

基于网络药理学与实验验证探讨茅岩莓治疗感染后咳嗽的作用机制

黄珊¹, 唐梓宁⁴, 刘学武⁴, 喻佩瑶³, 于宝祥³, 姜德建^{2,3,4*}

1. 常德职业技术学院药理学系, 湖南 常德 415000

2. 中南大学芙蓉实验室, 湖南 长沙 410000

3. 湖南中医药大学科创中心, 湖南 长沙 410208

4. 湖南省药物安全评价研究中心&新药药效与安全性评价湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410331

摘要: **目的** 通过网络药理学结合体内实验验证, 探讨茅岩莓 *Ampelopsis grossedentata* 提取物治疗感染后咳嗽 (post-infection cough, PIC) 的作用及机制。 **方法** 通过 HERB 数据库筛选茅岩莓活性成分, 结合 GeneCards 平台获取 PIC 相关靶点, 得到交集靶点并构建“药物-活性成分-靶点”网络及蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 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, 同时对核心成分与核心靶点进行分子对接验证。构建 PIC 豚鼠模型, 设置对照组、模型组及茅岩莓提取物低、中、高剂量 (64、128、256 mg/kg) 组和苏黄止咳胶囊 (314 mg/kg) 组, 给药后检测咳嗽敏感性、肺泡灌洗液中炎性细胞数量及白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4)、P 物质 (substance P, SP)、 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平, 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察气管、支气管及肺组织病理变化, 采用 Western blotting 检测肺组织中核心靶点蛋白的表达。 **结果** 网络药理学筛选出茅岩莓核心活性成分包括大黄素甲醚、大黄素、槲皮素等, 核心靶点有 B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、信号转导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1)、肉瘤原癌基因激酶 (sarcoma proto-oncogene kinase, SRC) 等, 富集涉及 EGFR、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; 分子对接显示核心成分与核心靶点结合能较低, 亲和力良好。动物实验结果显示, 与模型组比较, 茅岩莓提取物可显著延长豚鼠咳嗽潜伏期并减少咳嗽次数 ($P < 0.05$ 、 0.01), 降低肺泡灌洗液中炎性细胞数量及 SP、IL-4、TNF- α 、INF- γ 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 改善气管、支气管及肺组织病理损伤, 上调肺组织 Bcl-2 蛋白表达 ($P < 0.01$), 下调 EGFR、p-STAT3 蛋白表达 ($P < 0.01$)。 **结论** 茅岩莓提取物对 PIC 具有显著的治疗效果, 其作用机制可能为通过大黄素甲醚、大黄素、槲皮素等核心成分作用于 Bcl-2、EGFR、STAT3 等靶点, 调控相关信号通路, 减轻气道黏膜损伤及炎症反应, 从而发挥治疗作用。

关键词: 感染后咳嗽; 茅岩莓; 二氢杨梅素; 气道黏膜损伤; 炎症反应; B 细胞淋巴瘤-2; 表皮生长因子受体; 大黄素甲醚; 大黄素; 槲皮素

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2026)08-2932-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.08.006

Mechanism of *Ampelopsis grossedentata* in treating post-infection cough based on network pharmacology and experimental verification

HUANG Shan¹, TANG Zining⁴, LIU Xuewu⁴, YU Peiyao³, YU Baoxiang³, JIANG Dejian^{2,3,4}

1. Department of Pharmacy, Changde Vocational Technical College, Changde 415000, China

2. Furong Laboratory of Central South University, Changsha 410000, China

3. Innovation and Entrepreneurship Center of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

4. Hunan Provincial Drug Safety Evaluation Research Center & Hunan Provincial Key Laboratory of New Drug Efficacy and Safety Evaluation, Changsha 410331, China

收稿日期: 2025-09-19

基金项目: 湖南省科技创新创业团队 (2021); 湖南省科技领军人才项目 (2024)

作者简介: 黄珊, 女, 硕士, 讲师, 主要从事药理毒理学研究。E-mail: 773682404@qq.com

*通信作者: 姜德建, 男, 博士, 研究员, 研究方向为新药药效与安全性评价。E-mail: jiangdejian@hnsc.org

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of *Ampelopsis grossedentata* extract in treating post-infection cough (PIC) through network pharmacology combined with *in vivo* experiments. **Methods** Active components from *A. grossedentata* were screened through HERB database, PIC related targets were obtained from GeneCards platform, intersecting targets were obtained, “drug-active ingredient-target” network and protein-protein interaction (PPI) network were constructed. Gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed, and molecular docking validation was performed between core components and core targets. PIC guinea pig model was constructed, control group, model group, *A. grossedentata* extract low-, medium-, high-dose (64, 128, 256 mg/kg) groups and Suhuang Zhike Capsule (苏黄止咳胶囊, 314 mg/kg) group were set up. After administration, cough sensitivity, inflammatory cell numbers and levels of interleukin-4 (IL-4), substance P (SP), interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α) in bronchoalveolar lavage fluid were detected. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe pathological changes in tracheal, bronchial and lung tissues. Western blotting was used to detect the expressions of core target proteins in lung tissue. **Results** The core active ingredients of *A. grossedentata* screened by network pharmacology included physcion, emodin, quercetin, etc. The core targets included B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), epidermal growth factor receptor (EGFR), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), estrogen receptor 1 (ESR1), sarcoma proto oncogene kinase (SRC), etc. The enrichment involved EGFR, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-protein kinase B (Akt) and other signaling pathways. Molecular docking showed that the binding energy between core components and core targets was low, with good affinity. The animal experiment results showed that compared with model group, *A. grossedentata* extract could significantly prolong the cough latency and reduce the number of coughs in guinea pigs ($P < 0.05, 0.01$), reduce the number of inflammatory cells and levels of SP, IL-4, TNF- α , INF- γ in bronchoalveolar lavage fluid ($P < 0.05, 0.01$), improve the pathological damage of trachea, bronchus and lung tissue, up-regulate the expression of Bcl-2 protein in lung tissue ($P < 0.01$), down-regulate the expressions of EGFR and p-STAT3 protein ($P < 0.01$). **Conclusion** *A. grossedentata* extract has significant therapeutic effects on PIC, and its mechanism may be through the action of core components such as physcion, emodin and quercetin on targets such as Bcl-2, EGFR, STAT3, regulating related signaling pathways, reducing airway mucosal damage and inflammatory reactions, and thus exerting therapeutic effects.

