

基于超高效液相色谱/四极杆-静电场轨道阱质谱 联合网络药理学筛选“芩百清肺浓缩丸”治疗 肺炎的活性成分

于洋^{1,2}, 辛杨^{1,2}, 王海军³, 杨清竹⁴, 王伟明¹

(1. 黑龙江省中医药科学院, 黑龙江 哈尔滨 150036; 2. 齐齐哈尔大学化学与化学工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006;

3. 齐齐哈尔医学院全科医学与继续教育学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006;

4. 齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要: 为筛选中药地龙在芩百清肺浓缩丸治疗肺炎时贡献的活性成分, 本研究在开展细胞实验证实芩百清肺浓缩丸抗炎作用的基础上, 采用超高效液相色谱/四极杆-静电场轨道阱质谱(UHPLC/Q-Exactive Orbitrap MS)法检测有、无地龙的芩百清肺浓缩丸提取液, 借助 Compound Discoverer 软件筛选差异离子, 根据二级质谱数据及标准品鉴定差异成分, 进一步开展差异成分治疗肺炎的网络药理学研究, 预测活性成分与靶点, 并通过分子对接与实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(RT-qPCR)技术验证活性成分与靶点。结果表明, 芩百清肺浓缩丸可通过降低细胞炎症因子 IL6、IL-1b, 趋化因子 CXCL2 和 CXCR2 的表达发挥抗炎活性, 通过液相色谱-质谱筛选得到了 15 个差异成分, 网络药理预测得到 7 个潜在活性成分及 22 个核心靶点, 其中 α -亚麻酸和腺苷经分子对接及 RT-qPCR 实验验证为地龙在芩百清肺浓缩丸治疗肺炎时贡献的活性成分。该方法为筛选中药复方中组方药材贡献活性成分提供了参考, 为中药复方活性成分研究提供了思路。

关键词: 超高效液相色谱/四极杆-静电场轨道阱质谱(UHPLC/Q-Exactive Orbitrap MS); 网络药理; 芩百清肺浓缩丸; α -亚麻酸; 腺苷; 肺炎

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2024)06-0884-13

DOI: 10.7538/zpxb.2024.0035

CSTR: 32365.14.zpxb.2024.0035

Screening of the Active Components of Qinbai Qingfei Concentrated Pill on Treating Pneumonia Based on UHPLC/Q-Exactive Orbitrap MS Uniting Network Pharmacology

YU Yang^{1,2}, XIN Yang^{1,2}, WANG Hai-jun³, YANG Qing-zhu⁴, WANG Wei-ming¹

(1. Heilongjiang Academy of Chinese Medical Sciences, Harbin 150036, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China;

3. School of General Medicine and Continuing Education, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China;

4. College of Life Science and Agroforestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

Abstract: In order to screen the active ingredients of Qinbai Qingfei Concentrated Pill (QQCP) on treating pneumonia contributed by Pheretima, the extracts of QQCP with and without Pheretima were

detected by ultra-high performance liquid chromatography/quadrupole-exactive Orbitrap mass spectrometry (UHPLC/Q-Exactive Orbitrap MS) after conducting the cell anti-inflammatory experiment. Compound Discoverer (CD) software was used to screen the differential ions, and the differential components were identified according to MS² spectra and standards. Further, the active ingredients and targets were predicted by carrying out network pharmacology of differential components treating pneumonia. At last, active ingredients which were identified by standards and their corresponding targets were verified by molecular docking and real-time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR). The results of cell anti-inflammatory experiments showed that QQCP can exert anti-inflammatory activity by decreasing the expression of IL6, IL-1b, CXCL2 and CXCR2. After detecting the extracts of QQCP by applying UHPLC/Q-Exactive Orbitrap MS, a total of 15 components are identified on the basis of their retention time, MS/MS spectra as well as standards. After that, there are 7 components connecting and 22 core targets obtained by applying network pharmacology. After verified by molecular docking and RT-qPCR, α -linolenic acid and adenosine are considered as the active components of QQCP treating pneumonia. This study develops a method of UHPLC/Q-Exactive Orbitrap MS uniting network pharmacology to screen the contributing active components from one medicine in Chinese medicine compounds, which provides a new idea for the study on active components of Chinese medicine compounds.

Key words: ultra-high performance liquid chromatography/quadrupole-exactive Orbitrap mass spectrometry (UHPLC/Q-Exactive Orbitrap MS); network pharmacology; qinbai qingfei concentrated pill; α -linolenic acid; adenosine; pneumonia

肺炎威胁着人类的生命健康, 如果不及干预, 容易转化为重症肺炎而危及生命^[1]。现今治疗肺炎的方法主要是利用抗生素控制感染、缓解症状、防治并发症, 但大量使用抗生素引起的不良反应和耐药性问题日益突出。因此, 开发新型肺炎治疗药物势在必行。

芩百清肺浓缩丸是黑龙江省中医药科学院自主研发, 由黄芩、百部、地龙、桔梗、紫苑、麦冬组成的中药复方制剂^[2], 具有清热解毒、润肺止咳之功效, 治疗肺炎起效快、效果明显^[3]。前期研究^[4]表明, 该方剂可提高免疫功能且促进上皮细胞修复, 在抑制病原体的同时保护肺上皮细胞。地龙作为方中臣药, 在肺炎治疗中具有不可或缺的作用^[5-6]。实验研究^[7]表明, 地龙可显著改善肺炎小鼠肺组织结构、减少炎性反应; 临床研究^[8]表明, 地龙可治疗关节痹痛、高热神昏、肺热咳嗽等症。因此, 本实验以地龙为研究对象, 以期筛选其在芩百清肺浓缩丸治疗肺炎时贡献的活性成分。

在检测技术与研究方法的选择方面, 液相色

谱-质谱技术以高效、快速、灵敏的特点, 广泛应用于中药成分研究^[9]; 网络药理学以经济、省时的特点, 可用于预测中药活性成分与作用靶点及通路^[10]。开展基于液相色谱-质谱技术检出成分的网络药理学, 可减少仅通过搜索已报道成分开展网络药理学的假阳性结果。实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(RT-qPCR)技术可定量评估目标基因的表达水平^[11-12], 可用于液相色谱-质谱技术联合网络药理学预测结果的验证。

为揭示地龙在芩百清肺浓缩丸治疗肺炎中的作用, 本研究以筛选地龙贡献的活性成分为目标, 首先开展细胞实验评价芩百清肺浓缩丸的抗炎活性, 进一步采用超高效液相色谱/四极杆-静电场轨道阱质谱(UHPLC/Q-Exactive Orbitrap MS)技术检测有、无地龙的芩百清肺浓缩丸提取液, 借助 Compound Discoverer 3.1 SP1 软件筛选差异成分, 通过网络药理学预测差异成分治疗肺炎的靶点, 并通过分子对接及 RT-qPCR 实验验证活性成分及靶点, 希望为中药复方活性成分的筛选研究提供参考。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

芩百清肺浓缩丸(批号: 202201)、无地龙的芩百清肺浓缩丸(批号: 202201): 由黑龙江省中医药科学院制剂室提供; 甲醇(分析纯, 批号: 20220621): 天津市科密欧化学试剂有限公司产品; 阿奇霉素(批号: 2202174): 湖北潜龙药业有限公司产品; 人源 H460 细胞(编号: BNCC339581): 北京北纳公司产品; 培养基 RPMI-1640(批号: 2023235): 美国 Thermo Fisher 公司产品; 腺苷(批号: 230510)、 α -亚麻酸(批号: 230312)、花生四烯酸(批号: 230421)、亚油酸(批号: 230605): 上海融禾医药科技发展有限公司产品。本研究中所用引物均由北京赛文有限公司合成, 具体序列信息列于附表 1(请登录《质谱学报》网站 <https://zpxb.xml-journal.net> 下载, 以下同)。

1.2 仪器与设备

Ultimate3000/Q-Exactive 超高效液相色谱-静电场轨道阱质谱仪、Quant studio 实时荧光定量 PCR 仪: 美国 Thermo Fisher 公司产品; YM5-120D 超声波清洗机、YML-100B 恒温混匀仪: 上海豫明仪器公司产品; bas124s 分析天平: 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司产品; TGL-16aR 高速冷冻离心机: 上海安亭科学仪器厂产品; Spark10M 多功能酶标仪: 瑞士 TECAN 公司产品; Thermo371 二氧化碳培养箱: 北京城茂兴业科技有限公司产品。

