

基于蛋白质组学和网络药理学探讨小儿化痰止咳颗粒 治疗过敏性咳嗽的作用机制

杜友启¹, 徐漪旋¹, 廖佳佳¹, 龙朝文¹, 邵诗蝶¹, 杜友文¹, 李松², 甘诗泉¹,
沈祥春¹, 陶玲¹, 杨熟英^{2*}, 付凌云^{1*}

(1. 贵州医科大学, 贵州 安顺 561113; 2. 贵州省科晖制药有限公司, 贵阳 550014)

[摘要] 目的: 基于蛋白质组学、网络药理学共同探讨小儿化痰止咳颗粒(XEHT)在治疗过敏性咳嗽(AC)可能涉及的药理作用机制。方法: 通过腹腔注射含卵蛋白(OVA)2 mg和氢氧化铝100 mg的混悬液1 mL致敏后,以1% OVA雾化构建豚鼠AC模型,随机分为模型组、XEHT低、中、高剂量组(1、5、20 g·kg⁻¹)与孟鲁斯特钠组(1 mg·kg⁻¹)每组6只,正常组6只。给药组按剂量灌胃给予相应药液,正常组和模型组灌胃给予同体积生理盐水,1次/d,连续给药10 d,以1% OVA雾化刺激豚鼠,观察咳嗽次数;苏木素-伊红(HE)染色观察肺组织病理变化;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测肺泡灌洗液(BALF)中C反应蛋白(CRP)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)及血清中免疫球蛋白G(IgG)、免疫球蛋白A(IgA)的含量;免疫组织化学法(IHC)观察肺部组织中IL-6、TNF- α 的蛋白表达;透射电镜观察肺泡II型上皮细胞超微结构;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)测定肺组织中IL-6、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、TNF- α mRNA水平。采用非标记蛋白质组学技术(Label Free)检测各干预组间差异蛋白;网络药理学预测XEHT治疗AC的作用靶点,将蛋白质组学及网络药理学的结果进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析并寻找相同的作用通路。结果: 与正常组比较,模型组咳嗽次数显著增加($P<0.01$),BALF中CRP、TNF- α 含量显著升高、SOD显著降低($P<0.01$),IL-6、MDA升高($P<0.05$),血清中IgA、IgG含量升高($P<0.05$, $P<0.01$),肺组织充血及炎症细胞浸润明显,IL-6和TNF- α 蛋白表达水平升高($P<0.01$),II型上皮细胞可见大范围低电子密度水肿区,细胞器明显肿胀、空泡化,胞核固缩或染色质稀疏、溶解,IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的mRNA表达水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组咳嗽次数减少($P<0.01$)、BALF中CRP、TNF- α 、IL-6、MDA含量减少($P<0.05$ 、 $P<0.01$),SOD活性增加($P<0.05$),孟鲁司特钠、XEHT中剂量组血清IgA、IgG含量降低($P<0.05$, $P<0.01$),各给药组肺组织充血及炎症细胞浸润及II型上皮细胞损伤不同程度缓解,IL-6、TNF- α 蛋白表达水平降低($P<0.01$),孟鲁司特钠、XEHT中、高剂量组IL-6、IL-1 β 、TNF- α mRNA表达减少($P<0.05$, $P<0.01$),XEHT低剂量组IL-6、TNF- α mRNA表达减少($P<0.05$, $P<0.01$)。Phospholipase D、mTOR及ErbB信号通路在蛋白质组学和网络药理学KEGG通路富集中存在交集。结论: 蛋白质组学结合网络药理学分析共同揭示了XEHT改善AC的作用与调控Phospholipase D、mTOR及ErbB信号通路密切相关。

[关键词] 过敏性咳嗽; 小儿化痰止咳颗粒; 蛋白质组学; 网络药理学; 作用机制

[中图分类号] R256;R441;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2025)03-0069-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20241427 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20240615.2324.002>

[网络出版日期] 2024-06-18 09:48:22

Proteomics and Network Pharmacology Reveal Mechanism of Xiaoer Huatan Zhike Granules in Treating Allergic Cough

DU Youqi¹, XU Yini¹, LIAO Jiajia¹, LONG Chaowen¹, TAI Shidie¹, DU Youwen¹, LI Song²,
GAN Shiquan¹, SHEN Xiangchun¹, TAO Ling¹, YANG Shuying^{2*}, FU Lingyun^{1*}

[收稿日期] 2024-04-03

[基金项目] 贵阳市科技计划项目(筑科合同[2022]5-11号);贵州省科技创新基地(黔科合中引地[2023]003);贵州省高层次创新型人才十层次人才项目(黔科合平台人才-GCC[2023]048);贵州省科技厅科技成果转化项目(黔科合成果[2022]一般010)

[第一作者] 杜友启,在读硕士,从事中药药理学研究,E-mail:2196699044@qq.com

[通信作者] *付凌云,博士,讲师,从事心血管系统药物药理研究,E-mail:605606875@qq.com;

*杨熟英,硕士,高级工程师,从事新药及食品研究,E-mail:alei8879@163.com

(1. Guizhou Medical University, Anshun 561113, China;
2. Guizhou Kehui Pharmaceutical Co Ltd., Guiyang 550014, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the pharmacological mechanism involved in the treatment of allergic cough (AC) by Xiaoer Huatan Zhike granules (XEHT) based on proteomics and network pharmacology. **Methods:** After sensitization by intraperitoneal injection of 1 mL suspension containing 2 mg ovalbumin (OVA) and 100 mg aluminum hydroxide, a guinea pig model of allergic cough was constructed by nebulization with 1% OVA. The modeled guinea pigs were randomized into the model, low-, medium- and high-dose (1, 5, 20 g·kg⁻¹, respectively) XEHT, and sodium montelukast (1 mg·kg⁻¹) groups ($n=6$), and another 6 guinea pigs were selected as the blank group. The guinea pigs in drug administration groups were administered with the corresponding drugs by gavage, and those in the blank and model groups received the same volume of normal saline by gavage, 1 time·d⁻¹. After 10 consecutive days of drug administration, the guinea pigs were stimulated by 1% OVA nebulization, and the coughs were observed. The pathological changes in the lung tissue were observed by hematoxylin-eosin staining. The enzyme-linked immunosorbent assay was performed to measure the levels of C-reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA) in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and immunoglobulin G (IgG) and immunoglobulin A (IgA) in the serum. Immunohistochemistry (IHC) was employed to observe the expression of IL-6 and TNF- α in the lung tissue. Transmission electron microscopy was employed to observe the alveolar type II epithelial cell ultrastructure. Real-time PCR was employed to determine the mRNA levels of IL-6, interleukin-1 β (IL-1 β), and TNF- α in the lung tissue. Label-free proteomics was used to detect the differential proteins among groups. Network pharmacology was used to predict the targets of XEHT in treating AC. The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis was performed to search for the same pathways from the results of proteomics and network pharmacology. **Results:** Compared with the blank group, the model group showed increased coughs ($P<0.01$), elevated levels of CRP, TNF- α , IL-6, and MDA and lowered level of SOD in the BALF ($P<0.05$, $P<0.01$), elevated levels of IgA and IgG in the serum ($P<0.05$, $P<0.01$), congestion of the lung tissue and infiltration of inflammatory cells, increased expression of IL-6 and TNF- α ($P<0.01$), large areas of low electron density edema in type II epithelial cells, obvious swelling and vacuolization of the organelles, karyopyknosis or sparse and dissolved chromatin, and up-regulated mRNA levels of IL-6, IL-1 β , and TNF- α ($P<0.01$). Compared with the model group, the drug administration groups showed reduced coughs ($P<0.01$), lowered levels of CRP, TNF- α , IL-6, and MDA and elevated level of SOD in the BALF ($P<0.05$, $P<0.01$), alleviated lung tissue congestion, inflammatory cell infiltration, and type II epithelial cell injury, and decreased expression of IL-6 and TNF- α ($P<0.01$). In addition, the medium-dose XEHT group and the montelukast sodium group showcased lowered serum levels of IgA and IgG ($P<0.05$, $P<0.01$). The medium- and high-dose XEHT groups and the montelukast sodium showed down-regulated mRNA levels of IL-6, IL-1 β , and TNF- α and the low-dose XEHT group showed down-regulated mRNA levels of IL-6 and TNF- α ($P<0.05$, $P<0.01$). Phospholipase D, mammalian target of rapamycin (mTOR), and epidermal growth factor receptor family of receptor tyrosine kinase (ErbB) signaling pathways were the common pathways predicted by both proteomics and network pharmacology. **Conclusion:** Proteomics combined with network pharmacology reveal that XEHT can ameliorate AC by regulating the phospholipase D, mTOR, and ErbB signaling pathways.

