

基于网络药理学和实验验证探究青龙白虎汤改善急性咽炎的作用机制

陈 姣¹, 王继森^{2#}, 郭亭君¹, 陈元惠¹, 卿 莹¹, 朱宗萍¹, 高天慧¹, 傅超美¹, 廖 婉^{1*}

1. 成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137

2. 成都市药品检验研究院, 国家药品监督管理局中药材质量监测评价重点实验室, 四川 成都 610045

摘要: **目的** 基于网络药理学和实验验证探究青龙白虎汤改善急性咽炎的作用机制。**方法** 通过网络药理学预测青龙白虎汤改善急性咽炎的生物调控过程和信号通路, 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络和“成分-通路”网络。建立氨水诱导的急性咽炎大鼠模型, 给予青龙白虎汤干预后, 测定大鼠体质量、咽喉组织指数和肺指数; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色观察咽喉组织病理变化; 采用试剂盒检测血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) 水平以及血清和咽喉组织中丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 活性; 采用 Western blotting 检测咽喉组织中 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 和核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)/血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 信号通路相关蛋白表达。**结果** 共获得青龙白虎汤中 26 个活性成分, 86 个活性成分与疾病的交集靶点, 其中核心靶点 34 个。网络药理学分析结果显示, 青龙白虎汤可以调节 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等核心靶点, 调节抗氧化等生物过程, 调控 NF- κ B 信号通路, 从而治疗急性咽炎。体内实验结果显示, 青龙白虎汤能够改善急性咽炎大鼠咽部组织损伤, 显著抑制血清中炎症因子水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 调控血清和咽喉组织中的氧化应激水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 显著下调 TLR4/NF- κ B 信号通路相关蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 显著上调 Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.001)。**结论** 青龙白虎汤能够通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路并激活 Nrf2/HO-1 信号通路, 抑制炎症反应, 调控氧化应激, 从而改善急性咽炎。

关键词: 青龙白虎汤; 急性咽炎; 网络药理学; 表儿茶素; 没食子酸; 鞣花酸; 绿原酸; 原儿茶酸; 炎症; 氧化应激; TLR4/NF- κ B 信号通路; Nrf2/HO-1 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)17-5875-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.17.014

Mechanism of Qinglong Baihu Decoction on improving acute pharyngitis based on network pharmacology and experimental validation

CHEN Jiao¹, WANG Jisen², GUO Tingjun¹, CHEN Yuanhui¹, QIN Ying¹, ZHU Zongping¹, GAO Tianhui¹, FU Chaomei¹, LIAO Wan¹

1. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Key Laboratory of Quality Monitoring and Evaluation of Chinese Medicinal Materials, National Medical Products Administration, Chengdu Institute for Drug Control, Chengdu 610045, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Qinglong Baihu Decoction (青龙白虎汤, QBD) on improving acute pharyngitis based on network pharmacology and experimental verification. **Methods** The biological regulatory processes and signaling pathways of QBD on improving acute pharyngitis were predicted by network pharmacology, protein-protein interaction (PPI) network and “component-pathway” network were constructed. A rat model of acute pharyngitis induced by ammonium hydroxide was established,

收稿日期: 2024-04-27

基金项目: 四川省中医药管理局中医药开发专项 (2018KF001); 成都市科技局国际科技合作项目 (2022-GH02-00033-HZ)

作者简介: 陈 姣, 女, 硕士, 研究方向为中药新制剂和新剂型研究。Tel: 18428303508 E-mail: 1922702305@qq.com

#共同第一作者: 王继森, 男, 硕士, 副主任中药师, 从事药品检验研究。E-mail: 93230623@qq.com

*通信作者: 廖 婉, 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药炮制工艺与机制、中药药剂研究。E-mail: liaowan@cdutcm.edu.cn

and after intervention with QBD, body weight, pharyngeal tissue index and lung index of rats were measured; Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe pathological changes in pharyngeal tissue; Reagent kit was used to detect the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, prostaglandin E₂ (PGE₂) in serum, as well as the level of malondialdehyde (MDA) and activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in serum and pharyngeal tissue; Western blotting was used to detect the expressions of Toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor- κ B (NF- κ B) and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) signaling pathway related proteins in pharyngeal tissue. **Results** A total of 26 active ingredients were obtained from QBD, and 86 interaction targets between active ingredients and diseases, including 34 core targets. The results of network pharmacology analysis showed that QBD could regulate core targets such as TNF- α , IL-1 β and IL-6, regulate biological processes such as antioxidant activity, and regulate NF- κ B signaling pathway, thereby treating acute pharyngitis. The *in vivo* experimental results showed that QBD could improve the damage of pharyngeal tissue in rats with acute pharyngitis, significantly inhibit the levels of inflammatory factors in serum ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), regulate the levels of oxidative stress in serum and pharyngeal tissue ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), significantly down-regulate the expressions of TLR4/NF- κ B signaling pathway related proteins ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and significantly up-regulate the expressions of Nrf2/HO-1 signaling pathway related proteins ($P < 0.05, 0.001$). **Conclusion** QBD can improve acute pharyngitis by inhibiting TLR4/NF- κ B signaling pathway and activating Nrf2/HO-1 signaling pathway, suppressing inflammatory responses and regulating oxidative stress.

Key words: Qinglong Baihu Decoction; acute pharyngitis; network pharmacology; epicatechin; gallic acid; ellagic acid; chlorogenic acid; protocatechuic acid; inflammation; oxidative stress; TLR4/NF- κ B signaling pathway; Nrf2/HO-1 signaling pathway

急性咽炎为临床常见疾病，主要表现为咽部疼痛或干燥、有灼热感或异物感，吞咽时加重，主要发病机制为病毒、细菌或理化因素刺激咽喉部引发的炎症反应^[1]。急性咽炎在中医上称为“急喉痹”，是累及咽部黏膜、黏膜下组织及周围淋巴组织的急性炎症，常继发于急性鼻炎、急性扁桃体炎，冬季和初春发病率最高^[2]。随着现代社会的发展，工业化程度越来越高，环境污染、职业因素、心理因素和不良生活习惯等在疾病发生中的影响日益显著，急性咽炎的患病率也依然居高不下。据估计全球每年会有 6.16 亿例链球菌感染性咽炎病例出现，我国 0~14 岁儿童咽炎患病率高达 20%^[2-3]。如果急性咽炎治疗不及时或反复发作就可能发展成慢性咽炎。急性咽炎会引起咽喉发炎，导致咳嗽、肿胀和疼痛，而炎症引起的病理变化会导致许多呼吸道疾病。因此，迫切需要探索新的有效方法来缓解急性咽炎的症状，从而有助于预防急性鼻炎和扁桃体炎的进展。近年来，随着中医药临床前和临床研究的快速发展，中药治疗急性咽炎已显示出不良反应少、安全性高、疗效显著的优势^[4]。中药复方如金银花与青果复合制品^[5]、咽喉清复方^[2]、疏风解毒胶囊^[6]、扁咽宁汤^[7]等具有多层次、多渠道、多靶点的药理作用，对改善急性咽炎有独特的优势，具有安全、长效的治疗潜力。

