

川贝枇杷糖浆的化学成分及止咳作用机制的网络药理学研究

张学建^{1,2,3}, 徐 鸿², 张 婷²,
吴 雷^{1,3}, 简美玲^{1,3}, 常丹丹^{1,3}, 吴纯洁², 陶飞燕^{1,3*}

¹四川三联新材料有限公司, 成都 610041; ²成都中医药大学中医药创新研究院 交叉学科研究院, 成都 611137;

³四川中烟工业有限责任公司, 成都 610066

摘要: 本文旨在研究川贝枇杷糖浆 (Chuanbei Pipa syrup, CPS) 的化学成分及其止咳作用机制。首先, 运用小鼠急性咳嗽模型验证 CPS 的止咳作用并结合 ELISA 检测了相关炎症因子的释放水平; 随后, 运用 UPLC-MS/MS 和 GC-MS 分析 CPS 的化学成分并结合网络药理学探讨其止咳作用机制: 通过建立药物与疾病交集靶点筛选出核心靶点构建咳嗽-药物-成分-核心靶点网络和核心靶点蛋白-蛋白相互作用网络并进行基因本体论富集 (GO) 和京都基因与基因组百科全书通路 (KEGG) 富集, 分析 CPS 止咳的潜在靶点和信号通路。小鼠咳嗽实验结果表明 CPS 具有显著的止咳作用, 可以影响呼吸道炎症因子白介素-10 (interleukin-10) 和白介素-17A (interleukin-17A) 的释放。基于超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱 (UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS) 和顶空-固相微萃取-气相-质谱联用技术 (HS-SPME-GC-MS) 共鉴定出 CPS 的 33 种化学成分。网络药理学研究中, 一共筛选出 152 个核心靶点用于构建咳嗽-药物-成分-核心靶点网络和核心靶点蛋白-蛋白相互作用网络。GO 分析结果表明 CPS 主要影响内肽酶活性, 蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性, 跨膜受体蛋白激酶活性等, KEGG 富集分析表明 CPS 干预 MAPK 信号通路, PI3K-Akt 信号通路, 以及炎症介质对 TRP 通道的调节。

关键词: 川贝枇杷糖浆; 止咳作用; 药效学验证; 成分分析; 网络药理学

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880 (2024) Suppl-0098-15

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.S.013

Constituents of Chuanbei Pipa syrup and its mechanism on relieving cough based on network pharmacology

ZHANG Xue-jian^{1,2,3}, XU Hong², ZHANG Ting², WU Lei^{1,3},
JIAN Mei-ling^{1,3}, CHANG Dan-dan^{1,3}, WU Chun-jie², TAO Fei-yan^{1,3*}

¹Sichuan Sanlian New Material Co., Ltd., Chengdu 610041, China; ²Innovative Institute of Chinese Medicine and Pharmacy Academy for Interdiscipline, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

³Research and Development Centre, China Tobacco Sichuan Industrial Co., Ltd., Chengdu 610066, China

Abstract: This study aims to investigate the chemical constituents and antitussive mechanism of Chuanbei Pipa syrup (CPS). For the first time, the antitussive effect of CPS was verified using the mouse acute cough model, and the release levels of related inflammatory factors were detected by ELISA. Subsequently, the chemical components of CPS were analyzed by UPLC-MS/MS and GC-MS to explore its antitussive mechanism combined with network pharmacology. By constructing a "cough-drug-core target" network, protein-protein interaction (PPI) network of core targets, and performing gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis on the intersection targets of drugs and diseases, potential targets and signaling pathways for the treatment of cough diseases by CPS were screened. The mouse acute cough model tests showed a significant antitussive effect of the syrup. It was also found to affect the release of respiratory pro-inflammatory factors interleukin-10 and interleukin-17A. Based on ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-elec-

trostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry (UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS) and headspace-solid phase micro-extraction-gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS), a total of 33 chemical components were identified in CPS. A total of 152 core targets were selected to construct the cough-drug-core target network and core target PPI network. The GO enrichment analysis revealed activities such as endopeptidase activity, protein serine/threonine kinase activity, and transmembrane receptor protein kinase activity, while the KEGG enrichment analysis showed the MAPK signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, and regulation of inflammatory mediators on TRP channels.

