

• 药理与临床 •

基于网络药理学及斑马鱼模型的瓜蒌薤白半夏汤干预慢性阻塞性肺疾病的作用机制研究

谈晓莹, 李 丹, 刘 培*, 冯伟萌, 武文星, 刘嘉庆, 宿树兰, 郭 盛, 尚尔鑫, 张黄琴, 段金廛*

南京中医药大学 江苏省方剂高新技术研究重点实验室, 江苏省方剂研究重点实验室, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 江苏 南京 210023

摘要:目的 基于网络药理学方法和斑马鱼模型探讨瓜蒌薤白半夏汤干预慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)的潜在作用机制。方法 运用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)、中医药百科全书数据库(ETCM)、中医药综合数据库(TCMID)以及国内外相关文献检索瓜蒌薤白半夏汤的主要活性成分,通过 TCMSP 和 SwissTargetPrediction 数据库预测靶点;通过 GeneCards 数据库、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)和 TCMSP 数据库获取 COPD 相关靶点,并采用交集法筛选出与瓜蒌薤白半夏汤活性成分作用共同靶点。运用 Cytoscape 3.7.1 软件构建“中药-活性成分-靶点”网络,通过 String 数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络;通过 DAVID 数据库对共有基因进行基因本体(gene ontology, GO)功能富集分析及京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析;借助斑马鱼炎症模型对筛选的靶点进行实验验证。结果 瓜蒌薤白半夏汤共筛选出成分 955 个,潜在活性成分 106 个,核心活性成分如芹菜素、茴香酸、美迪紫檀素、金圣草黄素、香叶木素等 74 个,对应靶点 1134 个;PPI 网络分析获得瓜蒌薤白半夏汤干预 COPD 的关键作用靶点 408 个,包括碳酸酐酶 9(carbonic anhydrase 9, CA9)、前列腺素内过氧化物合酶 1(prostaglandin-endoperoxide synthase 1, PTGS1)、胰岛素(insulin, INS)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1(serine/threonine protein kinase 1, AKT1)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、丝裂原活化蛋白激酶 1(mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)、MAPK3、血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)等;GO 功能及 KEGG 通路富集分析得出与瓜蒌薤白半夏汤干预 COPD 作用相关的生物过程 1096 个,如炎症反应、细胞溶质、酶结合等;相关信号通路 125 条,如癌症通路、TNF 信号通路、前列腺癌、缺氧诱导因子 1 信号通路、神经活性配体-受体相互作用等。斑马鱼炎症模型实验结果显示,瓜蒌薤白半夏汤显著降低 IL-6、B 淋巴细胞 2(B-cell lymphoma 2, BCL2)和 EGFR mRNA 表达水平($P < 0.05$),降低半胱氨酸蛋白酶 8(Caspases 8, CASP8) mRNA 表达水平。结论 瓜蒌薤白半夏汤可能通过作用于 EGFR、IL-6、BCL2、CASP8 等靶点,调节多条信号通路,从而发挥对 COPD 的治疗作用。

关键词: 瓜蒌薤白半夏汤;慢性阻塞性肺疾病;网络药理学;斑马鱼模型;EGFR;IL-6;BCL2;CASP8

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)17-5233-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.17.015

Mechanism of Gualou Xiebai Banxia Decoction on chronic obstructive pulmonary disease based on network pharmacology and zebrafish model

TAN Xiao-ying, LI Dan, LIU Pei, FENG Wei-meng, WU Wen-xing, LIU Jia-qing, SU Shu-lan, GUO Sheng, SHANG Er-xin, ZHANG Huang-qin, DUAN Jin-ao

Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of TCM Formulae, Jiangsu Key Laboratory of TCM Formulae, Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, National and Local Collaborative Engineering

收稿日期: 2021-05-12

基金项目: 江苏省自然科学基金面上项目(BK20201403);江苏省高校自然科学基金重大项目(19KJA320002);江苏省第十六批“六大人才高峰”计划(JNHB-066);江苏省青蓝工程项目;江苏省高等学校大学生创新创业训练计划项目(202010315047Y)

作者简介: 谈晓莹(1997—),女,硕士研究生,主要从事中药功效物质基础研究。E-mail: tantanjy@163.com

*通信作者: 刘 培,女,副教授,研究方向为中药资源综合利用研究。Tel: (025)85811917 E-mail: liupeij@njucm.edu.cn

段金廛,男,沈阳药科大学 43 期药理学系校友,现任南京中医药大学教授。代表性经典方剂类方衍化关系与功效物质研究成果获国家教育部自然科学一等奖和中华中医药学会科学技术进步一等奖。Tel: (025)85811917 E-mail: dja@njucm.edu.cn

Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To explore the potential mechanism of Gualou Xiebai Banxia Decoction (瓜蒌薤白半夏汤) on intervention of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) based on network pharmacology method and zebrafish model. **Methods** The main active ingredients of Gualou Xiebai Banxia Decoction were searched using TCM System Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), TCM Encyclopedia (ETCM), TCM Comprehensive Database (TCMID), and related literature at home and abroad, targets were predicted through TCMSP and SwissTargetPrediction database; COPD-related targets were obtained through GeneCards database, online human Mendelian Inheritance Database (OMIM) and TCMSP database, the common target interacts with active ingredients of Gualou Xiebai Banxia Decoction were screened out by intersection method. “Traditional Chinese medicine-active ingredients-targets” network was constructed by Cytoscape 3.7.1 software, protein-protein interaction (PPI) network was constructed by String database, shared genes were performed gene ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis by DAVID database; The screened targets were verified by zebrafish inflammation model. **Results** A total of 955 ingredients were screened for Gualou Xiebai Banxia Decoction, 106 potential active ingredients, and 74 core active ingredients such as apigenin, anisic acid, methyl pterostil, chrysophyllin, geraniol, etc., corresponding to 1134 targets; PPI network analysis obtained 408 key targets for Gualou Xiebai Banxia Decoction to interfere with COPD, including carbonic anhydrase 9 (CA9), prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (PTGS1), insulin (INS), interleukin-6 (IL-6), serine/threonine protein kinase 1 (AKT1), tumor necrosis factor (TNF), mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), MAPK3, vascular endothelial growth factor A (VEGFA), epidermal growth factor receptor (EGFR), etc.; GO function and KEGG pathway enrichment analysis showed that there were 1096 biological processes related to the intervention of Gualou Banxia Xiebai Decoction on COPD, such as inflammation, cytosol, enzyme binding, etc., and 125 related signal pathways such as cancer pathways, TNF signaling pathway, prostate cancer, hypoxia-inducible factor 1 signaling pathway, neuroactive ligand-receptor interaction, etc. The experimental results of zebrafish inflammation model showed that Gualou Xiebai Banxia Decoction significantly reduced *IL-6*, *B-cell lymphoma-2 (BCL2)* and *EGFR* mRNA expressions ($P < 0.05$), reduced *Caspases 8 (CASP8)* mRNA expression. **Conclusion** Gualou Xiebai Banxia Decoction may regulate multiple signal pathways by acting on targets such as EGFR, IL-6, BCL2, and CASP8, thereby exerting a therapeutic effect on COPD.