青龙白虎汤出自清代著名医家王孟英《王氏医案》卷二，全方 2 味。方中青果是具有清热解毒、润喉生津功效的君药^[8-10]。莱菔又名白萝卜，被誉为

“蔬中圣品”，具有丰富的营养元素和药用价值，能消食下气、利尿化痰^[11-13]、健脾宽中、清热解毒，对于肺热痰火、咳嗽痰多、食停不化、脘腹胀满等有很好的疗效^[14-16]，还可清热解毒，对肺热、痰火、咳嗽、哮喘有很好的治疗作用。青龙白虎汤是一种药食两用方，符合中医“药食同源”理论的精髓，融合了预防、保健、治疗等多种应用价值，与中医药的传统特点相关联。青龙白虎汤“药极简易，性最平和，味不恶劣，易粉易服”，善于清热利咽，主治热毒内盛、上灼咽喉、津液损伤所致咽喉肿痛。青龙白虎汤入药，可消经络留滞之痰，解膏粱鱼面之毒，预防春季咽喉疾病^[17]。然而，青龙白虎汤治疗急性咽炎尚未见相关报道。本研究基于网络药理学预测了青龙白虎汤治疗急性咽炎的作用靶点及相关机制，采用急性咽炎大鼠模型考察了青龙白虎汤的药效作用，并对网络药理学预测结果进行了验证。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠，体质量 (200±20) g，购自斯贝福（北京）生物技术有限公司，合格证号 SCXK（京）2019-0010。大鼠在 SPF 环境中适应性喂养 1 周，温度 18~23 ℃，明暗周期为 12/12 h，自由进食饮水。动物实验经成都中医药大学实验动物伦理委员会批准（批准号 CDU2019S121）。

1.2 药品与试剂

1,1-二苯基-2-苦肟基（1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical, DPPH，批号 C1846081）、

2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS, 批号 C112/04530001]、过硫酸钾(批号 C12662811)、氨水(批号 C11442880)购自麦克林生物有限公司;地塞米松(批号 211101)购自仙琚制药股份有限公司;肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒(批号 E-EL-H0109)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA 试剂盒(批号 E-EL-H0149)、IL-6 ELISA 试剂盒(批号 E-EL-H6156)、前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) ELISA 试剂盒(批号 E-EL-0034)购自杭州联科生物科技股份有限公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(批号 A003-1)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒(批号 A001-3)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)检测试剂盒(批号 A005-1)购自南京建成生物工程研究所;Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 抗体(批号 GB15186-100)、核因子- κ B p65 (nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p65) 抗体(批号 GB113882-100)、环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 抗体(批号 GB111037-100)、核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 抗体(批号 GB115673-100)、血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 抗体(批号 GB15104-100)、 β -actin 抗体(批号 GB15001-100)、二抗(批号 GB111738-100、GB111739-100)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;其他试剂均为分析级。

1.3 药材

青果(批号 YP190501)购自四川合江,莱菔(批号 LF200530)购自成都温江无公害蔬菜基地农场,经成都中医药大学药学院标本中心蒋桂华教授鉴定分别为橄榄科植物橄榄 *Canarium album* Raeusch. 的干燥成熟果实、十字花科植物莱菔 *Raphanus sativus* L. 的新鲜根茎。

1.4 仪器

UPK-I-10T 型纯水机(四川优普超纯科技有限公司);AR224CN 型万分之一电子天平[奥豪斯仪器(常州)有限公司];CPA225D 型十万分之一电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];FTS-10A 型全自动煎药壶(潮州市一壶百饮电器实业有限公司);SCIENTZ-10N 型冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司);DL-720D 型数控超声波清洗器(上海之信仪器有限公司);OSB-2100 型旋

转蒸发仪(深圳市安科科技有限公司);D3024R 型台式高速冷冻型微量离心机、D3024R 型台式高速冷冻离心机[大龙兴创实验仪器(北京)股份公司];Chemray240/800 型全自动生化分析仪(深圳雷杜生命科技);KZ-II 型高速组织研磨仪、MX-F 型涡旋混合器(武汉赛维尔生物科技有限公司);Epoch 酶标检测仪(美国伯腾仪器有限公司);制胶架、电泳仪及凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 青龙白虎汤活性成分筛选 利用 TCMSP 数据库(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)以“青果”“莱菔”为关键词,以药物口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性(drug-likeness, DL) ≥ 0.10 为筛选标准,检索青龙白虎汤中的主要活性成分。并通过文献检索对候选活性成分进行补充^[19]。

2.1.2 活性成分靶点与急性咽炎的预测 通过 TCMSP、SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)预测青龙白虎汤中活性成分的作用靶点,借助 Uniprot 数据库(<https://www.Uniprot.org/>)官方命名,限定物种为“Human”,检索得到靶点名称对应的 Gene Symbol,删除无对应基因名的靶点。利用 DrugBank 数据库(<https://www.Drugbank.ca/>)、Gene Cards 数据库(<http://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库(<http://www.Omim.org/>),以“acute pharyngitis”为关键词,检索得到急性咽炎的作用靶点,运用 Venny 平台将青龙白虎汤活性成分靶点与急性咽炎靶点相交,获得青龙白虎汤治疗急性咽炎的潜在靶点。

2.1.3 “药物-成分-靶点”网络的构建 将青龙白虎汤活性成分与急性咽炎的交集靶点输入 Cytoscape 3.9.1 软件中,构建“药物-成分-靶点”网络,然后运用 cytoNCA 插件对网络节点进行分析,并计算网络参数,筛选出青龙白虎汤治疗急性咽炎的主要活性成分。

2.1.4 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建 将青龙白虎汤活性成分与急性咽炎的交集靶点导入 String 数据库(<https://string-db.org/>),并将物种限定为“homo sapiens”。选取置信度高于 0.40 的数据,下载 TSV 格式后导入 Cytoscape 3.9.1 软件中,构建 PPI 网络,筛选青龙白虎汤治疗急性咽炎的核心靶点。

2.1.5 基因本体 (gene ontology, GO) 功能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 利用 Metascape 数据库 (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>) 对 PPI 网络中的核心靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, 设定阈值 $P < 0.05$, 筛选排名靠前的条目, 采用微生信平台以及 Cytoscape 3.9.1 软件将结果可视化。

2.2 实验验证

2.2.1 青龙白虎汤的制备 称取青果饮片 60 g 加水浸泡 30 min, 然后加入切制小块的新鲜莱菔 60 g, 加入 8 倍量水 (960 mL) 煎煮 2 次, 每次 1 h, 合并 2 次青龙白虎汤煎煮液。取煎煮液 1 200 mL 减压浓缩至 150 mL, 冷冻干燥得青龙白虎汤冻干粉 (回收率约为 14.22%)。课题组前期采用高效液相色谱结合多指标组分含量测定, 建立了青龙白虎汤的质量控制方法^[18], 结果显示, 青龙白虎汤中主要成分为表儿茶素、没食子酸、鞣花酸、绿原酸、原儿茶酸, 质量分数分别为 0.724%~1.301%、2.184%~2.840%、0.607%~0.760%、0.061%~0.141%、0.017%~0.079%。

2.2.2 分组、造模与给药 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、地塞米松 (5 mg/kg) 组和青龙白虎汤高、中、低剂量 (9.45、7.35、5.25 g/kg, 分别相当于临床等效剂量的 8.0、6.2、4.4 倍) 组, 每组 9 只。参照文献方法^[2,20], 采用 15%氨水定点喷雾的方式制备急性咽炎大鼠模型。除对照组外, 其余大鼠于每日 9:00、17:00 时采用 15%氨水喷雾刺激咽部, 以 400 mm Hg 恒压每次均匀喷 3 下 (1 mmHg=133 Pa), 连续 3 d, 使大鼠咽部黏膜因氨水急性刺激而充血肿胀, 形成急性炎症。对照组大鼠咽部给予生理盐水。实验第 4 天, 各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续给药 5 d。

2.2.3 大鼠一般情况观察 每天观察大鼠进食、饮水量、活动、垫料洁净、精神、皮毛脱落、搔抓口部次数、咳喘、色变 (咽喉部红肿面积大小、颜色深浅) 等情况, 同时每天记录大鼠体质量。

2.2.4 取材与处理 末次给药结束后, 大鼠经异氟烷麻醉, 腹主动脉取血, 室温静置 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 于 -80 °C 保存。取血后, 大鼠脱颈椎处死, 取出肺组织, 称定质量。立即从环状软骨水平剪断气管食管, 从咽后壁向上分

离软组织至腭帆水平, 然后剪断组织。取下的咽部黏膜及其下组织称定质量后, 分为 2 部分, 一部分用 4%多聚甲醛固定, 用于病理检测; 另一部分于 -80 °C 保存, 用于生化指标的测定以及蛋白提取。

