

基于网络药理学、分子对接及体内外实验探究地八角缓解慢性咽炎的作用机制

何旭东^{1,2}, 杨艾^{1#}, 苏文涛¹, 韩绍聪^{1,2}, 沈娜^{1,2}, 李丽^{1,2}, 周越^{1,2}, 张祎^{1,2*}, 杨兴鑫^{1,2*}

1. 云南中医药大学中药学院, 云南 昆明 650500

2. 云南省南药可持续利用重点实验室, 云南 昆明 650500

摘要: 目的 基于网络药理学、分子对接以及体内外实验, 探究地八角 *Astragalus bhotanensis* 治疗慢性咽炎的作用机制。方法 体外考察地八角提取物对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA)、 β -溶血性链球菌 (*β -hemolytic streptococcus*, HS)、大肠埃希菌 (*Escherichia coli*, EC) 和肺炎双球菌 (*Diplococcus pneumoniae*, DP) 的抗菌活性。建立 HS 诱导的慢性咽炎大鼠模型, 考察地八角提取物的药效作用。利用 PubChem、GeneCards、STRING 等数据库构建地八角提取物与慢性咽炎的相互作用网络, 并借助 Cytoscape 软件筛选核心靶点, 进行基因本体 (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。采用 Autodock vina 软件进行分子对接验证, 并通过 Western blotting 验证预测结果。结果 地八角提取物对 SA、HS、EC、DP 均具有一定的抗菌活性。与模型组比较, 地八角提取物可显著降低慢性咽炎大鼠血清中炎症因子水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 并有效逆转咽部组织的病理损伤。网络药理学分析表明, 地八角提取物可能通过调控丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 和磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 等信号通路, 作用于热休克蛋白 90 α 家族 B 类成员 1 (heat shock protein 90 alpha family class B member 1, HSP90AB1)、磷脂酰肌醇-3-激酶催化亚基 α (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha, PIK3CA)、MAPK1、MAPK3、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 和雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1) 等靶点, 从而发挥治疗慢性咽炎的作用。分子对接结果表明, 油酸、7 β -羟基谷甾醇、astrabhotin A 与 MAPK 蛋白具有良好的结合能力。Western blotting 结果显示, 地八角提取物可显著降低慢性咽炎大鼠咽部组织 TLR4 蛋白表达以及核因子- κ B p65 (nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p65) 和 p38 MAPK 的磷酸化水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 地八角提取物通过调控 TLR4/p38 MAPK/NF- κ B p65 信号通路缓解 HS 诱导的大鼠慢性咽炎。

关键词: 地八角; 慢性咽炎; 抗菌; 抗炎; TLR4/p38 MAPK/NF- κ B 信号通路; 甘草素; 异甘草素; 胡萝卜苷

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)02-0553-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.02.015

Mechanism of *Astragalus bhotanensis* in alleviating chronic pharyngitis based on network pharmacology, molecular docking, *in vitro* and *in vivo* experiments

HE Xudong^{1,2}, YANG Ai¹, SU Wentao^{1,2}, HAN Shaocong^{1,2}, SHEN Na^{1,2}, LI Li^{1,2}, ZHOU Yue^{1,2}, ZHANG Yi^{1,2}, YANG Xingxin^{1,2}

1. School of Chinese Materia Medica, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

2. Yunnan Provincial Key Laboratory of Sustainable Utilization of Southwestern Medicinal Resources, Kunming 650500, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of *Astragalus bhotanensis* (AB) against chronic pharyngitis based on network pharmacology, molecular docking, *in vitro* and *in vivo* experiments. **Methods** The antibacterial activity of AB extract against *Staphylococcus aureus* (SA), *β -hemolytic streptococcus* (HS), *Escherichia coli* (EC) and *Diplococcus pneumoniae* (DP) was assessed

收稿日期: 2025-09-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82060707)

作者简介: 何旭东, 男, 博士研究生, 研究方向为中药药效物质研究。E-mail: 2758251701@qq.com

#共同第一作者: 杨艾, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药理研究。E-mail: 469082087@qq.com

*通信作者: 杨兴鑫, 男, 博士, 教授, 研究方向为中药药效物质分析。E-mail: yxx78945@163.com

张祎, 女, 博士, 教授, 研究方向为中药药理研究。E-mail: zhangyi@ynucm.edu.cn

in vitro. A chronic pharyngitis rat model induced by HS was established and the pharmacological effects of AB extract was investigated. The interaction network between AB extract and chronic pharyngitis was constructed using databases such as PubChem, GeneCards, and STRING, and core targets were screened using Cytoscape software, followed by gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis. Molecular docking was performed using Autodock vina software, and the predicted results were verified by Western blotting. **Results** AB extract showed certain antibacterial activity against SA, HS, EC and DP. Compared with model group, AB extract significantly reduced the levels of inflammatory factors in serum of rats with chronic pharyngitis ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and effectively reversed the pathological damage of pharyngeal tissue. Network pharmacology analysis suggested that AB extract may act on targets such as heat shock protein 90 alpha family class B member 1 (HSP90AB1), phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA), MAPK1, MAPK3, epidermal growth factor receptor (EGFR) and estrogen receptor 1 (ESR1) by regulating signaling pathways such as mitogen activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt), thereby exerting therapeutic effects on chronic pharyngitis. The molecular docking results showed that oleic acid, 7 β -hydroxysterol and astrabhotin A had good binding ability with MAPK protein. Western blotting results showed that AB extract significantly reduced TLR4 protein expression and phosphorylation levels of nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65) and p38 MAPK in pharyngeal tissue of chronic pharyngitis rats ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** AB extract alleviates HS-induced chronic pharyngitis in rats by regulating TLR4/p38 MAPK/NF- κ B p65 signaling pathway.

Key words: *Astragalus bhotanensis* Baker; chronic pharyngitis; antibiosis; anti-inflammatory; TLR4/p38 MAPK/NF- κ B signaling pathway; liquiritigenin; isoliquiritigenin; carotenoids

咽炎是一种普遍存在的上呼吸道炎症性疾病，其临床表现包括咽喉部瘙痒、干燥、疼痛、咳嗽以及异物感或喉部阻塞等症状^[1]，对患者的日常生活质量造成了显著影响。慢性咽炎通常由细菌或病毒感染引起，也可能由于化学或物理性刺激而发生。细菌性咽炎最常见的病原体包括 β -溶血性链球菌 (β -hemolytic streptococcus, HS) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA) ^[2-3]。在慢性咽炎病例中，HS 感染是导致咽部损伤的先决条件^[4]。目前，慢性咽炎的治疗主要依赖于糖皮质激素、抗生素和非甾体抗炎药^[5]。然而，这些药物的长期应用可能会引发包括胃黏膜损伤、肝脏损害或肾脏功能损伤在内的多种不良反应^[6]。