Key words: post-infection cough; *Ampelopsis grossedentata* (Hand.-Mazz.) W. T. Wang; dihydromyricetin; airway mucosal damage; inflammatory response; B-cell lymphoma-2; epidermal growth factor receptor; physcion; emodin; quercetin

感染后咳嗽 (post-infection cough, PIC) 又称“感冒后咳嗽”, 是指呼吸道感染急性期症状 (如发热) 消失后, 咳嗽仍迁延不愈, 持续时间可达 3~8 周的常见呼吸系统并发症。其主要表现为刺激性干咳或伴少量白色黏液痰, 常因讲话、冷空气吸入等刺激诱发或加重, 严重影响患者生活质量^[1]。目前, PIC 的病理生理机制尚未完全明确, 普遍认为与呼吸道病原体感染导致的气道黏膜损伤、气道炎症、气道高反应性及咳嗽敏感性升高等密切相关^[2]。

茅岩莓为葡萄科植物显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* (Hand.-Mazz.) W. T. Wang 的全株, 是我国传统药用植物, 其化学成分复杂, 富含黄酮类、多酚、多糖类、萜类等多种活性成分, 其中黄酮类化合物为主要活性成分, 含量高达 65.7%^[3]。现代药理学研究证实, 茅岩莓具有显著的消炎抑菌、抗病毒作用, 尤其在治疗上呼吸道感染、急慢性咽炎、支气管炎等疾病中表现出良好疗效^[4-6]。本课题组前期研究亦发现, 茅岩莓提取物可通过调节口腔黏膜炎症因子水平, 促进放射性口腔溃疡的修复^[7], 但其在 PIC 治疗中的作用及潜在机制尚未见报道。鉴

于此, 本研究采用网络药理学结合实验验证的策略, 通过烟熏联合呼吸道合胞病毒激发构建 PIC 豚鼠模型, 考察茅岩莓提取物对模型动物咳嗽敏感性、气道炎症介质及气管、支气管、肺脏组织病理学变化的影响, 明确其治疗 PIC 的药效学作用; 同时, 结合网络药理学与分子对接技术, 筛选茅岩莓防治 PIC 的主要活性成分及关键作用靶点, 并采用 Western blotting 技术进一步验证相关作用机制, 为茅岩莓在 PIC 防治中的临床应用提供理论依据和实验支持。

1 材料

1.1 动物与细胞

SPF 级 Hartley 豚鼠 68 只, 雌雄各半, 体质量 253.4~368.7 g, 购自广东维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 SCXK (粤) 2022-0063, 实验动物质量合格证号 44829700035806。动物在屏障环境动物实验室 C 区饲养, 实验操作由湖南普瑞玛药物研究中心有限公司动物伦理审查委员会批准, 实验动物伦理审查编号 IACUC-2024 (3) 088, 实验动物使用许可证号 SYXK (湘) 2020-0015。

人喉表皮样癌 HEp-2 细胞 (货号 CL-0104) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 病毒株

人呼吸道合胞病毒株 (编号 VR-26PQ) 由美国 ATCC 提供, 半数组织细胞感染剂量 (50% tissue culture infective dose, TCID₅₀) 为 $10^{-4.39}/0.1$ mL, 在病原微生物实验室 (BSL-II) 培养和扩增, 实验室备案编号为卫实验室备案[202405312]BSL2-04。

1.3 药材

茅岩莓购自张家界茅岩莓有限公司, 经湖南普瑞玛药物研究中心有限公司江芝副研究员鉴定为葡萄科植物显齿蛇葡萄 *A. grossedentata* (Hand.-Mazz.) W. T. Wang 的全株。茅岩莓提取物 (批号 20210302) 由湖南普瑞玛药物研究中心有限公司药学研究部采用水浸渍法制备: 取茅岩莓 20 g, 加入 200 g 水 (含 0.3% 柠檬酸) 浸泡 3 d, 滤过, 浓缩至 50 mL, 按 1:1 的比例加入 95% 乙醇醇沉 24 h 除杂, 滤过后置于 4 °C 冰箱中保存备用^[8], HPLC 测得浓缩液中二氢杨梅素质量浓度为 320 mg/mL。

1.4 药品与试剂

苏黄止咳胶囊 (国药准字 Z20103075, 0.45 g/粒, 批号 24010792、24031211、24011811) 购自扬子江药业集团江苏龙凤堂中药有限公司; 辣椒素 (5 g/瓶, 批号 C16154777) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 芙蓉牌香烟 (焦油量 11 mg, 烟气烟碱量 0.9 mg, 烟气一氧化碳 13 mg) 购自湖南常德卷烟厂; 豚鼠白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4)、P 物质 (substance P, SP)、 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 检测试剂盒 (批号均为 08/2024) 购自黄石市艾恩斯生物科技有限公司; DMEM 培养基 (批号 6124071) 购自美国 Gibco 公司; 信号转导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 抗体 (批号 YT4443, 稀释比例 1:500)、p-STAT3 抗体 (批号 YP0251, 稀释比例 1:500)、 β -actin 抗体 (批号 YT0099, 稀释比例 1:2 000) 购自美国 Immunoway 公司; B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体 (批号 HY-P80029, 稀释比例 1:1 000) 购自美国 MCE 公司; 表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 抗体 (批号 30552, 稀释比例 1:500) 购自美国 ProMab 公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 AS014, 稀释比例 1:5 000) 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.5 仪器

BSC1300-II-B2 型生物安全柜 (山东新华医疗器械股份有限公司); CJ-1F 型医用净化工作台 (苏州冯氏实验动物设备有限公司); 3111 型 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Fisher 公司); DMIL 倒置显微镜、DFC 420C 病理成像系统 (德国 Leica 公司); YXQ-50A 型立式压力灭菌器 (上海博讯医疗生物仪器股份有限公司); TD4 型台式低速离心机 (湖南省凯达实业发展有限公司); CSM 型自动吸烟机 (上海塔望智能科技有限公司); 自制烟雾暴露箱 (400 mm×300 mm×400 mm); YLS-8A 型多功能诱咳引喘仪 (济南益延科技发展有限公司)。

2 方法

2.1 网络药理学研究

2.1.1 茅岩莓活性成分及靶点筛选 运用 HERB 数据库 (<http://herb.ac.cn/v2/>), 以 “*Ampelopsis grossedentata*” 为关键词进行检索, 获取其药物活性成分并通过 Lipinski 五原则进行筛选, 通过 Swiss TargetPrediction 数据库 (<https://swisstargetprediction.ch/>) 预测靶点。

2.1.2 疾病靶点收集 借助 GeneCards 平台 (<https://www.genecards.org/>), 以 “post infectious cough” 为关键词检索, 将所获基因运用 R 语言软件筛选、合并、去重后, 得到疾病靶点。

2.1.3 “药物-活性成分-靶点”网络构建与分析 将茅岩莓活性成分靶点与疾病靶点取交集, 绘制韦恩图。运用 Cytoscape 3.7.1 软件, 将交集靶点、药物活性成分导入, 进行网络拓扑分析, 根据节点度值判断茅岩莓治疗 PIC 的核心成分, 度值越大, 重要性越高。

2.1.4 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建与分析 将茅岩莓和 PIC 交集靶点导入 STRING 平台 (<https://string-db.org/>), 以 0.400 作为最小相互作用阈值, 对离群靶点进行隐藏后完成 PPI 网络构建, 结果以 TSV 格式文件在 Cytoscape 3.7.1 软件中进行分析, 对核心靶点进行筛选。

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 将茅岩莓和 PIC 交集靶点导入 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>), 限定靶基因为 “homo sapiens”, 选择 “functional annotation”, 对茅岩莓调控 PIC 的功能靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析, 将所得数据