2.2.5 咽喉组织指数和肺指数的测定 由于咽喉和肺气道是相连的, 可以通过检测咽喉组织和肺指数来反映损伤程度。称定大鼠的体质量以及完整咽喉组织、肺组织的质量, 分别计算咽喉组织指数和肺指数。

脏器指数=脏器质量/体质量

2.2.6 苏木素-伊红 (HE) 染色法观察咽喉组织病理变化 取固定于 4%多聚甲醛的咽喉组织, 经组织修复、石蜡包埋、5 μm 切片、HE 染色、乙醇梯度脱水、透明和密封后, 于光学显微镜下观察并拍照。

2.2.7 血清和咽喉组织中炎症因子和生化指标的测定 按照试剂盒说明书检测血清中 IL-1β、TNF-α、IL-6、PGE₂ 水平以及血清和咽喉组织中 MDA 水平和 SOD、GSH-Px 活性。

2.2.8 Western blotting 检测咽喉组织中 NF-κB p65、TLR4、COX-2、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达 取各组咽喉组织, 加入含 1 mmol/L 苯基甲基磺酰氟和蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液, 于冰上匀浆裂解, 于 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 于 5%脱脂牛奶中室温封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次, 5 min/次, 加入一抗 (1:1 000), 4 °C 摇床孵育过夜; TBST 洗膜后, 加入二抗 (1:5 000), 室温孵育 2 h, TBST 洗膜后, 加入化学发光试剂显影、曝光。使用图像分析系统分析条带灰度值。

2.2.9 统计学分析 采用 GraphPad Prism 8.0 和 SPSS 23.0 软件进行统计分析, 使用 t 检验或方差分析 (ANOVA) 进行组间比较, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 网络药理学分析

3.1.1 青龙白虎汤活性成分的筛选 通过 TCMSP 数据库确定青龙白虎汤的主要成分 53 个, 其中青果 47 个、莱菔 6 个, 通过 $OB \geq 30\%$ 且 $DL \geq 0.10$ 对青龙白虎汤的成分进行筛选, 共筛选得到活性成分 11 个。通过查阅文献, 发现表儿茶素、异柯里拉京、绿原酸、柚皮苷、穗花杉双黄酮和芦丁等成分虽然 OB 较差, 但具有较好的生物活性和 DL, 因此, 整合数据后共得到活性成分 26 个 (表 1)。

表 1 青龙白虎汤中的活性成分
Table 1 Active ingredients in Qinglong Baihu Decoction

编号	Mol ID	化合物	PubChem CID	OB/%	DL	来源
1	MOL001002	鞣花酸	5281855	43.06	0.43	青果
2	MOL001494	亚麻油酸乙酯	5282184	42.00	0.19	青果
3	MOL001641	亚油酸甲酯	5152227	41.93	0.17	青果
4	MOL001600	胡椒烯	12303902	29.47	0.12	青果
5	MOL002037	穗花杉双黄酮	5281600	2.95	0.65	青果
6	MOL002085	α -萜澄茄烯	442359	16.73	0.11	青果
7	MOL000263	齐墩果酸	10494	29.02	0.76	青果
8	MOL002875	油酸甲酯	5364509	31.90	0.17	青果
9	MOL000358	β -谷甾醇	222284	36.91	0.75	青果
10	MOL000415	芦丁	5280805	3.20	0.68	青果
11	MOL004328	柚皮素	932	59.29	0.21	青果
12	MOL004368	金丝桃苷	5281643	6.94	0.77	青果
13	MOL000520	α -香树脂醇	73170	10.28	0.76	青果
14	MOL005812	柚皮苷	442428	6.92	0.78	青果
15	MOL006699	5-[(Z)-2-(4-甲氧基苯基)乙烯基]间苯二酚	—	72.37	0.13	青果
16	MOL000069	棕榈酸	985	19.30	0.10	青果
17	MOL000870	三十六烷	12412	7.95	0.41	青果
18	MOL000937	58870_FLUKA	—	49.01	0.10	青果
19	MOL000098	槲皮素	5280343	46.43	0.28	青果
20	MOL006698	异橙皮苷	442428	24.38	0.55	青果
21	MOL006790	异柯里拉京	10077799	9.64	0.44	青果
22	MOL001955	绿原酸	1794427	11.93	0.33	青果
23	MOL006505	表儿茶素	72276	11.93	0.33	青果
24	MOL001986	β -谷甾醇	348285530	5.84	0.71	莱菔
25	MOL001454	小檗碱	2353	36.86	0.78	莱菔
26	MOL000014	芸苔葡萄糖硫苷	656506	53.64	0.48	莱菔

3.1.2 青龙白虎汤活性成分作用靶点与急性咽炎靶点的筛选 采用TCMSP、SwissTargetPrediction数据库得到青龙白虎汤 26 个活性成分对应的靶点，删除重复靶点，得到靶点 226 个。以相关性分数 ≥ 5 为筛选条件，删除重复靶点，得到与急性咽炎相关靶点 688 个。利用 Venny 平台对其进行交集，绘制韦恩图（图 1-A），得到青龙白虎汤治疗急性咽炎的潜在靶点 86 个。“药物-成分-靶点”网络（图 1-B）具有 115 个节点，青龙白虎汤改善急性咽炎的活性成分前 10 名分别为槲皮素、表儿茶素、 β -谷甾醇、柚皮素、芦丁、棕榈酸、鞣花酸、金丝桃苷、5-[(Z)-2-(4-甲氧基苯基)乙烯基]间苯二酚、柚皮苷。

3.1.3 PPI 网络分析 将青龙白虎汤治疗急性咽炎 86 个靶点导入 String 数据库，得到 PPI 网络（图 2-A）。PPI 网络共有 86 个节点、1 484 条边，平均节点度为 33，平均局部聚类系数为 0.71。网络中节点越大，颜色由浅黄到橙色，表示靶点的度值越大。TNF- α 、IL-1 β 、蛋白激酶 B1（protein kinase B1, AKT1）、IL-6、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3（cystein-aspartate protease-3, CASP3）、表皮生长因子受体（epidermal

growth factor receptor, EGFR）、胰岛素编码基因（insulin, INS）、血管内皮生长因子 A（vascular endothelial growth factor A, VEGFA）等靶点位于网络的核心位置，在 PPI 网络中发挥重要调控作用。同时根据靶点度值进行筛选，选取排名前 30 位核心基因，并采用微生信平台可视化（图 2-B）。

借助 Metascape 数据库对 PPI 网络中的 34 个核心靶点进行 GO 功能富集分析，共富集到 832 个 GO 条目，其中生物过程（biological process, BP）条目 751 个、细胞组成（cellular component, CC）条目 23 个、分子功能（molecular function, MF）条目 58 个。根据基因数从大到小排列，分别取排名前 10 的条目运用微生信平台可视化，结果见图 3-A。BP 主要涉及对脂多糖的反应、细胞群增殖负调控、蛋白质磷酸化的正调节、对活性氧的反应等；CC 主要涉及富含 ficolin-1 的颗粒管腔、溶解液泡和溶酶体等；MF 主要涉及细胞因子受体结合、抗氧化活性、过氧化物酶活性、氧化还原酶活性等。表明青龙白虎汤的活性成分可能通过参与各种生物调节过程发挥改善急性咽炎的作用。