中药因其明确的疗效、较低的不良反应以及多成分、多靶点的相互作用机制，被视为药物研发领域的关键资源。通过系统挖掘传统中药的民间应用，有望发掘出针对慢性咽炎安全且高效的治疗药物。《中华本草》和《中药大词典》中记载地八角 *Astragalus bhotanensis* Baker 具有清热解毒、利尿止泻之功效，民间常用于治疗咽喉肿痛、咳嗽、牙痛、口鼻出血等。前期研究从地八角中分离出 14 种化合物，包括 α -D-葡萄糖、 β -D-葡萄糖、白雀木醇、3-羟基丙酸、油酸、异甘草素、甘草素、芳香膜菊素、7 β -羟基谷甾醇、胡萝卜苷以及 astrabhotin A 等^[7]。然而，目前尚未见关于地八角对慢性咽炎致病菌的抗菌作用、对慢性咽炎的干预作用及其机制的相关报道，严重制约地八角的药物开发与临床安全用药。

因此，本研究考察地八角对 SA、大肠埃希菌 (*Escherichia coli*, EC)、HS 和肺炎双球菌 (*Diplococcus pneumoniae*, DP) 活性的抑制作用；通过复制 HS 诱导的慢性咽炎大鼠模型，评价地八角的药效作用；采用网络药理学与分子对接方法，借助高通量筛选、网络分析及网络可视化等技术手段，对地八角缓解慢性咽炎的潜在机制进行预测，并通过 Western blotting 进行验证，旨在为地八角防治 HS 诱导的慢性咽炎的临床应用与推广提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 (体质量 200~220 g) 和昆明种小鼠 (体质量 18~22 g)，均由北京斯贝福生物科技有限公司提供，动物生产许可证号 SCXK (京) K2024-0001，动物质量合格证号 110324251105659571。动物于温度 18~22 °C、相对湿度 50%~60%、12 h 光暗交替照明的环境中饲养。本动物实验方案已通过云南中医药大学动物实验伦理委员会审查批准 (批准号 R-062022120)。

1.2 菌株

SA [菌种编号 CMCC(B)26003, 批号 211220]、EC [菌种编号 CMCC(B)44102, 批号 220313] 和 HS [菌种编号 CMCC(B)32210, 批号 32210-5a1] 购自中国食品药品检定研究院；DP (菌种编号 ATCC6305, 批号 210717) 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

1.3 药材

地八角采自云南省宣威市,经云南中医药大学杨兴鑫教授鉴定为豆科植物地八角 *A. bhotanensis* Baker, 标本(凭证号 YXX20220313)存放于云南中医药大学中医药预防代谢性疾病重点实验室。

1.4 药品与试剂

蛋白质定量试剂盒(批号 A423250912)购自碧云天生物科技有限公司;麦氏比浊管(批号 20220423)、RIPA 裂解缓冲液(批号 20221222)、四环素(批号 20210909)购自北京索莱宝科技有限公司;醋酸泼尼松片(批号 150520)购自浙江仙居制药股份有限公司;蛋白磷酸酶抑制剂(批号 716427)购自 MedChemExpress 公司;脑心浸出液肉汤培养基(批号 HB4120)购自广东环凯微生物科技有限公司;对照品异甘草素(质量分数>98%,批号 20112401)、甘草素(质量分数>98%,批号 21052404)、胡萝卜苷(质量分数>98%,批号 22022402)购自成都格利普生物科技有限公司;三酰甘油(triglycerides, TG)试剂盒(批号 20220713)、总胆固醇(total cholesterol, TC)试剂盒(批号 20220716)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒(批号 20220614)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒(批号 20220612)、总蛋白(total protein, TP)试剂盒(批号 20220417)、尿素氮(urea nitrogen, BUN)试剂盒(批号 20220516)、白蛋白(albumin, ALB)试剂盒(批号 20220315)购自南京建成生物医学工程研究所;白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)试剂盒(批号 202219237R)、IL-1 β 试剂盒(批号 202219075R)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)试剂盒(批号 220919041R)、前列腺素 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)试剂盒(批号 202219016R)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)试剂盒(批号 202219026R)、细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)试剂盒(批号 202219049R)、C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)试剂盒(批号 202219004R)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)试剂盒(批号 202219015R)、环氧酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)试剂盒(批号 202219978R)、白三烯 C₄(leukotriene C₄, LTC₄)试剂盒(批号 202219116R)购自江苏酶联生物技术有限公司;p38 丝裂原活化

蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)抗体(批号 00170897)、磷酸化 p38 MAPK(phosphorylated p38 MAPK, p-p38 MAPK)抗体(批号 00174533)、核因子- κ B p65(nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p65)抗体(批号 22004671)、磷酸化 NF- κ B p65(phosphorylated NF- κ B p65, p-NF- κ B p65)抗体(批号 22014551)、Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)抗体(批号 00171151)、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(批号 00139414)、黏着斑蛋白(Vinculin)抗体(批号 00191416)、HRP 标记的兔源二抗(批号 20001572)购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.5 仪器

Ultimate3000 型高效液相色谱仪(赛默飞世尔科技有限公司);XS-900i 型全自动血液分析仪(华鑫科技有限公司);SF-TGL-18R 型离心机(上海菲恰儿分析仪器有限公司);DEP-300HC 型电泳仪(大龙兴创实验仪器股份公司);NIKON ECLIPSE E100 型显微镜(日本尼康公司);Readmax1900 型酶标仪(上海闪谱生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 地八角提取物的制备及成分分析

2.1.1 地八角提取物的制备 地八角加 8 倍体积水浸泡 30 min,煎煮 60 min(煮沸时开始计时),收集滤液;药渣再用 10 倍体积 80%乙醇进行回流提取 60 min,收集滤液;合并 2 次滤液。滤液减压浓缩至浸膏状,转移至冻干机中,冷冻干燥得冻干粉,至干燥器中保存备用,临用时用生理盐水配制溶液。

2.1.2 地八角提取物的成分分析 采用高效液相色谱法分析地八角提取物中的成分,所用设备包括四通泵、自动进样器、柱温箱以及带在线脱气器的二极管阵列检测器。色谱条件:Agilent HPLC ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液,等度洗脱[甘草素(乙腈-0.1%磷酸水溶液 45:55)、异甘草素(乙腈-0.1%磷酸水溶液 40:60)、胡萝卜苷(乙腈-0.1%磷酸水溶液 75:25)];检测波长为甘草素 275 nm、异甘草素 370 nm、胡萝卜苷 205 nm;柱温 30 $^{\circ}$ C;体积流量 1.0 mL/min;进样体积 10 μ L。对照品甘草素、异甘草素和胡萝卜苷溶解于甲醇中,制备成质量浓度为 0.1 mg/mL 的对照品溶液。地八角提取物同样溶解于甲醇中,制备成质量浓度为 25 mg/mL 的供试品溶液。通过高效液相色谱法测得地八角提

取物中甘草素、异甘草素和胡萝卜苷的含量分别为 198、449、226 $\mu\text{g/g}$ 。

2.2 地八角提取物的抗菌活性测定

将 SA、EC、HS 和 DP 菌株接种在 5% 脑心浸出液肉汤培养基琼脂平板上, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。使用无菌接种环将形态相似的数个菌落 (4~5 个) 转移到脑心浸出液肉汤液体培养基中, 培养至浊度达到 0.5 麦氏比浊标准。将处于对数生长期的菌液用无菌生理盐水调整浊度, 使其与 0.5 麦氏比浊标准一致, 制备成细菌悬浮液。使用无菌棉签将该悬浮液均匀涂布于脑心浸出液肉汤培养基琼脂平板上, 以确保培养后形成均匀的菌苔。用移液枪将地八角提取物 (0.5、1.0、1.5 g/mL) 滴加到平板上。将无菌滤纸片 (直径 6 mm) 等距离放置于平板的 4 个角附近, 每组设置 3 个重复。让平板静置 5 min 以使药物扩散, 然后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。使用透明尺测量平板周围抑菌圈的直径来确定抗菌活性。以四环素 (2.5 mg/mL) 和无菌生理盐水分别作为阳性对照和阴性对照。