Key words: Chuanbei Pipa syrup; cough relieving effect; pharmacodynamic validation; constituent analysis; network pharmacology

咳嗽反射是一种多层面的精确定时的神经肌肉现象,其特征是膈肌,胸壁各种肌群,颈肌,腹肌,喉部外展肌和内收肌的激活模式,大脑的髓质和高级皮质区域精确的协调^[1]。咳嗽反射可由呼吸道的一些炎症或机械变化,以及化学和机械刺激物的吸入引起,这些刺激物通常来自上气道部位,特别是喉部、隆突和近气道分支的其他点。咳嗽是一种保护呼吸道的反射反应,用于清理上呼吸道的分泌物或者异物,但过度咳嗽和慢性咳嗽均会导致患者身心不适,需要进行治疗。川贝枇杷糖浆(Chuanbei Pipa syrup, CPS)是以川贝母、枇杷叶、桔梗、薄荷脑为主要原料制成的糖浆剂,是常用的治疗咳嗽的中成药,具有清热宣肺化痰止咳的功效,临床用于风热犯肺、痰热内阻所致的咳嗽痰黄或咯痰不爽、咽喉肿痛、胸闷胀满等。据相关报道,CPS治疗风热感冒所引起的咳嗽的总有效率为93.33%,显效率为53.33%^[2];针对毛细支气管炎,CPS也有较好效果,总有效率达到80%^[3]。口服CPS对慢性咳嗽也有一定疗效,总有效率为44.95%^[4]。此外,CPS与异丙嗪、利巴韦林联合治疗顽固性干咳也有良好的防治效果,总有效率达95.5%^[5]。现有研究提示治咳川贝枇杷露和蜜炼川贝枇杷膏对PM_{2.5}所致大鼠急性肺损伤具有明显的预防和治疗作用,可缓解肺损伤症状,减少肺内生化指标和炎症因子的分泌,保护肺部组织^[6]。治咳川贝枇杷滴丸中止咳平喘成分为平贝母和半夏的生物碱成分,消炎成分为枇杷叶和桔梗中的三萜皂苷和羧酸衍生物,薄荷脑成分也具有一定的扩张气路止咳的功效^[7]。

总体来看,目前CPS及其相关制剂的质量评价和质量检测方面的研究较多,而其物质基础和止咳作用机制研究较少。本文通过UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS和HS-SPME-GC-MS分析糖浆的化学成分,研究其治疗咳嗽的物质基础,并结合网络药理学分析和小鼠急性咳嗽模型初步探究其止咳作用机制,以为相关研究提供一定的支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂

CPS(批号:20210901,江西和盈药业有限公司);磷酸可待因片(批号:20210504,青海制药有限公司);白介素-10(interleukin-10, IL-10)、白介素-17A(interleukin-17A, IL-17A) Mouse ELISA试剂盒(批号:20220318,北京四正柏生物科技有限公司);羧甲基纤维素钠(批号:2020081701,成都市科隆化学制品有限公司);甲醇/乙腈(HPLC级,美国Thermo Fisher Scientific);浓氨水(分析级,批号:2021070101,成都市科隆化学制品有限公司)。

1.1.2 仪器

UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS超高效高分辨液质联用仪(赛默飞公司);8890 GC-MS气质联用仪(安捷伦公司);SPME萃取纤维头(SPME Fiber Assembly 50/30 μm DVB/CAR/PDMS, Stableflex 24Ga, Manual Holder 3pk);Labconco 117型冻干机(Labconco Corporation);UPT-II-10T优普超纯水制造系统(成都超纯科技有限公司);粤华WH-2000超声波雾化器(汕头市粤华医疗器械厂有限公司);SpectraMAX Plus384酶标仪(美谷分子仪器有限公司);DZKW-4电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司)。

1.1.3 动物

昆明小鼠,雄性,5周龄,32 \pm 3 g,购于斯贝福生物技术有限公司;成都中医药大学实验动物使用许可证号:SYXK(川)2020-124。本实验符合动物实验伦理学要求,获成都中医药大学实验动物伦理委员会的批准(批准号20210604)。

1.2 方法

1.2.1 糖浆止咳作用实验验证

1.2.1.1 小鼠急性咳嗽模型的建立

雄性昆明小鼠(30~35 g)适应性喂养1 d后,初筛。将15 mL的25%氨水加入超声波雾化喷雾

器中并连接 1 L 的透明钟罩,将小鼠放入透明钟罩中,设置雾化器为最大风力,雾化功率为中档,持续喷雾时间 10 s。随后将小鼠取出放入透明容器内,观察咳嗽次数(典型咳嗽为小鼠腹肌收缩,同时张大口,有微弱咳嗽声),筛选出 3 min 内咳嗽次数在 1~20 次的雄性昆明种小鼠作为试验小鼠。

48 只试验小鼠适应性喂养 3 d 后,随机分为 6 组(每组 8 只),即:空白组(control, Con)和模型组(model, Mod)、磷酸可待因组(即阳性对照, positive control, Pos)、糖浆低、中、高剂量组(CPS high, middle, low dose group; CPS-H, CPS-M, CPS-L)。实验前小鼠禁食不禁水 12 h,然后各组小鼠按体重灌胃给药,连续 3 d,Con 组(10 mL/kg, 0.5% CMC-Na 水溶液)末次给药后不造模, Mod 组(10 mL/kg, 0.5% CMC-Na 水溶液), Mod 组(60 mg/kg, 磷酸可待因溶解于 0.5% CMC-Na 水溶液),以及 CPS-L(5 mL/kg)、CPS-M(10 mL/kg)、CPS-H(15 mL/kg)剂量组;末次给药 1 h 后,照前文所述程序逐只将小鼠进行氨水引咳试验,取出小鼠,观察小鼠 3 min 内的咳嗽次数。Mod 组小鼠均出现前述典型咳嗽症状,在 3 分钟内咳嗽次数为 5~30 次,且 Pos 组提示小鼠急性咳嗽模型造模成功。

