

SOD等抗氧化基因发挥其抗炎抗氧化活性并抑制ALI^[15]。研究表明,甘草酸有抗炎、抗氧化和免疫调节作用,能够触发IFN的产生并且通过阻断COX-2来阻断前列腺素-E₂(PG-E₂)的合成,并且可以通过调节PI3K/Akt/mTOR通路进而抑制LPS诱导的ALI^[16-17]。苦杏仁苷能够逆转ALI状态下的炎症因子水平改变(如TNF- α 、IL-1 β 和IL-6等),并且能显

著抑制LPS诱导的NF- κ B和NLRP3激活从而治疗ALI^[18]。松脂醇能够降低IL-2、IL-6、IL-8和IFN- γ 的水平并抑制蛋白激酶B(Akt)和c-Jun N末端激酶(JNK),具有显著的抗炎作用^[9]。综上,桑菊饮可能通过其中的多种化合物特别是核心成分的协同作用,通过调节氧化应激、炎症反应等机制,对ALI发挥治疗作用。

KEGG通路分析显示,桑菊饮可能通过干预花生四烯酸(ARA)代谢、类固醇激素的生物合成、化学致癌作用-活性氧、PI3K-Akt信号通路等信号通路,发挥治疗ALI作用。ARA代谢失调会导致ALI中炎症反应失控,COX是将ARA转换为PG的关键酶,COX-2的表达在ALI的发展过程中显著增加,抑制COX-2进而调控ARA代谢可减轻LPS诱导的ALI^[20]。类固醇通过抑制COX-2、iNOS和促炎细胞因子(包括TNF- α 和各种IL)的基因表达来发挥抗炎或免疫抑制作用^[21]。类固醇激素广泛用于临床各种疾病治疗中,在严重肺炎中使用类固醇治疗可以改善氧合、减少机械通气的需要并且提升患者生存率^[22]。采用抑制IL-6、IL-8和细胞黏附分子等方式,并诱导M2型巨噬细胞,可有效减轻ALI^[23]。



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 大鼠肺组织中 *TNF*、*EGFR*、*STAT3* 和 *PTGS2* mRNA 表达变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 8 Changes of *TNF*, *EGFR*, *STAT3*, and *PTGS2* mRNA expression in rat lung tissue ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

氧化应激是 ALI 的重要发病机制之一,氧化应激表现为活性氧(ROS)的异常和抗氧化防御受损,进而导致细胞损伤引发炎症细胞介导的促炎细胞因子的积累,抑制 ROS 通路有助于改善 ALI^[24]。PI3K-Akt 信号通路在多种肺损伤模型中均发挥重要作用,尤其是在 ALI 中参与了病理全过程,其中, Akt 的 Ser473 位点被磷酸化后通常介导炎症反应,当肺泡和上皮屏障功能出现缺陷时,高蛋白质和高炎症介质液体会进入肺泡腔,从而导致肺上皮细胞凋亡及炎症细胞浸润^[25]; AKT1 激酶是 PI3K/Akt 信号通路的中心蛋白, AKT1 的过度激活可诱导肺纤维化,针对导致 ALI 的关键调控基因进行的相关研究进一步表明,调节 PI3K-Akt 信号传导可降低肺上皮细胞中与促低氧血症相关的基因表达从而达到抗 ALI 的作用^[26-27]。综上, ALI 的发生发展及桑菊饮对 ALI 的治疗机制可能与上述多通路具有重要关联。

另一方面,在通路富集研究作用机制的基础上,进一步深入探讨桑菊饮治疗 ALI 涉及的关键靶点。根据 PPI 的度值排名及与 ALI 相关研究,筛选出 *TNF*、*EGFR*、*STAT3*、*PTGS2*、*ESR1*、*JUN*、*HIF1A* 为关键靶点。TNF 家族是一类能引起细胞凋亡和炎症反应的细胞因子, TNF 可以诱导上皮细胞凋亡,并显著增强肺部损伤^[28]。相关研究表明, ALI 大鼠的血浆、肺、支气管肺泡灌洗液中 *TNF- α* 水平显著增加,药物治疗能显著回调其含量^[29]。另有研究表明 *TNF- α* 可通过激活 JNK/FoxO3a 通路诱导 PMN 细胞凋亡延迟,从而促进急性肺损伤^[28]。抑制 *TNF- α* 可有效减少肺组织损伤,尤其是肺中多形核中性粒细胞(PMN)的破坏性浸润^[28]。此外, *TNF* 的过度表达可反式激活表皮生长因子受体(EGFR),而 EGFR 的激活在肺上皮修复中发挥重要作用,且 EGFR 反式激活的靶标是 PI3K/Akt,因此 PI3K/Akt 通路可能通过 *TNF* 反式激活 EGFR 促进细胞存活,