采用琼脂稀释法测定最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)。将地八角提取物加入平板计数琼脂培养基中, 制备琼脂稀释生物测定平板。待培养基凝固后, 向其表面添加 1~2 μL 细菌悬浮液。每个处理均设置 3 个重复, 平板于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。以仅含有培养基的平板作为阴性对照组, 以四环素作为阳性对照组, 通过肉眼观察判定结果。MIC 定义为能够完全抑制细菌生长的最低药物浓度。

2.3 地八角对 HS 诱导的慢性咽炎大鼠模型的疗效评价

2.3.1 分组与给药 雄性 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、醋酸泼尼松片 (6.25 mg/kg) 组和地八角提取物低、中、高剂量 (0.25、0.50、1.00 g/kg , 分别相当于临床等效剂量的 1、2、4 倍)^[4] 组, 每组 6 只。各给药组 ig 相应药物 (5 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积的蒸馏水, 1 次/d, 连续给药 30 d。

2.3.2 慢性咽炎模型的复制 给药第 16 天, 依据文献方法^[8], 模型组和给药组构建由 HS 引发的大鼠慢性咽炎模型。使用经过灭菌处理的镊子将大鼠的上颌口颊翻开, 随后利用注射器以近乎水平的角度对黏膜进行点刺, 并注入 0.02 mL 含有 HS (1×10^8 CFU/mL) 的菌液, 每 3 天注射 1 次, 共注射 5 次。造模成功时, 大鼠会出现精神萎靡、频繁饮水、毛发失去光泽等表现, 并且可能会出现死亡的情

况, 同时在咽部会出现红肿以及伴有少量黄色分泌物的病理改变。

2.3.3 样本采集 末次给药后, 大鼠禁食 12 h (不禁水), ip 1% 戊巴比妥钠溶液 (40 mg/kg) 麻醉。腹主动脉血, 室温静置 1 h 后, 3 000 r/min (离心半径 8 cm) 离心 15 min, 分离血清。于环状软骨水平切断食管和气管, 从咽后壁向上分离并摘取咽部组织及黏膜下组织, 一部分样本置于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 于常温下保存 24 h; 另一部分样本置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存, 以备后续检测。

2.3.4 血清指标检测 取大鼠血清, 按照试剂盒说明书检测血清中 COX-2、IL-1 β 、PGE₂、TNF- α 、5-HT、MCP-1、CRP、ICAM-1、IL-6 和 LTC₄ 的水平。

2.3.5 咽部组织苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色 取大鼠咽部组织, 经乙醇梯度脱水与二甲苯透明化后, 石蜡包埋并制备切片。切片烘干后依次完成脱蜡与乙醇化, 随后在苏木素染色液中浸泡 3~5 min, 经自来水冲洗后以分化液处理至返蓝。切片在乙醇中脱水 5 min, 于伊红染液中染色 5 min, 再经乙醇梯度脱水和二甲苯透明化, 以中性树胶封片。于显微镜下观察并拍照。

2.4 网络药理学预测地八角治疗慢性咽炎的作用机制

2.4.1 地八角活性成分收集与靶点预测 通过 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), 检索并确定地八角中活性成分对应的靶基因。

2.4.2 慢性咽炎相关基因的收集 在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>) 和 DisGeNET 数据库 (<https://www.disgenet.org/>) 中检索“慢性咽炎”相关基因, 对检索结果进行整理、合并, 并去除重复条目, 以确保数据的全面性和非重复性。

2.4.3 药物与疾病靶点的交集分析 将地八角活性成分对应的靶基因和慢性咽炎相关基因输入 Venny2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/>), 生成维恩图, 交集靶基因代表药物治疗疾病的潜在靶点。

2.4.4 核心作用靶点的筛选及蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建 将交集靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>), 选择“homo sapiens”作为生物体, 置信度分数设为 ≥ 0.9 (最高置信度)。排除孤立靶点, 网

络中的靶点被视为药物治疗疾病的核心靶点。将结果以 TSV 格式保存并导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行分析。利用 Cytoscape 中的“Generate Style from Statistics”工具设置网络,节点的大小和颜色梯度与度值相对应。

2.4.5 “中药-活性成分-核心靶点”网络的构建 将经过整理的包含地八角活性成分和核心靶点的 Excel 表格导入 Cytoscape 3.9.1 软件,构建“中药-活性成分-核心靶点”网络。该网络直观地展示了药物治疗疾病的分子机制,并对其重要性进行评估。

2.4.6 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 将药物治疗疾病的潜在核心靶点导入 DAVID 数据库,设置物种为“homo sapiens”,阈值小于 0.01。进行 GO 生物过程 (biological process, BP)、GO 细胞组分 (cellular component, CC)、GO 分子功能 (molecular function, MF) 和 KEGG 通路的富集分析,整理并保存分析报告,利用生物信息学网站 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 将结果以条形图和气泡图的形式可视化。

2.4.7 分子对接验证 从 PDB 数据库 (<http://www.pdb.org/>) 和 PubChem 数据库 (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 分别检索靶蛋白的晶体结构和活性分子的三维结构。利用 AutodockTools 4 采用半柔性对接协议,确定活性分子与靶蛋白分子的结合亲和力。结合能 ≤ 0 表明化合物能够与靶蛋白分子结合并相互作用,结合能 < -5 kcal/mol (1 kcal/mol = 4.182 kJ/mol) 则表明它们之间具有较强的亲和力。

2.5 Western blotting 检测咽部组织 TLR4/p38 MAPK/NF- κ B 通路相关蛋白表达

取大鼠咽部组织,加入 RIPA 裂解液, 4°C 条件下进行研磨,随后在冰上静置 30 min。3 500 r/min (离心半径为 8 cm) 离心 15 min,收集上清液,采用 BCA 法定量分析蛋白浓度,并进行变性处理。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,加入 5% 脱脂牛奶,室温封闭后,用 TBST 洗涤 3 次,每次 15 min,分别加入 TLR4、p-p38 MAPK、p38 MAPK、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、 β -actin、Vinculin 一抗 (稀释比例均为 1:1 000), 4°C 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次,每次 15 min,加入相应二抗 (稀释比例为 1:5 000),室温孵育 2 h。TBST 洗涤 3 次,每次 15 min,加入 ECL 化学发光试剂显色后,将膜置于化学发光成像系统中进行成像。以 β -actin、Vinculin 作为内参蛋白,使用 Image J 软件对各目标蛋白的条带灰度值进行分析,以目标蛋白与内参蛋白的灰度值比值来表示蛋白的相对表达水平。

2.6 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间的比较采用单因素方差分析,两两比较则使用 LSD 检验。