1.3 体外抗炎实验

1.3.1 药液制备 称取 0.100 0 g 芩百清肺浓缩丸, 以甲醇为溶剂, 经恒温混匀仪振荡 30 min 后, 超声提取 30 min, 以 10 000 r/min 离心 10 min, 得上清液。

1.3.2 细胞培养 选择人源 H460 细胞, 于 37 °C、5%CO₂ 饱和湿度下培养, 用含 10%胎牛血清(FBS)的 1640 培养基进行常规培养和传代。

1.3.3 噻唑蓝(MTT)法检测细胞存活率 选取处于对数生长期的人肺癌 H460 细胞, 以 5 000 个/100 μ L 的细胞数接种于无菌 96 孔板中, 培养箱中过夜培养 16 h。将细胞分为空白组、脂多糖(LPS)炎症组、阳性药组、不同浓度芩百清肺浓缩丸组。待细胞贴壁后, 将孔中培养基移除, 加入含有不同浓度药物的培养基继续培养细胞 24 h 和 48 h, 每组 3 复孔。然后, 向每孔中加入 10 μ L 5 g/L MTT,

培养箱中避光孵育 4 h。将孔中的液体全部移除后, 向每孔中加入 100 μ L 二甲基亚砜(DMSO), 使用酶标仪于 490 nm 波长下测定每孔的吸光度值 A 。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{药物}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

1.3.4 RT-qPCR 检测炎症因子表达 将处于对数生长期的细胞, 经传代分组, 贴壁 12~18 h, 利用 50 mg/L LPS 诱导细胞产生炎症。向阳性药组加入 20 μ L 10 g/L 阿奇霉素溶液, 向芩百清肺浓缩丸组加入 20 μ L 20 g/L 芩百清肺浓缩丸, 继续培养细胞 24 h 后, 收集细胞, 使用 Trizol 法从细胞分离出总 RNA, 利用 Nanodrop 2000 检测 RNA 浓度及纯度。利用 ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover 试剂盒逆转录 cDNA, 并利用 TB Green[®] Fast qPCR Mix 试剂盒对逆转录的 cDNA 进行聚合酶链式反应(PCR)扩增, 检测相关基因在 mRNA 水平的变化。步骤中设定 40 个循环反应, 待反应结束后, 用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法进行数据分析, α -微管蛋白(α -tubulin)为内参基因。

1.4 差异成分检测与分析

1.4.1 样品制备 精确称取 0.100 0 g 芩百清肺浓缩丸(实验组)和无地龙的芩百清肺浓缩丸(对照组), 以 70%甲醇水溶液和纯甲醇作为提取溶剂对实验组与对照组药粉进行提取, 每组 10 个样品。经恒温混匀仪振荡 30 min 后, 超声提取 30 min, 以 10 000 r/min 离心 10 min, 得上清液。

1.4.2 色谱条件 CSH C18 色谱柱(50 mm \times 2.1 mm \times 1.7 μ m); 柱温 30 °C; 流动相为甲醇(A)-水(B); 梯度洗脱程序: 0 min(10%A), 3 min(75%A), 16 min(90%A), 17 min(100%A); 流速 0.3 mL/min; 进样量 5 μ L。

1.4.3 质谱条件 扫描模式: Full Mass-SIM(一级), Full MS/dd-MS²(二级); 质量扫描范围 m/z 100~1 500; 分辨率 70 000(一级)、17 500(二级); 毛细管温度 300 °C; 喷雾电压 4.0 kV; 鞘气流速 35 L/h; 出口透镜(S-lens)电压 50 V; 碰撞能量(NCE): 10、20、30。

1.4.4 差异成分分析 将 UHPLC/Q-Exactive Orbitrap MS 检测源文件导入 Compound Discoverer 3.1 SP1 软件进行处理, 设置无地龙的芩百清肺浓缩丸为“control”, 有地龙的芩百清肺浓缩丸为“sample”, 以 P -value(sample/control) $<$ 0.05、Adj. P -value(sample/control) $<$ 0.05、Log₂FoldChange (sample/control) $>$

2 为筛选条件, 获得差异离子。

利用 PubChem 数据库、化学专业数据库、化源网数据库、mzCloud 数据库、Chemspider 数据库检索地龙成分的相关信息, 总结化学成分分子式、结构式和分子质量, 通过 HMDB 在线数据库整合二级碎片离子, 同时结合文献^[13-14]中地龙的化学成分数据, 建立化学成分数据库。

根据 Xcalibur 软件中一级提取保留时间、二级质谱碎片信息, 结合地龙化学成分数据库推测差异离子结构, 并通过与标准品的液相色谱-质谱图对比, 鉴定差异成分。

1.5 差异成分治疗肺炎的网络药理学

1.5.1 差异成分作用靶点获取 利用 PubChem 数据库获得差异成分的 Canonical SMILES, 通过设置 Swiss Target Prediction 数据库的“Homo sapiens”选项进行靶点预测。将各成分得到的靶点以“Probability>0”为条件进行筛选, 去除无靶点成分, 然后合并全部靶点, 去除无用靶点和重复值。

1.5.2 肺炎靶点获取 以肺炎“pneumonia”为关键词, 通过 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org>)、OMIM 数据库(<https://omim.org>)查找相关靶点, 再借助 DRUGBANK 数据库(<https://www.drugbank.ca>)查找肺炎临床一线西药作用的靶点进行补充。使用 GeneCards 数据库时, Score 值越高, 代表该靶点与疾病联系越密切, 以 Score 值大于中位数的目标靶点作为肺炎潜在靶点, 合并 3 个疾病数据库靶点后, 删除重复值, 得到肺炎靶点^[15]。

1.5.3 差异成分靶点-肺炎靶点蛋白互作(PPI)网络构建 利用 Venny(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny>)在线平台获得差异成分靶点与肺炎靶点的交集靶点。利用 STRING 数据库(<https://cn.string-db.org/>)选择物种为“Homo sapiens”, 得到交集靶点的 PPI 网络图^[16], 再利用 CytoScape 3.8.2 软件中的 CytoNCA 插件计算交集靶点的节点连接度(degree)、介度(betweenness centrality)、紧密度(closeness centrality), 以连接度>18.579 4、介度>108.523 4、紧密度>0.004 8 为筛选条件, 得到核心靶点。

1.5.4 核心靶点 GO 生物学功能分析和 KEGG 代谢通路富集分析 将核心靶点输入到 Metascape(<https://metascape.org/gp/index.html>)数据平台进

行基因本体(gene ontology, GO)生物学功能分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)代谢通路富集分析, 种属参数设置为人类“Homo species”。选择生物过程(biological processes, BP)、细胞组成(cell components, CC)、分子功能(molecular function, MF) 3 类信息 *P* 值较小的前 10 个结果, 在微信(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)网站进行可视化, 绘制 KEGG 排名前 10 的通路气泡图。

1.5.5 差异成分-靶点-通路网络 利用 CytoScape 3.8.2 软件展示由差异成分、核心靶点、KEGG 通路构成的网络图, 得到差异成分-靶点-通路网络图。

1.5.6 分子对接 从 PDB 数据库(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)下载核心靶点蛋白结构, 使用 Pymol 软件进行去除配体、水等操作, 利用 AutoDockTools1.5.7 软件进行分子对接, 采用半柔性对接, 对接参数均为默认值, 对接次数 50 次。

1.6 RT-qPCR 检测核心靶点基因表达

将处于对数生长期的细胞经传代分组, 贴壁 12~18 h, 设置空白组、腺苷组、 α -亚麻酸组。向腺苷组加入 10 g/L 腺苷, α -亚麻酸组加入 10 g/L α -亚麻酸, 处理 24 h, 各组均按 200 μ L 培养基加入 10 μ L 药液计。分别收集 3 组细胞, 根据 Trizol 法从细胞分离出总 RNA, 利用 Nanodrop2000 检测 RNA 浓度及纯度。利用 ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover 试剂盒逆转录 cDNA, 并利用 TB Green[®] Fast qPCR Mix 试剂盒对逆转录的 cDNA 进行 PCR 扩增, 检测 EGFR、CCND1、MAPK1、SRC、PPARG、AR、IL6 基因在 mRNA 水平的表达。步骤中设定 40 个循环反应, 待反应结束后, 用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法进行数据分析, GAPDH 为内参基因。