[Keywords] allergic cough; Xiaoer Huatan Zhike granules; proteomics; network pharmacology; mechanism of action

过敏性咳嗽(AC)又称咳嗽变异性哮喘,是儿科常见病、多发病之一。临床表现为持续性咳嗽、咽痒、痰少或无痰,多发生于夜间或晨起,常由吸入刺激性气味、冷空气、接触变应原、运动所引起。实验室检查无明显感染征象,但患者血清中免疫球蛋白E(IgE)或嗜酸性粒细胞水平明显升高;口服抗组胺和糖皮质激素类药物可改善AC,但长期使用会导致严重的不良反应,从而限制了这些药物的发展^[1]。中医认为风邪侵袭是AC的主因,肺失宣降为主要病机。治疗以祛风、宣降、散敛结合、随证加味、兼顾调护的治疗思路制定了中医治疗方案,对临床AC的治疗具有重要的意义^[2]。因此,亟需探索AC进行性恶化的发病机制,寻找新的治疗靶位和防治中药,为改善与逆转AC提供实验基础和理论指导。

小儿化痰止咳颗粒(XEHT)最初载于《中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂第九册》(WS3-B-1691-94)^[3],其成分为桔梗流浸膏、桑白皮流浸膏、吐根酊、盐酸麻黄碱等药物及枸橼酸、枸橼酸钠、蔗糖、食用香精等辅料混合制成的颗粒,具有祛痰、镇咳的药理作用,临床广泛用于儿童咳嗽和支气管炎的治疗。盐酸麻黄碱和吐根酊是其主要成分^[4],现有质量标准只做了这两种成分的薄层定性鉴别,却忽略了其他成分的作用,违背了中药通过调节整体和综合防治疾病的理论。中药复方因其成分复杂,系统庞大,且作用靶点众多,使深入研究中药的作用机制较为困难。蛋白质组学概念由澳大利亚学者WILKINS等^[5]提出,具有特异性、整体性、动态性、阶段性等特点,随着研究条件的进步,

现阶段已将其作为重大疾病诊疗及新药研发的重要手段之一^[6],被誉为“后基因组学”,研究内容以探究生物体内细胞、组织及体液内所有蛋白质的组成、表达与组合蛋白质功能模式为主,这种研究方式不仅以探查蛋白质组的功能,表达及相互作用为目的,也与中医药“整体观念”相契合。以其广泛关联的网络结构为特点,可对中药的作用机制进行深入研究^[7]。网络药理学打破了传统新药研发模式,以整体性和系统性的特点将单一的药物研发理念转变为与复杂疾病相连接的多靶点、多途径的新型研究理念,是现代中药研究和新药研发的重要手段^[8]。本项目通过分析运用Label Free非标记定量蛋白质组学数据,了解XEHT对于卵蛋白(OVA)雾化构建豚鼠AC模型蛋白质的影响,结合网络药理学揭示药物成分与蛋白变化之间的相互作用从而深入探究XEHT治疗AC可能的作用机制,为XEHT治疗AC提供实验基础与理论依据,以期优化临床AC综合防治提供新的策略。

1 材料

1.1 动物 健康Dunkin Hartley系雄性豚鼠36只,体质量(200±20)g,实验动物合格证号SCXK(湘)2019-0015,动物实验经贵州医科大学伦理委员会批准(批号2200447)。动物在室温20~23℃,相对湿度40%~70%的环境下饲养。

1.2 药品及试剂 OVA(美国Sigma-Aldrich公司,货号#A5503-1 g,纯度>98%);氢氧化铝(上海麦克林生化科技股份有限公司,规格500 g,货号A800852);注射用环磷酰胺(Baxter Oncology GmbH公司,国药准字HJ20160467,规格0.2 g,批号2E548A);孟鲁斯特钠颗粒[长春海悦药业股份有限公司,规格0.5 g:4 mg(以孟鲁斯特计),国药准字H20183273,批号GA220508];辣椒素(北京世纪银丰科技发展有限公司,规格20 mg,货号#A0198,纯度>98%);小儿化痰止咳颗粒(贵州省科晖制药有限公司,规格5 g/袋,国药准字Z52020398,批号20220530);聚山梨酯-80(北京鼎国生物技术有限公司,规格100 mL,货号0442),RNA裂解液(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号R701-01-AA);逆转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(全式金生物技术有限公司,货号分别为R20702、R20721);豚鼠C反应蛋白(CRP)、豚鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、豚鼠白细胞介素-6(IL-6)、豚鼠免疫球蛋白G(IgG)、豚鼠免疫球蛋白A(IgA)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海泛音生物

科技有限公司,货号分别为CK-E40006、CK-E40082、CK-E40026、CK-E4009、CK-E40156);总超氧化物歧化酶(SOD)测试剂盒(南京建成生物有限公司,货号A001-1);电镜固定液、丙二醛(MDA)测试盒、苏木素-伊红(HE)染液套装(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号分别为G1102、G4300-96T、G1003),812包埋剂、醋酸铀(英国SPI公司,货号分别为90529-77-4、02624-AB),钼酸(美国Ted Pella Inc公司,货号18456),硝酸铅(美国Sigma公司,货号203580),TNF- α 、IL-6一抗、HRP标记山羊抗兔二抗(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号分别为GB11188、GB11117、GB23303)。

1.3 仪器 403D型压缩空气式雾化器(江苏鱼跃医疗设备股份有限公司);Bio-Rad CFX Manager 3.1系统、CFX96型Real-time PCR仪(美国Bio-Rad Laboratories公司);5810R型冷冻离心机(德国Eppendorf公司);HD-2700系列型透射电子显微镜(日本Hitachi公司),EASY-nLC 1200型高效液相色谱仪,Orbitrap Exploris 480型质谱仪、VARIOSKANLUX型酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),G6100型组化笔(武汉赛维尔生物科技有限公司),E100型显微镜(尼康仪器有限公司)。

2 方法

2.1 AC豚鼠模型的建立 选用健康纯系雄性豚鼠36只,体质量(200±20)g。适应喂养1周后,进行辣椒素咳嗽敏感性测定,筛选咳嗽频率在5~15次的豚鼠,排除咳嗽敏感性异常豚鼠。随机抽取6只作为正常组,其余30只建立AC模型。按MURAKI等^[9]所用方法致敏,模型组第1天腹腔注射30 mg·kg⁻¹的环磷酰胺免疫抑制剂,2 d后腹腔注射含OVA 2 mg和氢氧化铝100 mg的混悬液1 mL,3周后再次腹腔注射含OVA 0.01 mg和氢氧化铝100 mg的混悬液1 mL,正常组腹腔注射同等量的生理盐水。完成上述步骤后,将豚鼠置于自制雾化箱内给予1%OVA溶液雾化60 s以激发咳嗽。激发时观察豚鼠反应,如出现咳嗽、竖毛、呼吸困难、喷嚏、干呕、腹肌抖动、极度烦躁则表明造模成功^[10-11]。