导入微生信在线平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 进行结果可视化。

2.1.6 分子对接验证 将筛选出的前3名核心成分及前5个核心靶点进行分子对接, 从TCMSP数据库 (<https://www.tcm-sp-e.com>) 获取核心成分的3D结构, 通过Openable 2.4.1软件转换成pdb格式。通过PDB数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 获得核心靶点的蛋白晶体结构, 利用Pymol 2.2.0软件对所有蛋白进行修饰, 去除水分子及多余的配体。借助AutoDock Vina软件进行分析, 采用Pymol对结果进行可视化。

2.2 动物实验验证

2.2.1 造模、分组与给药 选用检疫合格的Hartley豚鼠68只, 雌雄各半, 按性别和体质量随机分为对照组(14只)和模型组(54只), 将模型组豚鼠置于自制烟熏箱中, 采用自动吸烟器按5 min/支的速度燃烧香烟, 并将燃烧后的烟气通入烟熏箱中, 每次烟熏1 h, 1次/d, 连续7 d。于末次烟熏后使用乙醚轻微麻醉豚鼠, 经鼻滴入人呼吸道合胞病毒原液(250 μ L/次, 当日滴鼻2次, 500 μ L/只), 对照组经鼻滴入等体积的0.9%氯化钠注射液, 连续观察7 d。感染病毒后次日各组随机选取4只豚鼠, 使用异氟烷吸入麻醉(1%~4%诱导麻醉, 0.25%~2%维持麻醉), 腹主动脉放血安乐死, 解剖采集肺组织, 使用空斑法检测病毒滴度, 确认模型制备成功。感染病毒后第8天取50只模型豚鼠, 使用超声波雾化1 mmol/L辣椒素溶液诱咳15 s, 记录动物出现咳嗽的潜伏期(雾化开始至出现咳嗽的时间), 动物按咳嗽潜伏期及性别随机分为模型组及茅岩莓提取物低、中、高剂量(给药质量浓度分别为6.4、12.8、25.6 mg/mL, 豚鼠平均体质量按400 g计, 折算至豚鼠给药剂量分别为64、128、256 mg/kg)组和苏黄止咳胶囊(临床用量4.05 g/d, 成人平均体质量以70 kg计, 根据体表面积法换算成豚鼠等效剂量为314 mg/kg)组, 每组10只。给药前采用纯水配制相应浓度的给药溶液, 各给药组ig相应药物(10 mL/kg), 对照组及模型组ig等体积的纯水, 1次/d, 连续给药7 d。

2.2.2 病毒滴度检测 将细胞瓶中成片生长的HEp-2细胞消化后, 铺24孔细胞板, 于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的培养箱中培养24 h。用DMEM培养基对病毒进行10倍稀释, 每孔加0.1 mL稀释的病毒液至细胞培养板中, 每个稀释度设置2个平行孔; 将细胞板置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的培养箱中孵育, 使病毒

吸附1 h, 每30分钟倾斜摇晃细胞板1次; 吸附1 h后弃去上清, 使用DMEM培养基清洗细胞1次; 微波融化琼脂置于56 $^{\circ}$ C水浴锅中, 37 $^{\circ}$ C温育DMEM, 1:1混合琼脂和DMEM, 将混合液以1 mL/孔加于24孔板中; 将细胞板置于安全柜内至琼脂凝固, 颠倒放置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的培养箱中孵育2~5 d, 当白色斑点出现后用结晶紫染色(1 mL/孔), 37 $^{\circ}$ C孵育4 h, 吸去染液后计数空斑。

病毒滴度=每孔平均空斑个数 \times 病毒稀释度倒数/每孔病毒接种量

2.2.3 一般生理状态观察 每日观察动物的给药前及给药后生理状态, 包括喷嚏、咳嗽等症状。

2.2.4 咳嗽敏感性检测 于末次给药后2 h, 使用超声波雾化1 mmol/L辣椒素溶液诱咳15 s, 记录各组动物出现咳嗽的潜伏期(雾化开始至出现咳嗽的时间)及5 min内豚鼠咳嗽次数, 5 min内不咳嗽者潜伏期记为300 s。

2.2.5 肺泡灌洗液中炎性细胞数量及细胞因子水平的检测 于末次给药后次日, 采集各组豚鼠左侧肺脏肺泡灌洗液, 采用五分类血细胞分析仪检测肺泡灌洗液这白细胞、中性粒细胞、淋巴细胞数量, 按照ELISA试剂盒说明书检测肺泡灌洗液中SP、IL-4、TNF- α 、INF- γ 水平。

2.2.6 组织病理学检测 于末次给药后次日, 采集右侧肺脏下叶、气管及支气管, 置于10%中性福尔马林固定后, 经石蜡包埋、切片、苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色, 置于显微镜下观察右侧肺组织、气管及支气管病理学变化。肺脏组织病理学变化, 从肺泡上皮破坏及肺泡隔增厚程度, 炎性、血性渗出程度, 炎症细胞浸润程度进行评分; 气管及支气管组织病理学变化, 包括气管黏膜充血、水肿, 淋巴细胞和中性粒细胞等炎症细胞浸润, 纤毛细胞损伤、脱落, 黏液腺体增生、肥大情况。根据病理变化程度进行组织病理学评分: 正常0分; 轻微0.5分; 轻度1分; 中度2分; 重度3分; 严重4分。

2.2.7 Western blotting 检测肺组织中Bcl-2、EGFR、STAT3和p-STAT3蛋白表达 取对照组、模型组和茅岩莓提取物高剂量组大鼠肺组织, 置于低温冷冻研磨仪中研磨后, 加入RIPA裂解液充分裂解, 离心提取总蛋白。蛋白样品经12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 转至PVDF膜, 加入快速封闭液于室温封闭15 min, 加入相应一抗, 4 $^{\circ}$ C孵育过夜; TBST洗涤后, 加入二抗, 室温孵育1 h, TBST洗涤

3次后,加入ECL化学发光试剂显影,通过凝胶成像系统采集图像,并用Image J软件进行灰度值分析。

2.2.8 统计学分析 采用SPSS 23.0软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,分别使用Shapiro-Wilk、Leven's test方法检验正态性和方差齐性。如果满足正态性,用单因素方差分析(ANOVA)进行统计分析,并根据方差齐性情况选用LSD+Dunnet(方差齐)或Tamhane's T2(方差不齐)进行比较分析。如果不满足正态性,则用Kruskal-Wallis检验,并用Mann-Whitney检验进行两两比较分析。

3 结果

3.1 网络药理学分析

3.1.1 茅岩莓活性成分及PIC靶点筛选 在HERB数据库中筛选出茅岩莓的活性成分5个,预测靶点并利用Uniprot数据库标准化命名,删除重复项后共获得靶点297个。通过检索GeneCards数据库得到PIC相关的基因靶点1964个。利用Venn在线工具将茅岩莓活性成分靶点与PIC靶点取交集,获得151个共同靶点(图1)。

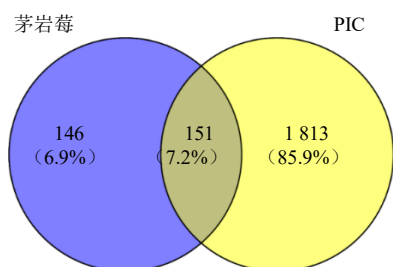


图1 茅岩莓与PIC交集靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of intersection targets of *A. grossedentata* and PIC