1.2.1.2 ELISA 检测支气管肺泡灌洗液中炎症因子水平

引咳试验后,立即取小鼠的支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)。利用酶联免疫吸附法(ELISA)技术,检测 BALF 中 IL-10 和 IL-17 的含量。具体操作按照试剂盒说明书,反应终止后用多功能酶标仪检测 450 nm 处吸光度值($A_{450\text{ nm}}$),再根据标准曲线计算出 IL-10 和 IL-17A 的浓度。

1.2.2 统计方法

应用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析,以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间差异采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

1.2.3 UPLC-MS/MS 和 GC-MS 分析

1.2.3.1 UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS 分析成分

供试品溶液的制备:将 CPS 置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 预冻 2 h,将预冻后的 CPS 放入冻干机中冷冻干燥,得糖浆冻干粉;取冻干粉 40 mg 溶于 2 mL 甲醇中,超声至粉末完全溶解,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

色谱条件:Thermo scientificTM AccucoreTM C₁₈(3

mm \times 100 mm, 2.6 μm) 色谱柱;流速:0.4 mL/min;柱温:35 $^{\circ}\text{C}$;进样量为 1 μL ;流动相 A 为 0.1% 含甲酸的乙腈,流动相 B 为含 0.1% 甲酸的水;梯度洗脱程序为:0~0.6 min, 3% A;0.6~4.5 min, 3% A \rightarrow 10% A;4.5~6.6 min, 10% A;6.6~8.7 min, 10% A \rightarrow 15% A;8.7~10 min, 15% A;10~14 min, 15% A \rightarrow 22% A;14~16 min, 22% A \rightarrow 25% A;16~20 min, 25% A \rightarrow 35% A;20~24 min, 35% A \rightarrow 40% A;24~27 min, 40% A \rightarrow 60% A;27~31 min, 60% A \rightarrow 90% A。

质谱条件:电喷雾离子源,选择正负离子模式(ESI⁺/ESI⁻),在 100~1 500 m/z 范围内进行全扫描分析;离子源温度设置为 120 $^{\circ}\text{C}$,喷雾电压:3.0 kV;毛细管温度:320 $^{\circ}\text{C}$;最大喷射电流:100 A;探针加热器温度:350 $^{\circ}\text{C}$;洗脱溶剂温度设置为 400 $^{\circ}\text{C}$;鞘气和辅助气体均为氮气,流速分别为 35.00 L/min 和 10.00 L/min。

1.2.3.2 UPLC-MS/MS 质谱数据解析

使用 Compound Discovery 3.1 软件和 Xcalibur 软件(赛默飞公司)对原始数据进行处理。参考 Thermo Scientific 建立的化合物库(mz Cloud 和 mz Vault)并结合文献中相关化合物的碎片离子信息,保留时间,相对分子质量等确定 CPS 中可能存在的成分。

1.2.3.3 HS-SPME-GC-MS 分析

供试样品前处理:将 3 mL CPS 置于顶空瓶中,将老化的 SPME 萃取纤维头插入顶空瓶中吸附 30 min,迅速拔出后直接接入气相色谱的进样口,使 SPME 纤维头涂膜吸附的成分在高温下解吸。

色谱条件:色谱柱为 HP-Innowax(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm);载气:氦气,流速为 1.5 mL/min;升温程序:初始温度 60 $^{\circ}\text{C}$,保持 1 min,再以 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 250 $^{\circ}\text{C}$ 。

质谱条件:进样方式:分流进样,分流比 10:1;进样口温度:250 $^{\circ}\text{C}$;电离能量:70 eV;离子源温度:230 $^{\circ}\text{C}$;四级杆温度:150 $^{\circ}\text{C}$;全扫描范围:35~350 amu。

1.2.4 网络药理学分析

1.2.4.1 候选靶点分析和蛋白互作网络构建

以 UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS 和 HS-SPME-GC-MS 鉴定出的 CPS 中的化学成分为研究对象,在 TCMS (http://tcmsp.com/tcmsp.php), Pharmmapper (http://lilab-ecust.cn/pharmmapper/) 和 SwissTarget Prediction (http://www.swisstargetprediction.ch/) 等在线数据库中查找各个成分对应的靶点蛋