从而起到抗 ALI 的作用^[30]。TNF 诱导的 EGFR 磷酸化是调节 ALI 中的关键生理反应,也很可能是桑菊饮治疗 ALI 的关键机制^[30]。信号转导和转录激活因子 3(STAT3)通过调节促炎介质的表达在急性肺部炎症的发病机制中发挥重要作用。多项研究表明, ALI 病理状态下,常伴随 STAT3 高度表达,并且通过诱导促炎介质表达促进炎症的发生发展,采用抑制 STAT3 的方法,可有效保护肺损伤^[31-33]。STAT3 靶基因转录由 IL-6 与细胞膜受体结合而启动,该过程受 JAK-STAT 途径调控,进而激活 Janus 激酶并磷酸化其下游的 STAT3 而实现^[29]。环氧合酶 2(*PTGS2*/*COX-2*)是将 ARA 转化为促进炎症和引起疼痛的 PG 的关键酶,抑制 *PTGS2* 基因的表达可通过干预 ARA 代谢、减少 PG 的合成,从而抑制 ALI 的炎症反应^[20]。ARA 会通过各种酶促反应,例如环氧合酶途径、脂氧合酶途径,衍生出类二十烷酸等炎症相关介质,进而损伤肺泡上皮细胞和毛细血管内皮细胞,从而加剧 ALI 的发展,因此可通过抑制 ARA 代谢改善 ALI^[29,34]。缺氧诱导因子 1A(*HIF1A*)是炎症反应、缺氧应答中重要的转录因子,过表达的 *HIF1A* 可诱导细胞凋亡,并通过激活 EGFR/PI3K/Akt 通路从而上调炎症因子的表达,另一方面,肺部炎症诱导激活的 EGFR/PI3K/Akt 通路可进一步上调 *HIF1A* 的表达^[35]。多项研究进一步表明,在细胞因子风暴的早期阶段, *HIF1A* 可以激活 NF- κ B 通路并促进 *TNF- α* 和 IL-6 等细胞因子的分泌^[32]。

由此可见,桑菊饮治疗 ALI 作用可能与甘草苷、芦丁和苦杏仁苷等核心成分与 *TNF*、*EGFR* 和 *STAT3* 等关键靶点的协同作用密切相关。为进一步探究桑菊饮对 ALI 的治疗作用,本研究进一步采用分子对接与 qRT-PCR 技术对网络药理学结果进行验证。结果表明, ALI 状态下大鼠肺组织 *TNF*、*EGFR*、*STAT3*、*PTGS2* mRNA 的表达水平显著升高,

桑菊饮可能通过松脂醇、甘草酸、柚皮素等潜在活性成分作用于TNF、PTGS2等关键靶点,进而限制炎症反应、修复氧化应激与肺部损伤相关生命过程。相关研究进一步表明,甘草苷和苦杏仁苷可通过下调TNF、IL-6表达来抵抗LPS引起的炎症损伤^[14,18]。芦丁则可通过直接靶向EGFR抑制Akt通路,从而抑制炎症的发生发展^[36]。芹菜素可降低髓过氧化物酶(MPO)、炎症细胞因子和COX-2水平,下调NF- κ B和STAT3,并抑制Akt、ERK、MAPK、COX-2、IL-6、TNF- α 、IL-1和iNOS等活性,从而抑制炎症的发生和发展^[13]。本研究基于入血成分分析、网络药理学和实验验证探讨了桑菊饮对ALI的治疗作用及其机制。然而,仍需从关键分子靶点的表达调控及调控模式上,对作用机制进行进一步的探索和验证。同时,针对本研究筛选的核心成分,课题组将进一步进行指纹图谱、含量测定等研究,并进一步对核心成分-关键靶点间的互作关系及位点进行深入解析。