2 实验结果

2.1 体外抗炎实验

MTT 法检测细胞存活率实验结果表明, 当炎症组细胞中加入 10 μ L 50 mg/L LPS, 阳性药组细胞中加入 10 μ L 10 g/L 阿奇霉素, 药液组加入 10 μ L 20 g/L 芩百清肺浓缩丸提取液, 培养细胞 24 h 后, 细胞存活率均大于 80%。

实时荧光定量 PCR 实验结果示于图 1。可见, 经芩百清肺浓缩丸给药 24 h 后, 可使炎症因

子 IL6 明显回调, IL-1b 显著回调, CXCL2 趋化因子显著回调, CXCR2 趋化因子极显著回调, 表明芩百清肺浓缩丸对炎症因子具有抑制作用。

2.2 差异成分筛选与鉴定

采用 UHPLC/Q-Exactive Orbitrap MS 技术检测实验组和对照组药液, 结果示于图 2。以 70% 甲醇作为提取溶剂时, 得到 255 个差异离子; 以纯甲醇作为提取溶剂时, 得到 204 个差异离子; 取并集去掉重复离子, 共得到 296 个差异离子。

将差异离子的二级质谱数据与文献和数据库比对^[13-14], 并经标准品验证, 共推断与鉴定出 15 个差异成分, 列于表 1。以 α -亚麻酸为例, 其色谱图和二级质谱图示于图 3。 α -亚麻酸的保留时间为 10.74 min, 准分子离子为 m/z 279.231 3 $[M+H]^+$, MS^2 碎片离子为 m/z 137.132 3 $[M-COOH-C_7H_{12}]^+$ 、123.116 8 $[M-COOH-C_8H_{14}]^+$ 、109.101 3 $[M-COOH-C_9H_{13}]^+$, 与文献^[13]中的质谱数据一致。经与 α -亚麻酸标准品的谱图对照, 可确定 m/z 279.231 3 为 α -亚麻酸, 示于附图 1 (请登录《质谱学报》网站 <https://zpxb.xmljournal.net> 下载, 以下同)。

2.3 差异成分治疗肺炎的网络药理学

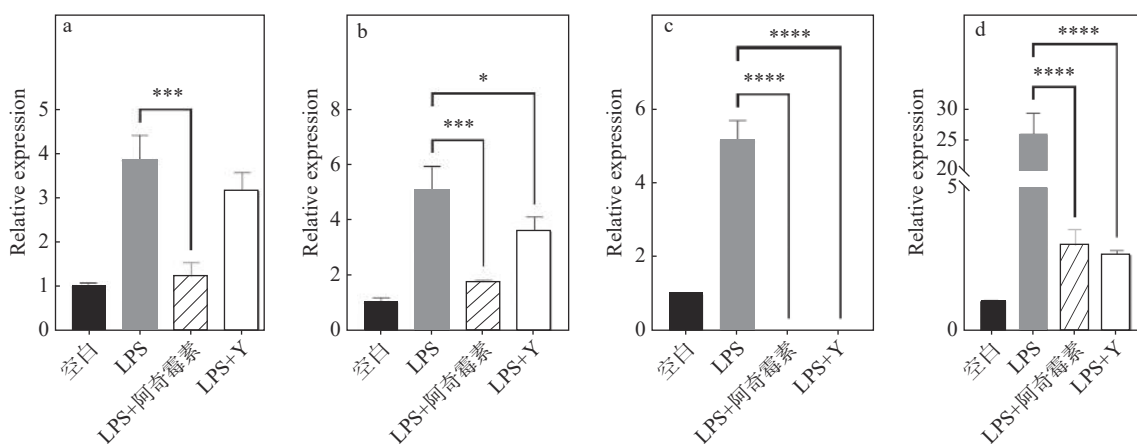
2.3.1 差异成分作用靶点获取 将得到的 15 个差异成分经 Swiss Target Prediction 数据库预测, 表 1 中第 15 号成分未获得靶点, 1~14 号成分共获得 939 个靶点, 去除重复靶点后保留 367 个靶点。

2.3.2 肺炎靶点获取 通过 GeneCards 数据库得到有关肺炎的所有 5 358 个靶点, Score 最大值为 27.88, 最小值为 0.11, 中位数为 0.99, 设定 $Score > 0.99$ 为肺炎的潜在靶点, 筛选得到 1 263 个靶点; 通过 OMIM 数据库得到 33 个靶点; 通过 DRUGBANK 数据库得到 34 个靶点。将 3 个数据库靶点合并后删除重复靶点, 最终得到 1 293 个肺炎靶点。

2.3.3 差异成分靶点-肺炎靶点 PPI 网络构建 利用 Venny 平台获得 109 个差异成分靶点与疾病靶点的交集靶点, 推测为差异成分治疗肺炎的作用靶点。

利用 STRING 数据库获得 109 个交集靶点的 PPI 网络, 示于图 4, 共包含 109 个节点、994 条边, 颜色越红、连接度越高的靶点在肺炎中的作用越大。利用 CytoScape 3.8.2 软件筛选得到交集靶点中的 22 个核心靶点, 包括白细胞介素-6 (interleukin 6, IL6)、RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, AKT1)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、表皮生长因子受体 (epithelial growth factor receptor, EGFR)、有丝分裂原激活蛋白激酶 3 (mitogen-activated protein kinase 3, MAPK3)、转信号传导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 等, 按连接度值排序列于附表 2。

2.3.4 核心靶点基因的 GO 生物学功能及 KEGG 代谢通路富集分析 GO 富集分析结果显

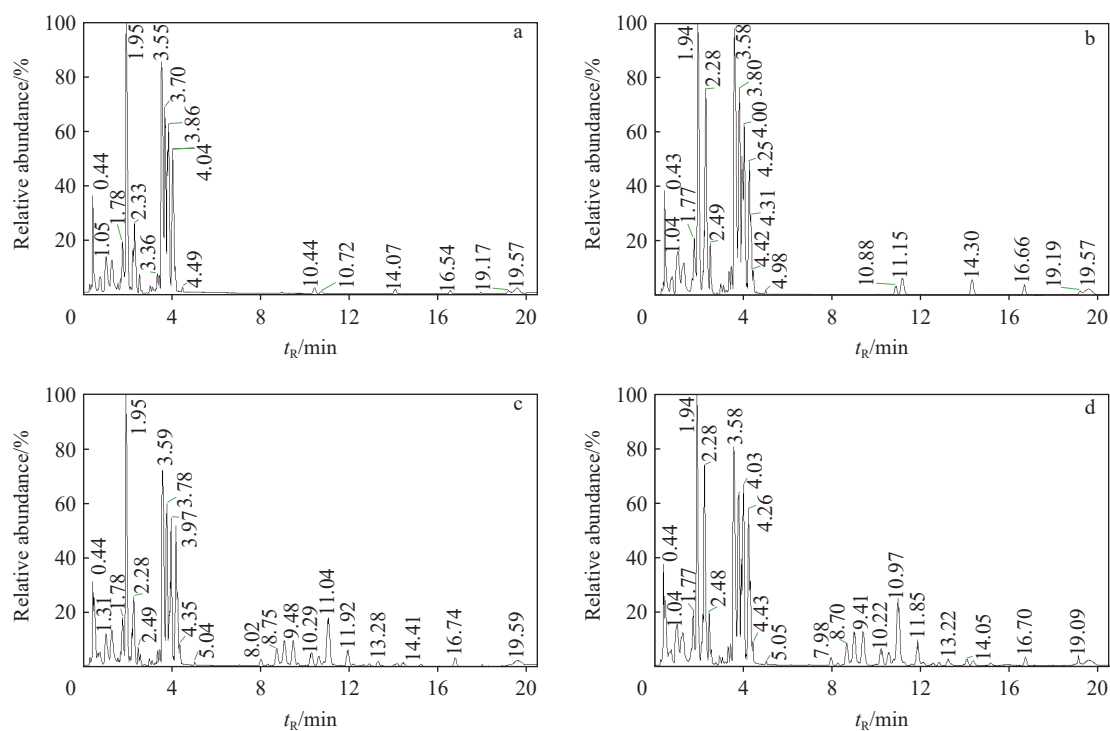


注: a. IL6; b. CXCL2; c. CXCR2; d. IL-1b; LPS. 炎症组; LPS+阿奇霉素. 阳性药组; LPS+Y. 芩百清肺浓缩丸组;