3 结果

3.1 地八角提取物的抗菌活性

地八角提取物对 SA、EC、HS、DP 的生长抑制活性如表 1 所示,地八角提取物对 SA、EC、HS 和 DP 的 MIC 分别为 0.250、0.250、0.125、0.250 g/mL,表明地八角提取物对诱导慢性咽炎的相关菌有一定抗菌活性。

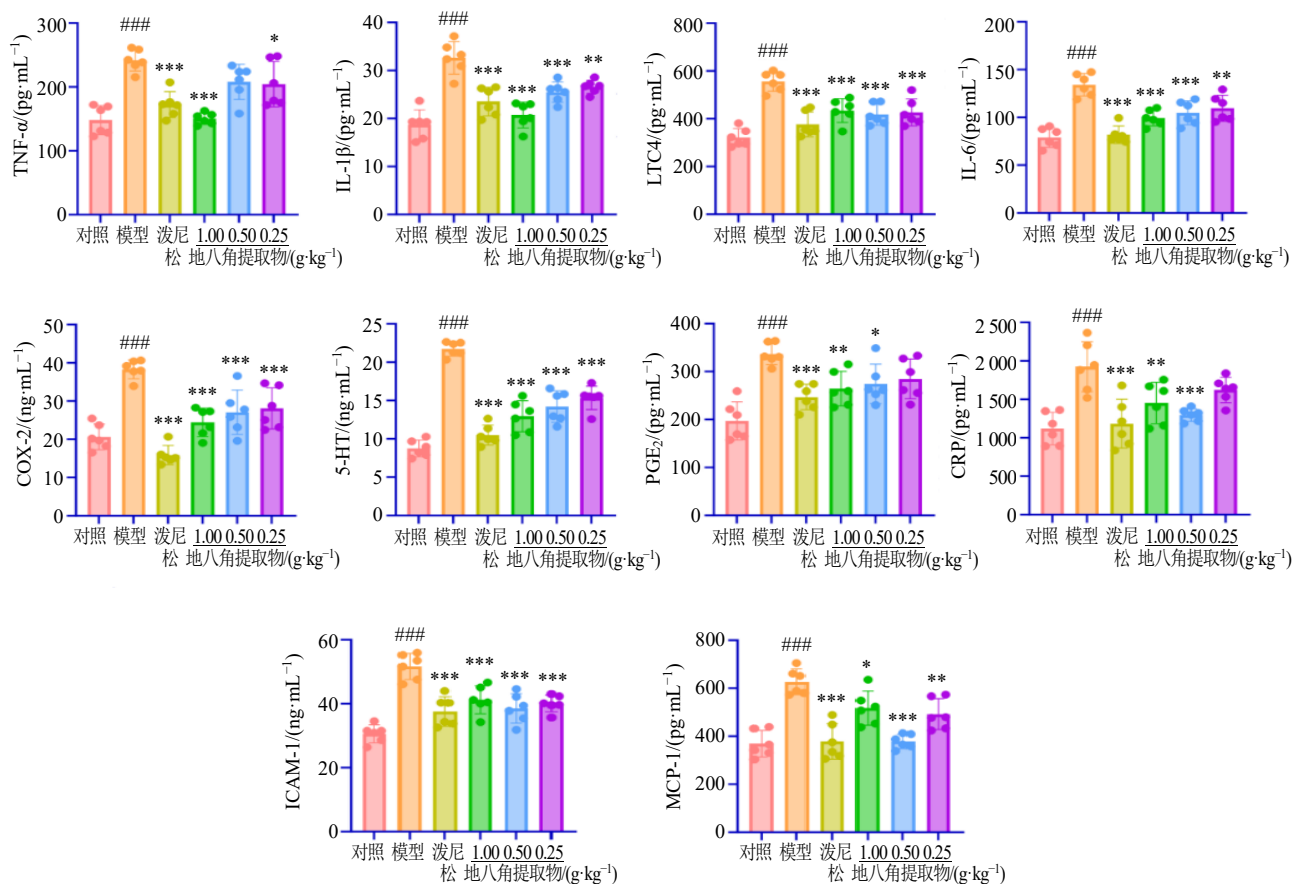
3.2 地八角提取物对 HS 诱导的慢性咽炎大鼠的药效作用

3.2.1 地八角提取物对 HS 诱导的慢性咽炎大鼠血清中炎症因子水平的影响 如图 1 所示,与对照组比较,模型组大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、LTC₄、IL-6、COX-2、5-HT、PGE₂、CRP、ICAM-1 和 MCP-1 水平显著升高 ($P < 0.001$);与模型组比较,泼尼松组和地八角提取物高剂量组 TNF- α 、IL-1 β 、LTC₄、IL-6、COX-2、5-HT、PGE₂、CRP、ICAM-1 和 MCP-1 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001),地八角提取物中剂量组 IL-1 β 、LTC₄、IL-6、COX-2、

表 1 地八角提取物对 HS、DP、EC、SA 的抑菌圈直径 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Inhibition zone diameters of *A. bhotanensis* extract against HS, DP, EC and SA ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	质量浓度/(g·mL ⁻¹)	抑菌圈直径/mm			
		SA	EC	HS	DP
地八角提取物	0.5	20.6 \pm 1.7	14.0 \pm 1.4	12.3 \pm 1.2	10.6 \pm 1.2
	1.0	13.3 \pm 1.2	7.3 \pm 0.5	14.0 \pm 1.2	12.0 \pm 1.6
	1.5	10.6 \pm 2.3	8.0 \pm 0.8	10.0 \pm 0.8	8.6 \pm 1.2
四环素	2.5 \times 10 ⁻³	26.6 \pm 1.7	21.6 \pm 0.5	21.6 \pm 3.2	19.6 \pm 2.5



与对照组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 图 8 同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as Fig. 8.

图 1 地八角提取物对 HS 诱导的慢性咽炎大鼠血清中炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 1 Effect of *A. bhotanensis* extract on levels of inflammatory factors in serum of rats with HS-induced chronic pharyngitis ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

5-HT、PGE₂、CRP、ICAM-1 和 MCP-1 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.001), 地八角提取物低剂量组 TNF- α 、IL-1 β 、LTC₄、IL-6、COX-2、5-HT、ICAM-1 和 MCP-1 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。表明地八角提取物能够抑制 HS 引起的炎症反应, 从而缓解大鼠慢性咽炎。