Key words: Gualou Xiebai Banxia Decoction; chronic obstructive pulmonary disease; network pharmacology; zebrafish model; EGFR; IL-6; BCL2; CASP8

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种以持续呼吸道症状和持续气流受限为主要特征的临床常见病, 通常由香烟烟雾等有害颗粒和气体暴露引起的气道和 (或) 肺泡异常导致^[1]。慢阻肺发病机制复杂, 主要与气道和肺慢性炎症、氧化应激、蛋白酶/抗蛋白酶失衡以及细胞凋亡等有关^[2]。中医理论中尚无对 COPD 的明确记载, 将其纳入“咳”“喘”“肺胀”等范畴^[3], 久病体虚, 复感外邪时导致病情不断反复发作或加重进而导致肺胀发生。诸多中医研究者认为肺脾兼虚为导致 COPD 长期反复发作、病程延长的主要原因。COPD 急性发作发生时, 如患者未能及时接受有效治疗, 可引发心力衰竭、呼吸衰竭等, 严重威胁患者生命安全。现有研究表明, COPD 的发生发展可激活核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、Notch、Janus 激酶/信号转导与转录激活因子 (Janus kinase/signal transducer and activator of

transcription, JAK/STAT)、转化生长因子 (transforming growth factor, TGF)-Smad 蛋白、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen activated protein kinases, p38 MAPK)、Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 等多条炎症相关信号通路。在 COPD 的发病机制中, 多种促炎和抗炎细胞因子间相互作用, 产生了系统性炎症反应, 加速 COPD 的发生与发展^[4]。瓜蒌薤白半夏汤出自东汉张仲景的《金匮要略·胸痹心痛短气病脉证并治第九》: “胸痹不得卧, 心痛彻背者, 栝蒌薤白半夏汤主之”, 全方由瓜蒌、薤白、半夏、白酒 (非现代白酒) 等药味组成, 功擅行气解郁、通阳散结、祛痰宽胸, 原方用于治疗胸痹、心痛病属痰瘀痹阻者。然心肺同居于上焦, 本方现代亦可用于治疗 COPD、创伤性气胸、老年咳喘、慢性支气管炎、肺间质纤维化等肺疾病属上述病机者^[5]。临床研究表明^[6-8], 瓜蒌薤白半夏汤可用于治疗 COPD 急性发作期患者, 能够有效提高临床疗

效,改善患者通气状态,从而更好地提高患者的生活质量,但其作用机制尚未阐明。

本研究基于网络药理学方法,系统分析瓜蒌薤白半夏汤干预 COPD 的有效成分、潜在靶点、作用通路及生物过程等信息,探讨瓜蒌薤白半夏汤干预 COPD 的潜在作用机制,同时根据网络药理学研究结果对其核心靶点采用斑马鱼模型进行实验验证,为瓜蒌薤白半夏汤治疗 COPD 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 瓜蒌薤白半夏汤中活性成分的收集

通过检索国内外文献关于“瓜蒌”“薤白”“半夏”等活性成分的报道,并利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://tcmspw.com/>)^[9]、中医药百科全书数据库(ETCM, <http://www.tcmip.cn/ETCM/>)、中医药综合数据库(TCMID, <http://www.megabionet.org/tcmid/>)^[10]等以“瓜蒌”“薤白”“半夏”等关键词搜索,经 PubChem 数据库(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)^[11]验证和整理分类,收集瓜蒌薤白半夏汤中的活性成分。

1.2 潜在活性成分作用靶点的筛选

借助 TCMSP 和 SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)^[12]数据库查询潜在活性成分的靶点,并借助 UniProt 数据库(<http://www.uniprot.org/>)^[13]等对靶点蛋白名称进行规范化和校正,得到标准化基因靶点信息。

1.3 “中药-活性成分-靶点”网络的构建

将筛选出的靶点、活性成分、药物等信息输入 Cytoscape 3.7.1 软件(<http://www.cytoscape.org/>),构建“中药-活性成分-靶点”网络,导出其相关的度值、中心度值等拓扑数据,并运用“Network Analyzer”功能分析其拓扑学属性。

1.4 COPD 相关靶点的获取

以“chronic obstructive pulmonary disease”为关键词,通过 GeneCards 数据库(<http://www.genecards.org/>)^[14]、OMIM (<https://www.omim.org/>)^[15]和 TCMSP 数据库,获得与 COPD 相关的作用靶点。

1.5 蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络的构建与分析

利用 BioVenn 分析工具,将活性成分对应的靶点与 COPD 相关的靶点进行叠加,取交集,作为瓜蒌薤白半夏汤与 COPD 关系密切的靶点,导入 String 数据库(<http://string-db.org/>)^[16],限定物种为“Homo Sapiens”,去除孤立靶点,以“置信度=0.4”为条

件筛选,获取蛋白相互作用关系。分析结果保存为 TSV 格式文件,导入 Cytoscape 3.7.1 软件,结合节点度值大小,构建 PPI 网络。

1.6 靶点通路分析

将筛选得到的瓜蒌薤白半夏汤作用的靶点导入 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>)^[17],通过输入靶点并限定物种为人,将所有靶基因名称校正为其官方名称,经上述数据库检索和转化操作,设定阈值 $P < 0.05$,将瓜蒌薤白半夏汤的 PPI 核心基因进行基因本体(gene ontology, GO)生物学过程富集分析及京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析,运用 R version 3.6.3 软件将其结果进行可视化。

1.7 实验验证

1.7.1 动物 AB 系野生型健康斑马鱼,购自南京一树梨花斑马鱼养殖中心。斑马鱼饲养于斑马鱼专用的养殖系统,在照明 14 h、黑暗 10 h、28 °C 的标准条件下进行饲养。实验经南京中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号 202105A016)。