*表示 $P \leq 0.05$, ***表示 $P \leq 0.001$, ****表示 $P \leq 0.0001$

图 1 细胞因子表达图

Fig. 1 Expression of cytoinflammatory factor



注: a.c. 70%甲醇提取液; b.d. 纯甲醇提取液

图2 对照组(a, b)和实验组(c, d)药液的基峰离子色谱图

Fig. 2 Basic ion chromatograms of drug solutions of control group (a, b) and experimental group (c, d)

表1 差异成分信息

Table 1 Information of differential compounds

| 序号 No. | 离子模式 Ion mode | 保留时间 Retention time/min | 化合物 Compound | 测定质荷比 Measured value (<i>m/z</i>) | 理论质荷比 Theoretical value (<i>m/z</i>) | 质量偏差 Mass value deviation/ $\times 10^{-6}$ | 分子式 Molecular formula | 碎片离子 Fragment ion (<i>m/z</i>) |
|------------------|------------------|----------------------------|---------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| 1 ^{ab} | + | 0.70 | 次黄嘌呤 ^[13-14] | 137.0455 | 137.0458 | 2.19 | C ₅ H ₄ N ₄ O | 119.0352, 110.0350 |
| 2 ^{ab} | + | 0.61 | 腺苷 ^[13] * | 268.1033 | 268.1040 | 5.59 | C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄ | 136.0616, 119.0352 |
| 3 ^b | + | 10.74 | α -亚麻酸 ^[14] * | 279.2311 | 279.2319 | 2.87 | C ₁₈ H ₃₀ O ₂ | 137.1323, 123.1168, 109.1013, 95.0859, 81.0703 |
| 4 ^b | + | 12.31 | 脱氢枞醇 ^[13] | 287.2362 | 287.2369 | 2.44 | C ₂₀ H ₃₀ O | 269.2259, 227.1787, 213.1633, 203.1790, 201.1633 |
| 5 ^{ab} | + | 10.64 | 二十碳五烯酸 ^[13] | 303.2309 | 303.2319 | 3.30 | C ₂₀ H ₃₀ O ₂ | 285.2210, 233.1532, 207.1379, 189.1634, 175.1480, 161.1322, 147.1168 |
| 6 ^b | + | 12.18 | 花生四烯酸 ^[13] * | 305.2466 | 305.2475 | 2.95 | C ₂₀ H ₃₂ O ₂ | 287.2364, 249.1847, 235.1686, 207.1375, 205.1951, 147.1165, 121.1012 |
| 7 ^{ab} | + | 17.40 | 11-二十碳烯酸 ^[13-14] | 311.2935 | 311.2945 | 3.21 | C ₂₀ H ₃₈ O ₂ | 223.2437, 97.1015, 57.0605 |
| 8 ^b | + | 15.80 | Neergostatriene ^[13] | 367.3349 | 367.3359 | 2.72 | C ₂₇ H ₄₂ | 255.2116, 241.1944, 213.1631, |
| 9 ^{ab} | + | 3.60 | 2-Aminotetralin [#] | 148.1114 | 148.1121 | 4.73 | C ₁₀ H ₁₃ N | 131.0857, 129.0699, 105.0699, 103.0543, 91.0545 |
| 10 ^{ab} | + | 2.02 | Staphyloamide B [#] | 213.1227 | 213.1234 | 3.28 | C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ | 195.1125, 98.0602, 70.0657 |
| 11 ^{ab} | + | 2.90 | Limazepine F [#] | 245.1278 | 245.1285 | 2.86 | C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂ | 217.1331, 153.0655, 120.0807, 91.0547 |

续表

| 序号 No. | 离子模式 Ion mode | 保留时间 Retention time/min | 化合物 Compound | 测定质荷比 Measured value (<i>m/z</i>) | 理论质荷比 Theoretical value (<i>m/z</i>) | 质量偏差 Mass value deviation/ $\times 10^{-6}$ | 分子式 Molecular formula | 碎片离子 Fragment ion (<i>m/z</i>) |
|------------------|------------------|----------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 12 ^{ab} | + | 0.69 | Shinorine [#] | 333.1283 | 333.1292 | 2.70 | C ₁₃ H ₂₀ N ₂ O ₈ | 315.1181, 297.1079, 287.1230, 269.1127 |
| 13 ^a | + | 12.53 | 亚油酸 ^{[13-14]*} | 281.2468 | 281.2475 | 2.49 | C ₁₈ H ₃₂ O ₂ | 263.2362, 219.2110, 179.1797, 165.1640 |
| 14 ^a | + | 13.64 | 8,11,14-二十碳三烯酸 ^[13] | 307.2622 | 307.2631 | 2.93 | C ₂₀ H ₃₄ O ₂ | 289.2523, 209.1535, 121.1013, 109.1013 |
| 15 ^b | + | 18.47 | 麦角甾-1,3,5,7-四烯-1-醇 ^[13] | 395.3306 | 395.3308 | 0.51 | C ₂₈ H ₄₂ O | 377.3216, 311.2360, 297.2207, 269.1894, 251.1794 |

注: *表示与标准品进行对照; #表示参考HMDB数据库; a表示70%甲醇提取有、无地龙样品所得的差异成分; b表示纯甲醇提取有、无地龙样品所得的差异成分

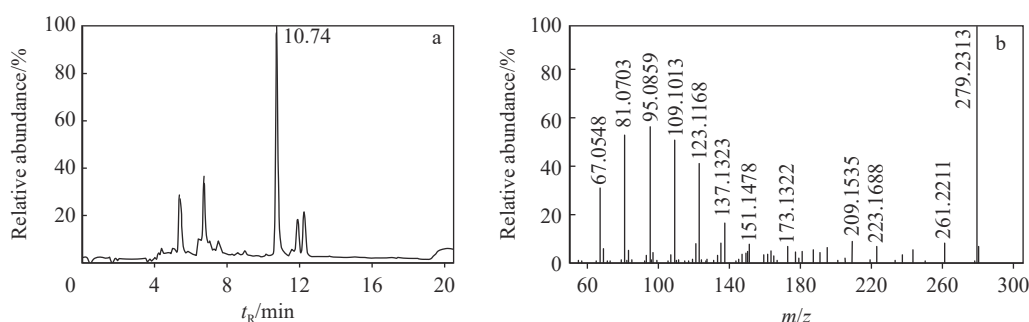


图3 *m/z* 279.2313 的提取离子色谱图(a)和二级质谱图(b)

Fig. 3 Extracted ion chromatogram (a) and MS² spectrum (b) of *m/z* 279.2313

示, GO 条目共 563 个 ($P < 0.05$), 涉及 498 个生物过程、30 个细胞组成、35 个分子功能, 分别占 88.5%、5.3%、6.2%。将 3 个类别得到的分析结果按照 P 值从小到大排序, 排序前 10 的生物过程包括对激素的反应、对肽的反应、对营养水平的反应、对细胞外刺激的反应、对肽激素的反应、细胞对激素刺激的反应、细胞对有机氮化合物的反应、酶联受体蛋白信号通路、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路、细胞对氮化合物的反应; 排序前 10 的细胞组成包括膜筏、膜微区、膜穴样内陷、等离子体膜筏、富含 ficolin-1 的颗粒管腔、囊泡腔、富含 ficolin-1 的颗粒、焦点粘连、细胞-基底结、核包络; 排序前 10 的分子功能包括磷酸酶结合、蛋白激酶结合、DNA 结合转录因子结合、激酶结合、血红素结合、核受体活性、配体激活的转录因子活性、四吡咯结合、蛋白激酶活性、RNA 聚合酶 II 特异性 DNA 结合转录因子结合。

对 22 个核心靶点进行 KEGG 代谢通路富集分析, 共得到 123 条信号通路, 前 10 的信号通路示于图 5。结果表明, 肺炎与人类巨细胞病毒感染、脂质和动脉粥样硬化、化学致癌-受体激活、

卡波西肉瘤相关疱疹病毒、癌症中的蛋白聚糖等密切相关。可以看出, 肺炎的发生可能与多种肺外疾病以及癌症的发生密切相关, 越来越多的证据支持炎症能够加速多种癌症的发展^[17]。差异成分可能通过调控脂质和动脉粥样硬化、卡波西肉瘤相关疱疹病毒、人类巨细胞病毒感染、化学致癌-受体活化等途径发挥治疗肺炎的作用。