2.2 实验动物分组及给药 造模成功后,将豚鼠随机分为正常组、模型组、孟鲁斯特钠组、XEHT低、中(人和豚鼠等效剂量)、高剂量组。正常组和模型组分别给予同等剂量的生理盐水灌胃,豚鼠给药剂量参考《药理实验方法学》中人和豚鼠等效剂量比进行换算^[12](按6岁儿童计算,平均体质量22 kg,孟鲁斯特钠4 mg·d⁻¹,小儿化痰止咳颗粒用量3次/d,1次5~10 g,即

日用量为15~30 g,取20 g·d⁻¹,豚鼠与人等效剂量比为5.42,即孟鲁斯特钠:4 mg/(22 kg)×5.42≈1 mg·kg⁻¹,小儿化痰止咳颗粒:20 g/(22 kg)×5.42≈5 g·kg⁻¹。豚鼠孟鲁斯特钠组灌胃剂量为1 mg·kg⁻¹,小儿低、中剂量组为1、5 g·kg⁻¹(人和豚鼠等效剂量)、高剂量组为20 g·kg⁻¹,每天1次,连续灌胃10 d。

2.2.1 计数咳嗽次数 末次给药后,将豚鼠放入自制雾化箱内雾化吸入1×10⁻⁴ mol·L⁻¹辣椒素60 s,在雾化箱内停留60 s,观察并记录豚鼠2 min内咳嗽次数^[13]。豚鼠咳嗽表现为伸出前脚、颈部伸向前、张口等特征性体位出现,即可记录1次咳嗽^[9]。

2.2.2 取材 给药结束后,按40 mg·kg⁻¹腹腔注射1%戊巴比妥钠对豚鼠进行麻醉。通过腹主动脉取血,3 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径10 cm)得到血清。打开胸腔暴露气管,结扎左侧主支气管,行右肺肺泡灌洗后,低温剖取右肺冻存;左肺一部分切成1 mm³小块制备透射电镜标本;剩余部分置于4%多聚甲醛固定。

2.2.3 肺泡灌洗液(BALF)中细胞因子活性或含量检测 按照豚鼠CRP、IL-6、TNF-α、SOD、MDA ELISA试剂盒说明书的操作步骤测定肺泡灌洗液中的细胞因子的含量。

2.2.4 血清中细胞因子活性或含量检测 按照豚鼠IgG、IgA ELISA试剂盒说明书的操作步骤测定血清中的细胞因子含量。

2.2.5 HE染色检测相关病理学改变 取新鲜的豚鼠肺组织,在4%多聚甲醛中固定24 h,进行梯度脱水、浸蜡、包埋、切片、脱蜡,HE染色,并使用光学显微镜对豚鼠肺组织形态进行观察。

2.2.6 肺组织免疫组化检测 基于免疫组织化学法(IHC)染色处理,即切片经过二甲苯脱蜡、梯度脱水、热修复、细胞通透15 min、3% H₂O₂室温避光孵育25 min、3%BSA室温封闭30 min,一抗孵育(1:200,4℃过夜)、二抗孵育(1:200,室温孵育50 min)、DAB显色约10 s、苏木素染色3 min、苏木素返蓝液返蓝,流水冲洗,中性树胶封片,置于正置显微镜下观察,采集图像,采用Fiji图像处理软件测量TNF-α、IL-6蛋白检测平均光密度值(AOD)。

2.2.7 肺泡Ⅱ型上皮细胞电镜观察 新鲜的豚鼠肺组织切割成1 mm³的小组织块,转移至装有电镜固定液的离心管内,4℃固定保存。然后取出进行漂洗、后固定、室温脱水、渗透包埋、聚合、超薄切片、染色,透射电子显微镜下观察并采集图像。

2.2.8 Real-time PCR检测肺组织中mRNA表达

按照RNA提取试剂盒说明提取豚鼠肺组织总RNA,将其逆转录为cDNA(37℃,15 min,85℃,5 s,4℃保存),并根据试剂盒说明进行PCR反应(95℃、30 s,1次循环;95℃、5 s,60℃、35 s,40个循环),每个样本分别用待检测基因和内参基因引物扩增,用2^{-ΔΔC_t}法计算其相对表达水平。PCR引物由北京睿博兴生物技术有限公司合成,见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
β-actin	上游 AGGTGACAGCAGTTGGTTGG	138
	下游 AGGGTGAGGGACTTCCTGTA	
IL-6	上游 AGTTCCTCTCCACAAGCACC	103
	下游 GCTGTGAAGTCGTGCTGAAC	
IL-1β	上游 CCTACCTCTACCCCATGCCT	275
	下游 GTGAGACGGTCTGCCTGAAA	
TNF-α	上游 CCGTCTCTACCCGAAAAAG	255
	下游 GAAGGGATGGATGGAGAGACG	

2.3 蛋白质组学研究

2.3.1 蛋白质提取和肽段酶解 取适量样本于冰上,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,加入适量蛋白质裂解液,超声破碎,冰上孵育,4℃,12 000 r·min⁻¹,离心20 min(离心半径10 cm),取上清,蛋白质定量后取少量进行SDS-PAGE跑胶质控,取适量蛋白质溶液,加胰蛋白酶酶切过夜。萃取收集肽段,真空旋干,0.1%甲酸水溶液复溶。收得肽段溶液旋干后-80℃保存。

2.3.2 色谱条件 采用纳升流速高效液相色谱法(HPLC)液相系统EASY-nLC1200对每份分级样品进行分离。A:0.1%甲酸水溶液,B:0.1%甲酸乙腈水溶液(乙腈为80%),色谱柱以100%的A液平衡,样品由自动进样器上样到上样柱(2 cm×100 μm,3 μm,C₁₈),再经分析柱(15 cm×150 μm,1.9 μm,C₁₈)进行分离,流速为600 nL·min⁻¹。相关液相梯度如下0~50 min,B液线性梯度从0%~35%;50~58 min,B液线性梯度从35%~100%;58~60 min,B液维持在100%。

2.3.3 质谱条件 用Orbitrap Exploris 480质谱仪对经色谱分离后的样品进行质谱分析,分析时长120 min,检测方式为正离子模式,母离子扫描范围300~1 400 m/z,一级质谱分辨率120 000, Automatic gain control (AGC) target 为5×10⁵, Maximum IT 为80 ms,动态排除时间Dynamic exclusion 为40.0 s。多肽和多肽碎片的质荷比按照下列方法采集:每次全扫

描后碎片图谱(MS2scan)的采集周期共为1.5 s,采用HCD碎裂模式,Normalized Collision Energy为30%,隔离窗为1.6 m/z ,二级质谱分辨率7~500。FAIMS电压分别设定-45 V和-65 V,其他参数一致。

2.3.4 生物信息学分析 将质谱采集的数据文件导入iProteome一站式数据分析云平台进行查库定性及定量分析。首先对目标蛋白质集合的定量信息进行归一化处理(Z-score)。然后使用pheatmap R包,同时对样品和蛋白质的表达量两个维度进行分类(距离算法欧几里得,连接方式Average linkage),并生成层次聚类热图。通过公共数据(NCBI, UniProt或Geneontology)获取该物种基因的基因本体论(GO)注释,如无该物种注释信息则通过InterProScan进行注释。通过京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库获取该物种基因的KEGG注释信息,若无该物种注释信息则通过Blast比对至KEGG数据库进行注释。

2.4 网络药理学

2.4.1 XEHT候选化合物筛选 利用中药系统药理学分析平台(TCMSP),检索到桔梗和桑白皮的所有化学成分。根据口服生物利用度(OB)和类药性(DL)2个属性对化合物进行筛选。DL是指化合物与已知药物的相似性^[14]。OB是药物由胃肠道吸收,经过肝脏而到达体循环血液中的药量占口服剂量的比例^[15]。以化合物OB \geq 30%和化合物DL \geq 0.18为条件,筛选出桔梗和桑白皮的候选化合物。然而,吐根和盐酸麻黄碱未在TCMSP数据库中检索到。通过文献查阅得吐根相关化合物^[16],盐酸麻黄碱则是一个单一的化合物。筛选截止日期为2022年11月15日。