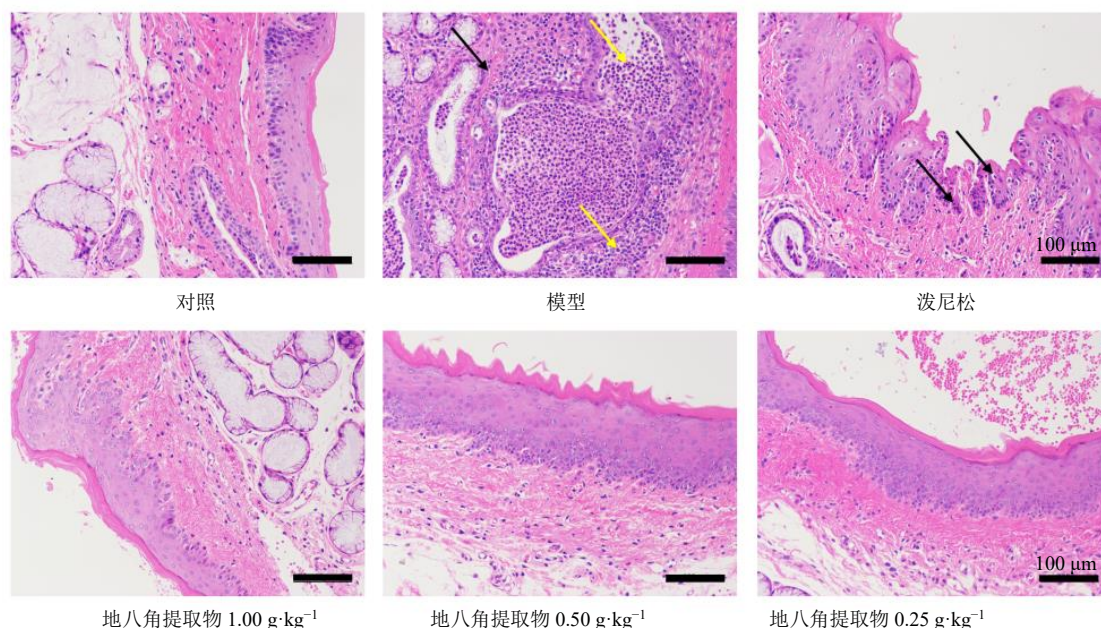
3.2.2 地八角提取物对 HS 诱导的慢性咽炎大鼠咽部组织病理变化的影响 如图 2 所示, 与对照组比较, HS 诱导大鼠咽部黏膜层的鳞状上皮细胞增殖, 导致黏膜上皮变厚, 固有层腺体出现坏死, 同时伴有炎性细胞的浸润。与模型组比较, 地八角提取物干预后大鼠咽部组织的病理变化明显减轻。表明地八角提取物能有效改善由 HS 引起的咽部组织病理变化。

3.3 网络药理学分析结果

3.3.1 地八角提取物治疗慢性咽炎潜在靶点的获取 如图 3 所示, 地八角提取物潜在的作用靶点共

205 个, 慢性咽炎特异性靶点共 2 306 个, 二者交集靶点 150 个。

3.3.2 PPI 网络分析 如图 4 所示, 将 150 个共同靶点数据导入 STRING 数据库以获取蛋白质相互作用信息, 并借助 Cytoscape 3.9.1 软件中的 Generate Style from Statistics 进行网络设置, 依据度中心性 (degree centrality, DC) 值的中位数进行 2 次筛选, 最终确定热休克蛋白 90 α 家族 B 类成员 1 (heat shock protein 90 alpha family class B member 1, HSP90AB1, DC=12)、磷脂酰肌醇-3-激酶催化亚基 α (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha, PIK3CA, DC=14)、PIK3CB (DC=13)、MAPK1 (DC=12)、MAPK3 (DC=11)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR, DC=16) 和雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1, DC=13) 等靶点具有较高的度



黄色箭头表示黏膜鳞状上皮增生；黑色箭头表示固有层腺体坏死。

Yellow arrows indicate squamous epithelial hyperplasia of mucosa; Black arrows denote necrosis of lamina propria glands.

图 2 地八角提取物对 HS 诱导的慢性咽炎大鼠咽部组织病理变化的影响 (HE, ×100)

Fig. 2 Effect of *A. bhotanensis* extract on pathological changes of pharyngeal tissues in rats with HS-induced chronic pharyngitis (HE, × 100)

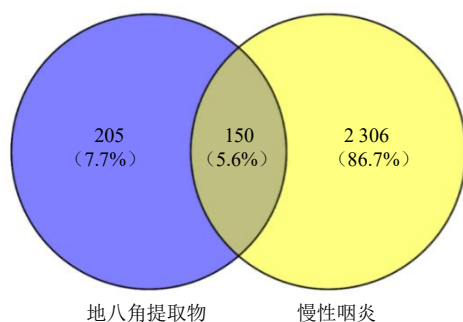


图 3 地八角提取物治疗慢性咽炎的交集靶点 Venn 图

Fig. 3 Venn diagram of intersecting targets of *A. bhotanensis* extract in treatment of chronic pharyngitis

值。这些靶点在 PPI 网络中的核心地位表明，它们可能在地八角提取物治疗慢性咽炎的作用机制中发挥关键作用。

3.3.3 GO 功能及 KEGG 通路富集分析 GO 功能富集分析识别出 844 个显著条目，其中 BP 条目 608 个、CC 条目 88 个、MF 条目 148 个，主要涉及外界刺激的反应、基因表达的调控、细胞信号传递、细胞结构和功能的维持等，对各类别中排名前 10 的条目进行可视化展示 (图 5-A)。KEGG 通路富集分析共得到 159 条信号通路，主要包括 MAPK 信号

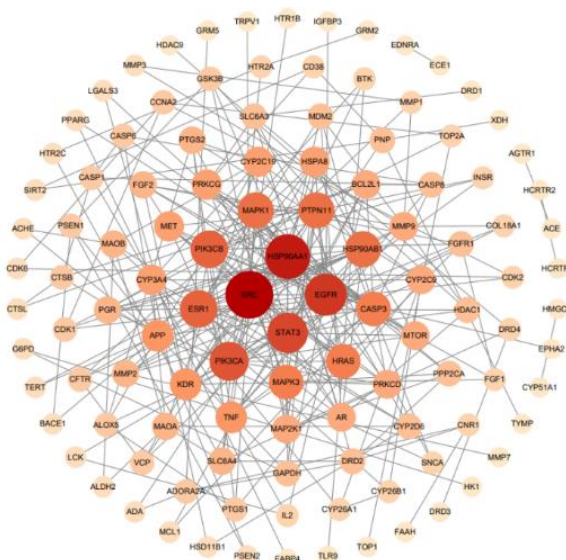


图 4 PPI 网络

Fig. 4 PPI network

通路、癌症相关通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药通路以及磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路，提示地八角提取物可能通过调节多种抗炎等相关信号通路对慢性咽炎发挥治疗作用。对排名前 20 条信号通路进行可视化展示 (图 5-B)。在