2.3.5 差异成分-靶点-通路网络 利用 CytoScape 3.8.2 软件构建差异成分-核心靶点-通路网络, 示于图 6, 其中, 22 个核心靶点以红色标示, 蓝色三角形节点代表富集的 10 个关键通路, 橙色菱形节点代表 7 个成分。连接节点的边共有 101 条, 节点的大小与连接度成正比, 节点越大, 表明与此节点相连接的节点越多, 在治疗肺炎时发挥的作用越大。由此可知, 与核心靶点相关联的成分为 α -亚麻酸、Limazepine F、腺苷、二十碳五烯酸、Staphyloamide B、8,11,14-二十碳三烯酸、脱氢枞醇, 被预测为地龙贡献的潜在活性成分。

2.3.6 分子对接 利用 AutoDock 软件进行分子对接, 对接参数均为默认值, 采用半柔性对接、对接次数 50 次。选取腺苷和 α -亚麻酸(经标准品鉴定结构, 为网络药理预测的活性成

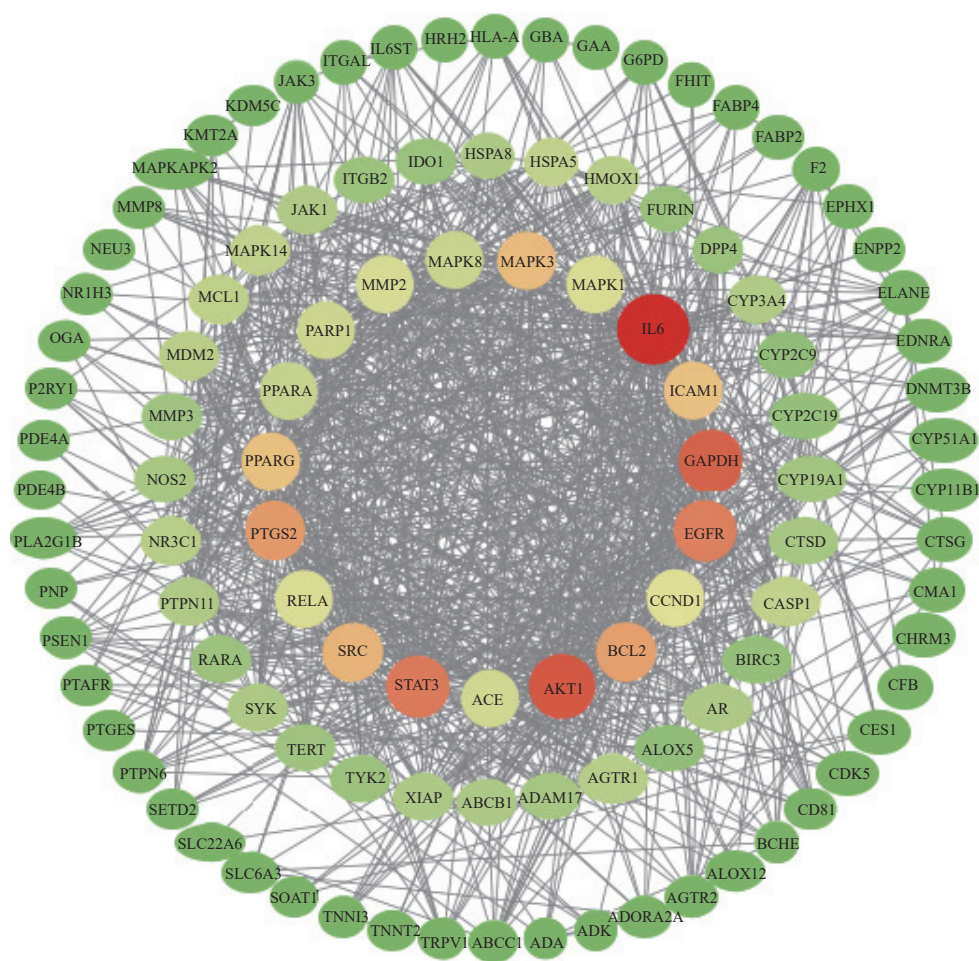


图 4 交集靶点 PPI 网络图
Fig. 4 PPI network map of intersection target

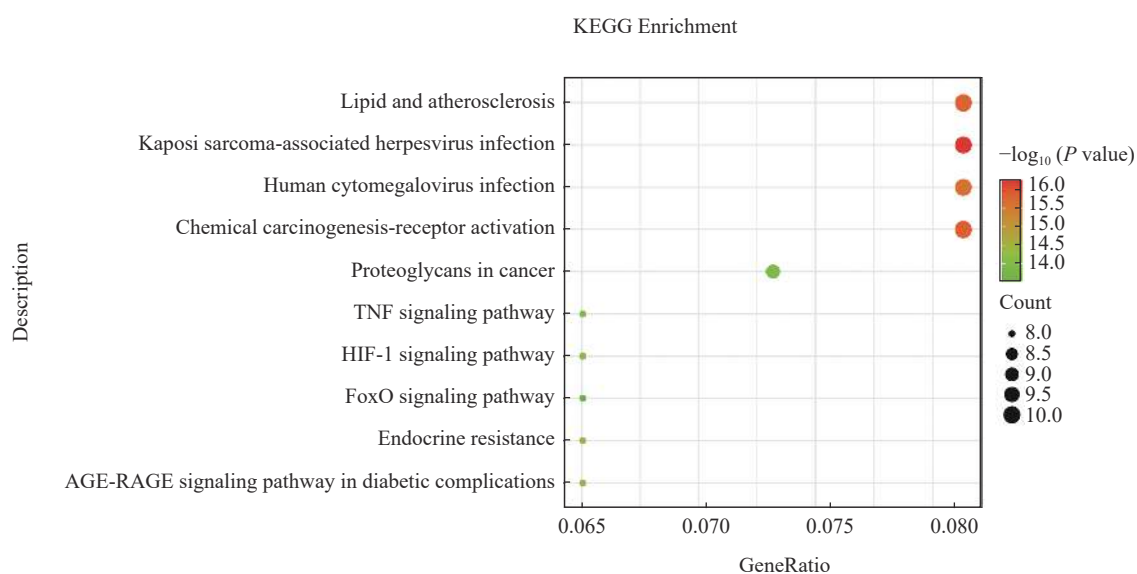


图 5 KEGG 信号通路富集图
Fig. 5 Enrichment of KEGG signal pathway

分)与对应的核心靶点进行对接,对接结果小于 -5.02 kJ/mol 被认为是有效结合,结果示于附图 2。

2.3.7 RT-qPCR 检测核心靶点基因表达 为验证分子对接结果,采用 RT-qPCR 技术检测腺苷和 α -亚麻酸干预前、后 H460 细胞中 4 种核心靶点基因的表达水平,示于图 7。显然,经腺苷和 α -亚麻酸干预后,各对应核心靶点基因的相对表达量均发生下调,表明腺苷可作用在靶点基因 EGFR、CCND1、MAPK1、SRC 上发挥抗炎活性,

α -亚麻酸可作用在靶点基因 PPARG、AR、IL6、MAPK1 上发挥抗炎活性。

3 讨论

研究表明,IL6 高表达可引起机体产生炎症,抑制 IL6 表达可降低炎症反应。CXCL2 是具有致炎作用的趋化因子^[18],可通过介导 PI3K/Akt 和 NF- κ B 信号通路参与调控炎症反应^[19]。正常生理状态下,机体不表达或低表达促炎趋化因子,但受脂多糖等刺激,促炎趋化因子被诱导高