白,得到成分相关靶点。在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>), TTD (<http://db.idrblab.net/ttd/>) 和 DrugBank (<https://go.drugbank.com/>) 三个数据库中,以“cough”为关键词进行检索,得到疾病(咳嗽)相关靶点。利用 R4.3.0 进行韦恩分析,得到成分靶点和疾病靶点的交集靶点。

将成分和其对应的交集靶点导入 Cytoscape 3.7.1 软件,进行网络拓扑分析,选取度值(degree)大于中位数的靶点作为核心靶点,接着绘制成分和疾病与核心靶点的关系网络,进一步分析糖浆活性成分治疗咳嗽的作用机制。然后将核心靶点导入 String 数据库(<https://string-db.org/>),以物种 Homo sapiens,0.9 置信度为筛选条件进行蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction,PPI)网络分析,隐藏网络中断开的节点,将生成的文件导入 Cytoscape 软

件中制得 PPI 图。

1.2.4.2 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

利用 R 4.3.0 对药物与咳嗽的交集靶点进行基因本体论富集(Gene Ontology,GO)和京都基因与基因组百科全书通路分析(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG),选取 P 值 < 0.05 的相关结果,对前 20 个结果进行可视化。

2 结果与分析

2.1 动物实验验证结果

通过小鼠急性咳嗽模型^[8]试验表明,低(5 mL/kg)、中(10 mL/kg)、高(15 mL/kg)剂量 CPS 均能显著降低模型小鼠的咳嗽次数并呈浓度依赖关系,高剂量的 CPS 与阳性对照组(60 mg/kg,磷酸可待因^[9]溶于 0.5% CMC-Na 水溶液)效果相当,结果如图 1 所示。

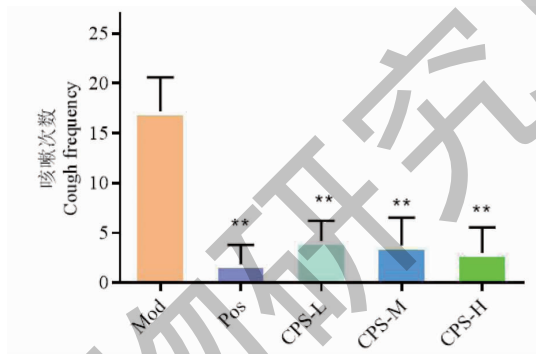


图 1 CPS 在小鼠急性咳嗽模型中的作用。

Fig. 1 Effect of CPS on acute cough model in mice

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。Compared with model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

引咳实验后,采用 ELISA 检测小鼠的 BALF 中促炎因子 IL-10^[8,10]和 IL-17A^[11]的含量。磷酸可待因作为中枢镇咳药,对 BALF 中的炎症因子释放没有显著影响。中剂量的 CPS 能一定程度地降低模型小鼠的 IL-10 和 IL-17A 释放;低剂量的 CPS 对炎

症因子释放没有显著影响;而高剂量的 CPS 则能使半数的小鼠大量释放 IL-10 和 IL-17A,由此可见 CPS 可以影响呼吸道促炎因子 IL-10 和 IL-17A 的释放(见图 2)。

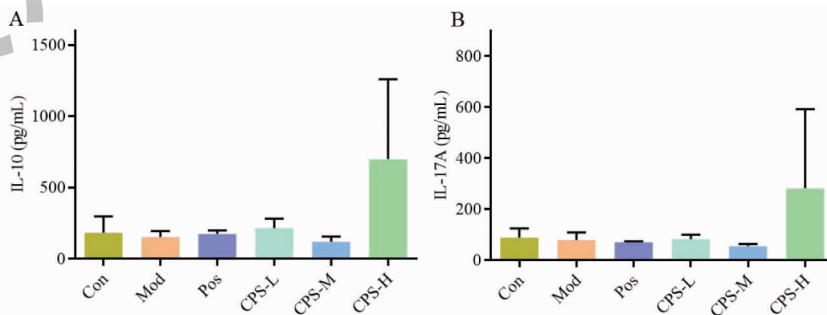


图 2 CPS 对 BALF 中 IL-10 (A) 和 IL-17A (B) 的影响

Fig. 2 The effects of CPS on IL-10 (A) and IL-17A (B) in BALF

2.2 UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS/MS 分析 CPS 的成分

本文使用 UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS 对 CPS 进行分析。将化合物的相对分子质量、保留时间和二级质谱碎片离子信息等与 Thermo Scientific 建立的化合物库(mz Cloud 和 mz Vault)以及相关文献报道数据对比分析,共分析鉴定了 29 个成分,包括皂

苷类、生物碱类、酚类等化合物。使用 HS-SPME-GC-MS 分析 CPS 的挥发性成分,测得四种含量较高的化合物,分别是苯甲醛、薄荷醇、苯甲酸和橙花叔醇。UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS 的总离子流图如图 3 所示,鉴定出的所有化合物均见表 1;HS-SPME-GC-MS 总离子流图如图 4 所示,鉴定出的所有化合物均见表 2,所有化合物的结构式见图 5。