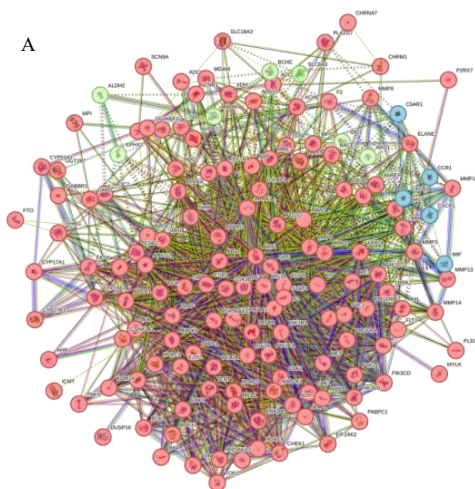


图3 PPI网络(A)及茅岩莓治疗PIC的核心靶点(B)

Fig. 3 PPI network (A) and core targets of *A. grossedentata* in treatment of PIC (B)

3.1.2 “药物-活性成分-靶点”网络构建与分析 通过Cytoscape 3.7.1软件构建“药物-活性成分-靶点”网络(图2),图中5个活性成分与151个共同靶点相对应。利用Network Analyzer进行分析,网络中度值为该节点相关联边的条数,度值大小与活性成分关键程度呈正相关。度值排名前3位的成分分别为大黄素甲醚、大黄素、槲皮素,这些成分可能是茅岩莓治疗PIC的关键活性成分。

3.1.3 PPI网络构建与分析 将茅岩莓治疗PIC的151个共同靶点导入STRING平台构建PPI网络(图3-A),下载数据导入Cytoscape 3.7.1软件筛选核心靶点,网络节点连接度值越高,表示其在蛋白调控所起的作用越重要,可视为PPI网络中的核心调控

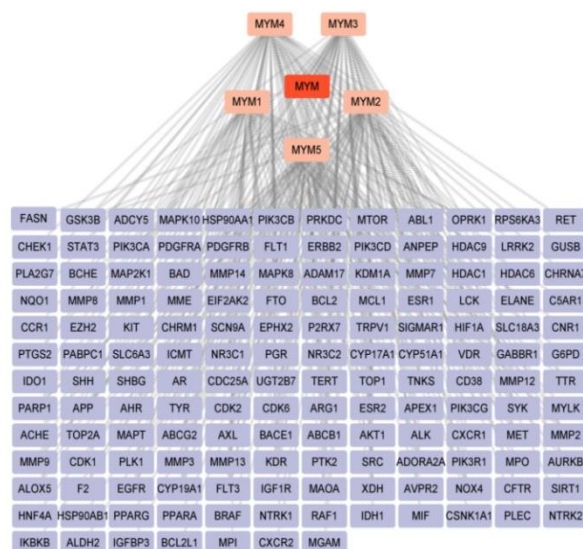
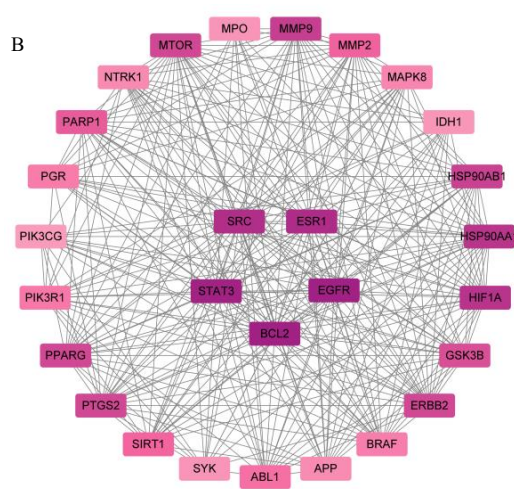


图2 “药物-活性成分-靶点”网络

Fig. 2 “Drug-active ingredient-target” network



蛋白。使用 Centiscape 2.2 插件进行度中心度、紧密度中心度、节点中心度分析后，共得到茅岩莓治疗 PIC 的核心靶点 28 个（图 3-B），其中度值排名前 5 位的核心靶点分别为 Bcl-2、EGFR、STAT3、雌激素受体 1（estrogen receptor 1, ESR1）、肉瘤原癌基因激酶（sarcoma proto-oncogene kinase, SRC），推测茅岩莓可能通过以上核心靶点发挥治疗 PIC 的作用。

3.1.4 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 GO 分析结果（图 4）显示，生物过程（biological process,

BP）涉及表皮生长因子受体信号通路等条目，细胞成分（cellular component, CC）主要富集在受体复合物等条目，分子功能（molecular function, MF）主要包含蛋白激酶活性等。KEGG 富集分析获得 120 条信号通路，将结果按 *P* 值排序，选取前 10 条相关通路制成气泡图，结果如图 5 所示，茅岩莓治疗 PIC 的靶点所富集的通路主要涉及癌症途径、EGFR 信号通路等，提示其可能通过多通路协同作用调节炎症、细胞代谢与增殖等生理过程发挥药效。

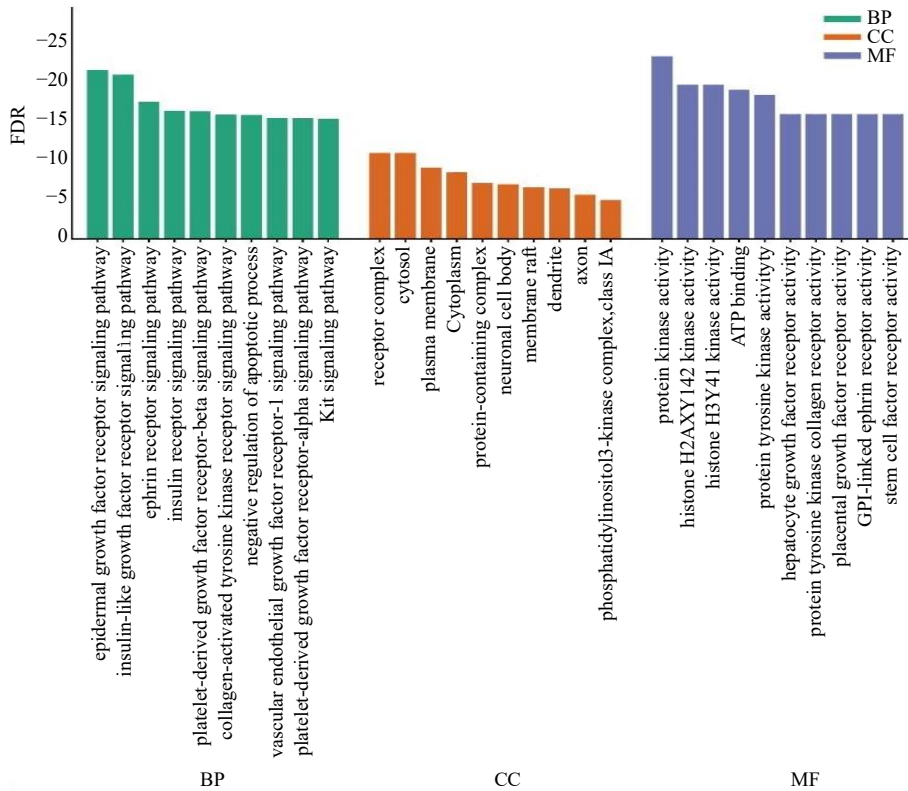


图 4 GO 功能富集分析 (前 10)