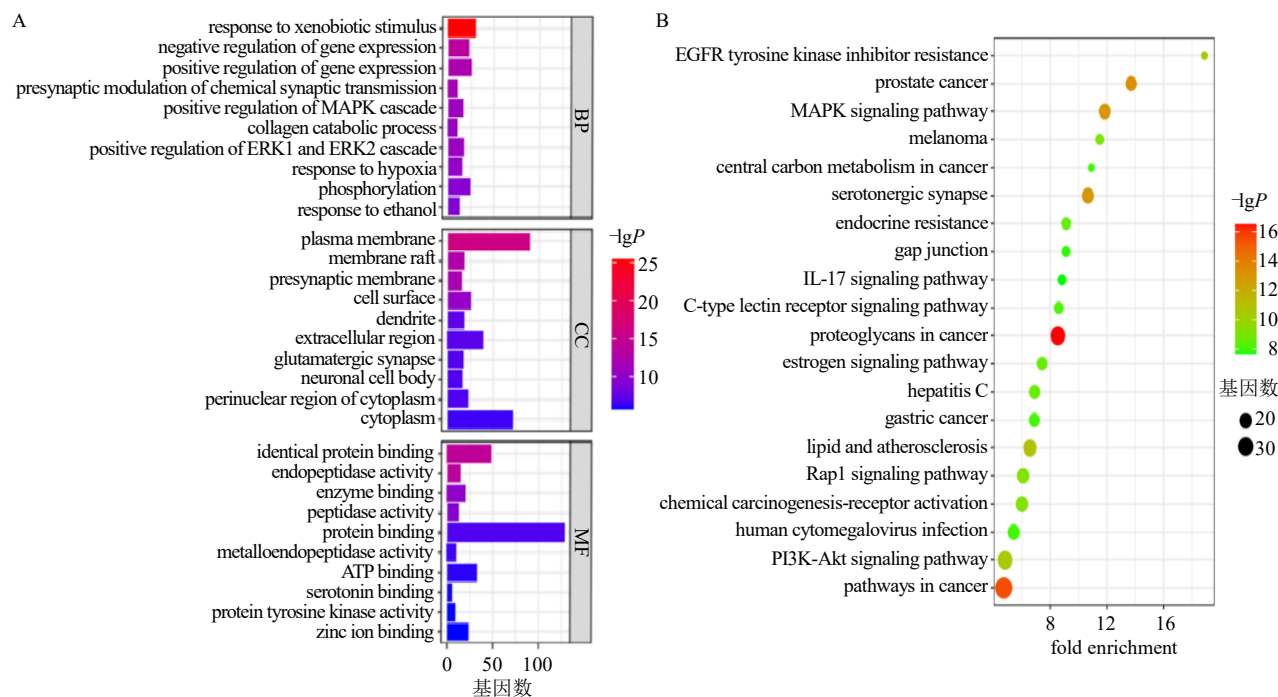


图 5 地八角提取物治疗慢性咽炎关键靶点的 GO 功能 (A) 和 KEGG 通路 (B) 富集分析

Fig. 5 GO function (A) and KEGG pathway (B) enrichment analysis of key targets of *A. bhotanensis* extract in treatment of chronic pharyngitis

KEGG 通路分析中, MAPK 信号通路排名靠前, 并通常与炎症性疾病中的炎症应答密切相关。鉴于慢性咽炎的病理特征以及地八角提取物在降低血清炎症因子水平和减轻咽部炎症细胞浸润方面的显著效果, 本研究将 MAPK 信号通路作为探究其抗炎作用潜在机制的重点研究对象。

3.3.4 分子对接验证 基于地八角提取物的生物活性成分与慢性咽炎病理靶点之间的相互作用, 利

用 Cytoscape 3.9.1 软件构建了 1 个“药物-活性成分-靶点-疾病”网络 (图 6)。分析表明, 地八角中多种生物活性成分 (如油酸、7β-羟基谷甾醇、astrabhotin A 等) 对 MAPK 信号通路具有调控作用。选择油酸 (DC=30)、7β-羟基谷甾醇 (DC=16)、astrabhotin A (DC=24) 与 MAPK 靶点蛋白进行对接 (图 7)。结果显示, 地八角提取物多种活性成分与慢性咽炎关键蛋白都具有较好的结合活性。