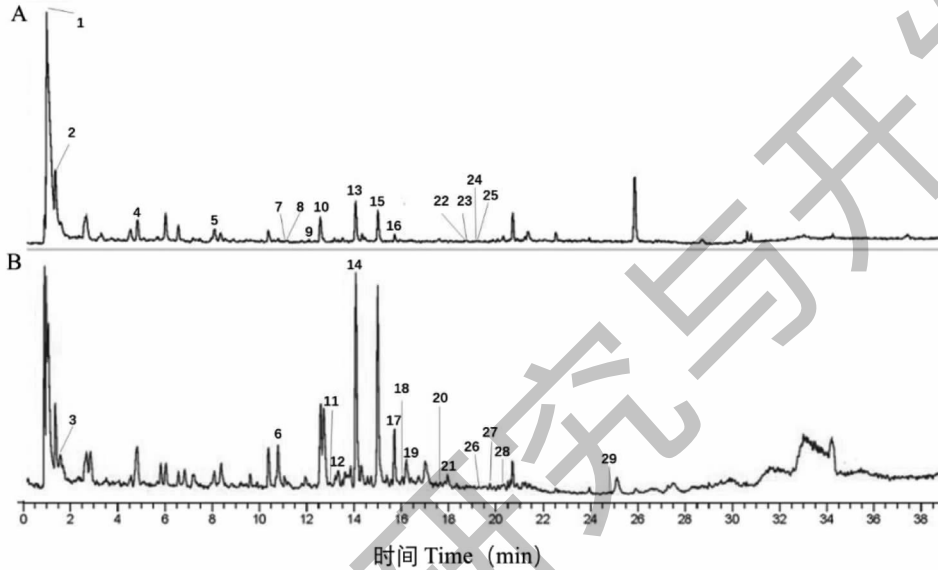


图 3 CPS 的 UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS 总离子流图

Fig. 3 UPLC-QE-Orbitrap-MS total ion chromatogram of CPS

注:A:负离子模式;B:正离子模式。Note:A: Negative ion mode;B: Positive ion mode.

表 1 UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS 鉴定出的 CPS 的成分

Table 1 Components identified by UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS in CPS

编号 No.	t_R (min)	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	离子模式 Ion mode	理论值 Theoretical value (m/z)	实验值 Experimental value (m/z)	误差 Error ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 Fragment ion (m/z)	参考文献 Ref.
1	0.99	奎宁酸 Quinic acid	$C_7H_{12}O_6$	$[M-H]^-$	191.056 1	191.055 6	2.6	173.045 4, 171.029 3, 127.039 3, 109.028 7	12
2	1.17	葡萄糖酸 Gluconic acid	$C_6H_{12}O_7$	$[M-H]^-$	195.051 0	195.050 6	2.1	177.040 0, 159.029 8, 129.018 5, 75.007 7	13
3	1.74	腺苷 Adenosine	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	$[M+H]^+$	268.104 0	268.104 0	0.0	136.061 9, 119.035 8, 89.060 3, 73.029 0, 57.034 2, 280.245 7, 191.055 6,	14
4	4.6	绿原酸 Chlorogenic acid	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	353.087 8	353.088 1	0.8	173.044 9, 161.023 7, 155.034 6, 135.044 3, 107.049 2	14
5	8.09	新绿原酸 Neochlorogenic acid	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	353.087 8	353.087 9	0.3	191.055 7, 179.033 9, 135.044 2, 127.039 4, 111.044 0, 93.033 5	15
6	10.83	西贝母碱苷 Edpetiline	$C_{33}H_{53}NO_8$	$[M+H]^+$	592.384 4	592.384 3	0.2	574.373 8, 138.127 8	16
7	11.00	柚皮苷 Naringin	$C_{27}H_{32}O_{14}$	$[M-H]^-$	579.171 9	579.172 6	1.2	271.060 8, 151.003 3, 136.015 8, 131.013 2	17
8	11.09	芦丁 Rutin	$C_{27}H_{30}O_{16}$	$[M-H]^-$	609.146 1	609.146 6	0.8	299.020 5, 284.032 7	12

续表 1 (Continued Tab. 1)