Fig. 4 GO function enrichment analysis (top 10)

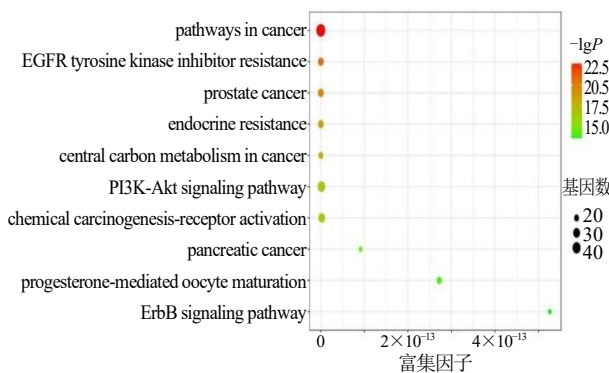


图 5 KEGG 通路富集分析 (前 10)

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis (top 10)

3.2 分子对接实验

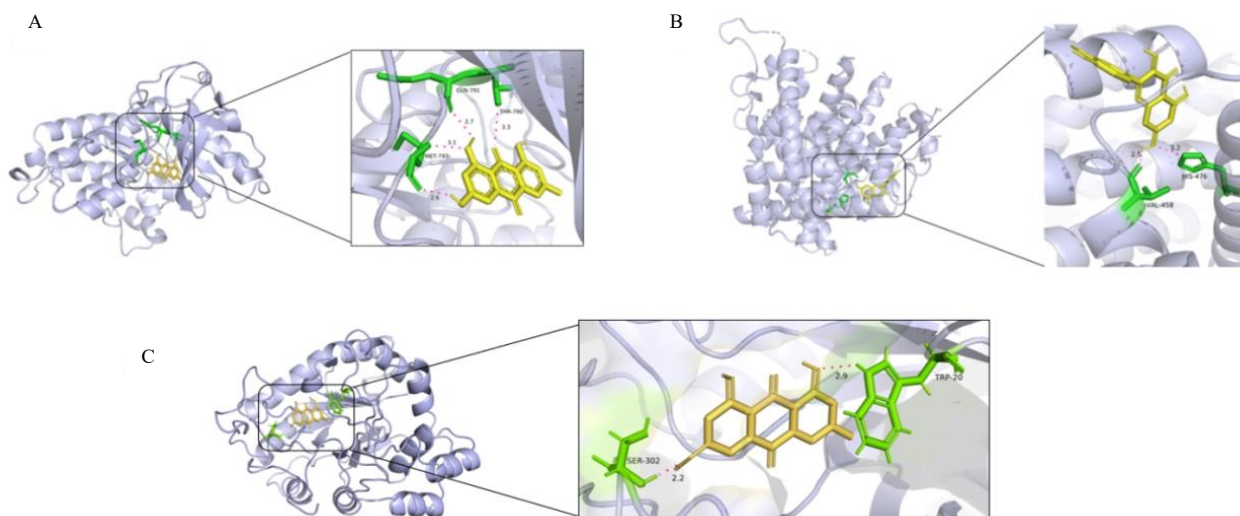
为了进一步揭示茅岩莓治疗感染后的作用机制，选取与通路相关且度值较高的靶点蛋白，进行分子对接验证。采用 AutoDock Vina 软件将筛选出的前 3 个核心成分（大黄素甲醚、大黄素、槲皮素）与核心靶点 Bcl-2、EGFR、STAT3、ESR1、SRC 进行分子对接验证，结合能见表 1。大黄素甲醚、大黄素、槲皮素与 Bcl-2、EGFR、STAT3、ESR1、SRC 的结合能均 < -5.0 kcal/mol（ 1 kcal/mol = 4.182 kJ/mol），显示出较好的亲和力，将部分对接结果进行可视化展示，见图 6。

表 1 核心成分与核心靶点的分子对接结合能

Table 1 Molecular docking binding energy of core components with core targets

成分	结合能/(kcal·mol ⁻¹)				
	Bcl-2	EGFR	STAT3	ESR1	SRC
大黄素甲醚	-6.1	-8.1	-7.6	-7.5	-8.6
大黄素	-6.4	-8.2	-7.6	-7.6	-8.7
槲皮素	-6.1	-7.3	-6.7	-7.3	-8.5

1 kcal·mol⁻¹=4.182 kJ·mol⁻¹



A-大黄素-EGFR; B-槲皮素-ESR1; C-大黄素甲醚-SRC; 黄色为核心成分, 绿色为氨基酸残基, 红色虚线代表氢键。

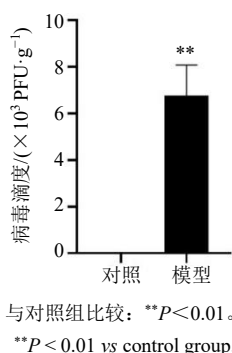
A-emodin-EGFR; B-quercetin-ESR1; C-physcion-SRC; Yellow is core component, green is amino acid residue, and red dashed line represents hydrogen bonding.

图 6 部分核心成分与核心靶点的分子对接结果

Fig. 6 Molecular docking results of partly core components binding to core targets

3.3 茅岩莓提取物对 PIC 模型豚鼠一般状态的影响

如图 7 所示, 与对照组比较, 感染病毒次日模型组豚鼠肺组织病毒滴度显著升高 ($P < 0.01$)。在造模与给药过程中, 对照组豚鼠活动自如, 饮食正常, 未见明显异常。而模型组豚鼠在烟熏和病毒滴鼻后, 逐渐表现出自主活动减少, 竖毛, 伴有呼吸急促等体征。



与对照组比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group.

图 7 对照组和模型组豚鼠肺组织病毒滴度 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 7 Virus titers in lung tissues of guinea pigs in control and model groups ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.4 茅岩莓提取物对 PIC 模型豚鼠咳嗽敏感性的影响

如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组豚鼠咳嗽潜伏期显著缩短 ($P < 0.01$), 咳嗽次数显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 茅岩莓提取物中、高剂量组和苏黄止咳胶囊组豚鼠咳嗽潜伏期显著增加 ($P < 0.01$), 各给药组豚鼠咳嗽次数显著减少 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.5 茅岩莓提取物对 PIC 模型豚鼠气道炎症的影响

如图 9 所示, 与对照组比较, 模型组豚鼠肺泡灌洗液中白细胞、中性粒细胞、淋巴细胞数量及 SP、IL-4、TNF- α 、INF- γ 水平均显著升高 ($P < 0.05, 0.01$); 与模型组比较, 茅岩莓提取物中、高剂量组和苏黄止咳胶囊组豚鼠肺泡灌洗液中白细胞、淋巴细胞数量及 SP、IL-4、INF- γ 水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 茅岩莓提取物高剂量组豚鼠肺泡灌洗液中中性粒细胞数量及 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.01$)。表明茅岩莓提取物对 PIC 豚鼠肺部炎症具有