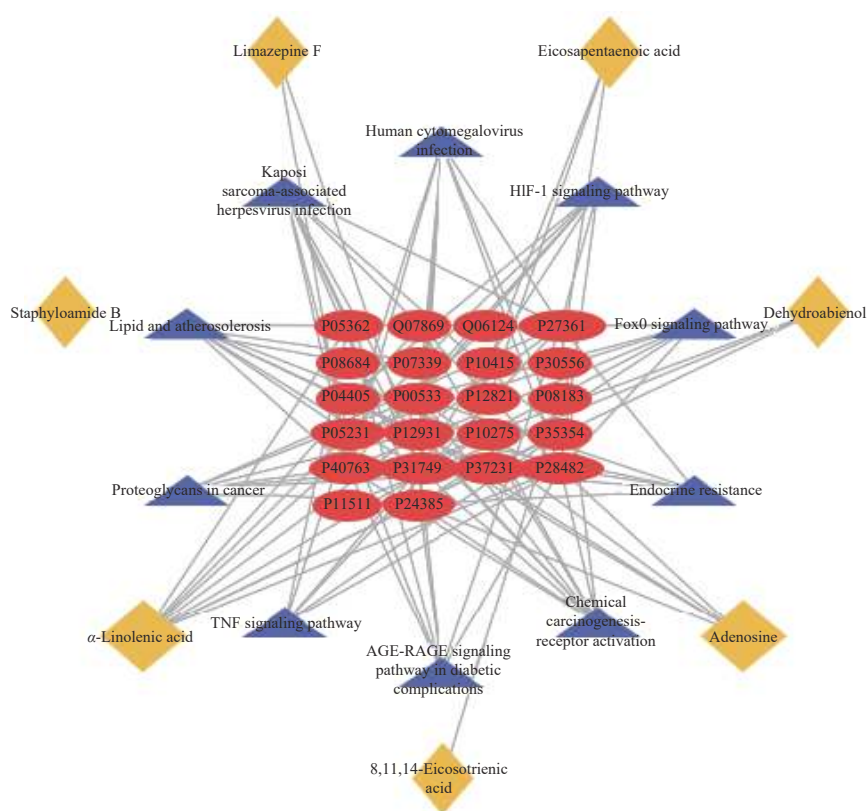


图 6 差异成分-肺炎靶点-通路网络图

Fig. 6 Network of differential compounds-target of pneumonia-pathway

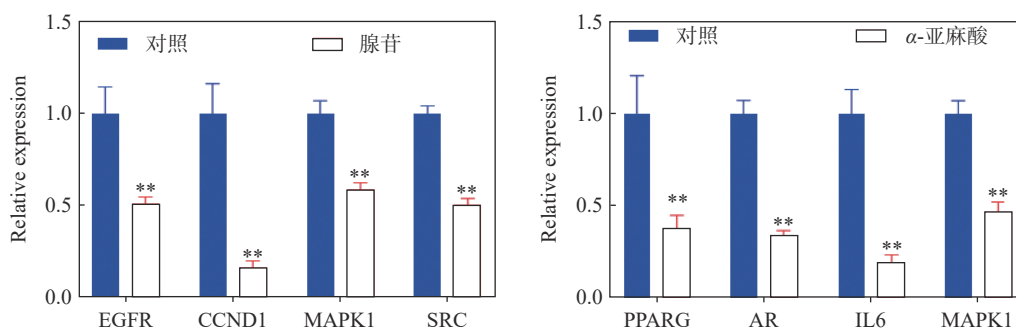


图 7 活性成分干预前、后,核心靶点基因表达图

Fig. 7 Gene expression of core target before and after active ingredient intervention

表达,同时巨噬细胞中 NLRP3 炎症小体的调控也被激活^[20],大量的 NLRP3 炎症小体被释放出来,使 CXCR2 被激活^[21]。本研究中,经芩百清肺浓缩丸干预后,与脂多糖刺激的肺泡上皮细胞相比,炎症因子 IL6 表达下调,炎症因子 IL-1b 表达显著下调,趋化因子 CXCL2 和 CXCR2 表达显著下调,表明芩百清肺浓缩丸具有抗炎活性。

地龙作为芩百清肺浓缩丸方中臣药^[22],其发挥的作用不可忽视。地龙无蛋白提取液可显著抑制炎症细胞因子 IL-1b 和 IL6 的释放,表明其具有良好的抗炎作用^[23]。为筛选芩百清肺浓缩丸治疗肺炎时地龙贡献的活性成分,本研究分别对有、无地龙的芩百清肺浓缩丸进行提取,采用 UHPLC/Q-Exactive Orbitrap MS 技术检测化学成分,结合网络药理学分析,预测出 7 个活性成分可通过作用于 22 个核心靶点发挥治疗肺炎的作用,并对其中 2 个经标准品鉴定结构的活性成分与相应靶点进行分子对接。结果表明, α -亚麻酸与 PPARG、AR、IL6、MAPK1 可有效结合,腺苷与 EGFR、CCND1、SRC、MAPK1 可有效结合。上述靶点中,MAPK1 属于丝裂原活化蛋白激酶通路家族,主要涉及细胞的存活、增殖、分化和凋亡等来响应各种细胞外信号^[24],可以促进炎症因子表达,导致内毒性急性肺损伤等相关炎症疾病的发生^[25];表皮生长因子受体 EGFR 是一种酪氨酸激酶受体,其信号传导引发的肺损伤会引起肺纤维化,与气道炎症反应、气道黏液分泌、气道重塑等相关^[26],可通过 ERK1/2、NF- κ B 等信号通路参与细菌感染,导致肺上皮损伤过程及炎症细胞因子的生成^[27],抑制 EGFR 信号可防止一些呼吸道病毒感染肺部纤维化的反应^[28];CCND1 是调节细胞周期的重要蛋白质,是 AKT-GSK3 β 通路的潜在下游靶因子,抑制其表达可下调肿瘤细胞增殖,增强肺癌患者的抗肿瘤免疫功能^[29];SRC 在细胞形态、运动、增殖和存活中发挥重要作用,与特异性肺纤维化的发生有着密切关系^[30]。可见,抑制这些靶点基因表达可以发挥治疗肺炎的作用。因此,为了验证分子对接结果,采用 RT-qPCR 技术考察 α -亚麻酸对 PPARG、AR、IL6、MAPK1 靶点基因表达的影响,以及腺苷对 EGFR、CCND1、SRC、MAPK1 靶点基因表达的影响,结

果显示, α -亚麻酸与腺苷均能显著性下调相应靶点基因的表达,表明它们具有抗炎活性。

α -亚麻酸是人体必需的不饱和脂肪酸,具有多种营养保健作用和药理作用,包括抗癌、神经保护、抗骨质疏松、抗氧化、抗炎和抑菌等^[31-32]。 α -亚麻酸具有强效抗炎特征,可以抑制炎症相关的 NF- κ B 信号通路^[33],通过作用在丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase1, MAPK1) 上,调控 MAPK 的磷酸化水平^[34],因此,其可能通过 MAPK 影响 NF- κ B 通路抑制趋化因子表达,介导肺炎。在人体内, α -亚麻酸还可以被转化为二十碳五烯酸 (eicosapentenoic acid, EPA),EPA 具有显著的抑菌和抗炎作用^[35],并且不会产生明显的耐药性^[36]。腺苷被科学家誉为“生命的物质”,可以激活免疫系统,调控包括清除细菌、病毒、癌细胞等一系列的身体免疫修复恢复机制^[37]。腺苷具有增强肺部免疫力、抗炎、保护心脏、保护肝脏、保护肾脏和抗肺纤维化等多重作用^[38]。内源性腺苷存在于血管内皮细胞和红细胞中,通过环腺苷酸 (cAMP) 介导,可以降低由肺炎导致的肺动脉压力增高。外源性腺苷可刺激肺血管平滑肌细胞上的去肾上腺素能受体,激活细胞膜上的腺苷酸环化酶,使细胞内 cAMP 增加,引起肺血管扩张^[39]。研究表明^[40],当适量腺苷进入肺循环,可能完全与血管内皮细胞表面的受体结合产生舒张作用,或被内皮细胞摄取代谢,使肺炎诱导的肺动脉高压降低。

综上所述,采用超高效液相色谱/四极杆-静电场轨道阱质谱联合网络药理学筛选出芩百清肺浓缩丸治疗肺炎时地龙贡献的活性成分为 α -亚麻酸和腺苷,该方法可为中药复方活性成分的筛选提供参考。

参考文献:

- [1] 甘大莉,师军凤,杨素琴,向梅先.基于网络药理学探究清肺达原颗粒治疗肺炎的药理作用机制[J].*中国药科大学学报*,2020,51(5):568-576.
GAN Dali, SHI Junfeng, YANG Suqin, XIANG Meixian. Pharmacological mechanism of Qingfei Dayuan Granules for the treatment of pneumonia by network pharmacology[J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 2020, 51(5): 568-576(in Chinese).
- [2] 鲁憬莉,宋之臻,赵松峰,袁永亮.芩百清肺浓缩丸对肺