编号 No.	t_R (min)	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	离子模式 Ion mode	理论值 Theoretical value (m/z)	实验值 Experimental value (m/z)	误差 Error ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 Fragment ion (m/z)	参考文献 Ref.
9	12.05	金丝桃苷 Hy- peroside	$C_{21}H_{20}O_{12}$	$[M-H]^-$	463.088 2	463.088 7	1.1	151.039 3, 179.055 7, 273.097 9	18
10	12.4	异槲皮苷 Iso- quercitrin	$C_{21}H_{20}O_{12}$	$[M-H]^-$	463.088 2	463.088 6	0.9	389.241 1, 300.027 0	19
11	12.9	蒜黎芦碱 Jer- vine	$C_{27}H_{39}NO_3$	$[M+H]^+$	426.300 3	426.300 3	0.0	114.091 7	20
12	13.36	贝母甲素 Ver- ticine	$C_{27}H_{45}NO_3$	$[M+H]^+$	432.347 2	432.347 0	0.5	396.325 9, 138.127 8, 123.785 4, 112.112 3, 98.096 9, 96.081 1, 86.510 9, 81.021	21
13	13.91	黄芪苷 Astraga- lin	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M-H]^-$	447.093 3	447.093 4	0.2	285.040 7, 255.030 0, 227.034 8	19
14	14.06	西贝素 Imperia- line	$C_{27}H_{43}NO_3$	$[M+H]^+$	430.331 6	430.331 5	0.2	412.321 2, 354.721 6, 335.957 1, 318.047 1, 283.597 3, 166.701 2, 138.127 9, 126.127 9, 112.112 5, 98.096 9, 96.081 2, 53.052 3	21
15	15.09	刺槐素 Robinin	$C_{33}H_{40}O_{19}$	$[M-H]^-$	739.209 1	739.210 1	1.4	693.204 3, 620.380 9, 593.152 8, 495.162 7, 475.125 0, 336.859 0, 241.898 9, 187.860 7	14
16	15.52	阿福豆苷 Afze- lin	$C_{21}H_{20}O_{10}$	$[M-H]^-$	431.098 4	431.098 5	0.2	285.040 6, 151.002 5, 135.007 9, 93.033 6	22
17	15.55	山柰酚 Kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$	$[M+H]^+$	287.055 0	287.055 3	1.0	255.158 8, 211.004 1, 227.055 8	23
18	15.98	贝母素乙 Ver- ticinone	$C_{27}H_{43}NO_3$	$[M+H]^+$	430.331 6	430.331 3	0.7	412.320 3, 396.123 8, 175.148 6, 161.132 8, 157.101 2, 133.101 2, 131.085 8, 124.112 2, 98.096 9, 96.081 1, 95.085 9, 91.054 9, 81.070 5, 67.055 0, 55.055 0	24
19	16.27	黎芦碱 Veratra- mine	$C_{27}H_{39}NO_2$	$[M+H]^+$	410.305 4	410.305 4	0.0	295.205 9, 183.116 9, 171.117 0	20
20	17.53	石竹素 Caryo- phyllene oxide	$C_{15}H_{24}O$	$[M+H]^+$	221.190 0	221.190 1	0.5	203.176 9	25
21	17.90	去氢鄂贝定碱 Ebeiedinone	$C_{27}H_{43}NO_2$	$[M+H]^+$	414.336 7	414.336 6	0.2	184.781 1, 145.100 5, 133.100 7, 119.085 0, 107.086 1, 98.096 9, 81.070 7, 67.054 9, 57.488 8	21
22	18.81	桔梗皂苷 D Platycodin D	$C_{57}H_{92}O_{28}$	$[M-H]^-$	1 223.570 21	223.570 8	0.5	1133.539 2, 681.385 6, 541.177 0, 469.156 4	14
23	18.96	桔梗皂苷 A Platycodin A	$C_{59}H_{94}O_{29}$	$[M-H]^-$	1 265.580 81	265.581 9	0.9	681.387 4, 511.165 1, 469.156 7	26
24	19.03	远志皂苷 D Po- lygalacin D	$C_{57}H_{92}O_{27}$	$[M-H]^-$	1 207.575 31	207.577 0	1.4	503.286 5	26
25	19.11	桔梗酸 A Platy- conic acid A	$C_{57}H_{90}O_{29}$	$[M-H]^-$	1 237.549 51	237.549 5	0.0	1207.537 7, 485.291 0, 469.158 0, 377.113 9	14
26	19.40	贝母辛 Peimis- ine	$C_{27}H_{41}NO_3$	$[M+H]^+$	428.315 9	428.315 8	0.2	410.343 7, 109.101 5, 105.070 3, 95.086 0, 93.070 5, 84.081 4, 81.070 5, 79.055 0, 55.055 1	21
27	19.75	浙贝丙素 Pu- quiedinone	$C_{27}H_{43}NO_2$	$[M+H]^+$	414.336 7	414.336 7	0.0	396.327 8, 105.070 3, 98.096 9, 95.086 1, 69.070 5, 55.054 9	21
28	20.68	Prespatane	$C_{15}H_{24}$	$[M+H]^+$	205.195 1	205.195 2	0.5	149.132 6	25
29	24.80	川陈皮素 Nobi- letin	$C_{21}H_{22}O_8$	$[M+H]^+$	403.138 7	403.138 9	0.5	373.091 7, 183.028 9	17