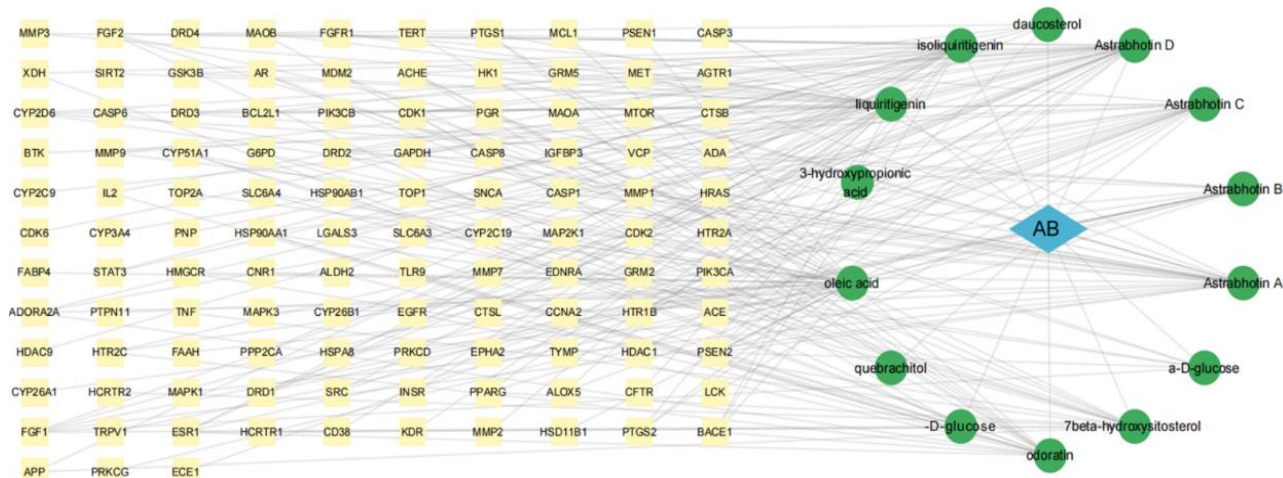


图 6 “药物-活性成分-靶点-疾病”网络

Fig. 6 “Drug-active ingredient-target-disease” network

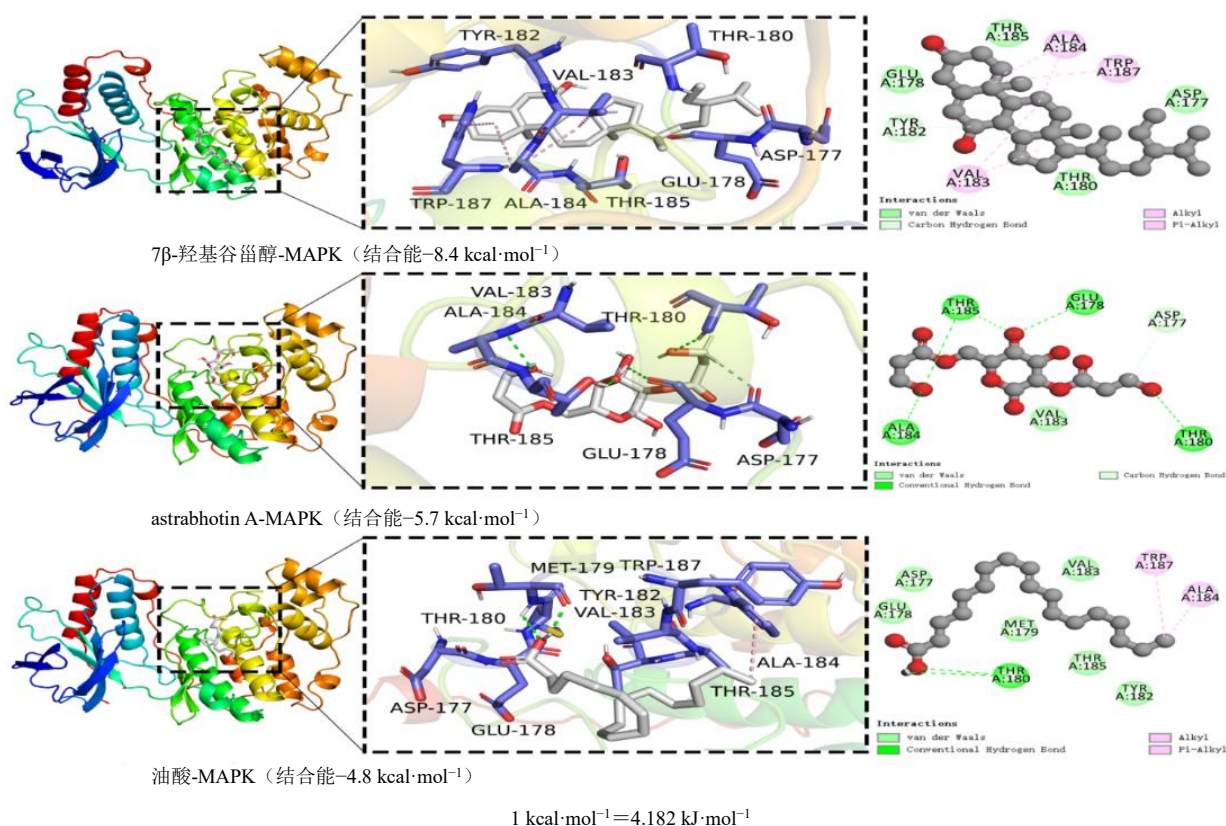


图 7 地八角提取物活性成分与关键靶点的分子对接图

Fig. 7 Molecular docking of active ingredient of *A. bhotanensis* extract and key targets

3.4 地八角提取物对 HS 诱导的慢性咽炎大鼠咽部组织 TLR4/p38 MAPK/NF-κB 信号通路相关蛋白表达的影响

如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠咽部

组织 NF-κB p65、p38 MAPK 的磷酸化与 TLR4 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), NF-κB p65、p38 MAPK 水平未见明显变化。与模型组比较, 地八角提取物高、中剂量组 NF-κB p65、p38 MAPK 的

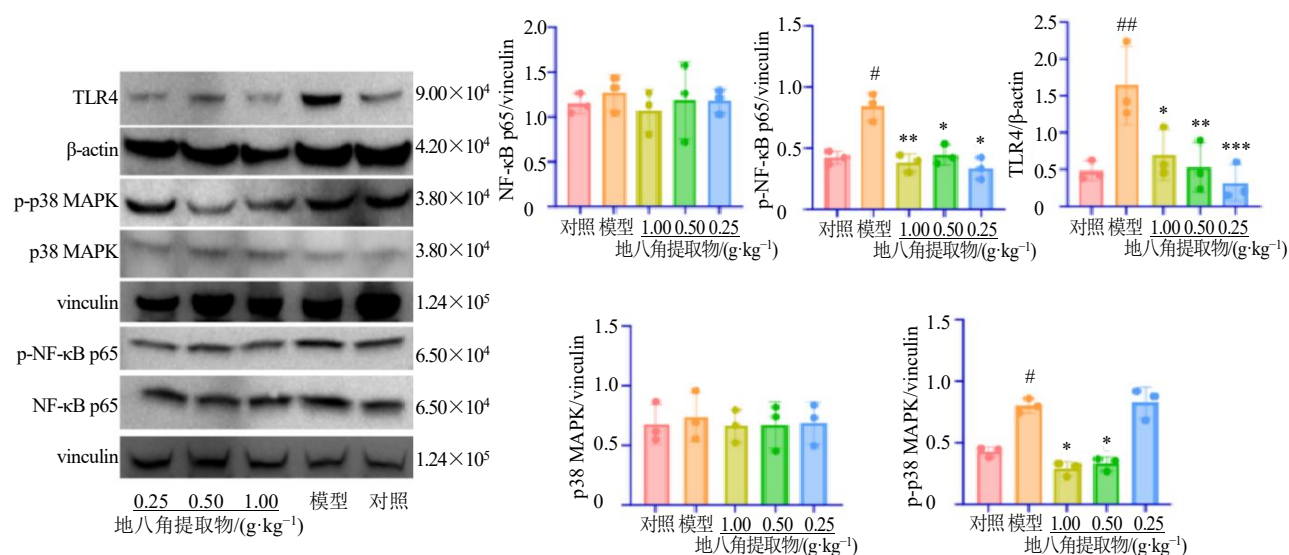


图 8 地八角提取物对 HS 诱导的慢性咽炎大鼠咽部组织 TLR4/p38 MAPK/NF-κB 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 8 Effect of *A. bhotanensis* extract on expressions of TLR4/p38 MAPK/NF-κB signaling pathway related proteins in pharyngeal tissue of rats with HS-induced chronic pharyngitis ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

磷酸化水平及 TLR4 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，地八角提取物低剂量组 NF- κ B p65 磷酸化水平与 TLR4 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。表明地八角提取物能够通过调控 TLR4/p38 MAPK/NF- κ B 通路，从而减轻大鼠咽部组织炎症反应。

4 讨论

慢性咽炎是一种咽部黏膜、黏膜下组织及淋巴组织的弥漫性炎症，主要病理特征包括黏膜增生、腺体膨大、血管扩张及黏液分泌增加，炎症介质（如 TNF- α 、IL-6）和炎症细胞（如淋巴细胞、白细胞）在其中起调控作用^[9]。本研究利用 HS 构建大鼠慢性咽炎模型，结果表明 HS 可诱导大鼠产生 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、MCP-1 等炎症介质，引发咽部组织炎症细胞浸润，导致咽部红肿出血，同时大鼠出现皮毛失去光泽、饮水量增加等表现，提示 HS 成功诱导了大鼠慢性咽炎模型。

青霉素和糖皮质激素是西医治疗慢性咽炎的常用药物，但鉴于耐药性和过敏反应等限制，研发新型慢性咽炎防治药物迫在眉睫^[6]。中药具有多靶点协同作用且不良反应小，是探索慢性咽炎创新疗法的重要方向。《中华本草》和《中药大词典》中记载地八角具有清热解毒、利尿止泻等功效，在民间常用于治疗咽痛、咳嗽等多种疾病，且成本低、来源广、应用方便、不良反应小，尤其在减少抗生素需求方面有优势，但其治疗慢性咽炎的疗效及机制尚未明确。鉴于持续的炎症反应是导致咽部黏膜损伤与症状产生的直接原因，控制炎症成为治疗的关键。本研究选用强效抗炎药醋酸泼尼松片作为阳性对照，通过对比地八角与醋酸泼尼松片在降低炎症因子、减轻炎症细胞浸润与组织病理损伤等方面的差异，评估地八角的抗炎效力。本研究发现，在地八角提取物干预下，高剂量组可显著降低 IL-6、MCP-1、CRP、COX-2、ICAM-1、IL-1 β 、TNF- α 和 PGE₂ 水平，并显著改善 HS 诱导的咽部组织黏膜上皮组织增生、炎症细胞浸润及充血红肿等病理损伤。提示地八角提取物进入机体后，可促进炎症渗出物吸收，降低毛细血管通透性，有效促进细胞组织修复，抑制炎症细胞迁移和聚集，从而缓解慢性咽炎。