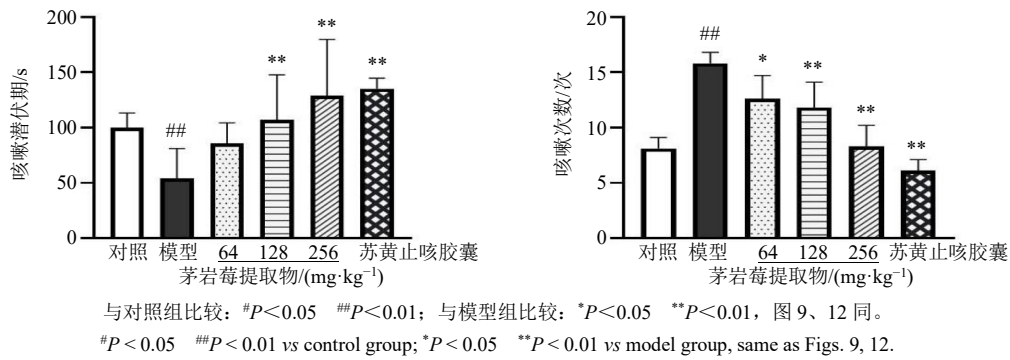


图8 茅岩莓提取物对PIC模型豚鼠咳嗽敏感性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 8 Effect of *A. grossedentata* extract on cough sensitivity of PIC model guinea pigs ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

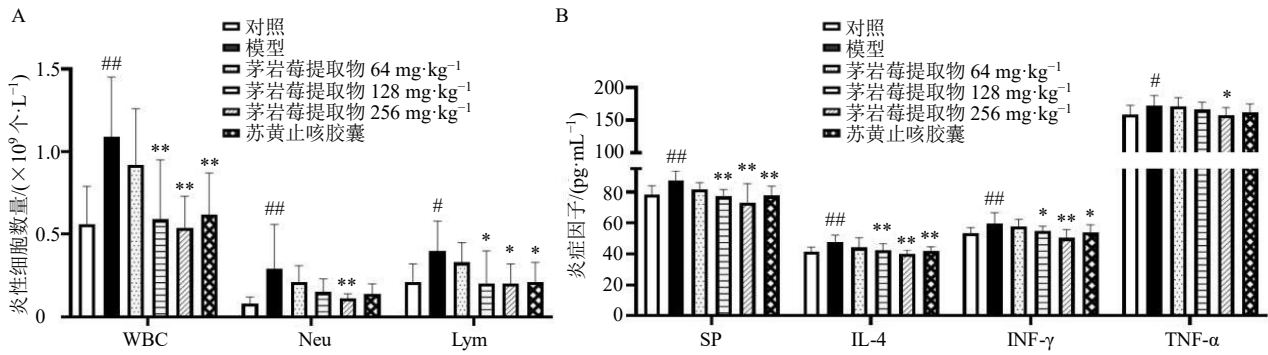


图9 茅岩莓提取物对PIC模型豚鼠肺泡灌洗液中炎症细胞数量(A)和炎症因子水平(B)的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Fig. 9 Effect of *A. grossedentata* extract on number of inflammatory cells (A) and levels of inflammatory factors (B) in bronchoalveolar lavage fluid of PIC model guinea pigs ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

明显的缓解作用。

3.6 茅岩莓提取物对PIC模型豚鼠肺组织、气管及支气管病理变化的影响

如图10所示,对照组豚鼠肺组织无明显变化,未见炎症细胞浸润;模型组豚鼠肺组织出现肺泡上

皮破坏、肺泡隔增厚、炎性/血性渗出及炎症细胞浸润;茅岩莓提取物低、中、高剂量组和苏黄止咳胶囊组肺组织病变较模型组均有不同程度的减轻。

如图11所示,对照组豚鼠气管及支气管无明显变化,未见炎症细胞浸润;模型组豚鼠气管及支

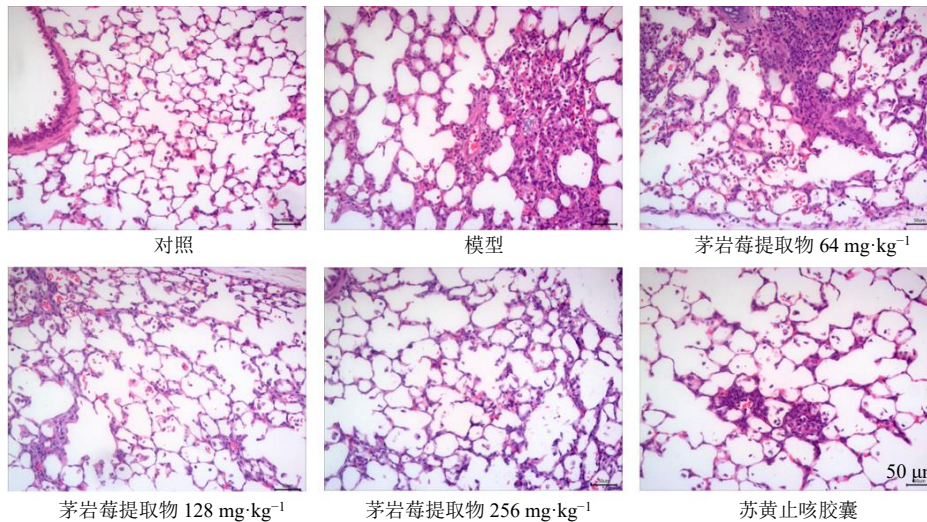


图10 茅岩莓提取物对PIC模型豚鼠肺组织病理变化的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 10 Effect of *A. grossedentata* extract on pathological changes of lung tissue in PIC model guinea pigs (HE, $\times 200$)

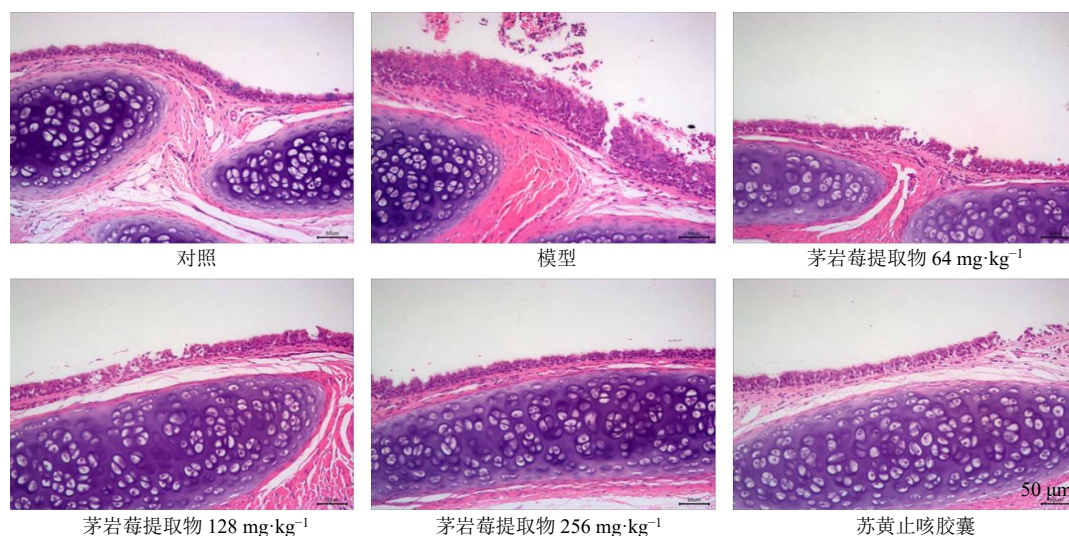


图 11 茅岩莓提取物对 PIC 模型豚鼠气管及支气管病理变化的影响 (HE, ×200)