1.7.2 药材 瓜蒌购自河北安国药材市场,经安徽省农业科学院园艺研究所董玲研究员鉴定为葫芦科植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 的干燥成熟果实;薤白(批号 180726)购自安徽广和中药股份有限公司,半夏(批号 181107)购自安徽六安众信商贸有限公司,经南京中医药大学严辉博士鉴定分别为百合科植物小根蒜 *Allium macrostemon* Bge. 的干燥鳞茎、天南星科植物半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎。

1.7.3 药品与试剂 氢化可的松购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;氯仿(批号 20171214)购自上海凌峰化学试剂有限公司;乙醇(批号 20170327)购自国药集团化学试剂有限公司;异丙醇(批号 32064)购自南京化学试剂有限公司;TRIZOL(批号 MKCD9593)购自美国 Sigma 公司;逆转录试剂盒(批号 P20329)购自北京全式金生物技术有限公司。

1.7.4 仪器 BSG-300 型程控光照培养箱(上海博迅实业有限公司);Axio Vert A1 型荧光倒置显微镜(卡尔蔡司光学中国有限公司);移液器(德国 Eppendorf 公司);EPED-E2-30TF 型实验室级超纯水器(南京易普易达科技发展有限公司);ML 204 型分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.7.5 瓜蒌薤白半夏汤的制备 据《金匱要略》原文记载,瓜蒌薤白半夏汤中栝楼实 1 枚、薤白 3 两、

半夏半斤、白酒 1 L; 根据《中国药典》及文献研究^[18-19]确定其现代剂量为瓜蒌 12 g、薤白 9 g、清半夏 9 g, 适量水煎。称取以上药物, 加适量水浸泡 30 min 后大火煮沸, 转小火煎煮 30~40 min。将药液滤过倒出, 将剩下的药渣加适量温水, 再煎煮 20 min, 滤出药液, 将 2 次煎煮药液混合。经超高效液相色谱-质谱联用 (UPLC-MS/MS) 分析, 瓜蒌薤白半夏汤含胞苷 2.98 mg/g、尿苷 2.52 mg/g、腺苷 0.02 mg/g、木犀草素 0.17 mg/g 和葫芦素 B 0.03 mg/g。

1.7.6 分组、造模与给药 将受精后 3 d (days post fertilization, dpf) 斑马鱼幼鱼置于 24 孔微量培养板, 20 只/孔, 于 28 °C 恒温培养箱培养。设置对照组、模型组和瓜蒌薤白半夏汤 (12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 μg/mL) 组, 每组设 3 个复孔。除对照组外, 其余各组加入氢化可的松浸泡 6 h 后进行切尾; 各给药组加入相应药物浸泡 4 h 后, 每组取 20 个幼鱼收集于 1.5 mL 离心管, 3000 r/min 离心 10 min, 将幼鱼沉于管底, 小心吸弃培养液, 迅速转移至 -20 °C 冰箱冻存。

1.7.7 qRT-PCR 法检测白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、半胱氨酸蛋白酶 8 (Caspase 8, CASP8)、B 淋巴细胞瘤 2 (B-cell lymphoma 2, BCL2) 和表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) mRNA 表达情况 按照试剂盒说明书提取斑马鱼中总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

1.7.8 数据处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 26 软件进行统计学分析, 运用成对样本 *t* 检验分析组间差异, 并用 GraphPad Prism 软件作图。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称	引物序列 (5'-3')
IL-6	F: GTCTGCTACACTGGCTACACTCTTC R: CGTCCACATCCTGAACCTTCGTCTC
CASP8	F: TCACAGAGACCAGGAACAAGTAGGAG R: TGTAAGTAATTGTGCCAGCCGAAGAG
BCL2	F: AGCGAGGATATGTGTGGAAATGTCAG R: CGGGCTATCAGGCATTGAGAGTTG
EGFR	F: CTGGACGAGACGGAAGAGGAGTATC R: GCTGAAGAAGGGCTTTGTGGAGAG
GAPDH	F: CGCTGGTGTCTGGTATTGCTCTC R: GCCATCAGGTCACATACACGGTTG

2 结果

2.1 瓜蒌薤白半夏汤潜在活性成分的筛选与对应靶点的收集

通过 TCMSP、ETCM、TCMID 等数据库和文献检索到瓜蒌、薤白及半夏的成分共 955 个, 其中 442 个来自于瓜蒌、236 个来自于薤白、277 个来自于半夏。瓜蒌薤白半夏汤主要活性成分有 28 种, 包括次黄嘌呤、鸟嘌呤、鸟苷、腺苷、腺嘌呤 5 种核苷类成分, 掌叶半夏戊、掌叶半夏丁、葫芦巴碱、麻黄碱、去甲哈尔满碱、哈尔满碱、肉叶芸香碱、巴豆碱 A、烟酰胺、3-羟基-2-甲基吡啶 10 种生物碱成分, 美迪紫檀素、香叶木素和水黄皮素 3 种黄酮类成分, 类缬氨酸、蒜氨酸、苯丙氨酸 3 种氨基酸及 7 种其他类化合物^[20], 暂未见有对其进行定量分析的报道。由于多药材共同煎煮溶出成分并非单独药材的简单加合, 参考关于对瓜蒌薤白半夏汤成分研究的相关文献, 筛选获得 106 个潜在活性成分^[20-21]。利用 TCMSP 平台和 SwissTargetPrediction 数据库, 对活性成分靶点进行预测, 74 个核心活性成分 (表 2) 共收集到 1134 个靶点。

表 2 瓜蒌薤白半夏汤中的核心活性成分

Table 2 Core active ingredients of Gualou Xiebai Banxia Decoction

编号	活性成分	来源	编号	活性成分	来源
1	3,4,5-trimethoxytoluene	半夏	17	2,5-furandimethanol	瓜蒌
2	3,4-dihydro-2-methoxy-2H-pyran	半夏	18	2-acetylfuran	瓜蒌
3	5'-S-methyl-5'-thioadenosine	半夏	19	3-hydroxybenzoic acid	瓜蒌
4	9-oxononanoic acid	半夏	20	4-hydroxybenzoic acid	瓜蒌
5	aminobutyric acid	半夏	21	4-hydroxynicotinic acid	瓜蒌
6	anisic acid	半夏	22	5-hydroxymethylfurfural	瓜蒌
7	antilirium	半夏	23	7-hydroxychromone	瓜蒌
8	banisterine monohydrate	半夏	24	apigenin	瓜蒌
9	carboline	半夏	25	apigenin-7-O-β-D-glucoside	瓜蒌
10	cytosine	半夏	26	chrysoeriol	瓜蒌
11	ephedrine	半夏	27	dehydrolololide	瓜蒌
12	gallic acid	半夏	28	di-n-octyl phthalate	瓜蒌
13	harmane	半夏	29	diosmetin	瓜蒌
14	hexadecanamide	半夏	30	flazin	瓜蒌
15	trans-4-hydroxycinnamic acid	半夏	31	fumaric acid	瓜蒌
16	trigonelline	半夏	32	glucose	瓜蒌