网络药理学融合了实验、临床和计算方法，已成为提升药物临床疗效的新趋势^[9]。本研究借助网络药理学和分子对接技术，初步探究了地八角提取

物治疗慢性咽炎的潜在机制。网络药理学分析表明，地八角提取物可作用于 205 个与慢性咽炎相关的靶点，其中 HSP90AB1、PIK3CA、PIK3CB、MAPK1、MAPK3、EGFR 和 ESR1 是潜在的关键靶点。GO 功能分析显示，地八角提取物治疗慢性咽炎的靶点主要涉及对外界刺激的反应、基因表达的调控、细胞信号传递、细胞结构和功能的维持等。KEGG 通路富集分析进一步提示，在排名前 20 通路中，MAPK、PI3K/Akt、C-型凝集素及 IL-17 与感染性炎症密切相关的信号通路可能被协同调控。基于通路分析，推测地八角可能通过以下途径发挥作用：首先，通过抑制 C-型凝集素受体与 IL-17 信号通路，从上游阻遏炎症信号的启动^[10-11]；进而削弱 MAPK 信号通路的活化，并下调 NF- κ B 等关键转录因子，最终导致 TNF- α 、IL-6 等促炎因子生成减少，缓解急性期红肿、疼痛及中性粒细胞浸润^[12-13]。同时，地八角对 PI3K-Akt 通路的抑制可能作用于慢性期组织重塑，通过促进异常增生细胞的凋亡并抑制病理性血管生成，共同逆转咽部黏膜的慢性病理转化^[14-15]。鉴于 MAPK 信号通路在富集分析中排名最为靠前，且处于炎症信号网络的枢纽位置，结合慢性咽炎的病理特征以及地八角提取物在降低血清炎症因子水平和减轻咽部炎症细胞浸润方面的显著效果，本研究将 MAPK 信号通路作为探究其抗炎作用潜在机制的重点研究对象。分子对接结果表明，油酸、7 β -羟基谷甾醇、astrabhotin A 与 MAPK 的结合度最高，提示该靶点在地八角提取物调控 MAPK 信号通路中具有重要意义。

机体遭受有害因子入侵时，会激活 TLR4，进而激活 p38 MAPK 和 NF- κ B，促进 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等炎症因子的产生，影响 ICAM-1 和 MCP-1 的表达，促使炎症细胞向咽部组织迁移和聚集，推动慢性咽炎的发生发展^[16-17]。采用 Western blotting 检测咽部组织中 TLR4 蛋白表达水平及 p38 MAPK、NF- κ B p65 磷酸化水平。结果显示，地八角提取物能显著降低 TLR4 蛋白表达水平，并抑制 p38 MAPK、NF- κ B p65 蛋白磷酸化。表明地八角提取物通过调控 TLR4/p38 MAPK/NF- κ B p65 信号通路，降低血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子水平，逆转咽部组织病理损伤，从而治疗慢性咽炎。Western blotting 结果与网络药理学预测结果一致，不仅验证了网络药理学分析的准确性，还为地八角提取物治疗慢性咽炎提供了实验依据。

本研究仅采用一种致病菌构建慢性咽炎模型，然而在实际生活中，慢性咽炎多由多种细菌感染引起。因此，未来有必要构建多种细菌诱导的慢性咽炎模型，以更全面地评估地八角提取物的药效作用。目前关于地八角化学成分的报道仅有 14 种，这在一定程度上限制了网络药理学的预测结果以及药效成分的预测范围。未来，地八角提取物的化学成分全面表征以及牙痛、口鼻出血等方面药理活性与有效成分仍值得进一步深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sun Y Y, Zang Z H, Xu X H, *et al.* Experimental investigation of the immunoregulatory and anti-inflammatory effects of the traditional Chinese medicine “Li-Yan Zhi-Ke Granule” for relieving chronic pharyngitis in rats [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(1): 199-203.
- [2] Hamilton J L, McCrea I L. Streptococcal pharyngitis: Rapid evidence review [J]. *Am Fam Physician*, 2024, 109(4): 343-349.
- [3] Zautner A E. Adenotonsillar disease [J]. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 2012, 6(2): 121-129.
- [4] Leung A K C, Lam J M, Barankin B, *et al.* Group A β -hemolytic streptococcal pharyngitis: An updated review [J]. *Curr Pediatr Rev*, 2024, 21(1): 2-17.
- [5] Gualtieri R, Verolet C, Mardegan C, *et al.* Amoxicillin vs. placebo to reduce symptoms in children with group A streptococcal pharyngitis: A randomized, multicenter, double-blind, non-inferiority trial [J]. *Eur J Pediatr*, 2024, 183(11): 4773-4782.
- [6] Di Muzio F, Barucco M, Guerriero F. Diagnosis and treatment of acute pharyngitis/tonsillitis: A preliminary observational study in general medicine [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(23): 4950-4954.
- [7] Qiu L, Xiao C J, Shen Y, *et al.* Bioactive hydroxypropionylated glucose derivatives from *Astragalus bhotanensis* [J]. *Nat Prod Res*, 2021, 35(23): 5066-5074.
- [8] 何旭东, 周连丽, 杨岚焜, 等. 珠子参对慢性咽炎模型大鼠的干预作用及其急性毒性研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2024, 35(1): 10-16.
- [9] 陈姣, 王继森, 郭亭君, 等. 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 [J]. *中草药*, 2024, 55(17): 5875-5886.
- [10] 王朝, 张馨慧, 周璇, 等. C 型凝集素在寄生虫感染与宿主抗感染中的调节作用 [J/OL]. *四川农业大学学报*, (2025-11-21) [2026-01-04]. <https://doi.org/10.16036/j.issn.1000-2650.202508651>.
- [11] 许善快, 温鑫, 田雨欣, 等. Th17/Treg 细胞失衡在慢性前列腺炎/慢性盆腔疼痛综合征中的作用研究进展 [J]. *甘肃医药*, 2025, 44(10): 873-877.
- [12] 何旭东, 倪皓雨, 何金彪, 等. 苦参醇 F 对溃疡性结肠炎小鼠的干预作用 [J]. *中国药房*, 2024, 35(4): 419-424.
- [13] 董宵汗, 张译丹, 安月鹏, 等. 中药调控 MAPK 信号通路治疗特应性皮炎的研究进展 [J]. *中南药学*, 2025, 23(10): 2983-2989.
- [14] 赵华, 唐丽丽. 基于 PI3K/AKT 信号通路探讨丹参提取物对前列腺癌细胞生物学行为的影响及其机制 [J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44(17): 4275-4279.
- [15] 韩杰, 玉开龙, 姚国军, 等. 中医药调控 PI3K/AKT 信号通路治疗膝骨关节炎的研究进展 [J]. *时珍国医国药*, (2025-10-22) [2026-01-12]. <https://link.cnki.net/urlid/42.1436.R.20251021.1433.002>.
- [16] Gratz N, Siller M, Schaljo B, *et al.* Group A *Streptococcus* activates type I interferon production and MyD88-dependent signaling without involvement of TLR2, TLR4, and TLR9 [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(29): 19879-19887.
- [17] 朱玉莹. 基于 TLR4/p38 MAPK 和 NF- κ B 信号通路探讨丹白颗粒治疗湿热瘀结型 SPID 作用机制 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2023.

[责任编辑 李亚楠]