Fig. 11 Effect of *A. grossedentata* extract on pathological changes of trachea and bronchi in PIC model guinea pigs (HE, × 200)

气管出现黏膜充血、水肿，纤毛细胞损伤、脱落，炎症细胞浸润；茅岩莓提取物低、中、高剂量组和苏黄止咳胶囊组豚鼠气管及支气管病变较模型组均有不同程度的减轻。

3.7 茅岩莓提取物对 PIC 模型豚鼠肺组织 Bcl-2、EGFR、STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达的影响

如图 12 所示，与对照组比较，模型组豚鼠肺

组织 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), EGFR、p-STAT3/STAT3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，茅岩莓提取物中、高剂量组豚鼠肺组织 Bcl-2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), EGFR、p-STAT3/STAT3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 表明茅岩莓可能通过调控 Bcl-2、EGFR、STAT3 发挥治疗 PIC 的作用。

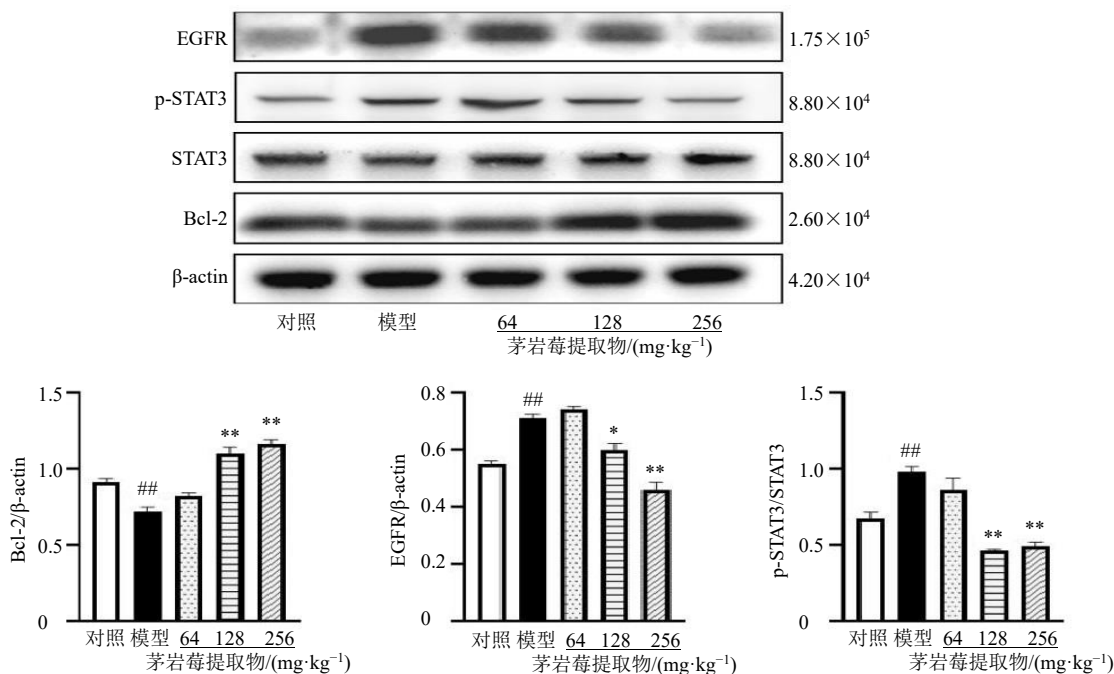


图 12 茅岩莓提取物对 PIC 模型豚鼠肺组织 Bcl-2、EGFR、STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 12 Effect of *A. grossedentata* extract on expressions of Bcl-2, EGFR, STAT3 and p-STAT3 protein in lung tissue of PIC model guinea pigs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

咳嗽是呼吸专科门诊和社区门诊最常见的症状之一,全球普通人群慢性咳嗽患病率达9.6%,而我国呼吸专科门诊中慢性咳嗽患者占比超过1/3^[9]。研究表明,11%~25%具有上呼吸道感染史的患者会发生PIC,而在流行季节中,PIC发病率可高达25%~50%,尤其好发于季节交替和免疫力低下人群,且既往有PIC病史者再次感染后更易出现咳嗽迁延不愈^[10]。目前,临床治疗以镇咳药、抗组胺药和减充血药为主^[11],存在用药针对性差、治疗周期长等缺点,并不能满足临床需求^[12]。本研究通过整合网络药理学、分子对接及动物实验验证,系统探讨了茅岩莓提取物治疗PIC的药效及其可能机制。

网络药理学分析为阐释茅岩莓“多成分-多靶点”作用提供了线索。本研究从茅岩莓中筛选出大黄素甲醚、大黄素、槲皮素等核心活性成分,均属于黄酮类或蒽醌类化合物,已有研究证实其具有抗炎、抗病毒、免疫调节等活性^[13-15]。槲皮素可抑制核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路减少炎症因子释放^[16],大黄素能调节免疫细胞功能^[17],这些成分可能是茅岩莓治疗PIC的物质基础。通过靶点预测与交集分析,获得151个茅岩莓与PIC的共同靶点,筛选出Bcl-2、EGFR、STAT3、ESR1、SRC等核心靶点。其中Bcl-2作为抗凋亡蛋白,其异常表达可能与气道上皮细胞损伤后的修复障碍相关^[18]。EGFR属于受体酪氨酸激酶家族,在呼吸道上皮细胞中广泛表达,激活后可通过下游信号通路调节细胞增殖、分化与存活,研究表明,呼吸道感染EGFR信号通路过度激活,参与气道炎症、气道重塑及咳嗽敏感性增高的病理过程^[19]。STAT3是一种转录因子,可被多种细胞因子和生长因子激活,在炎症反应中,STAT3激活后可调控炎症相关基因表达,促进炎症介质释放,加重气道炎症损伤^[20]。SRC作为非受体酪氨酸激酶,可通过激活磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)等通路影响细胞增殖与炎症^[21]。这些靶点的协同作用可能涵盖了PIC发病的核心环节,如气道上皮修复、炎症调控及细胞存活。KEGG通路富集分析显示,茅岩莓活性成分靶点主要富集EGFR、PI3K-Akt信号通路及癌症相关通路等。EGFR信号通路在气道黏膜损伤修复中起关键作用,抑制该通路可减轻气道重塑和炎症^[22];PI3K-Akt通路参与调节细胞存活、