- 炎支原体肺炎作用机制的网络药理学分析[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(3): 300-305.
- LU Jingli, SONG Zhizhen, ZHAO Songfeng, YUAN Yongliang. Exploring active mechanism of Qin Bai Qingfei concentrated pills on Mycoplasma pneumonia based on network pharmacology[J]. Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology, 2020, 31(3): 300-305(in Chinese).
- [3] 蒙艳丽, 王晓溪, 徐慧星, 王欣, 王伟明. 芩百清肺浓缩丸含药血清促进肺炎支原体感染细胞增殖作用的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2020, 27(3): 356-359.
- MENG Yanli, WANG Xiaoxi, XU Huixing, WANG Xin, WANG Weiming. Effect of serum contained qinbai Qingfei concentrated pill on cell proliferation infected with Mycoplasma pneumonia[J]. Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology, 2020, 27(3): 356-359(in Chinese).
- [4] 杨志敏, 蒙艳丽, 王慧慧, 王晓溪, 王伟明. 芩百清肺浓缩丸对肺炎支原体感染的影响[J]. 中成药, 2020, 42(5): 1 150-1 155.
- YANG Zhimin, MENG Yanli, WANG Huihui, WANG Xiaoxi, WANG Weiming. Effects of Qinbai Qingfei pills on Mycoplasma pneumoniae infection[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2020, 42(5): 1 150-1 155(in Chinese).
- [5] 方堃, 卓越, 徐荣良, 李丽, 许铁, 叶英. 重症肺炎患者病原学特点及 Th1/Th2/Th17 相关细胞因子的诊断价值分析[J]. 中国急救复苏与灾害医学杂志, 2021, 16(5): 501-504.
- FANG Kun, ZHUO Yue, XU Rongliang, LI Li, XU Tie, YE Ying. Pathogenic characteristics of severe pneumonia and diagnostic value of Th1/Th2/Th17 related cytokines[J]. China Journal of Emergency Resuscitation and Disaster Medicine, 2021, 16(5): 501-504(in Chinese).
- [6] 李舒雨, 杨启鑫, 左安娜, 田林华, 霍金海, 蒙艳丽, 汤庆发, 王伟明. 鲜广地龙纯化蛋白的制备及其体外抗肺纤维化活性评价[J]. 南方医科大学学报, 2022, 42(4): 618-625.
- LI Shuyu, YANG Qixin, ZUO Anna, TIAN Linhua, HUO Jinhai, MENG Yanli, TANG Qingfa, WANG Weiming. Preparation of purified proteins from fresh Pheretima and their inhibitory effect against pulmonary fibrosis in mice[J]. Journal of Southern Medical University, 2022, 42(4): 618-625(in Chinese).
- [7] 徐慧星, 蒙艳丽, 董坤, 王晓溪, 王欣, 王博, 孙亚瑞. 地龙提取物对肺炎支原体感染小鼠肺上皮组织 PCNA 及 ERK 表达的影响[J]. 中国中医药科技, 2023, 30(4): 653-656.
- XU Huixing, MENG Yanli, DONG Kun, WANG Xiaoxi, WANG Xin, WANG Bo, SUN Yarui. Effects of Dilong (earthworm) extract on PCNA and ERK expressions in lung epithelial cells of mice with Mycoplasma pneumoniae pneumonia[J]. Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology, 2023, 30(4): 653-656(in Chinese).
- [8] 陈静, 李玉霞, 吕彩兰, 张士卿. 张士卿教授运用虫类药物治疗小儿肺炎疾病临床经验[J]. 西部中医药, 2023, 36(4): 28-31.
- CHEN Jing, LI Yuxia, LV Cailan, ZHANG Shiqing. Professor Zhang Shiqing's clinical experience in treating infantile pulmonary disease with insect drugs[J]. Western Journal of Traditional Chinese Medicine, 2023, 36(4): 28-31(in Chinese).
- [9] 王莉婷, 李颜伶, 徐广, 秦铭, 郭宇瑛, 许思民, 马群. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术的车前子不同溶剂提取物成分分析[J]. 中国药师, 2022, 25(8): 1 341-1 347.
- WANG Liting, LI Yanling, XU Guang, QIN Ming, GUO Yuying, XU Simin, MA Qun. Analysis of the chemical constituents in different solvent extracts of Plantaginis semen by UPLC-Q-Exactive-Orbitrap mass spectrometry[J]. China Pharmacist, 2022, 25(8): 1 341-1 347(in Chinese).
- [10] 闫浩, 刘潇潇, 于春雪, 孙轲强, 成帆, 王虎, 宋道. 基于网络药理学和分子对接探究黄芪葛根汤治疗糖尿病的作用机制[J]. 陕西中医药大学学报, 2022, 45(4): 126-132.
- YAN Hao, LIU Xiaoxiao, YU Chunxue, SUN Keqiang, CHENG Fan, WANG Hu, SONG Xiao. Study on mechanism of Huangqi Gegen Decoction in treating diabetes based on network pharmacology and molecular docking[J]. Journal of Shaanxi University of Chinese Medicine, 2022, 45(4): 126-132(in Chinese).
- [11] 黄申, 闫茗熠, 陈梦月, 尚紫博, 杨晨, 张金林, 褚智国, 毛多斌. 基于转录组测序和 RT-qPCR 技术的烟草糖酯合成基因挖掘[J]. 轻工学报, 2023, 38(6): 78-84, 117.
- HUANG Shen, YAN Mingyi, CHEN Mengyue, SHANG Zibo, YANG Chen, ZHANG Jinlin, CHU Zhiguo, MAO Duobin. Excavating tobacco sugar ester synthesis genes based on transcriptome sequencing and RT-qPCR[J]. Journal of Light Industry, 2023, 38(6): 78-84, 117(in Chinese).
- [12] 刘楠楠, 郭百慧, 王晓溪, 王欣, 蒙艳丽, 王伟明. 麦冬对肺炎支原体感染后咳嗽小鼠 TRPA1、SP、CGRP 的影响[J/OL]. 中华中医药学刊, 1-13[2024-08-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20240307.1044.008.html>.