2.4.2 候选化合物对应靶点筛选 利用TCMSP分析平台,检索到桔梗和桑白皮的候选化合物对应的靶点,吐根和盐酸麻黄碱未在TCMSP数据库中检索到。在Pubchem平台中检索得到吐根和盐酸麻黄碱的SMILES号,然后根据SMILES号去Swiss数据预测靶点。将所有有可能性的化合物靶点纳入,将小儿化痰止咳颗粒活性成分通过UniProt数据库的UniProt知识库(UniprotKB)查询并规范其名称,矫正去重后筛选出药物靶点。筛选截止日期为2022年11月18日。

2.4.3 AC相关靶点的筛选 以关键词“Allergic cough”检索在线《人类孟德尔遗传》(OMIM)和GeneCards数据库,获取与过AC相关的疾病靶点。随后,利用Uniprot数据库对靶点名称进行标准化

并去重,建立靶点库。筛选截止日期为2022年11月20日。

2.4.4 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建

小儿化痰止咳颗粒活性成分的作用靶点与AC靶点交集,获得小儿化痰止咳颗粒治疗AC的潜在治疗靶点。在String平台选择“Multiple proteins”,输入潜在治疗靶点,设置物种为“Homo sapiens”,设定中等置信度0.40,得到靶点蛋白之间相互作用关系。根据String平台生成的TSV文件,导入Cytoscape 3.8.2软件中进行可视化。

2.4.5 富集分析 使用R软件Version 4.2.2中的clusterProfiler插件对交集靶点进行GO和KEGG通路富集分析。

2.4.6 “药物-成分-靶标-疾病-通路”网络的构建 将交集靶点与活性成分信息导入Cytoscape 3.8.2软件,构建出小儿化痰止咳颗粒治疗AC的“药物-成分-靶点-疾病-信号”通路网络。

2.5 统计学分析 采用GraPhPad Prism 9.0.0软件,用 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据均进行正态性和方差齐性检验,服从正态分布的计量资料的组间比较采用单因素方差分析,不服从正态分布时采用非参数秩和检验。 $P < 0.05$ 表示两组差异有统计学意义。

3 结果

3.1 XEHT对AC豚鼠咳嗽次数的影响 与正常组比较,模型组豚鼠咳嗽次数显著增加($P < 0.01$),在给予孟鲁斯特钠及低、中、高剂量的XEHT治疗后咳嗽次数均显著减少($P < 0.01$)。见表2。

表2 XEHT对AC豚鼠咳嗽频率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of XEHT on cough frequency in AC guinea pigs ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	咳嗽/次/2 min ⁻¹
正常组		3.00±1.29
模型组		12.17±1.34 ¹⁾
孟鲁斯特钠组	0.001	5.50±1.12 ²⁾
XEHT低剂量组	1	8.83±1.57 ²⁾
XEHT中剂量组	5	3.67±0.94 ²⁾
XEHT高剂量组	20	4.33±0.94 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$

3.2 XEHT对AC豚鼠BALF中细胞因子含量或活性的影响 与正常组比较,模型组豚鼠肺泡灌洗液中CRP、TNF- α 含量显著升高($P < 0.01$),IL-6、MDA含量明显升高($P < 0.05$),SOD活性显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,孟鲁司特钠组和XEHT中、高

剂量组 CRP 含量明显降低($P<0.05$), XEHT 低、中、高剂量组和孟鲁司特钠组、TNF- α 含量明显降低($P<0.05, P<0.01$), 孟鲁司特钠组和 XEHT 低、高剂量组中 IL-6 含量明显降低($P<0.05$), XEHT 中剂量

组显著降低($P<0.01$), 孟鲁司特钠组和 XEHT 低、中、高剂量组 SOD 活性明显增加, 差异有统计学意义($P<0.05$), 各给药组 MDA 含量明显减少($P<0.05$)。见表3。

表3 XEHT对AC豚鼠BALF中细胞因子含量或活性的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of XEHT on cytokine content or activity in BALF of AC guinea pigs ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CRP/mg·L ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	MDA/ μ mol·L ⁻¹
正常组		2.70±0.22	268.05±4.35	123.35±5.92	347.10±11.60	0.68±0.19
模型组		3.62±0.29 ²⁾	312.47±6.65 ²⁾	152.38±3.65 ¹⁾	201.58±21.93 ²⁾	2.20±0.54 ¹⁾
孟鲁斯特钠组	0.001	2.88±0.42 ³⁾	260.41±7.36 ⁴⁾	123.57±4.58 ³⁾	314.30±17.55 ³⁾	0.91±0.64 ³⁾
XEHT低剂量组	1	3.00±0.19	276.76±14.92 ³⁾	125.11±7.39 ³⁾	299.99±26.15 ³⁾	0.91±0.19 ³⁾
XEHT中剂量组	5	2.89±0.31 ³⁾	252.21±8.84 ⁴⁾	116.96±12.40 ⁴⁾	315.49±9.73 ³⁾	0.83±0.28 ³⁾
XEHT高剂量组	20	2.95±0.22 ³⁾	277.58±10.13 ³⁾	122.25±5.39 ³⁾	294.02±51.97 ³⁾	0.76±0.11 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表4-表6同)

3.3 XEHT对AC豚鼠血清中细胞因子IgG、IgA含量的影响 与正常组比较,模型组血清中IgG表达显著升高($P<0.01$),IgA含量明显升高($P<0.05$);与模型组比较,孟鲁司特钠组和XEHT中剂量组IgG及XEHT中、高剂量组IgA显著降低($P<0.01$),XEHT低剂量组IgG、孟鲁斯特钠组IgA明显降低($P<0.05$)。见表4。

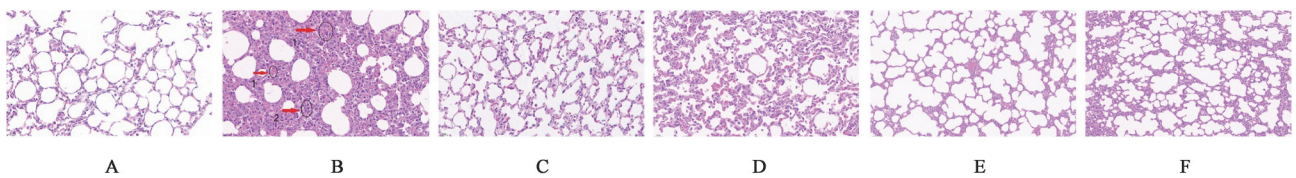
表4 XEHT对AC豚鼠血清细胞因子的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of XEHT on cytokine in serum of AC guinea pigs ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IgG/g·L ⁻¹	IgA/ μ g·L ⁻¹
正常组		7.49±0.14	219.37±11.99
模型组		9.46±0.59 ²⁾	253.23±13.62 ¹⁾
孟鲁斯特钠组	0.001	7.87±0.12 ⁴⁾	219.27±11.05 ³⁾
XEHT低剂量组	1	8.13±0.23 ³⁾	225.33±6.12
XEHT中剂量组	5	7.58±0.11 ⁴⁾	210.75±14.02 ⁴⁾
XEHT高剂量组	20	8.59±0.38	195.36±16.56 ⁴⁾

3.4 XEHT对AC豚鼠肺组织病理变化的影响 与正常组比较,AC模型组豚鼠肺组织充血及炎症细胞浸润明显(充血、炎症细胞浸润),孟鲁斯特钠和低、中、高剂量XEHT干预后肺组织病理损伤状况均

不同程度改善,XEHT中剂量组改善最佳。见图1。



注:A.正常组;B.模型组;C.孟鲁斯特钠组;D.XEHT低剂量组;E.XEHT中剂量组;F.XEHT高剂量组(图2-图4同)