炎症反应及气道平滑肌收缩,其过度激活与气道高反应性密切相关^[23],但其在网络中的连接度和中心性相对较低,提示其可能处于信号网络的相对下游或辅助位置。分子对接结果进一步证实,核心成分(大黄素甲醚、大黄素、槲皮素)与核心靶点(如EGFR、STAT3)的结合能均低于-5.0 kcal/mol,提示其具有较强的亲和力,可能通过直接结合靶点蛋白抑制下游炎症信号传导。基于此,本研究选择在网络中的度值排名前3位的Bcl-2、EGFR和STAT3作为重点验证靶点,这些靶点不仅在“药物-成分-靶点”网络中处于枢纽地位,且在调控气道炎症反应、上皮细胞凋亡与修复等PIC关键病理环节中具有明确生物学意义,有助于从分子层面揭示茅岩莓治疗PIC的核心机制,并为后续深入研究提供关键实验依据。

基于上述网络药理学预测所提示的潜在作用靶点与通路,进一步通过烟熏联合呼吸道合胞病毒激发构建PIC豚鼠模型,从整体动物水平系统验证茅岩莓提取物的治疗作用及其机制。结果显示,与模型组比较,茅岩莓提取物中、高剂量组豚鼠咳嗽潜伏期显著延长,咳嗽次数显著减少,表明茅岩莓提取物可有效降低PIC模型动物的咳嗽敏感性,缓解咳嗽症状。同时,茅岩莓提取物中、高剂量组豚鼠肺泡灌洗液白细胞、淋巴细胞、中性粒细胞数量及神经源性介质SP、IL-4、TNF- α 、INF- γ 水平显著降低,气管、支气管及肺组织病理学损伤明显减轻,显示茅岩莓提取物可显著减轻PIC模型豚鼠的气道炎症及组织病理损伤。此外,Western blotting检测结果显示,茅岩莓提取物能够呈剂量相关性地上调Bcl-2的表达,同时下调EGFR和p-STAT3的表达。这提示茅岩莓在治疗PIC的过程中,可能是通过调控Bcl-2信号通路,增强细胞的抗凋亡能力,从而使肺部细胞能够更有效地抵御炎症损伤,维持肺部的正常结构和功能。同时,调控EGFR和STAT3抗炎相关信号通路,减少肺泡灌洗液中的IL-4、TNF- α 等炎症因子水平,减轻肺组织的炎症损伤,改善肺部组织形态。

综上,本研究通过网络药理学结合动物实验明确了茅岩莓提取物对PIC具有显著的治疗效果。其作用机制可能涉及Bcl-2/EGFR/STAT3相关信号通路,通过减轻气道黏膜损伤、抑制气道炎症反应发挥作用。本研究为茅岩莓在PIC防治中的临床应用提供了理论依据和实验支持,但茅岩莓治疗PIC是

多成分、多靶点、多通路协同作用的结果，其具体的分子机制仍有待进一步深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 咳嗽的诊断与治疗指南 (2021) [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2022, 45(1): 13-46.
- [2] Baranova I V, Iliuk, Leshchenko S I, *et al.* Modern aspects of diagnostics and treatment of post-infectious cough hypersensitivity syndrome [J]. *Asthma Allergy*, 2020(4): 39-47.
- [3] 贺奥城, 郎一帆, 黄智超, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 的显齿蛇葡萄化学成分分析 [J]. 中药材, 2024, 47(8): 1986-1994.
- [4] Wu R R, Li X, Cao Y H, *et al.* China medicinal plants of the *Ampelopsis grossedentata*-a review of their botanical characteristics, use, phytochemistry, active pharmacological components, and toxicology [J]. *Molecules*, 2023, 28(20): 7145.
- [5] Du Q Z, Chen P, Jerz G, *et al.* Preparative separation of flavonoid glycosides in leaves extract of *Ampelopsis grossedentata* using high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1040(1): 147-149.
- [6] Chervet A, Nehme R, Decombat C, *et al.* Exploring the therapeutic potential of *Ampelopsis grossedentata* leaf extract as an anti-inflammatory and antioxidant agent in human immune cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(1): 416.
- [7] 唐梓宁, 彭冬冬, 刘学武, 等. 茅岩莓提取物治疗放射性口腔溃疡的作用研究 [J]. 中南药学, 2023, 21(9): 2311-2316.
- [8] 邵佩, 蹇顺华, 庄虎, 等. 不同藤茶提取物的理化指标、成分分析及抗氧化活性评价 [J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(10): 251-257.
- [9] 中华医学会, 中华医学会杂志社, 中华医学会全科医学分会, 等. 中国咳嗽基层诊疗与管理指南 (2024 年) [J]. 中华全科医师杂志, 2024, 23(8): 793-812.
- [10] 李云. 感染后咳嗽证素分布特点及杏仁止咳颗粒改善豚鼠感染后咳嗽的机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2024.
- [11] Braman S S. Postinfectious cough ACCP evidence-based clinical practice guidelines [J]. *Chest*, 2006, 129(1): 138S-146S.
- [12] 卢朋, 韩梁, 白雷, 等. 中药治疗感染后咳嗽的作用机制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(3): 757-769.
- [13] Rasul A. Physcion and physcion 8-O- β -D-glucopyranoside: Natural anthraquinones with potential anticancer activities [J]. *Curr Drug Targets*, 2021, 22(5): 488-504.
- [14] Liu Y H, Shang L R, Zhou J B, *et al.* Emodin attenuates LPS-induced acute lung injury by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis signaling pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. *Inflammation*, 2022, 45(2): 753-767.
- [15] Li Y, Yao J Y, Han C Y, *et al.* Quercetin, inflammation and immunity [J]. *Nutrients*, 2016, 8(3): 167.
- [16] Sul O J, Ra S W. Quercetin prevents LPS-induced oxidative stress and inflammation by modulating NOX2/ROS/NF- κ B in lung epithelial cells [J]. *Molecules*, 2021, 26(22): 6949.
- [17] Mabwi H A, Lee H J, Hitayezu E, *et al.* Emodin modulates gut microbial community and triggers intestinal immunity [J]. *J Sci Food Agric*, 2023, 103(3): 1273-1282.
- [18] Sun J, Jiang X Q, Chen Y X, *et al.* *Elsholtzia bodinieri* vaniot ameliorated acute lung injury by NQO1, BCL2 and PTGS2 *in silico* and *in vitro* analyses [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24): 15651.
- [19] Zaiss D M W, Gause W C, Osborne L C, *et al.* Emerging functions of amphiregulin in orchestrating immunity, inflammation, and tissue repair [J]. *Immunity*, 2015, 42(2): 216-226.
- [20] Hirano T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer [J]. *Int Immunol*, 2021, 33(3): 127-148.
- [21] Kao T I, Chen P J, Wang Y H, *et al.* Bletinib ameliorates neutrophilic inflammation and lung injury by inhibiting Src family kinase phosphorylation and activity [J]. *Br J Pharmacol*, 2021, 178(20): 4069-4084.
- [22] Dutta A, Hung C Y, Chen T C, *et al.* An IL-17-EGFR-TRAF4 axis contributes to the alleviation of lung inflammation in severe influenza [J]. *Commun Biol*, 2023, 6(1): 600.
- [23] Acosta-Martinez M, Cabail M Z. The PI3K/Akt pathway in Meta-inflammation [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(23): 15330.

[责任编辑 李亚楠]