编号	活性成分	来源	编号	活性成分	来源
33	kranjin	瓜蒌	54	prostaglandin B ₁	薤白
34	luteolin	瓜蒌	55	arginine	瓜蒌、半夏
35	luteolin-7-O-β-D-glucoside	瓜蒌	56	furfural	瓜蒌、半夏
36	medicarpin	瓜蒌	57	aspartic acid	瓜蒌、半夏
37	nicotinic acid	瓜蒌	58	leucine	瓜蒌、半夏
38	pentadecanoic acid	瓜蒌	59	L-glutamic acid	瓜蒌、半夏
39	p-hydroxybenzaldehyde	瓜蒌	60	nicotinamide	瓜蒌、半夏
40	pyroglutamic acid	瓜蒌	61	proline	瓜蒌、半夏
41	salicylic acid	瓜蒌	62	succinic acid	瓜蒌、半夏
42	tianshic acid	瓜蒌	63	threonine	瓜蒌、半夏
43	trichosanic acid	瓜蒌	64	tyrosine	瓜蒌、半夏
44	3-hydroxy-2-methylpyridine	薤白	65	uracil	瓜蒌、半夏
45	alliin	薤白	66	uridine	瓜蒌、半夏
46	dulcitol	薤白	67	dibutyl phthalate	瓜蒌、薤白
47	lunularic acid	薤白	68	adenine	瓜蒌、薤白、半夏
48	macrostemonoside f	薤白	69	adenosine	瓜蒌、薤白、半夏
49	mannitol	薤白	70	guanine	瓜蒌、薤白、半夏
50	N-(p-cis-coumaroyl) tyramine	薤白	71	guanosine	瓜蒌、薤白、半夏
51	N-(p-trans-coumaroyl) tyramine	薤白	72	hypoxanthine	瓜蒌、薤白、半夏
52	paeonol	薤白	73	phenprobamate	瓜蒌、薤白、半夏
53	prostaglandin A ₁	薤白	74	valine	瓜蒌、薤白、半夏

种活性成分节点、408 种靶点节点)和 235 710 条边。

并借助 Cytoscape 3.7.1 软件中的“Network analyze”功能对网络进行拓扑属性分析，其中度值与中心度

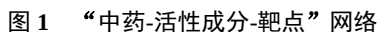


Fig. 1 “Traditional Chinese medicine-active ingredients-target” network

值是衡量 1 个节点在网络中关键性的 2 个重要参数。选取度值与中心度值较大的节点, 这些节点在网络中起到了枢纽作用, 可能是关键成分或靶点。以节点度值的平均数作为筛选标准, 同时参考其中心度值, 筛选出大于平均度值的化合物和靶点作为核心活性成分和核心靶点, 共得到 44 个核心活性成分和 143 个核心靶点, 其中排名前 5 位的活性成分为芹菜素 (apigenin)、茴香酸 (anisic acid)、美迪紫檀素 (medicarpin)、金圣草黄素 (chrysoeriol)、香叶木素 (diosmetin), 分别能与 77、76、70、64、61

个靶点发生作用; 排名前 5 的靶点为碳酸酐酶 9 (carbonic anhydrase 9, CA9)、前列腺素内过氧化物合酶 1 (prostaglandin-endoperoxide synthase 1, PTGS1)、二肽激肽酶 4 (dipeptidyl peptidase 4, DPP4)、EGFR、乙酰胆碱酯酶 (acetyl cholinesterase, ACHE), 分别能与 44、36、31、30、30 个活性成分相互作用 (表 3)。

2.3 COPD 靶点的收集与 PPI 网络的构建

通过 GeneCards、OMIM 和 TCMSP 数据库共收集到与 COPD 相关的靶点 2071 个, 与瓜蒌薤白

表 3 “中药-活性成分-靶点”网络关键节点及其拓扑学特征

Table 3 Key nodes and topological characteristics of “Traditional Chinese medicine-active ingredients-target” network

节点名称	归属	平均最短路径	介数中心性	中心接近度	度值
apigenin	活性成分 (瓜蒌)	2.529 9	0.012 1	0.395 3	77
anisic acid	活性成分 (半夏)	2.534 0	0.012 4	0.394 6	76
medicarpin	活性成分 (瓜蒌)	2.562 9	0.010 7	0.390 2	70
chrysoeriol	活性成分 (瓜蒌)	2.583 5	0.006 0	0.387 1	64
diosmetin	活性成分 (瓜蒌)	2.595 9	0.005 4	0.385 2	61
salicylic acid	活性成分 (瓜蒌)	2.608 2	0.005 8	0.383 4	58
prostaglandin B ₁	活性成分 (薤白)	2.628 9	0.006 7	0.380 4	57
dehydrolololide	活性成分 (瓜蒌)	2.628 9	0.006 9	0.380 4	54
lunularic acid	活性成分 (薤白)	2.633 0	0.007 2	0.379 8	54
gallic acid	活性成分 (半夏)	2.628 9	0.005 1	0.380 4	53
CA9	靶点	1.973 2	0.010 8	0.506 8	44
PTGS1	靶点	2.014 4	0.008 9	0.496 4	36
DPP4	靶点	2.026 8	0.005 4	0.493 4	31
EGFR	靶点	2.030 9	0.005 4	0.492 4	30
ACHE	靶点	2.030 9	0.004 8	0.492 4	30
PARP1	靶点	2.035 1	0.004 1	0.491 4	29
ADORA2A	靶点	2.035 1	0.004 5	0.491 4	29
PTGS2	靶点	2.043 3	0.003 1	0.489 4	27
ESR2	靶点	2.043 3	0.003 2	0.489 4	27
PTPN1	靶点	2.043 3	0.003 6	0.489 4	27
CYP19A1	靶点	2.047 4	0.003 0	0.488 4	26
GSK3B	靶点	2.051 5	0.002 8	0.487 4	25
PIM1	靶点	2.055 7	0.003 4	0.486 5	24
HSP90AA1	靶点	2.055 7	0.005 0	0.486 5	24
ESR1	靶点	2.059 8	0.002 2	0.485 5	23
FOLH1	靶点	2.063 9	0.002 4	0.484 5	22
MAOB	靶点	2.063 9	0.002 4	0.484 5	22
CASP3	靶点	2.068 0	0.002 2	0.483 5	21
MMP9	靶点	2.072 2	0.001 8	0.482 6	20
ALOX5	靶点	2.072 2	0.002 1	0.482 6	20
MMP1	靶点	2.076 3	0.001 7	0.481 6	19
ACE	靶点	2.076 3	0.002 0	0.481 6	19
MMP8	靶点	2.076 3	0.001 7	0.481 6	19
SRC	靶点	2.076 3	0.001 5	0.481 6	19
MMP2	靶点	2.076 3	0.001 8	0.481 6	19
PPARA	靶点	2.076 3	0.002 0	0.481 6	19
F2	靶点	2.076 3	0.002 2	0.481 6	19
KDR	靶点	2.076 3	0.001 6	0.481 6	19
TYR	靶点	2.076 3	0.001 5	0.481 6	19
AKR1C3	靶点	2.076 3	0.001 5	0.481 6	19