图1 XEHT对AC豚鼠肺组织病理学变化的影响(HE,×400)

Fig. 1 Effect of XEHT on histopathological changes in lungs of AC guinea pigs (HE,×400)

3.5 XEHT对AC豚鼠肺组织IL-6、TNF- α 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组豚鼠肺组织IL-6、TNF- α 表达显著升高,差异具有统计学意义

($P<0.01$);与模型组比较,孟鲁司特钠组及XEHT各剂量组IL-6、TNF- α 表达显著降低($P<0.01$)。见图2、图3、表5。

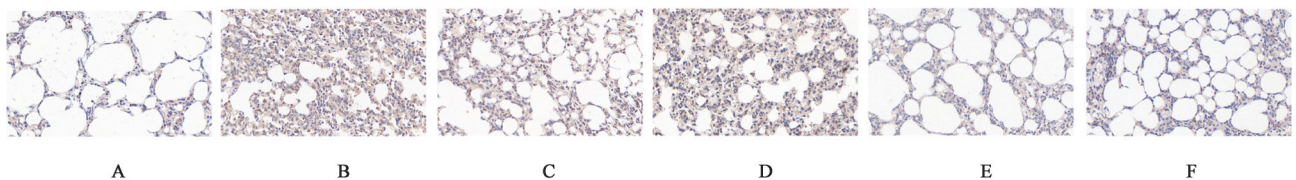


图2 XEHT对AC豚鼠肺间质IL-6蛋白表达情况的影响(IHC,×400)

Fig. 2 Effect of XEHT on expression of IL-6 protein in interstitial lungs of AC guinea pigs (IHC,×400)

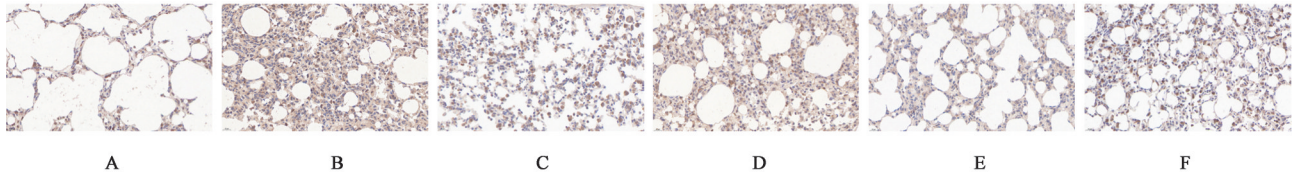


图3 XEHT对AC豚鼠肺间质TNF-α蛋白表达情况的影响(IHC, ×400)

Fig. 3 Effects of XEHT on TNF-α protein expression in interstitial lungs of AC guinea pigs (IHC, ×400)

表5 XEHT对AC豚鼠肺组织IL-6、TNF-α水平的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 5 Effect of XEHT on levels of IL-6 and TNF-α in lung tissues of AC guinea pigs ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-6	TNF-α
正常组		0.134±0.023	0.153±0.028
模型组		0.282±0.020 ²⁾	0.290±0.012 ²⁾
孟鲁斯特钠组	0.001	0.146±0.021 ⁴⁾	0.168±0.023 ⁴⁾
XEHT低剂量组	1	0.242±0.025 ⁴⁾	0.252±0.026 ⁴⁾
XEHT中剂量组	5	0.149±0.020 ⁴⁾	0.165±0.018 ⁴⁾
XEHT高剂量组	20	0.197±0.025 ⁴⁾	0.201±0.022 ⁴⁾

3.6 XEHT对AC豚鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞超微结构的影响 透射电镜结果显示,与正常组比较,模型组胞质可见大范围低电子密度水肿区,细胞器明显肿胀、空泡化,胞核固缩或染色质稀疏、溶解。孟鲁

斯特钠及XEHT低、中、高剂量干预后损伤减轻,表现为细胞核异染色质增加,减少胞质水肿或细胞器肿胀,细胞核异染色质少量凝集。见图4。

3.7 XEHT对AC豚鼠肺组织IL-6、IL-1β、TNF-α mRNA表达的影响 与正常组比较,模型组中IL-6、IL-1β、TNF-α mRNA表达水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,孟鲁司特钠组IL-6 mRNA表达明显减少($P<0.05$),IL-1β、TNF-α mRNA显著减少($P<0.01$),XEHT低剂量组IL-6、TNF-α mRNA明显减少($P<0.05, P<0.01$),XEHT中剂量组IL-6 mRNA表达明显减少($P<0.05$),IL-1β、TNF-α mRNA显著减少($P<0.01$)。XEHT高剂量组IL-1β mRNA表达明显减少($P<0.05$),IL-6、TNF-α mRNA显著减少($P<0.01$)。见表6。

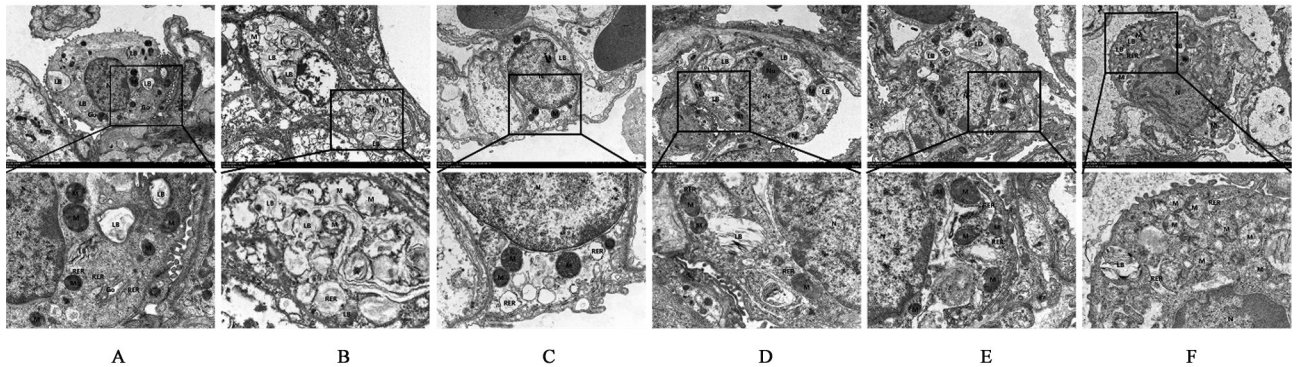


图4 XEHT对AC豚鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞超微结构的影响(透射电镜, ×3 000, ×8 000)

Fig. 4 Effect of XEHT on ultrastructure of alveolar type II epithelial cells in AC guinea pigs (TEM, ×3 000, ×8 000)

表6 XEHT对AC豚鼠肺组织中的IL-6、IL-1β、TNF-α mRNA表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table.6 Effect of XEHT on expression levels of IL-6, IL-1β, and TNF-α mRNA in lung tissues of AC guinea pigs ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-6	IL-1β	TNF-α
正常组		1.02±0.21	1.00±0.08	1.00±0.07
模型组		1.89±0.28 ²⁾	1.66±0.15 ²⁾	3.59±0.49 ²⁾
孟鲁斯特钠组	0.001	1.11±0.20 ³⁾	0.99±0.13 ⁴⁾	1.19±0.11 ⁴⁾
XEHT低剂量组	1	1.22±0.04 ³⁾	1.28±0.03	0.94±0.14 ⁴⁾
XEHT中剂量组	5	1.11±0.19 ³⁾	0.88±0.12 ⁴⁾	1.36±0.22 ⁴⁾
XEHT高剂量组	20	0.87±0.13 ⁴⁾	1.12±0.19 ³⁾	1.50±0.17 ⁴⁾