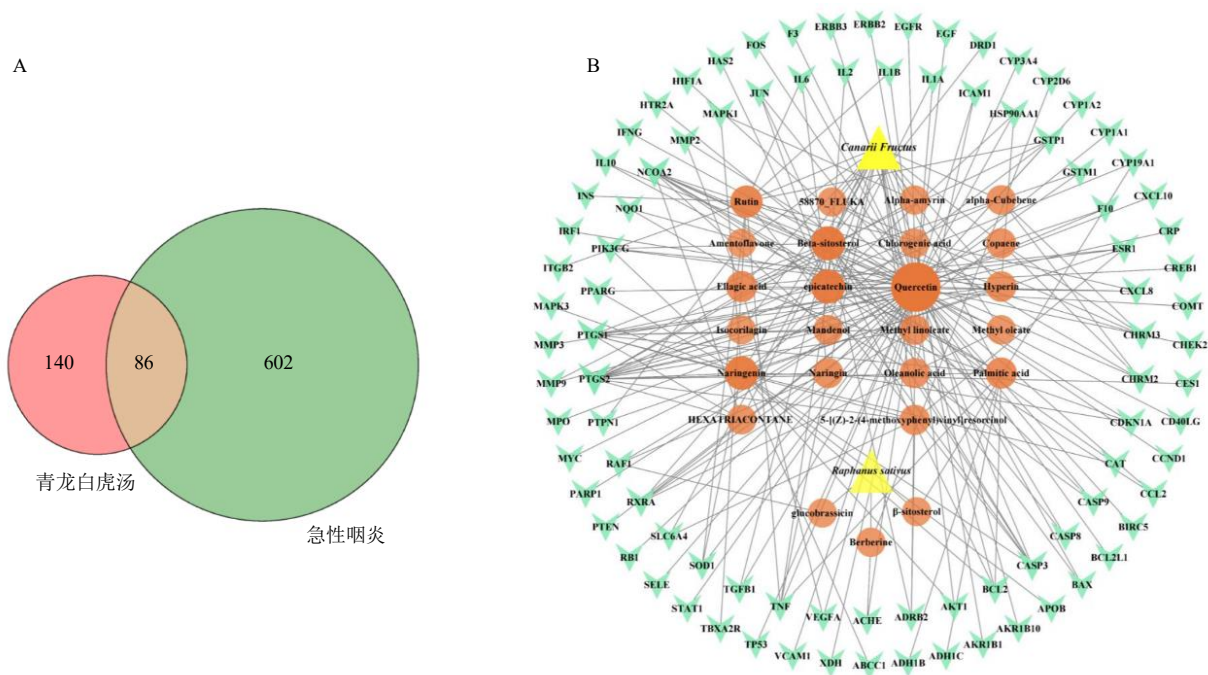


图 1 青龙白虎汤和急性咽炎交集靶点的 Venn 图 (A) 和“药物-成分-靶点”网络 (B)

Fig. 1 Venn diagram of intersection targets of Qinglong Baihu Decoction and acute pharyngitis (A) and “drug-component-target” network (B)

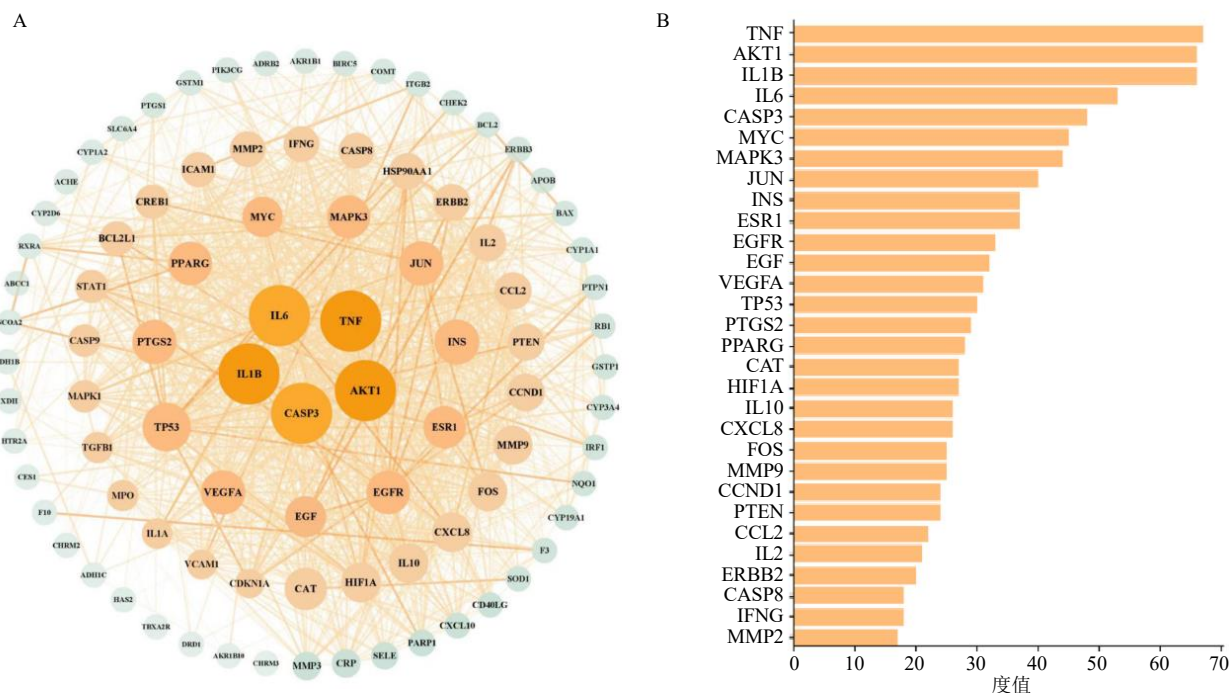


图 2 PPI 网络 (A) 和核心基因 (B)

Fig. 2 PPI network (A) and core gene (B)

采用 Metascape 数据库对 PPI 网络中的 34 个核心靶点进行 KEGG 通路富集分析, 共富集到 155 条通路, 根据 $P < 0.05$, 取 P 值最小的前 30 条通路, 采用微生信平台绘制气泡图 (图 3-B), 采用

Cytoscape 3.9.1 软件绘制“靶点-通路”网络 (图 3-C)。结果显示, 青龙白虎汤治疗急性咽炎主要涉及 NF- κ B 信号通路、百日咳、TNF 信号通路、癌症、脂质和动脉粥样硬化、乙型肝炎等信号通路。