表 2 HS-SPME-GC-MS 鉴定出的 CPS 中的成分

Table 2 Components identified by HS-SPME-GC-MS in CPS

编号 No.	t_R (min)	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	相对分子质量 Relative molecular mass	峰面积 Peak area
30	19.424	苯甲醛 Benzaldehyde	C_7H_6O	106.042	18 775 664
31	24.018	薄荷醇 Menthol	$C_{10}H_{20}O$	156.151	905 646 313
32	37.231	橙花叔醇 Nerolidol	$C_{15}H_{26}O$	222.198	12 129 374
33	48.470	苯甲酸 Benzoic acid	$C_7H_6O_2$	122.037	26 689 966

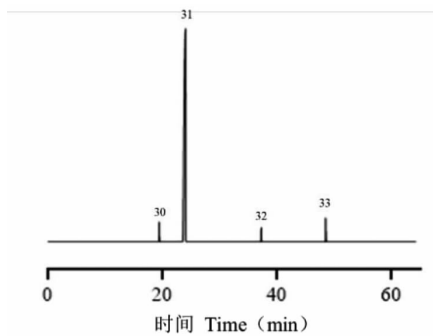
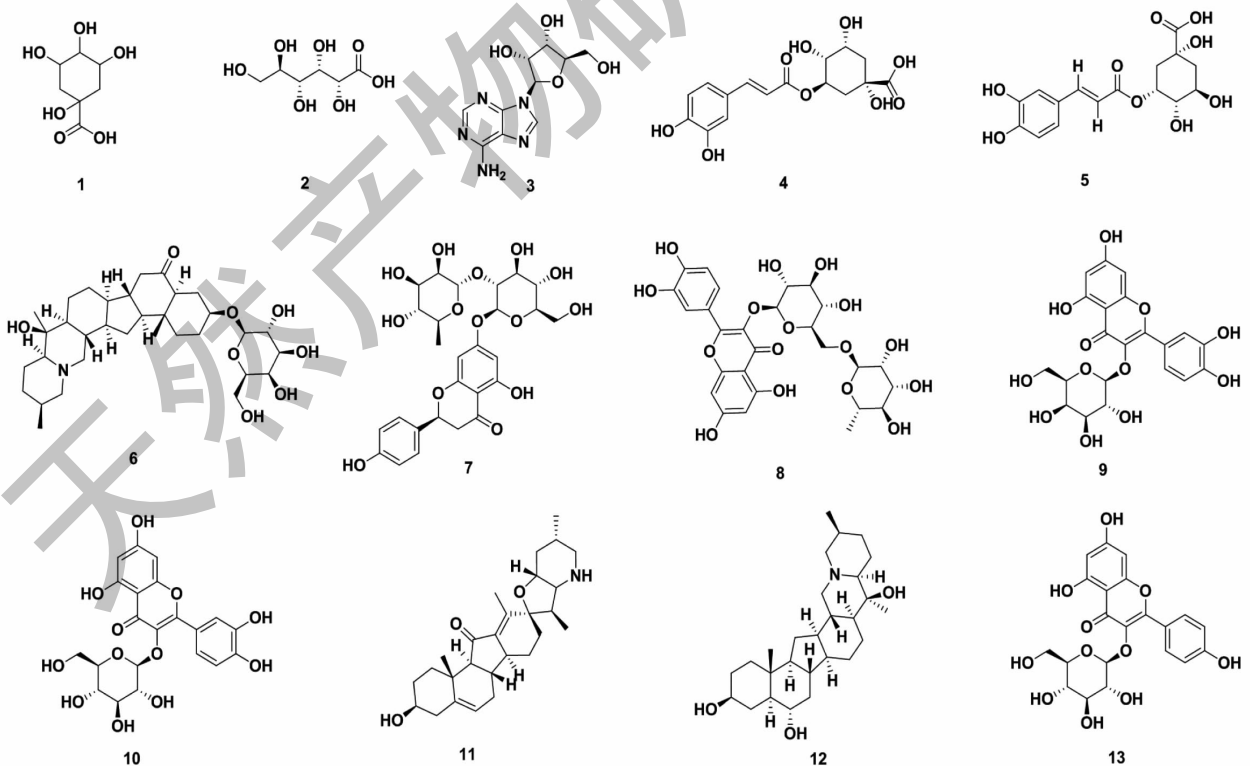


图 4 CPS 的 HS-SPME-GC-MS 总离子流图

Fig. 4 HS-SPME-GC-MS total ion chromatogram of CPS

2.3 网络药理学分析结果

将多个数据库检索出的靶点删除重复值后,共得到 714 个成分相关靶点和 4300 个咳嗽相关靶点, Venn 图显示两者有 318 个相交靶点(见图 6)。将这 318 个交集靶点与药物成分导入 Cytoscape 软件,进行网络拓扑分析,计算各个成分和靶点的 degree 值,以 degree 值大于中位数为阈值筛选核心靶点,共获得 152 个核心靶点(前 10 位靶点见表 3)。通过 Cytoscape 软件构建“咳嗽-药物-成分-核心靶点”网络,结果见图 7。结果显示网络中既存在 1 个化学成分作用多个靶点,也存在 1 个靶点对应多个化