3.8 蛋白质组学结果

3.8.1 差异蛋白的鉴定与定量分析 共鉴定出

7 077个蛋白,其中5 295个蛋白质在3组间重叠。以差异倍数(FC)>2或FC<0.5, $P<0.05$ 为筛选标准

差异表达的蛋白质。与正常组比较,模型组肺部组织共有124个差异蛋白,其中上调蛋白81个、下调蛋白43个;与模型组比较,小儿组肺部组织共有83个差异蛋白,其中上调蛋白31个、下调蛋白52个,结果以火山图和热图的形式进行展示。小儿化痰止咳颗粒治疗AC的差异蛋白分析见增强出版附加材料。

3.8.2 差异蛋白的GO功能富集分析 GO富集分析发现,在模型组与正常组的GO富集分析当中,下调差异蛋白质主要涉及到regulation of platelet aggregation, trans-Golgi network, 2 iron, 22 sulfur cluster binding等;上调差异蛋白质主要涉及到positive regulation of macroautophagy, phagocytic vesicle, cytoskeletal protein binding等,在XEHT组对比模型组的GO富集分析当中,下调差异蛋白质主要涉及到negative regulation of TOR signaling, vacuole, kinesin binding等,上调差异蛋白质主要涉及到regulation of humoral immune response, membrane raft, serine-type endopeptidase activity等,以上结果表明,XEHT通过影响细胞包膜的稳定性、细胞自噬、蛋白质泛素化等途径抑制AC的发生发展。差异蛋白质GO功能富集柱状图见增强出版附加材料。

3.8.3 差异蛋白的KEGG富集分析 将重叠的差异蛋白导入KEGG数据库进行富集分析,结果表明XEHT对抗AC的信号通路主要为Phospholipase D信号通路、mTOR信号通路及ErbB信号通路。差异蛋白质KEGG通路富集气泡图见增强出版附加材料。

3.9 XEHT治疗AC的网络药理学分析

3.9.1 XEHT活性成分 检索出XEHT中桔梗活性成分102个,桑白皮活性成分194个,候选中药活性成分共38个。吐根23个成分;盐酸麻黄碱为单一成分,即麻黄碱。

3.9.2 XEHT活性成分潜在作用靶点 通过TCMSP分别检索出桔梗活性成分靶点信息260个,桑白皮活性成分靶点信息1375个。吐根活性成分14个,相关靶点1062个。去重后得到306个相关成分靶点;盐酸麻黄碱得到23个相关靶点。然后将桔梗、桑白皮、麻黄碱、吐根的矫正基因名称进行去重处理,得到药物相关458个靶点。

3.9.3 AC相关靶点 在OMIM、GeneCards数据库以“Allergic cough”作为关键词检索AC相关的疾病靶点。在OMIM数据库得到191个靶点, GeneCards得到1650个靶点,经过合并去重处理得到1706个

疾病相关靶点。

3.9.4 网络药理学PPI网络的构建 将药物靶点和疾病靶点取交集得到了232个重叠靶点,并将其上传至STRING数据库,选择“Multiple proteins”,物种“Homo sapiens”,置信度为0.40,得到靶点之间相互作用关系。保存STRING平台生成的TSV文件,导入Cytoscape 3.8.2软件中进行PPI网络的可视化,并根据其Degree值获得核心靶点。疾病药物交集靶点venn、小儿化痰止咳颗粒与AC共同蛋白相互作用网络、小儿化痰止咳颗粒与AC共同蛋白PPI网络、PPI核心靶点基因见增强出版附加材料。

3.9.5 “药物-成分-靶标-疾病-通路”网络的构建

将交集靶点、活性成分的关联信息及交集靶点信号通路的相互作用数据导入Cytoscape 3.8.2软件,以可视化XEHT治疗AC的“药物-成分-靶点-疾病-信号通路”网络。所构建的网络图包括麻黄碱、桑白皮吐根、桔梗活性成分43个、232个潜在靶点,涉及20条信号通路,共有301个节点,1215条边。根据网络图筛选得药物前10个主要活性成分,及通路主要靶点基因。小儿化痰止咳颗粒治疗AC的药物-成分-靶点-疾病-信号通路网络、药物-成分-靶点-通路主要成分及主要靶点基因见增强出版附加材料。

3.9.6 网络药理学GO功能注释和KEGG富集分析 使用R软件Version 4.2.2将XEHT对AC有潜在治疗作用的靶点进行GO富集分析,设定 $P \leq 0.05$ 共得到3043个条目。其中,生物过程(BP)条目2914个涉及丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)活性的正调控、损伤愈合、对外源性刺激的反应、对脂多糖的反应、激酶活性的正向调节、对细菌来源分子的反应等;分子功能(MF)条目270个涉及蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性、跨膜受体蛋白激酶活性、神经递质受体活性、细胞因子受体结合等;细胞组分(CC)条目129个涉及膜筏、膜微域、质膜筏、膜的组成部分等。使用条形图展示前10个结果。小儿化痰止咳颗粒与AC共同蛋白GO功能分析、小儿化痰止咳颗粒与AC共同蛋白KEGG信号通路分析见增强出版附加材料。

使用R软件Version 4.2.2将XEHT对AC有潜在治疗作用的靶点进行KEGG富集分析,富集的信号通路也同样涉及调控Phospholipase D信号通路、mTOR信号通路、及ErbB信号通路。小儿化痰止咳颗粒与AC共同蛋白KEGG信号通路分析见增强出版附加材料。

4 讨论

AC以慢性咳嗽及哮喘为主要临床症状,其病因错综复杂,包括过敏反应、免疫紊乱、异物刺激、环境气候、内分泌等因素^[17],是儿童中常见的呼吸道疾病之一。由于小儿自身的支气管黏膜娇嫩,不容易抵抗外界病菌的感染,因而很容易引起炎症,产生咳嗽。近年来,我国小儿AC的发生率呈逐渐上升的趋势^[18]。西医常使用支气管扩张剂、抗组胺药物、抗过敏药物、糖皮质激素等治疗小儿AC,疗效确切,但容易反复、依从性差,且具有一定的不良反应^[19-21]。中医方面认为AC病机主要是风邪上扰于肺,气道不利,肺失宣降,肺气上逆发为咳嗽,病变部位主要在肺,以“受刺激则咳”为主要临床特征;治疗方面,其提出祛风为要、宣降并举、散敛结合、随证加味、兼顾调护的整体治疗思路^[22],在治疗小儿AC方面具有不良反应小、疾病复发率低、病程短、预后性强等独特优势。

XEHT成分包括桔梗流浸膏、桑白皮流浸膏、吐根酊、盐酸麻黄碱,辅料为蔗糖、香精、枸橼酸、枸橼酸钠。桔梗味辛苦,长于开宣肺气;桑白皮味辛甘,善于降气化痰,两药合用,一宣一降,以恢复肺之宣降功能,并能增强君药止咳化痰之力。全方配伍合理,温而不燥、润而不膩、散寒不助热、解表不伤正的特点^[23]。本实验通过OVA诱导建立AC豚鼠模型,XEHT进行干预,结果显示XEHT具有止咳、减少肺部IL-6、TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子的表达、降低免疫反应性、缓解肺部损伤、改善豚鼠肺功能。

蛋白组学KEGG信号通路结果显示,XEHT改善AC的富集通路主要为Phospholipase D、mTOR、ErbB信号通路。Phospholipase D、mTOR信号通路是重要的细胞信号传导通路,在细胞内起着重要的调节作用,涉及细胞生长、增殖、分化、凋亡等多种生理过程^[24-25]。PLD通过产生二磷酸甘油(PA),可以激活mTOR信号通路,同时,mTOR信号通路也可以调节PLD的活性和表达水平,从而影响PLD介导的信号传导路径。mTOR的过度活化会抑制细胞自噬,导致气道出现免疫细胞性炎症,增加免疫细胞内炎性小体的形成,刺激炎症因子产生,从而加重气道炎症及增高气道反应性。因此,抑制mTOR表达可减轻气道炎症反应^[26]。ErbB信号通路可通过ErbB家族受体的激活,触发一系列信号传递事件,包括Ras/Raf/MAPK、PI3K/Akt等下游途径。ErbB作为有效的炎症转录因子,调节多种靶基因。ErbB信号通路激活,导致炎性细胞因子(如IL-6、IL-4、