本研究结果表明,桑菊饮可能通过甘草苷、芦丁、苦杏仁苷等主要活性成分,相互作用于TNF、EGFR、STAT3等靶点,调控通路花生四烯酸代谢、PI3K-Akt信号通路、和类固醇激素的生物合成等信号通路,发挥治疗ALI的功效,体现了中药复方“多成分、多靶点、多途径”的治疗优势,为桑菊饮的临床合理应用提供了科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] He Y Q, Zhou C C, Yu L Y, et al. Natural product derived phytochemicals in managing acute lung injury by multiple mechanisms [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 163: 105224.
- [2] Meyer N J, Gattinoni L, Calfee C S. Acute respiratory distress syndrome [J]. *Lancet*, 2021, 398(10300): 622-637.
- [3] Wang Y Y, Wang X, Li Y X, et al. Xuanfei Baidu Decoction reduces acute lung injury by regulating infiltration of neutrophils and macrophages via PD-1/IL17A pathway [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 176: 106083.
- [4] 王玉, 于桂芳, 胡军华, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS及网络药理学探讨麻杏止咳颗粒治疗哮喘的有效成分和作用机制 [J]. *中草药*, 2023, 54(17): 5508-5521.
Wang Y, Yu G F, Hu J H, et al. Exploring effective components and mechanism of action of Maxing Zhixiao Granules in treatment of asthma based on UPLC-Q-TOF-MS/MS and network pharmacology [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(17): 5508-5521.
- [5] 徐杨, 何芷绮, 刘晓凤, 等. 代谢组学在中药复方制剂领域的研究进展及面临的挑战 [J]. *中草药*, 2024, 55(4): 1354-1364.
- [6] Xu Y, He Z Q, Liu X F, et al. Progress and challenges of metabolomics in field of traditional Chinese medicine compound preparations [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, 55(4): 1354-1364.
- [7] Ji S, He D D, Su Z Y, et al. P450 enzymes-based metabolic interactions between monarch drugs and the other constituent herbs: A strategy to explore compatibility mechanism of Sangju-Yin [J]. *Phytomedicine*, 2019, 58: 152866.
- [8] Lin S, Ren R N, Wang F, et al. Integrated network pharmacology, metabolomics, transcriptomics and microbiome strategies to reveal the mechanism of Sang Ju Yin on the treatment of acute lung injury on the gut-microbiota-lung axis [J]. *Arab J Chem*, 2024, 17(3): 105646.
- [9] 张天柱, 杨世海, 张景龙. 桑菊饮对内毒素诱导小鼠急性肺损伤的保护作用 [J]. *中药药理与临床*, 2014, 30(5): 12-14.
Zhang T Z, Yang S H, Zhang J L. Sangjuyin attenuates acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2014, 30(5): 12-14.
- [10] 祁钰涵, 马晓北. 桑菊饮治疗呼吸道病毒感染作用机制的生物信息学探讨与免疫分析 [J]. *云南民族大学学报(自然科学版)*, 2024, 33(3): 294-306.
Qi Y H, Ma X B. Bioinformatics study and immune analysis on the mechanism of Sangju decoction in the treatment of respiratory virus infection [J]. *J Yunnan Minzu University (Natural Sciences Edition)*, 2024, 33(3): 294-306.
- [11] Yang X M, Liu Z D, Liu X J, et al. Efficacy and influencing factors of Sangju cough mixture in the adjuvant treatment of adult patients with *Mycoplasma pneumoniae* infection: A retrospective study [J]. *Infect Drug Resist*, 2024, 17: 275-282.
- [12] 朱珍珍, 何梓龙, 任睿楠, 等. 基于网络药理学与动物实验探讨桑菊饮治疗急性肺损伤的作用机制 [J]. *河南中医*, 2024, 44(07): 1079-1087.
Zhu Z Z, He Z L, Ren R N, et al. Study on the mechanism of mulberry leaf and *Chrysanthemum* beverage in treating acute lung injury based on network pharmacology and animal experiments [J]. *Henan Tradit Chin Med*, 2024, 44(7): 1079-1087.
- [13] Zhi H J, Zhu H Y, Zhang Y Y, et al. *In vivo* effect of quantified flavonoids-enriched extract of *Scutellaria baicalensis* root on acute lung injury induced by influenza A virus [J]. *Phytomedicine*, 2019, 57: 105-116.
- [14] Kopustinskiene D M, Jakstas V, Savickas A, et al. Flavonoids as anticancer agents [J]. *Nutrients*, 2020, 12(2): 457.