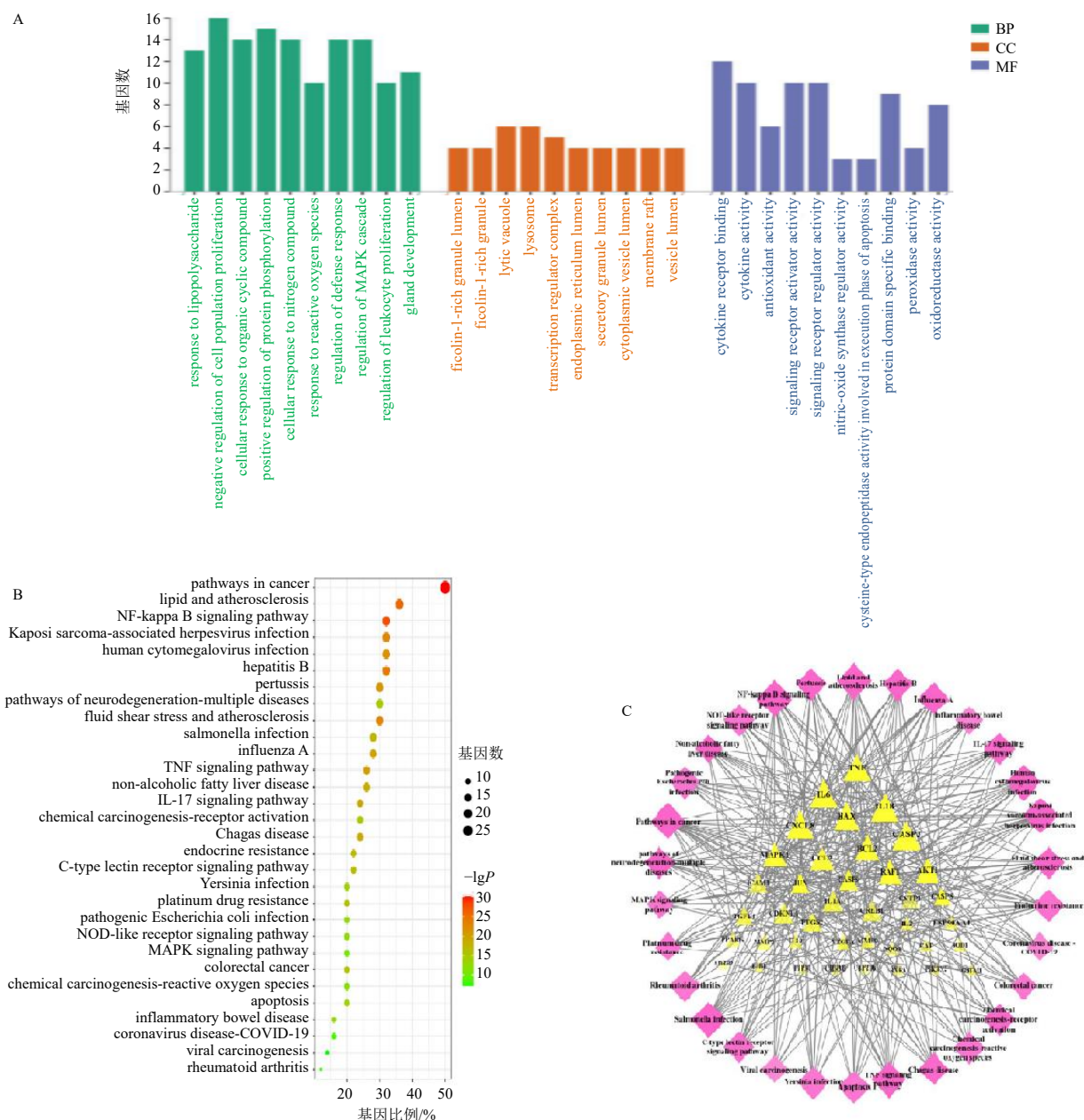


图 3 青龙白虎汤治疗急性咽炎的 GO 功能 (A)、KEGG 通路 (B) 富集分析和“靶点-通路”网络 (C)
Fig. 3 GO function (A), KEGG pathway (B) enrichment analysis and “target-pathway” network (C) of Qinglong Baihu Decoction in treatment of acute pharyngitis

TLR4/NF- κ B 通路是机体炎症反应的重要通路, 广泛存在于各种组织细胞中, 参与炎症的发生和调节^[21-23]。Nrf2 和 HO-1 是调节氧化应激的重要因素, Nrf2/HO-1 通路对机体氧化应激损伤的抵抗力有积极影响^[24-25]。因此选择 TLR4/NF- κ B 和 Nrf2/HO-1 信号通路进行实验验证。

3.2 青龙白虎汤对急性咽炎大鼠的影响

3.2.1 青龙白虎汤对急性咽炎大鼠体质量和脏器指数的影响 如图 4-A 所示, 实验第 4 天, 模型组大

鼠体质量显著降低 ($P < 0.001$); 给药后, 与模型组比较, 各给药组大鼠体质量均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。咽喉组织指数和肺指数可以反映咽喉组织和肺损伤的程度, 如图 4-B、C 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠咽喉组织和肺指数显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, 地塞米松组和青龙白虎汤高、中剂量组大鼠咽喉组织和肺指数显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。表明青龙白虎汤能够减轻急性咽炎大鼠的咽喉组织和肺组织损伤。

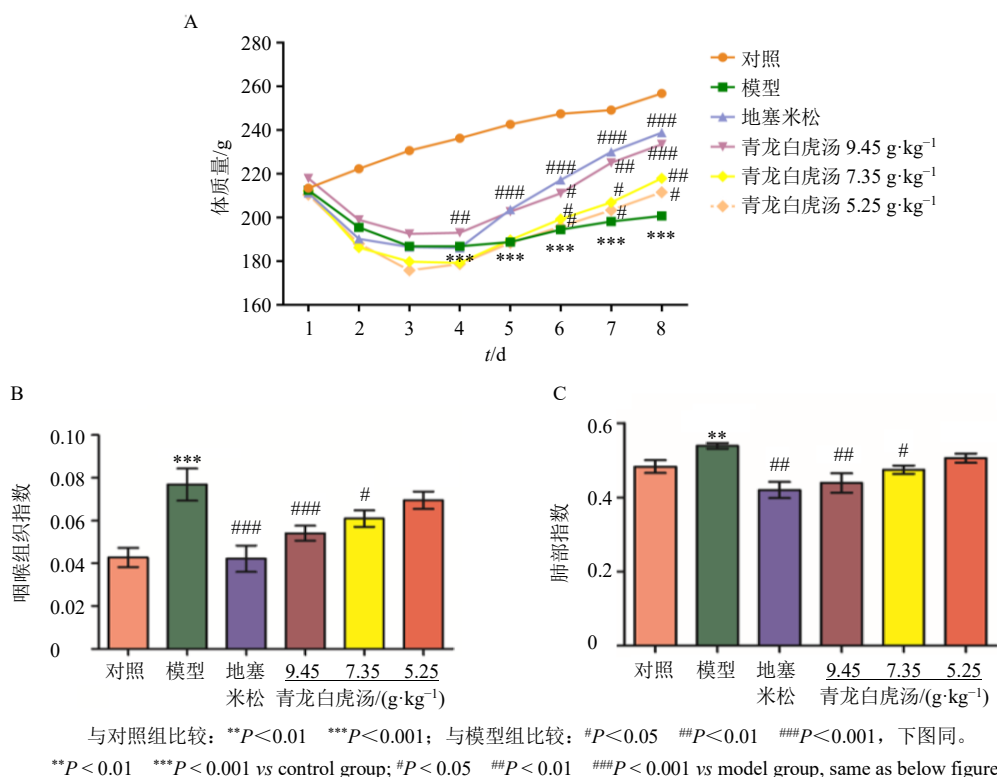


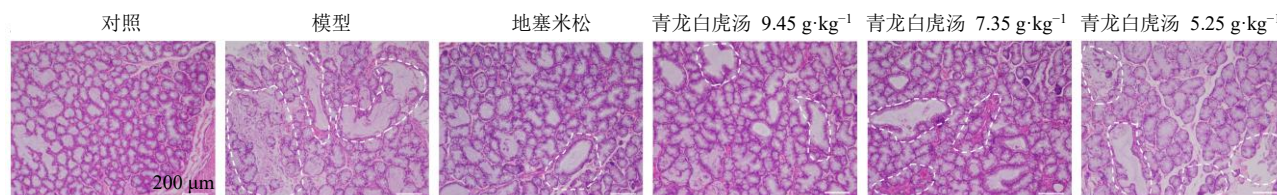
图 4 青龙白虎汤对急性咽炎大鼠体质量 (A) 及脏器指数 (B、C) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effect of Qinglong Baihu Decoction on body weight (A) and organ indexes (B, C) of rats with acute pharyngitis ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2.2 青龙白虎汤对急性咽炎大鼠咽喉组织病理变化的影响 如图 5 所示, 对照组大鼠咽喉组织界限及分层清晰, 黏膜上皮为复层扁平上皮, 未角化, 固有层内无炎症细胞浸润, 黏膜下层腺体结构组织正常, 未见血管扩张及出血; 模型组咽喉组织界限及分层模糊, 黏膜上皮出现角化或脱落, 上皮可见明显增厚, 固有层可见大量炎症细胞浸润, 并出现部分血管破裂出血, 混合性腺体呈现出形态不规则及肥大; 与模型组比较, 各给药组咽喉组织结构有明显的改善, 脱落的黏膜上皮逐渐修复, 腺体形态结构也恢复正常, 炎性细胞浸润减少。表明青龙白

虎汤能够减轻急性咽炎导致的炎症细胞浸润, 促进腺体及黏膜修复, 以青龙白虎汤高剂量组效果最佳。

3.2.3 青龙白虎汤对急性咽炎大鼠血清中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 和 PGE₂ 水平的影响 如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 地塞米松组和青龙白虎汤高、中剂量组 IL-1 β 、TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 各给药组 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.001)。表明青龙白虎汤能够抑制急性咽炎大鼠血清中炎症因子水平, 减轻炎症损伤, 且呈剂量相关性。



虚线表示炎性细胞浸润。

Dashed line represents infiltration of inflammatory cells.