IL-5)的过量产生。这些炎性细胞因子也能促进ErbB信号的激活,进而引发体内复杂的炎症级联反应。在哮喘患者中,肺及气道上皮细胞和巨噬细胞中ErbB的高表达表明了ErbB信号在哮喘发病机制中的重要性,因此,抑制ErbB信号通路的过度激活已成为治疗哮喘的新靶点^[27-28]。在AC中,气道炎症反应是主要特征之一。故XEHT可能通过Phospholipase D、mTOR/ErbB信号通路调节免疫细胞活化、炎症介质释放和气道炎症反应等途径对AC发挥一定的调节作用。

中药复方组方灵活多变、化学成分复杂,其确切有效成分及作用靶点尚不明确,且只有一小部分的中药或药物活性物质被挖掘^[29],网络药理学打破了传统新药研发模式,从网络角度解释了生物系统、药物和复杂疾病之间的相互作用关系,具有与中医相似的整体原理,被认为是阐明中药复杂机制的一种新方法^[30]。网络药理学通过构建药物活性成分-基因靶点-疾病-通路、蛋白互作网络,系统综合阐明药物的作用机制^[31-32]。通过网络药理学分析可知,槲皮素、吐根碱、木犀草素、刺槐素、麻黄碱等可能为XEHT治疗AC的主要活性成分。槲皮素是一种天然黄酮类化合物,研究表明其具有抗炎、抗氧化、免疫调节等药理作用^[33];吐根碱药理活性在于其能够作用于细胞增殖和代谢的过程并影响多种关键蛋白的表达水平^[34-36];木犀草素为黄酮类化合物,具有抗氧化、抗肿瘤等多种药理作用^[37],研究发现木犀草素可通过抗炎、抗氧化作用,改善脓毒症引起的急性肺损伤^[38];研究表明,刺槐素对肺损伤、哮喘、关节炎等多种炎症性疾病均具有改善作用^[39-41];麻黄碱是麻黄主要成分,研究表明其有镇咳、平喘、抗炎、抗过敏等药理作用^[42]。尤其重要的是,KEGG富集分析结果表明,XEHT同样通过参与调控Phospholipase D、mTOR、ErbB信号通路以干预AC的病理进程。

综上所述,本研究通过体内动物实验证实了XEHT对AC具有潜在的保护作用。此外,蛋白质组学及网络药理学KEGG富集分析共同揭示XEHT可能是通过调控Phospholipase D、mTOR、ErbB信号通路干预AC病理发生与发展。

[利益冲突] 沈祥春为《中国实验方剂学杂志》编委,但未参与审核的任何环节。

[参考文献]

[1] 刘伊莎,李耀辉,康艳. 儿童过敏性咳嗽的中西医研究进展

- [J]. 现代中医药, 2021, 41(3):18-22.
- LIU Y H, LI Y H, KANG Y. Research progress in traditional Chinese and Western medicine for allergic cough in children [J]. Tradit Chin Med, 2021, 41(3):18-22.
- [2] 曹灿, 王晓尧, 熊永毫, 等. 崔瑛教授辨治过敏性咳嗽临床经验[J]. 甘肃中医药大学学报, 2021, 38(6):12-15.
- CAO C, WANG XY, XIONG YH, et al. Professor CUI Ying's clinical experience in syndrome differentiation and treatment of allergic cough [J]. J Gansu Univ Tradit ChinMed, 2021, 38(6):12-15.
- [3] 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂第九册 (WS3-B-1691-94)[S]. 中华人民共和国卫生部药典委员会, 1994.
- Pharmacopoeia of the Ministry of Health of the People's Republic of China, Chinese medicine prescription preparations, Book IX (WS3-B-1691-94) [S]. Pharmacopoeia Committee of the Ministry of Health of the People's Republic of China, 1994.
- [4] 赵海, 李平, 喻懋国, 等. HPLC测定小儿化痰止咳颗粒中吐根碱的含量[J]. 贵州科学, 2015, 33(5):70-73.
- ZHAO H, LI P, YU MG, et al. Determination of content of ipecac alkali in children Huatan Zhike granule by HPLC [J]. Guizhou Sci, 2015, 33(5):70-73.
- [5] WILKINS M R, SANCHEZ J C, GOOLEY A A, et al. Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it [J]. Biotechnol Genet Eng Rev, 1996, 13:19-50.
- [6] LI X, WANG W, CHEN J. Recent progress in mass spectrometry proteomics for biomedical research [J]. Sci China(Life Sciences), 2017, 60(10):1093-1113.
- [7] 牟翔宇, 孙鹏, 薛玲, 等. 基于整体观念探讨中医药应用蛋白质组学的研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(11):6585-6588.
- MU XY, SUN P, XUE L, et al. Discussion on the research progress of proteomics in traditional Chinese medicine based on holistic concept [J]. China J Tradit Chin Med, 2021, 36(11):6585-6588.
- [8] BERGER SI, IYENGAR R. Network analyses in systems pharmacology[J]. Bioinformatics, 2009, 25(19):2466-2472.
- [9] MURAKI M, TOHDA Y, SUGIHARA R, et al. The effect of TYB-2285 on dual phase bronchoconstriction and airway hypersensitivity in guinea-pigs actively sensitized with ovalbumin[J]. J Pharm Pharmacol, 1994, 46(11):883-886.
- [10] 蔡黎, 毕小利, 王忆勤, 等. 咳嗽变异性哮喘豚鼠模型的构建[J]. 山西医科大学学报, 2007, (12):1070-1073.
- CAI L, BI X L, WANG Y Q, et al. Construction of cough variant asthma model in guinea pig [J]. J Shanxi Med Univ, 2007(12):1070-1073.
- [11] 邱忠民, 刘琦, 郭德华, 等. 缓激肽 B₂受体拮抗剂对致敏豚鼠模型咳嗽反应性的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002(2):13-16.
- QIU Z M, LIU Q, GUO D H, et al. The effect of bradykinin B₂ receptor antagonist on cough reactivity in a sensitized guinea pig model [J]. Chin J Tuberc Respir Dis, 2002(2):13-16.
- [12] 徐叔云, 芊如谦, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002:203.
- XU S Y, BENZ R L, CHEN X. Experimental Methodology of Pharmacology [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2002:203.
- [13] 李慧文, 金丽娜, 宋艺兰, 等. 朝医鹿茸大补汤对咳嗽变异性哮喘豚鼠TLR4/WNT-5A信号通路的影响[J]. 中国药理学通报, 2023, 39(5):978-985.
- LI H W, JIN LN, SONG Y L, et al. Effects of traditional korean medicine Lurong Dabu decoction on TLR4/WNT-5A signaling pathway in guinea pigs with cough variant asthma [J]. Chin Pharmacol Bull, 2023, 39(5):978-985.
- [14] RU J, LI P, WANG J, ZHOU W, et al. TC MSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. J Cheminform, 2014, doi: 10.1186/1758-2946-6-13.
- [15] XU X, ZHANG W, HUANG C, et al. A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(6):6964-6982.
- [16] 高海凤. 吐根化学成分的研究[D]. 长春:吉林大学, 2015.
- GAO H F. Research on the chemical composition of Tulipa sp [D]. Changchun: Jilin University, 2015.
- [17] 冯勇. 小儿过敏性咳嗽临床治疗分析[J]. 中国实用医药, 2014, 9(3):186-187.
- FENG Y. Analysis of clinical treatment of pediatric allergic cough [J]. Chin Practical Med, 2014, 9(3):186-187.
- [18] 裴文杰. 小儿过敏性咳嗽采用孟鲁司特钠的治疗效果分析[J]. 中文科技期刊数据库(全文版)医药卫生, 2022(11):107-110.
- PEI W J. Analysis of the therapeutic effect of montelukast sodium in pediatric allergic cough [J]. Chin Sci Tech J Database (Full Text Edition) Med Health, 2022(11):107-110.
- [19] 李文平. 小儿过敏性咳嗽38例临床分析[J]. 中国医药指南, 2011, 9(8):107-108.
- LI W P. Clinical analysis of 38 cases of pediatric allergic cough [J]. Guide Chin Med, 2011, 9(8):107-108.
- [20] 唐丹. 小儿过敏性咳嗽52例临床分析[J]. 中外医学研究, 2016, 14(13):106-107.
- TANG D. Clinical analysis of 52 cases of pediatric allergic cough [J]. Chin Foreign Med Res, 2016, 14(13):106-107.
- [21] 陈桂芳. 玉屏风散加减治疗小儿过敏性咳嗽的临床观察[J]. 中医临床研究, 2014, 6(20):117-118.
- CHEN G F. Clinical observation of the addition and subtraction of Yuping Fengsan in the treatment of allergic cough in children [J]. Clin J Chin Med, 2014, 6(20):117-118.
- [22] 耿晓, 阎兆君. 小儿过敏性咳嗽用药规律探究[J]. 现代中医药, 2020, 40(4):33-37.
- GENG X, YAN Z J. A Research on the Medication Rule in Treating the Infantile Anaphylactic Cough [J]. Mod Chin Med, 2020, 40(4):33-37.