半夏汤相关的 1134 个靶点进行交集分析后得到 408 个共有靶点, 见图 2。将共有靶点信息输入 String 数据库, 将输出结果 tsv 文件导入 Cytoscape 3.7.1 软件, 构建 PPI 网络, 去除 2 个独立靶点 (ABCC9、MAN1B), 网络中共包含 406 个节点。如图 3 所示, 靶点的平均节点度值为 41.38, 其中度值大于平均值的靶点有胰岛素 (insulin, INS)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (serine/threonine protein kinase 1, AKT1)、

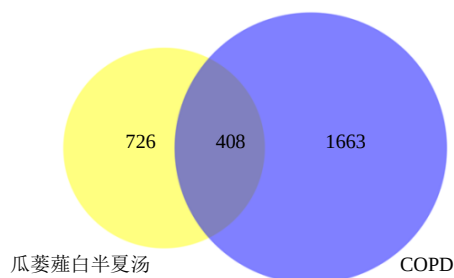


图 2 瓜蒌薤白半夏汤与 COPD 靶点交集的韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of targets of Gualou Xiebai Banxia and COPD

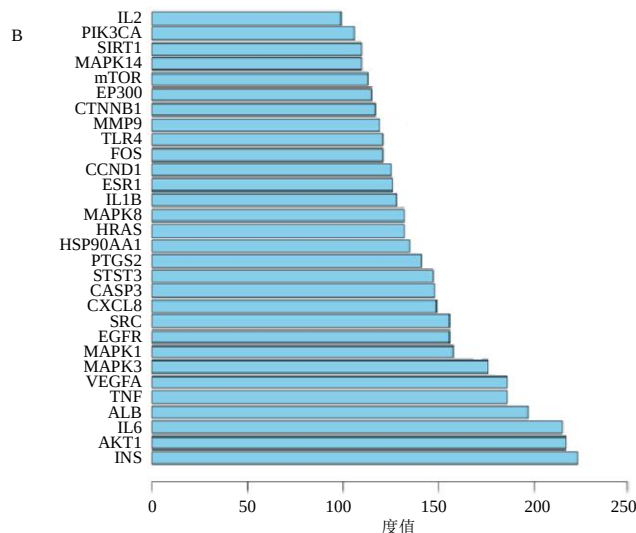
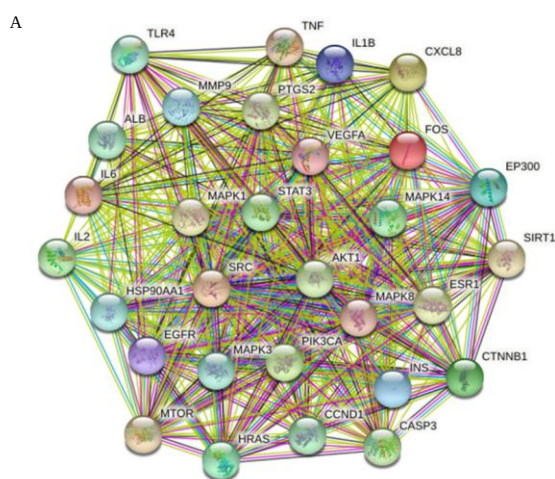


图 3 瓜蒌薤白半夏汤治疗的 COPD 的 PPI 网络 (A) 及关键靶点 (B)

Fig. 3 PPI network (A) and key targets (B) of Gualou Xiebai Banxia Decoction on treatment of COPD

2.4 GO 功能及 KEGG 通路富集分析

2.4.1 GO 功能富集分析 DAVID 中 GO 功能富集分析得到 GO 条目 1096 个 ($P < 0.05$), 其中生物过程 (biological process, BP) 条目 816 个、细胞组成 (cellular component, CC) 条目 88 个、分子功能 (molecular function, MF) 条目 192 个, 分别占 74.45%、8.03%、17.52%。按 $-\lg P$ 值排序, 分别选取前 10 条目, 见图 4。BP 中靶点主要涉及炎症反应、药物反应、细胞凋亡负调控、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 反应; CC 中靶点主要涉

IL-6、白蛋白 (albumin, ALB)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、MAPK1、MAPK3、EGFR、原癌基因 SRC、IL-8、CASP3、STAT3、PTGS2、热休克蛋白 90 $\alpha 1$ (heat shock protein 90 $\alpha 1$, HSP90A1)、原癌基因 HRAS、MAPK8、IL-1 β 、雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1)、周期蛋白 D1 (Cyclin D1, CCND1)、FOS、TLR4、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase 9, MMP9)、癌基因 CTNNB1、癌基因 EP300、雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)、MAPK14、沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (silent information regulator 2-related enzymes 1, SIRT1)、磷脂酰肌醇-3-激酶催化亚单位 α (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit α , PIK3CA)、IL-2 等 138 个, 这 138 个靶点可能是瓜蒌薤白半夏汤治疗 COPD 的关键靶点, 按照度值排序选取排名前 30 靶点进行结果展示 (图 3)。

及细胞溶质、质膜、细胞表面; MF 中靶点主要涉及酶结合、药物结合、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 结合、蛋白结合等。

2.4.2 KEGG 通路富集分析 通过使用 DAVID 数据中 KEGG 通路富集分析得到 125 条 ($P < 0.05$) 信号通路, 按照 $-\lg P$ 值排序, 选取前 20 条目, 绘气泡图, 见图 5。主要涉及癌症通路、TNF 信号通路、前列腺癌、缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 信号通路、神经活性配体-受体相互作用等通路, 主要涉及 INS、AKT1、IL-6、ALB、