图 5 青龙白虎汤对急性咽炎大鼠咽喉组织病理变化的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 5 Effect of Qinglong Baihu Decoction on pathological changes of pharyngeal tissue in rats with acute pharyngitis (HE, $\times 200$)

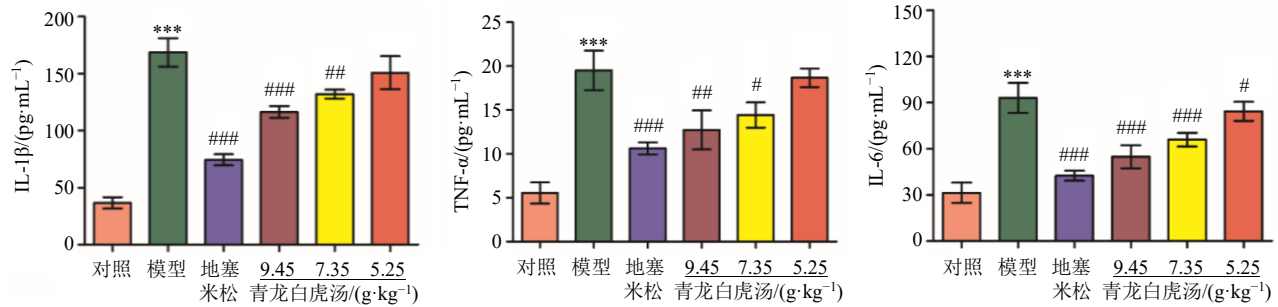


图 6 青龙白虎汤对急性咽炎大鼠血清中 IL-1β、TNF-α、IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Effect of Qinglong Baihu Decoction on levels of IL-1β, TNF-α and IL-6 in serum of rats with acute pharyngitis ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 PGE₂ 水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 地塞米松组和青龙白虎汤高、中剂量组 PGE₂ 水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。表明青龙白虎汤可以抑制急性咽炎大鼠血清中花生四烯酸代谢产物 PGE₂ 的表达, 从而缓解炎症导致的咽部黏膜充血水肿及疼痛等症状。

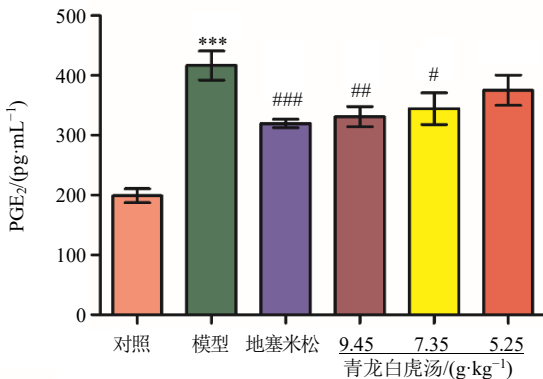


图 7 青龙白虎汤对急性咽炎大鼠血清中 PGE₂ 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Effect of Qinglong Baihu Decoction on PGE₂ level in serum of rats with acute pharyngitis ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

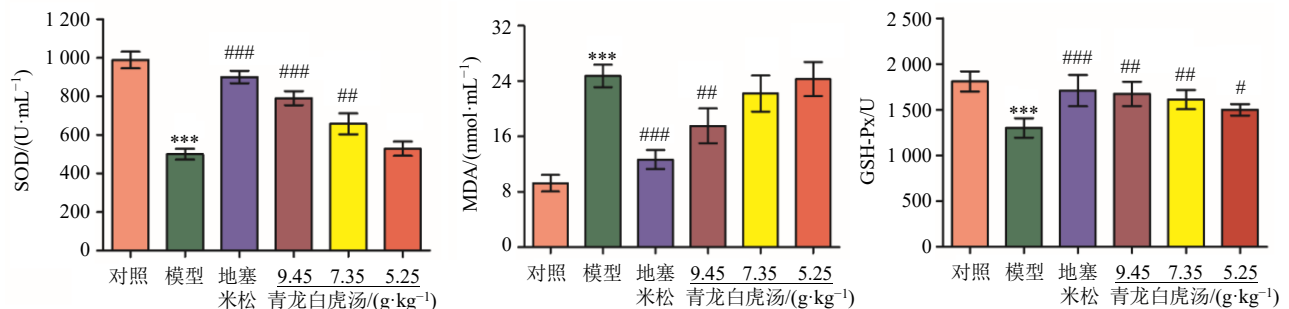


图 8 青龙白虎汤对急性咽炎大鼠血清中 MDA 水平及 SOD、GSH-Px 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 8 Effect of Qinglong Baihu Decoction on MDA level and activities of SOD and GSH-Px in serum of rats with acute pharyngitis ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2.4 青龙白虎汤对急性咽炎大鼠血清和咽喉组织中 MDA 水平及 SOD、GSH-Px 活性的影响 急性咽炎诱导的炎症伴随着氧化与抗氧化系统的失衡。炎症状态下, 由于相关的通路及促炎因子的激活, 细胞氧化还原平衡被打破, 抗氧化应激有助于防止炎症性疾病的发生^[26-27]。如图 8、9 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清和咽喉组织中 SOD 和 GSH-Px 活性显著降低 ($P < 0.001$), MDA 水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组大鼠咽喉组织中 SOD 和 GSH-Px 活性显著升高 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), MDA 水平显著降低 ($P < 0.01, 0.001$); 各给药组大鼠血清中 GSH-Px 活性显著升高 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 地塞米松组和青龙白虎汤高、中剂量组大鼠血清中 SOD 活性显著升高 ($P < 0.01, 0.001$), 地塞米松组和青龙白虎汤高剂量组大鼠血清中 MDA 水平显著降低 ($P < 0.01, 0.001$)。表明青龙白虎汤可以通过抗炎及改善氧化应激水平, 从而发挥对急性咽炎大鼠的保护作用。

3.2.5 青龙白虎汤对急性咽炎大鼠咽喉组织中 TLR4/NF-κB 和 Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白表达的影响 如图 10 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠

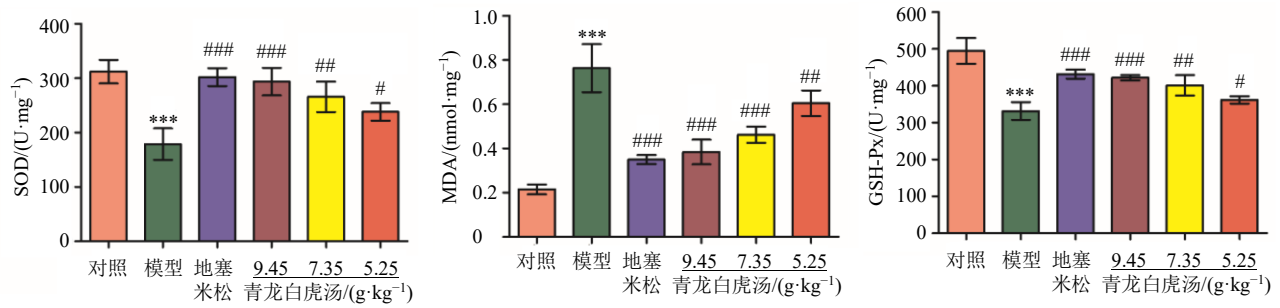


图 9 青龙白虎汤对急性咽炎大鼠咽喉组织中 MDA 水平及 SOD、GSH-Px 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 9 Effect of Qinglong Baihu Decoction on MDA level and activities of SOD and GSH-Px in pharyngeal tissue of rats with acute pharyngitis ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