- [23] 宁君,牛峰海. 小儿化痰止咳颗粒治疗支气管炎所致小儿咳嗽的临床观察[J]. 中国实用医药,2015,10(22):195-196.
NING J, NIU F H. Clinical observation of pediatric phlegm and cough granules in the treatment of pediatric cough caused by bronchitis [J]. Chin Practical Med, 2015, 10 (22) : 195-196.
- [24] BRUNTZ R C, LINDSLEY CW, BROWN H A. Phospholipase D signaling pathways and phosphatidic acid as therapeutic targets in cancer[J]. Pharmacol Rev, 2014, 66 (4):1033-1079.
- [25] BRUNTZ R C, LINDSLEY C W, BROWN H A. Phospholipase D signaling pathways and phosphatidic acid as therapeutic targets in cancer[J]. Pharmacol Rev, 2014, 66 (4):1033-1079.
- [26] CHOUDHURY D, GHOSH D, MONDAL M, et al. Polyploidy and mTOR signaling: A possible molecular link [J]. Cell Commun Signal, 2024, 22(1):196.
- [27] 连乐桑,孟星汝,黄秀芳,等. 基于网络药理学及体内实验探讨射麻止咳液治疗中性粒细胞型哮喘的分子机制[J]. 中药新药与临床药理,2024,35(2):247-256.
LIAN L S, MENG X R, HUANG X F, et al. Study on the molecular mechanism of Shema Zhichuan liquid in the treatment of neutrophilic asthma based on network pharmacology and *in vivo* experiment[J]. Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2024, 35(2):247-256.
- [28] LEDONNE A, MANGO D, LATAGLIATA E C, et al. Neuregulin 1/ErbB signalling modulates hippocampal mGluRI-dependent LTD and object recognition memory [J]. Pharmacol Res, 2018, 130:12-24.
- [29] 郑静,陈锋,徐婷婷,等. 基于NRG/ErbB信号通路探讨紫草素对哮喘模型大鼠的影响[J]. 新中医,2020,52(10):4-8.
ZHENG J, CHEN F, XU T T, et al. Shikonin Has Effect on Rat Models with Asthma Based on NRG/ErbB Signaling Pathways[J]. New J Tradit Chin Med, 2020, 52(10):4-8.
- [30] 王杰,高云霄,马虹宇,等. 基于网络药理学和实验验证探讨香连化浊方对慢性萎缩性胃炎的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(18):161-168.
WANG J, GAO Y X, MA H Y, et al. Mechanism of Xianglian Huazhuo prescription against chronic atrophic gastritis based on network pharmacology and experimental verification[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2022, 28(18) : 161-168.
- [31] 黄美雯,杨华杰,周晓春,等. 网络药理学在民族药研究中的应用与展望[J]. 中国中药杂志,2019,44(15):3187-3194.
HUANG M W, YANG H J, ZHOU X C, et al. Advances on network pharmacology in ethnomedicine research[J]. China J Chin Mater Med, 2019, 44(15):3187-3194.
- [32] 李玮婕,毛霞,郭秋岩,等. 网络药理学研究策略在组合药物研究中的应用[J]. 转化医学电子杂志,2018,5(3):3-16.
LI W J, MAO X, GUO Q Y, et al. Application of network pharmacology-based strategies in the development of drug combinations [J]. E-J Transl Med, 2018, 5(3):3-16.
- [33] BERGER S I, IYENGAR R. Network analyses in systems pharmacology[J]. Bioinformatics, 2009, 25(19):2466-2472.
- [34] GRANATO M, RIZZELLO C, GILARDINI MONTANI M S, et al. Quercetin induces apoptosis and autophagy in primary effusion lymphoma cells by inhibiting PI3K/AKT/mTOR and STAT3 signaling pathways[J]. J Nutr Biochem, 2017, 41:124-136.
- [35] BOON-UNGE K, YU Q, ZOU T, ZHOU A, et al. Emetine regulates the alternative splicing of Bcl-x through a protein phosphatase 1-dependent mechanism [J]. Chem Biol, 2007, 14(12):1386-1392.
- [36] MOLLER M, HERZER K, WENGER T, et al. The alkaloid emetine as a promising agent for the induction and enhancement of drug-induced apoptosis in leukemia cells[J]. Oncol Rep, 2007, 18(3):737-744.
- [37] SAMPIERI C L, NUTTALL R K, YOUNG D A, et al. Activation of p38 and JNK MAPK pathways abrogates requirement for new protein synthesis for phorbol ester mediated induction of select MMP and TIMP genes [J]. Matrix Biol, 2008, 27(2):128-138.
- [38] 于倩,巫冠中. 木犀草素抗炎机制的研究进展[J]. 药学研究, 2019, 38(2):108-111, 119.
YU Q, WU G Z. Research progress of anti-inflammatory properties of luteolin [J] J Pharm Res, 2019, 38 (2) : 108-111, 119.
- [39] 孙力超,陈旭,姚尧,等. 木犀草素对脓毒症小鼠急性肺损伤的保护作用[J]. 中华急诊医学杂志,2019,28(6):717-723.
SUN L C, CHEN X, YAO Y, et al. Protective effect of luteolin on acute lung injury in sepsis mice [J]. Chin J Emerg Med, 2019, 28(6):717-723.
- [40] OUYANG Y, RONG Y, WANG Y, et al. A systematic study of the mechanism of acacetin against sepsis based on network pharmacology and experimental validation [J]. Front Pharmacol, 2021, 12:683645.
- [41] 莫蕊辰,王妮妮,赵磊,等. 基于网络药理学预测桔梗治疗支气管哮喘的作用机制[J]. 山东医药,2021,61(5):13-17.
MO R C, WANG W W, ZHAO L, et al. Predicting the mechanism of platycodon grandiflorum in treatment of bronchial asthma based on network pharmacology [J]. Shandong Med J, 2021, 61(5):13-17.
- [42] LIU L, YANG J, ZU B, et al. Acacetin regulated the reciprocal differentiation of Th17 cells and Treg cells and mitigated the symptoms of collagen-induced arthritis in mice [J]. Scand J Immunol, 2018, 88(4):e12712.
- [43] 杨昕宇,肖长芳,张凯熠,等. 麻黄临床应用与药理作用研究进展[J]. 中华中医药学刊,2015,33(12):2874-2877.
YANG X Y, XIAO C F, ZHANG K Y, et al. Research progress on clinical application and pharmacological functions of ephedra [J]. China Arch Tradit Chin Med, 2015, 33(12):2874-2877.

[责任编辑 张丰丰]