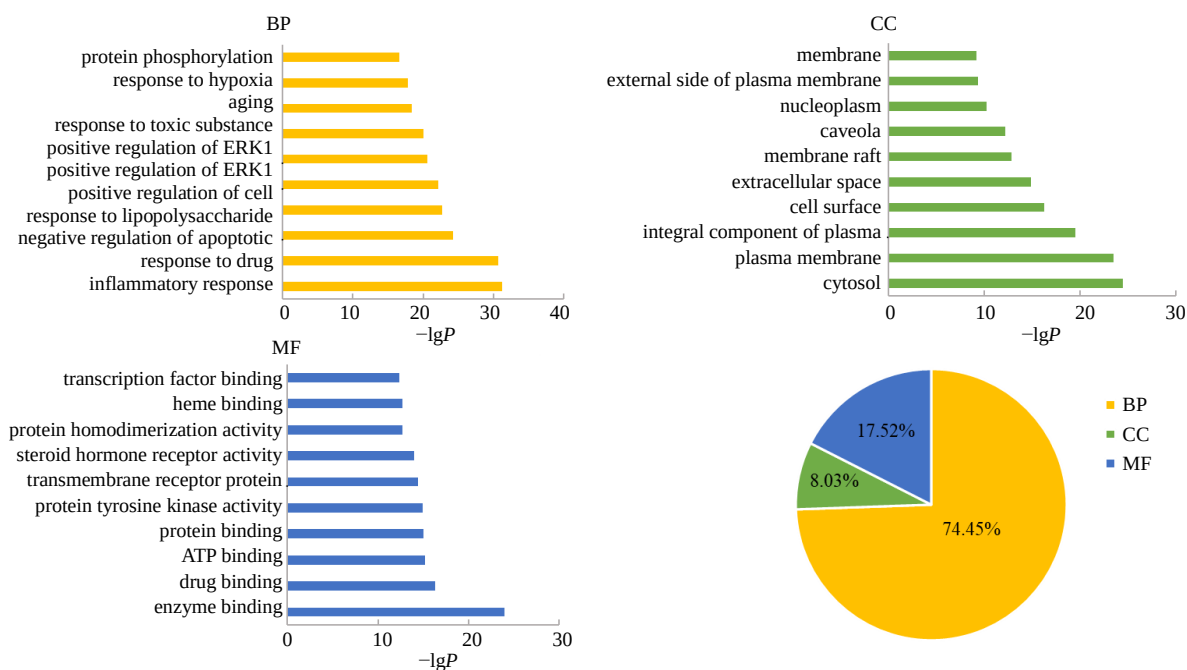


图 4 GO 功能富集分析 (前 10)

Fig. 4 GO enrichment analysis (top 10)

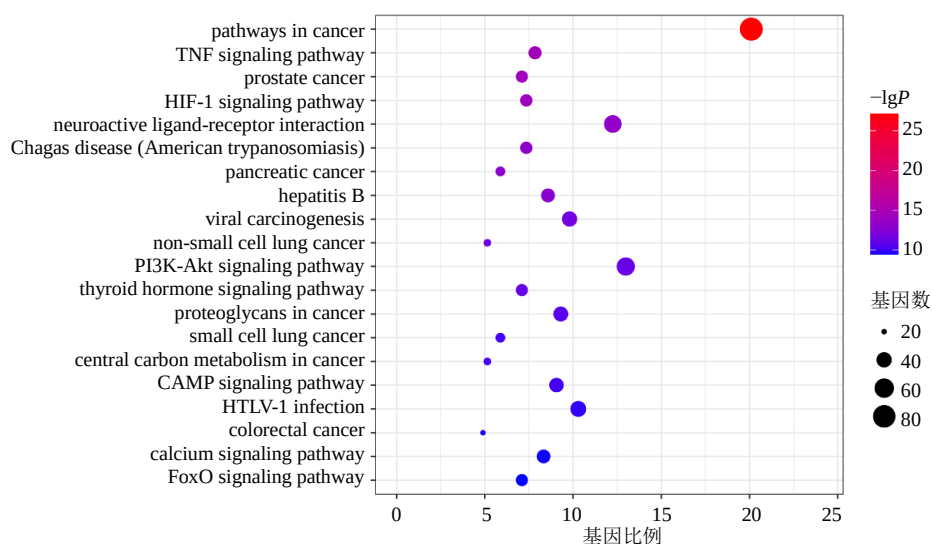


图 5 KEGG 通路富集分析 (前 20)

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis (top 20)

TNF、VEGFA、MAPK3、MAPK1、EGFR、SRC、CXCL8、CASP3、STAT3 和 PTGS2 等靶点。

2.5 qRT-PCR 法检测斑马鱼模型 *IL-6*、*CASP8*、*BCL2* 和 *EGFR* mRNA 表达情况

网络药理学结果表明, 炎症相关靶点及通路是瓜蒌薤白半夏汤治疗 COPD 的关键, 通过建立斑马鱼炎症模型对筛选出的炎症靶点 EGFR、IL-6、BCL2、CASP8 进行实验验证。如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组 *IL-6*、*CASP8*、*BCL2* 和 *EGFR*

mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, 瓜蒌薤白半夏汤 (200 $\mu\text{g/mL}$) 组 *IL-6*、*BCL2* 和 *EGFR* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 瓜蒌薤白半夏汤 (100 $\mu\text{g/mL}$) 组 *BCL2* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 瓜蒌薤白半夏汤各剂量组 *CASP8* mRNA 表达水平降低, 但无统计学意义。与网络药理学研究结果一致, 瓜蒌薤白半夏汤主要通过调节 EGFR、IL-6、BCL2、CASP8 等靶点干预 COPD。

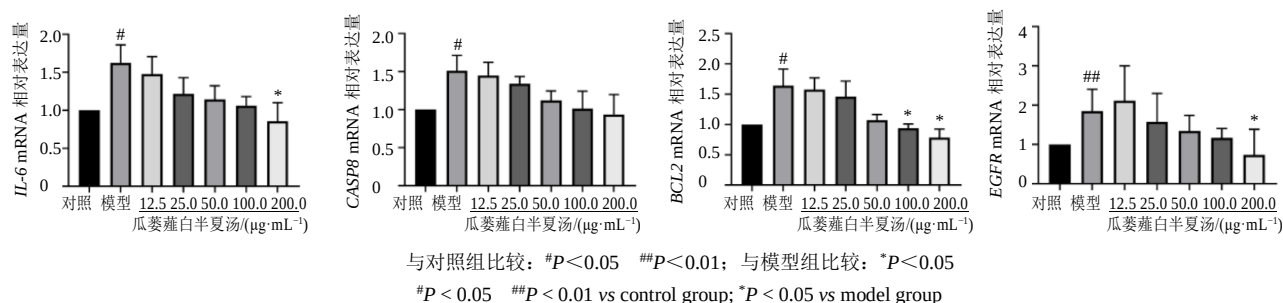


图 6 瓜蒌薤白半夏汤对斑马鱼模型 *IL-6*、*CASP8*、*BCL2* 和 *EGFR* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Effect of Gualou Xiebai Banxia Decoction on *IL-6*, *CASP8*, *BCL2* and *EGFR* mRNA expressions in zebrafish model ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3 讨论