- LIU Nannan, GUO Baihui, WANG Xiaoxi, WANG Xin, MENG Yanli, WANG Weiming. Effect of Maidong (Radix Ophiopogonis) on TRPA1, SP and CGRP in mice with cough after Mycoplasma pneumoniae infection [J/OL]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 1-13[2024-08-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20240307.1044.008.html>(in Chinese).
- [13] 张玉, 董文婷, 霍金海, 王伟明. 基于UPLC-Q-TOF-MS技术的广地龙化学成分分析[J]. 中草药, 2017, 48(2): 252-262.
- ZHANG Yu, DONG Wenting, HUO Jinhai, WANG Weiming. Analysis on chemical constituents of *Pheretima aspergillum* by UPLC-Q-TOF-MS[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2017, 48(2): 252-262(in Chinese).
- [14] 褚衍涛, 魏文峰, 霍金海, 王伟明. UPLC-Q-TOF-MS法分析芩苈清肺浓缩丸中的化学成分[J]. 中成药, 2016, 38(6): 1 303-1 310.
- CHU Yantao, WEI Wenfeng, HUO Jinhai, WANG Weiming. Analysis of chemical constituents in Qinbi Qingfei Concentrated pills by UPLC-Q-TOF-MS[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2016, 38(6): 1 303-1 310(in Chinese).
- [15] 毛正, 谭武宾, 陈贵恒, 郑珏, 陈昊, 李铁求, 杨科. 基于网络药理和分子对接探究山柰酚治疗抵抗性前列腺癌的机制[J]. 实用中西医结合临床, 2022, 22(4): 8-13, 24.
- MAO Zheng, TAN Wubin, CHEN Guiheng, ZHENG Jue, CHEN Hao, LI Tieqiu, YANG Ke. Exploring the mechanism of kaempferol in the treatment of castration-resistant prostate cancer based on network pharmacology and molecular docking[J]. Practical Clinical Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2022, 22(4): 8-13, 24(in Chinese).
- [16] 张春艳, 金蓉, 颜羽昕, 高晓阳, 赵晓璐, 马月宏. 基于药效学和网络药理方法探讨蓝盆花抗肝纤维化的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(13): 3 609-3 618.
- ZHANG Chunyan, JIN Rong, YAN Yuxin, GAO Xiaoyang, ZHAO Xiaolu, MA Yuehong. To explore mechanism of *Scabiosa comosa* against liver fibrosis based on pharmacodynamics and network pharmacology[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2022, 47(13): 3 609-3 618(in Chinese).
- [17] AOYAMA T, TAKANO M, MIYAMOTO M, YOSHIKAWA T, KATO K, SAKAMOTO T, TAKASAKI K, MATSUURA H, SOYAMA H, HIRATA J, SUZUKI A, SASA H, TSUDA H, FURUYA K. Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio was a predictor of lymph node metastasis in endometrial cancer patients[J]. *Oncology*, 2019, 96(5): 259-267.
- [18] OWEN J L, CRISCITIELLO M F, LIBREROS S, GARCIA-AREAS R, GUTHRIE K, TORROELLA-KOURI M, IRAGAVARAPU-CHARYULU V. Expression of the inflammatory chemokines CCL2, CCL5 and CXCL2 and the receptors CCR1-3 and CXCR2 in T lymphocytes from mammary tumor-bearing mice[J]. *Cellular Immunology*, 2011, 270(2): 172-182.
- [19] 李鑫丽. CXCL2介导NF- κ B和PI₃K/Akt调控LTA诱导的奶牛乳腺上皮细胞炎症应答反应[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2022.
- [20] 蒙健林, 王明刚, 王兵, 胡嗣钦, 俞渊, 王清坚. 大黄灵仙胶囊调控胆管细胞CXCL2、NLRP3、NOD1表达的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(10): 2 357-2 360.
- MENG Jianlin, WANG Minggang, WANG Bing, HU Siqin, YU Yuan, WANG Qingjian. Experimental study on the regulation of CXCL2, NLRP3 and NOD1 expression in bile duct cells affected by DHLX[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2021, 32(10): 2 357-2 360(in Chinese).
- [21] BORO M, BALAJI K N. CXCL1 and CXCL2 regulate NLRP3 inflammasome activation via G-Protein-Coupled Receptor CXCR2[J]. *J Immunol*, 2017, 199(5): 1 660.
- [22] 王伟明, 王学军, 张洪娟, 白秀云, 张树明, 王朝宇, 张俊威, 蒙艳丽, 许庆瑞. 芩苈清肺浓缩丸新药研究[R]. 黑龙江省中医研究院, 2009.
- [23] HUANG C Q, LI W, ZHANG Q F, CHEN L H, CHEN W M, ZHANG H C, NI Y X. Anti-inflammatory activities of Guang-Pheretima extract in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophages[J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 18: 46-56.
- [24] YANG T, LUO F, SHEN Y, AN J, LI X, LIU X, YING B, LIAO Z, DONG J, GUO L, WANG T, XU D, CHEN L, WEN F. Quercetin attenuates airway inflammation and mucus production induced by cigarette smoke in rats[J]. *International Immunopharmacology*, 2012, 13(1): 73-81.
- [25] 崔琳, 张燕丽, 文泽馨, 李鹏飞, 张敏. 丝裂原活化蛋白激酶在治疗肿瘤中的研究进展[J]. 西藏医药, 2019, 40(6): 19-21.
- CUI Lin, ZHANG Yanli, WEN Zexin, LI Pengfei, ZHANG Min. Research progress of mitogen-activated protein kinase in the treatment of tumors[J]. Tibetan Medicine, 2019, 40(6): 19-21(in Chinese).
- [26] INOUE H, AKIMOTO K, HOMMA T, TANAKA A,

- SAGARA H. Airway epithelial dysfunction in asthma: relevant to epidermal growth factor receptors and airway epithelial cells[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2020, 9(11): 3 698-3 706.
- [27] 肖非, 曹二龙, 龙南彪, 曾赛丽. 肺炎克雷伯杆菌荚膜多糖经 EGFR 途径诱导支气管上皮细胞分泌细胞因子[J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(3): 514-518.
XIAO Fei, CAO Erlong, LONG Nanbiao, ZENG Saili. Klebsiella pneumoniae capsular polysaccharide induces secretion of cytokines in bronchial epithelial cells via EGFR signaling pathway[J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2020, 36(3): 514-518(in Chinese).
- [28] 李敬贤. 中药在重症肺炎康复中的应用规律及网络药理学分析[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [29] KONG Q, ZHU H, GONG W, DENG X, LIU B, DONG J. Modified Bushen Yiqi formula enhances antitumor immunity by reducing the chemotactic recruitment of M2-TAMs and PMN-MDSCs in Lewis lung cancer-bearing mice[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2024, 319: 117 183.
- [30] 张伟, 刘闪闪, 魏冉, 潘梦瑾, 赵敏, 郎婧, 郭劲松, 张胜安. 基于网络药理学及分子对接方法分析川贝母治疗肺炎的分子机制[J]. *新中医*, 2023, 55(3): 7-16.
ZHANG Wei, LIU Shanshan, WEI Ran, PAN Mengjin, ZHAO Min, LANG Jing, GUO Jinsong, ZHANG Sheng'an. Analysis of molecular mechanism of fritillariae cirrhosae bulbos in treating pneumonia based on network pharmacology and molecular docking[J]. *New Chinese Medicine*, 2023, 55(3): 7-16(in Chinese).
- [31] 王冰. α -亚麻酸预处理对 LPS 诱导小鼠急性肺损伤的作用及机制研究[D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2017.
- [32] SUN M, ZHOU Z, DONG J, ZHANG J, XIA Y, SHU R. Antibacterial and antibiofilm activities of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) against periodontopathic bacteria[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2016, 99: 196-203.
- [33] OPPEDISANO F, MACRÌ R, GLIOZZI M, MUSOLINO V, CARRESI C, MAIUOLO J, BOSCO F, NUCERA S, CATERINA ZITO M, GUARNIERI L, SCARANO F, NICITA C, COPPOLETTA A R, RUGA S, SCICCHITANO M, MOLLACE R, PALMA E, MOLLACE V. The anti-inflammatory and antioxidant properties of n-3 PUFAs: their role in cardiovascular protection[J]. *Biomedicines*, 2020, 8(9): 306-325.
- [34] MASON J K, KLAIRE S, KHAROTIA S, WIGGINS A K A, THOMPSON L U. α -Linolenic acid and docosahexaenoic acid, alone and combined with trastuzumab, reduce HER2-overexpressing breast cancer cell growth but differentially regulate HER2 signaling pathways[J]. *Lipids in Health and Disease*, 2015, 14(1): 91-100.
- [35] SUZUMURA A, TERAOKA R, KANEKO H. Protective effects and molecular signaling of n-3 fatty acids on oxidative stress and inflammation in retinal diseases[J]. *Antioxidants*, 2020, 9(10): 920-928.
- [36] 周子超, 孙梦君, 束蓉. DHA 对 *P. gingivalis* LPS 诱导人牙周膜成纤维细胞炎症反应的影响[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2016, 36(5): 626-630, 635.
ZHOU Zichao, SUN Mengjun, SHU Rong. Effects of DHA on inflammatory response in human periodontal ligament cells induced by *P. gingivalis* LPS[J]. *Journal of Shanghai Jiao Tong University (Medical Science)*, 2016, 36(5): 626-630, 635(in Chinese).
- [37] SHETH S, BRITO R, MUKHERJEA D, RYBAK L P, RAMKUMAR V. Adenosine receptors: expression, function and regulation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(2): 2 024-2 052.
- [38] 杜静, 阚伟京, 杨健, 贾竑晓. 腺苷受体及蛹虫草草素在新冠肺炎防治中相关的药理机制[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2020, 22(3): 573-584.
DU Jing, KAN Weijing, YANG Jian, JIA Hongxiao. Possible pharmacological mechanisms of adenosine receptor and cordycepin from cordyceps militaris in the prevention and treatment of COVID-19 pneumonia[J]. *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology*, 2020, 22(3): 573-584(in Chinese).
- [39] GÖDECKE A. cAMP: fuel for extracellular adenosine formation?[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2008, 153(6): 1 087-1 089.
- [40] 黄宇戈, 谭建新, 黄秀兰, 郑朝晖. 不同剂量腺苷对肺炎大鼠肺动脉高压的调节作用[J]. *广东医学院学报*, 2009, 27(4): 357-359.
HUANG Yuge, TAN Jianxin, HUANG Xiulan, ZHENG Zhaohui. Effect of adenosine on pulmonary hypertension in experimental rats with pneumonia[J]. *Journal of Guangdong Medical College*, 2009, 27(4): 357-359(in Chinese).

(收稿日期: 2024-03-26; 修回日期: 2024-05-08)