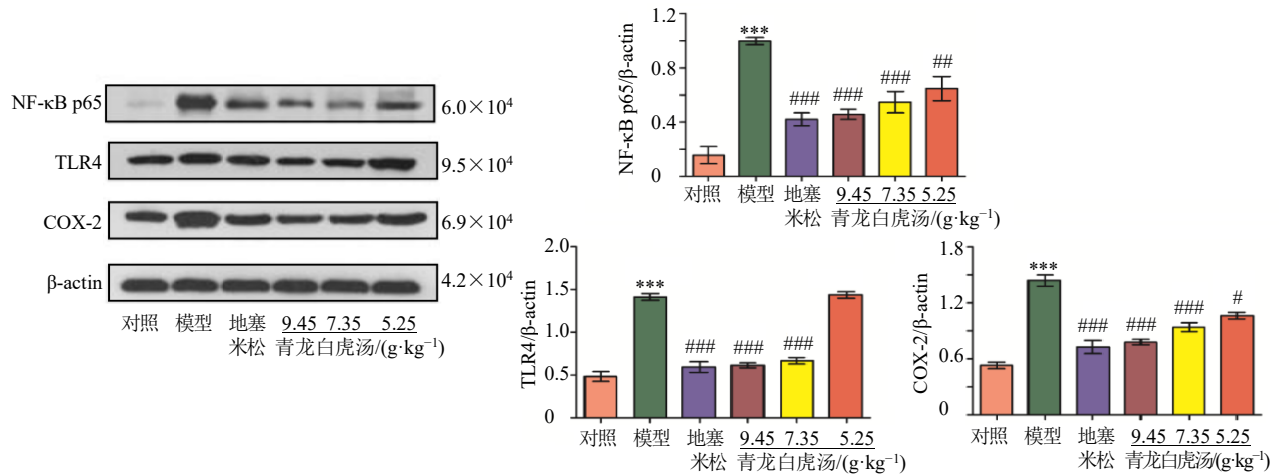


图 10 青龙白虎汤对急性咽炎大鼠咽喉组织中 TLR4/NF-κB 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effect of Qinglong Baihu Decoction on expressions of TLR4/NF-κB signaling pathway related proteins in pharyngeal tissue of rats with acute pharyngitis ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

咽喉组织中 NF-κB p65、TLR4、COX-2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$)；与模型组比较，各给药组大鼠咽喉组织中 NF-κB p65、COX-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，地塞米松组和青龙白虎汤高、中剂量组 TLR4 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$)。如图 11 所示，与对照组比较，

模型组大鼠咽喉组织中 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$)；与模型组比较，各给药组大鼠咽喉组织中 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001)。表明青龙白虎汤可以通过抑制 TLR4/NF-κB 信号通路，激活 Nrf2/HO-1 信号通路，从而改善急性咽炎，与网络药理学预测结果一致。

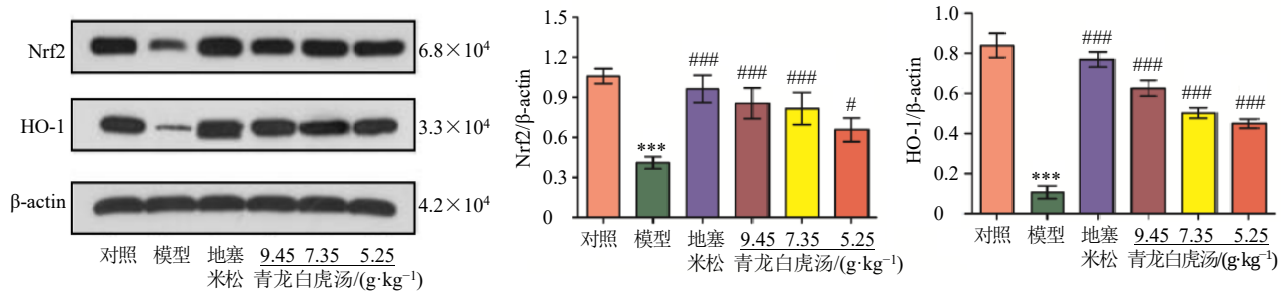


图 11 青龙白虎汤对急性咽炎大鼠咽喉组织中 Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Effect of Qinglong Baihu Decoction on expressions of Nrf2/HO-1 signaling pathway related proteins in pharyngeal tissue of rats with acute pharyngitis ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

急性咽炎在中医上被称为急性咽喉关节炎，具有季节性、顽固性和反复发作的特点。全球咽炎的发病率已高达 50%，严重者可能导致疼痛和残疾。青龙白虎汤是在中医药理论下成方的药食同源方，经历了漫长的历史临床检验，被证实安全有效，疗效确切，具有清热利咽、生津止渴之功。此方所主之证为热毒内盛、上灼咽喉、津液损伤所致，宜清热解毒，宣肺利咽生津，是治疗咽喉疾病良好的药方。但青龙白虎汤治疗急性咽炎的作用及机制尚不明确。

随着生物信息学的快速发展，网络分析已成为研究中药分子机制和途径的一种新方法^[28]。网络分析与网络数据库检索基础的结合，使传统的“药物-靶点-疾病”模式转变为新药开发，适合于研究中医药的作用机制。因此，本研究通过对青龙白虎汤的活性成分和靶标的数据挖掘，构建了青龙白虎汤“药物-成分-靶点”网络以及核心靶点的 PPI 网络，并进行了 GO 功能和 KEGG 通路富集分析，以探索急性咽炎发生发展的可能机制。结果显示，青龙白虎汤的活性成分主要包括多酚和类黄酮如鞣花酸、异柯里拉京、表儿茶素、槲皮素、绿原酸和柚皮苷，可通过激活 TNF、IL-1 β 、AKT1 和 IL-6 等核心靶点，作用于蛋白质磷酸化、对活性氧的反应、细胞因子活性、信号受体激活剂活性、过氧化物酶活性和氧化还原酶活性等生物学过程，调控 NF- κ B 信号通路、百日咳等相关信号通路，从而改善急性咽炎。网络药理学预测的生物学过程结果与中医理论中的青龙白虎汤清热解咽痛^[29]的功效一致。

本研究采用氨水诱导急性咽炎大鼠模型，考察了青龙白虎汤对急性咽炎大鼠的药效作用。结果显示，青龙白虎汤能在一定程度上改善急性咽炎大鼠的体质量降低、咽喉组织和肺组织损伤程度。咽喉组织 HE 染色结果显示，青龙白虎汤能显著减少急性咽炎大鼠咽喉组织炎症细胞的浸润，促进黏膜和腺体的修复，改善咽喉组织的病理结构。ELISA 检测结果显示，青龙白虎汤可不同程度地抑制血清中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、PGE₂ 水平，表明青龙白虎汤可下调炎症因子的表达，从而减轻炎症损伤，缓解炎症引起的咽黏膜充血、水肿和疼痛症状。急性咽炎引起的炎症还伴有氧化和抗氧化系统失衡。通过测定大鼠血清和咽喉组织中 SOD 和 GSH-Px 的活性以及 MDA 的含量，可以间接反映炎症损伤的程

度。结果显示，青龙白虎汤能不同程度地提高 SOD 和 GSH-Px 的活性，降低 MDA 含量。以上结果表明青龙白虎汤可通过抑制炎症反应和增强抗氧化作用，缓解氨水诱导的急性咽炎，与网络药理学预测的抗炎和抗氧化生物调节过程一致。

研究表明，氧化应激和炎症之间有着密切联系，抗氧化应激有助于预防和改善炎症性疾病^[26,30]。抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路和 Nrf2/HO-1 信号通路的激活可有效改善炎症，因此这 2 条信号通路被确定为青龙白虎汤治疗急性咽炎的特征通路。Western blotting 结果显示，与模型组比较，青龙白虎汤可显著降低大鼠咽喉组织中 NF- κ B p65、COX-2 和 TLR4 炎症相关蛋白的表达，上调 Nrf2 和 HO-1 氧化相关蛋白的表达，表明青龙白虎汤可以抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路并激活 Nrf2/HO-1 信号通路，从而发挥改善急性咽炎的作用（图 12），与网络药理学预测的通路一致。