本研究采用网络药理学方法共筛选出瓜蒌薤白半夏汤中成分 955 个, 考虑到汤剂煎煮对中药的影响选取潜在活性成分 106 个、核心活性成分 74 个, 作用于 1134 个靶点, 干预 COPD 的关键作用靶点 408 个, 体现了中药多成分、多靶点、整体性和关联性的特点。根据“中药-活性成分-靶点”网络的拓扑属性分析结果, 进一步得到其中排名前 5 位的活性成分分别为来自于瓜蒌的芹菜素、美迪紫檀素、金圣草黄素、香叶木素和来自于半夏的茴香酸。

黄酮类成分在瓜蒌薤白半夏汤干预 COPD 中起到了较为重要的作用。黄酮类化合物具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗病毒和调节免疫等药理作用, 其中抗炎和抗氧化活性使其成为预防和治疗肺部炎症疾病的潜在药物^[22]。芹菜素具有抗氧化、抗炎及保肝等作用。芹菜素碳苷可通过抑制 TLR4/瞬时受体电位阳离子通道蛋白 6 (transient receptor potential cation channel 6, TRPC6) 信号通路的激活来抑制急性炎症和细胞凋亡, 从而抑制 LPS 诱导的 BALB/c 小鼠急性肺损伤模型的肺部炎症^[23]。芹菜素可以降低 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 和过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性来调节炎症反应和氧化应激水平, 从而逆转百草枯诱发的急性肺损伤^[24]。金圣草黄素可显著抑制 LPS 诱导的前列腺素 E_2 (prostaglandin E_2 , PGE_2) 产生和环氧合酶 2 (cyclooxygenase 2, COX2) 表达, 进一步抑制 NF- κ B 和活化蛋白 1 (activator protein 1, AP1) 等表达; 金圣草黄素显著抑制 LPS 诱导的小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 中 TLR4 和髓样分化蛋白 88 等接头分子活化^[25]。研究表明, 肺部炎症损伤的大鼠中 TLR4

表达水平升高, 为维持 COPD 炎症反应的主要 TLRs^[26]。香叶木素能够降低肺湿/干质量, 以及支气管肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等蛋白表达水平^[27]; 此外, 香叶木素还能够显著抑制 LPS 诱导的髓过氧化物酶、丙二醛和活性氧水平的升高, 并通过激活核因子相关因子 2 (nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2) 以及抑制结构域蛋白 3 (NOD-like receptor family pyrin domain-containing protein 3, NLRP3) 炎症小体, 保护 LPS 诱导的急性肺损伤。

PPI 网络分析和“中药-活性成分-靶点”网络的拓扑属性分析结果表明, 瓜蒌薤白半夏汤干预 COPD 的主要作用靶点为 CA9、PTGS1、PTGS2、INS、AKT1、IL-6、TNF、CXCL8、EGFR、VEGFA、MAPK3、MAPK1、MAPK8 等。CA9 是非小细胞肺癌中的重要分子, 参与一系列血管生成、细胞凋亡和细胞间黏附破坏的蛋白表达^[28]。研究表明, 气道炎症是 COPD 发生发展的重要机制, COX2 是花生四烯酸代谢过程中的重要限速酶, 香烟烟雾暴露能够上调 COX2 表达, 而其代谢产物可加剧患者的气道炎症反应, 导致气流阻塞程度增加。此外, 细胞因子 IL-6、IL-8、TNF- α 、TNF- β 在 COPD 患者中表达上升, 均可诱导气道炎症的发生, 造成气道与肺组织持续性的损伤^[29-30]。CASP3、CASP8 属于半胱氨酸蛋白酶家族, 与细胞凋亡有关。CASP8 介导死亡受体途径, 并激活 CASP3, 被激活的 CASP3 作用于 BCL2 家族成员, 破坏宿主细胞内的结构蛋白及 DNA 稳定, 最终导致细胞凋亡^[31-32]。烟雾引起的 COPD 通过激活细支气管上皮细胞 CASP3 的免疫反应, 从而介导细胞凋亡^[32-33]。VEGFA 是血小板源性生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF)/VEGF 生长因子家族的成员, 可以诱导内

皮细胞增殖、促进细胞迁移、抑制凋亡,增加血管通透性和调节血栓形成。BCL2 与凋亡调节和肺功能有关^[34], 可通过维持线粒体膜电位介导细胞凋亡,从而促进 COPD 的发展。肺气肿型 COPD 患者的肺组织中 VEGF 和 BCL2 蛋白表达明显降低,提示瓜蒌薤白半夏汤可通过上调 VEGF 和 BCL2 表达, VEGF 进一步作为内皮细胞存活因子,保护内皮细胞。瓜蒌薤白半夏汤能够显著降低斑马鱼炎症模型 EGFR、BCL2 mRNA 表达水平,且呈剂量相关性。KEGG 通路富集主要涉及癌症通路、TNF 信号通路、神经活性配体-受体相互作用等通路,靶点富集数目最多的通路为癌症通路,且均涉及 IL-6。IL-6 是一种促炎因子,可通过趋化炎性细胞聚集和促进炎性细胞浸润,加速肺纤维化早期的肺泡炎症反应,进而介导特发性肺纤维化的发生,对肺部产生损伤^[35]。瓜蒌薤白半夏汤对病毒感染及肺部损伤具有一定的干预作用,瓜蒌薤白半夏汤能够显著降低斑马鱼炎症模型 IL-6 mRNA 表达水平,且呈剂量相关性。此外, TNF 信号通路在抗病毒、介导能量代谢、炎症反应、血管生成以及维持干细胞特性等方面发挥重要作用, HIF-1 信号通路免疫反应、炎症反应的发生与发展密切相关^[36]。