- [14] Zhou H L, Yang T J, Lu Z B, et al. Liquiritin exhibits anti-acute lung injury activities through suppressing the JNK/Nur77/c-Jun pathway [J]. *Chin Med*, 2023, 18(1): 35.
- [15] Sun L C, Zhang H B, Gu C D, et al. Protective effect of acacetin on sepsis-induced acute lung injury via its anti-inflammatory and antioxidative activity [J]. *Arch Pharm Res*, 2018, 41(12): 1199-1210.
- [16] Richard S A. Exploring the pivotal immunomodulatory and anti-inflammatory potentials of glycyrrhizic and glycyrrhetic acids [J]. *Mediators Inflamm*, 2021, 2021: 6699560.
- [17] Qu L H, Chen C, He W, et al. Glycyrrhizic acid ameliorates LPS-induced acute lung injury by regulating autophagy through the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(4): 2042-2055.
- [18] Zhang A, Pan W Y, Lv J, et al. Protective effect of amygdalin on LPS-induced acute lung injury by inhibiting NF- κ B and NLRP3 signaling pathways [J]. *Inflammation*, 2017, 40(3): 745-751.
- [19] Yang L, Liu R H, Fang Y W, et al. Anti-inflammatory effect of phenylpropanoids from *Dendropanax dentiger* in TNF- α -induced MH7A cells via inhibition of NF- κ B, Akt and JNK signaling pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 94: 107463.
- [20] Yang H H, Duan J X, Liu S K, et al. A COX-2/sEH dual inhibitor PTUPB alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by inhibiting NLRP3 inflammasome activation [J]. *Theranostics*, 2020, 10(11): 4749-4761.
- [21] Williams D M. Clinical pharmacology of corticosteroids [J]. *Respir Care*, 2018, 63(6): 655-670.
- [22] Tomazini B M, Maia I S, Cavalcanti A B, et al. Effect of dexamethasone on days alive and ventilator-free in patients with moderate or severe acute respiratory distress syndrome and COVID-19: The CoDEX randomized clinical trial [J]. *JAMA*, 2020, 324(13): 1307-1316.
- [23] Tu G W, Shi Y, Zheng Y J, et al. Glucocorticoid attenuates acute lung injury through induction of type 2 macrophage [J]. *J Transl Med*, 2017, 15(1): 181.
- [24] Dhlamini Q, Wang W, Feng G F, et al. FGF1 alleviates LPS-induced acute lung injury via suppression of inflammation and oxidative stress [J]. *Mol Med*, 2022, 28(1): 73.
- [25] Sokolowska M, Quesniaux V F J, Akdis C A, et al. Acute respiratory barrier disruption by ozone exposure in mice [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2169.
- [26] Callahan V, Hawks S, Crawford M A, et al. The pro-inflammatory chemokines CXCL9, CXCL10 and CXCL11 are upregulated following SARS-CoV-2 infection in an AKT-dependent manner [J]. *Viruses*, 2021, 13(6): 1062.
- [27] Xia Q D, Xun Y, Lu J L, et al. Network pharmacology and molecular docking analyses on Lianhua Qingwen capsule indicate Akt1 is a potential target to treat and prevent COVID-19 [J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(12): e12949.
- [28] Chen D L, Chen C J, Xiao X, et al. TNF- α induces neutrophil apoptosis delay and promotes intestinal ischemia-reperfusion-induced lung injury through activating JNK/FoxO3a pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 8302831.
- [29] Wang T Y, Lin S, Liu R, et al. Acute lung injury therapeutic mechanism exploration for Chinese classic prescription Qingzao Jiufei Decoction by UFLC-MS/MS quantification of bile acids, fatty acids and eicosanoids in rats [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 189: 113463.
- [30] Yamaoka T, Arata S, Homma M, et al. Blockade of EGFR activation promotes TNF-induced lung epithelial cell apoptosis and pulmonary injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(16): 4021.
- [31] Zhao J P, Yu H, Liu Y D, et al. Protective effect of suppressing STAT3 activity in LPS-induced acute lung injury [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 311(5): L868-L880.
- [32] Li W L, Li D, Chen Y S, et al. Classic signaling pathways in alveolar injury and repair involved in sepsis-induced ALI/ARDS: New research progress and prospect [J]. *Dis Markers*, 2022, 2022: 6362344.
- [33] Qiang Z Z, Dong H, Xia Y Y, et al. Nrf2 and STAT3 alleviates ferroptosis-mediated IIR-ALI by regulating SLC7A11 [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 5146982.
- [34] Wang T Y, Lin S, Li H, et al. A stepwise integrated multi-system to screen quality markers of Chinese classic prescription Qingzao Jiufei Decoction on the treatment of acute lung injury by combining 'network pharmacology-metabolomics-PK/PD modeling' [J]. *Phytomedicine*, 2020, 78: 153313.
- [35] Zhang H X, Yang J J, Zhang S A, et al. HIF-1 α promotes inflammatory response of chronic obstructive pulmonary disease by activating EGFR/PI3K/AKT pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(18): 6077-6084.
- [36] Choi S, Lim T G, Hwang M K, et al. Rutin inhibits B[a]PDE-induced cyclooxygenase-2 expression by targeting EGFR kinase activity [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 86(10): 1468-1475.