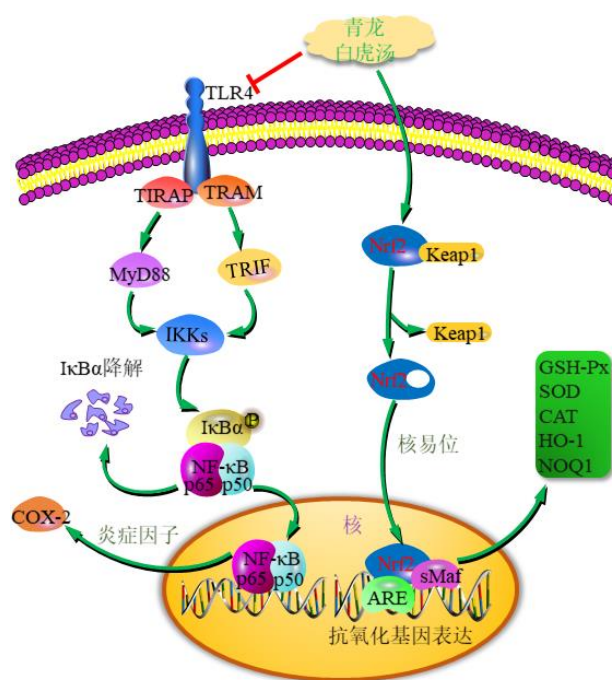


图 12 青龙白虎汤通过 TLR4/NF- κ B 和 Nrf2/HO-1 信号通路治疗急性咽炎

Fig. 12 Qinglong Baihu Decoction treats acute pharyngitis through TLR4/NF- κ B and Nrf2/HO-1 signaling pathways

综上，本研究采用网络药理学探讨了青龙白虎汤改善急性咽炎的作用机制，并通过建立氨水诱导的急性咽炎大鼠模型考察了青龙白虎汤对急性咽炎的药效作用及作用机制。青龙白虎汤可能通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路并激活 Nrf2/HO-1 信号通路，

抑制炎症反应,减轻氧化损伤,从而发挥治疗急性咽炎的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李凡成,徐绍勤. 中西医结合耳鼻咽喉科学 [M]. 北京:人民卫生出版社,2001:271-274.
- [2] 徐敏. 咽喉清复方对急性咽炎 p38/Erk/NF- κ B/COX-2 信号通路调控的影响 [D]. 遵义:遵义医科大学,2020.
- [3] 徐金红. 基于 TLR4/NF- κ B 信号通路探讨紫正地黄汤治疗急性咽炎的机制研究 [D]. 合肥:安徽中医药大学,2020.
- [4] 李岩,陶荆华,汪婧怡,等. 中医外治法治疗急性咽炎的研究进展 [J]. 中国中医急症, 2021, 30(11): 2065-2068.
- [5] 王燕. 金银花、青果复合制品安全毒理学及清咽功能评价 [D]. 兰州:兰州大学,2018.
- [6] 钱雅琴. 疏风解毒胶囊对急性咽炎大鼠血清中 PGE₂、IL-1 β 和 TNF- α 的影响及临床疗效观察 [D]. 合肥:安徽中医药大学,2019.
- [7] 文德鉴,袁丽君,李三字,等. 扁咽宁汤对急性咽炎模型大鼠 Th1/Th2 平衡漂移的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(1): 95-98.
- [8] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 206.
- [9] Chen F Z, Yang L P, Huang Y N, *et al.* Isocorilagin, isolated from *Canarium album* (Lour.) Raeusch, as a potent neuraminidase inhibitor against influenza A virus [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 523(1): 183-189.
- [10] Duan W J, Tan S Y, Chen J, *et al.* Isolation of anti-HIV components from *Canarium album* fruits by high-speed counter-current chromatography [J]. *Anal Lett*, 2013, 46(7): 1057-1068.
- [11] 王凤秀,戴莹,翟华强,等. 中药煎煮历史源流与技术研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2018, 42(2): 109-112.
- [12] 王小鹏,桂新景,王艳丽,等. 中药汤剂煎煮加水量与得液量控制方法研究 [J]. 医药导报, 2021, 40(11): 1528-1533.
- [13] 邢丹. 中药汤剂煎煮技术文献研究 [D]. 北京:北京中医药大学,2014.
- [14] 蒋全德,王景杰,刘琳娜,等. 白萝卜提取物对大鼠胃排空、肠推进及豚鼠离体回肠平滑肌的影响 [J]. 山西医科大学学报, 2007, 38(3): 215-217.
- [15] 张旭,马波,杜钢军,等. 白萝卜提取物对小鼠胃排空、肠推进及家兔离体回肠平滑肌的影响 [J]. 河南大学学报:医学版, 2011, 30(1): 36-38.
- [16] 任秦有,王胜智,张超,等. 莱菔提取物对功能性消化不良患者胃运动功能的影响 [J]. 贵阳中医学院学报, 2011, 33(2): 15-17.
- [17] 清·王士雄著,陆士谔辑,达美君等校注. 王孟英医案 [M]. 北京:中国中医药出版社,1997: 40.
- [18] 陈姣,王继森,邓晶晶,等. 基于量质传递及化学计量学的药食同源名方青龙白虎汤质量控制研究 [J]. 中草药, 2021, 52(13): 3872-3884.
- [19] 汪乐,李佳楠,杨洋,等. 基于网络药理学整合体内实验探究四物汤单味药组分治疗胆汁淤积性肝损伤的作用与机制 [J]. 中草药, 2024, 55(5): 1553-1566.
- [20] 苗明三,常兵杰,白明,等. 急性咽炎动物模型制备规范(草案) [J]. 中药药理与临床, 2018, 34(1): 175-178.
- [21] 贾璐,杭薇,徐幸杰,等. 五味子乙素通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路减轻 PD 小鼠炎症反应及 DA 能神经元凋亡 [J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(4): 427-431.
- [22] Cao C, Yin C F, Shou S T, *et al.* Ulinastatin protects against LPS-induced acute lung injury by attenuating TLR4/NF- κ B pathway activation and reducing inflammatory mediators [J]. *Shock*, 2018, 50(5): 595-605.
- [23] Wang Y P, Huo L L. Role of TLR4/NF- κ B pathway in the damage of acute hypobaric hypoxia to small intestinal mucosa in rats [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2021, 40(1): 79-88.
- [24] Sharma T, Islam N, Ahmad J, *et al.* Correlation between bone mineral density and oxidative stress in postmenopausal women [J]. *Indian J Endocrinol Metab*, 2015, 19(4): 491-497.
- [25] Zhang J, Song N, Liu Y Z, *et al.* Platycodin D inhibits β -amyloid-induced inflammation and oxidative stress in BV-2 cells via suppressing TLR4/NF- κ B signaling pathway and activating Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Neurochem Res*, 2021, 46(3): 638-647.
- [26] 王柏森. 绿原酸通过抑制 TLR4/MAPK/NF- κ B 通路激活自噬抑制炎症和氧化应激 [D]. 长春:吉林大学, 2021.
- [27] Reuter S, Gupta S C, Chaturvedi M M, *et al.* Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(11): 1603-1616.
- [28] 严王惠. 丹参复方降血压的网络药理学探讨及实验验证 [D]. 合肥:合肥工业大学,2019.
- [29] 陈姣,游宇,廖婉,等. 药食同源中药青果的保健功效及现代应用探析 [J]. 中草药, 2021, 52(20): 6442-6454.
- [30] Reuter S, Gupta S C, Chaturvedi M M, *et al.* Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(11): 1603-1616.

[责任编辑 李亚楠]