综上所述,瓜蒌薤白半夏汤中芹菜素、茴香酸、美迪紫檀素、金圣草黄素、香叶木素等 74 个核心功效成分作用于 CA9、PTGS1、INS、IL-6、AKT1、TNF、MAPK1、MAPK3、VEGFA、EGFR 等 408 个靶点,通过炎症反应、细胞溶质、酶结合等 1096 个生物过程,癌症通路、TNF 信号通路、前列腺癌、HIF-1 信号通路、神经活性配体-受体相互作用等 125 条信号通路,从而治疗 COPD。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zubair T, Abbasi A, Khan O A, et al. Role of passive smoking in non-smoking related chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Pak Med Assoc*, 2018, 68(9): 1310-1315.
- [2] Zu Y, Li D, Lei X, et al. Effects of the Chinese herbal formula San-Huang Gu-Ben Zhi-Ke treatment on stable chronic obstructive pulmonary disease: Study protocol of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Trials*, 2019, 20(1): 647.
- [3] 蔡柏蔷. 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组工作会议纪要 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2010, 33(9): 715-717.
- [4] Barnes P J. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 138(1): 16-27.
- [5] 于小芸, 王璞子, 安蓉芳. 瓜蒌薤白半夏汤在肺间质纤维化病程发展中的应用 [J]. *中国民族民间医药*, 2016, 25(22): 53.
- [6] 黄循夫, 钟山. 三拗瓜蒌薤白半夏汤治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期临床疗效观察 [J]. *基层医学论坛*, 2017, 21(13): 1682-1683.
- [7] 陈敏毅. 三拗汤、六君子汤、瓜蒌薤白半夏汤在急性加重期慢性阻塞性肺疾病治疗中的临床效果 [J]. *内蒙古中医药*, 2017, 36(6): 88.
- [8] 段艳锋, 刘荃乐, 郑丹文, 等. 三拗汤和六君子汤、瓜蒌薤白半夏汤治疗急性加重期慢性阻塞性肺疾病疗效观察 [J]. *新中医*, 2014, 46(1): 43-44.
- [9] Ahmed S S, Ramakrishnan V. Systems biological approach of molecular descriptors connectivity: Optimal descriptors for oral bioavailability prediction [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40654.
- [10] Huang L, Xie D, Yu Y, et al. TCMID 2.0: A comprehensive resource for TCM [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D1117-D1120.
- [11] UniProt Consortium. UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D480-D489.
- [12] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: Updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W357-W364.
- [13] Rebhan M. GeneCards: integrating information about genes, proteins and diseases [J]. *Trends Genet*, 1997, 13(4): 163.
- [14] Smoot M E, Ono K, Ruscheinski J, et al. Cytoscape 2.8: New features for data integration and network visualization [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(3): 431-432.
- [15] Amberger J S, Bocchini C A, Schiettecatte F, et al. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(D1): D789-D798.
- [16] Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, et al. STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: D447-D452.
- [17] Burley S K, Berman H M, Kleywegt G J, et al. Protein data bank (PDB): The single global macromolecular structure archive [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1607: 627-641.

- [18] 李洪雷, 王媛, 刘彩红, 等. 瓜蒌薤白半夏汤本原剂量与现代剂量对痰浊壅塞证大鼠心肌梗死后心功能的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(11): 5388-5391.
- [19] 段金彪, 范欣生, 宿树兰. 方剂类方现代研究 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2021: 687.
- [20] 王宇卿, 黄涵. UPLC-Q-TOF/MS 法分析瓜蒌薤白半夏汤中主要化学成分 [J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(19): 2017-2021.
- [21] 李欣. 基于 UPLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS 技术的瓜蒌薤白半夏汤物质基础研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2019.
- [22] 俞文英, 张欢欢, 吴月国, 等. 黄酮类化合物的构效关系及其在肺部炎症疾病中的应用 [J]. 中草药, 2018, 49(20): 4912-4918.
- [23] Li K, He Z, Wang X, *et al.* Apigenin C-glycosides of *Microcos paniculata* protects lipopolysaccharide induced apoptosis and inflammation in acute lung injury through TLR4 signaling pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 124: 163-175.
- [24] Liu Y, Li Z, Xue X, *et al.* Apigenin reverses lung injury and immunotoxicity in paraquat-treated mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 65: 531-538.
- [25] Yoon H S, Park C M. Chrysoeriol ameliorates COX-2 expression through NF- κ B, AP-1 and MAPK regulation via the TLR4/MyD88 signaling pathway in LPS-stimulated murine macrophages [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(1): 718.
- [26] Sidletskaia K, Vitkina T, Denisenko Y. The role of toll-like receptors 2 and 4 in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Int J Chronic Obstr Pulm Dis*, 2020, 15: 1481-1493.
- [27] Liu Q, Ci X, Wen Z, *et al.* Diosmetin alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury through activating the Nrf2 pathway and inhibiting the NLRP3 inflammasome [J]. *Biomol Ther: Seoul*, 2018, 26(2): 157-166.
- [28] Giatromanolaki A, Koukourakis M I, Sivridis E, *et al.* Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrase-9 relates to angiogenic pathways and independently to poor outcome in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(21): 7992-7998.
- [29] Chakraborti A K, Garg S K, Kumar R, *et al.* Progress in COX-2 inhibitors: A journey so far [J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17(15): 1563-1593.
- [30] 伍清华, 陈瑞坤, 彭芳, 等. 气道炎症在 COPD 发生发展中的研究进展 [J]. 中国医药科学, 2020, 10(17): 48-52.
- [31] 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.
- [32] Chiappara G, Gjomarkaj M, Sciarrino S, *et al.* Altered expression of p21, activated caspase-3, and PCNA in bronchiolar epithelium of smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Exp Lung Res*, 2014, 40(7): 343-353.
- [33] Valipour A, Schreder M, Wolzt M, *et al.* Circulating vascular endothelial growth factor and systemic inflammatory markers in patients with stable and exacerbated chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Clin Sci Lond Engl*, 2008, 115(7): 225-232.
- [34] Yang D L, Yan Y, Hu F, *et al.* CYP1B1, VEGFA, BCL2, and CDKN1A affect the development of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Int J Chronic Obstr Pulm Dis*, 2020, 15: 167-175.
- [35] 郭盛, 武文星, 谢红, 等. 基于网络药理学与分子对接技术的补肺活血胶囊用于新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 恢复期治疗的分子机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(9): 2307-2316.
- [36] 何玲玲, 赵玲. 瓜蒌薤白半夏汤防治新型冠状病毒肺炎潜在应用的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(5): 1024-1027.

[责任编辑 李亚楠]