续图 5(Continued Fig.5)

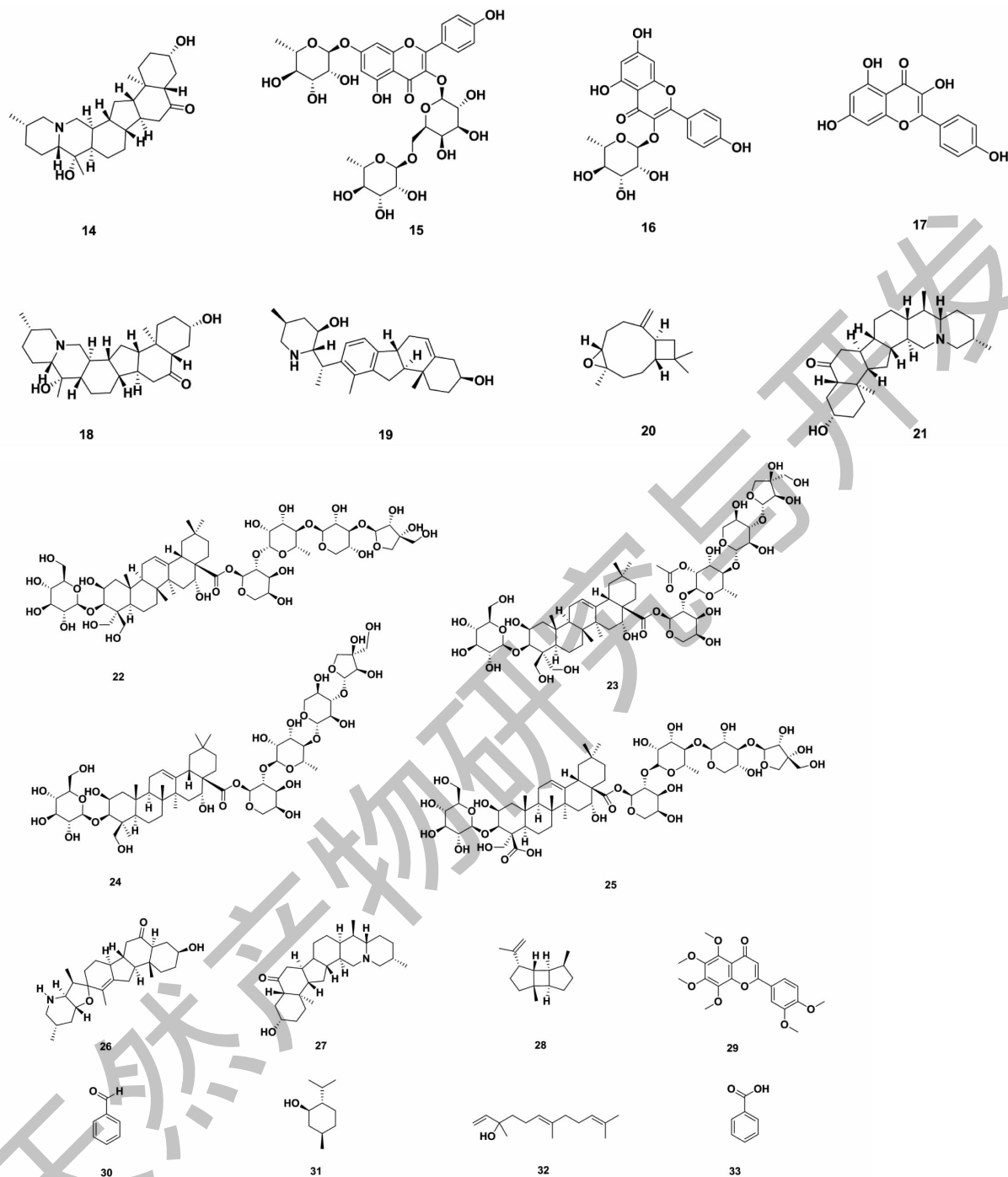


图5 CPS 中化合物的结构

Fig. 5 Structures of compounds from CPS

学成分,表明 CPS 止咳作用具有多成分、多靶点的特点。其中活性成分按 degree 值由大到小分别为:刺槐素、山柰酚、桔梗皂苷 D、桔梗酸 A、桔梗皂苷 A、西贝母碱苷、芦丁、黎芦碱、金丝桃苷和远志皂苷

D。Degree 值越大表明其调控更多的基因或被更多的基因调控,可在网络调控中发挥越大的作用,这提示以上成分和靶点在 CPS 止咳作用中有着重要作用。

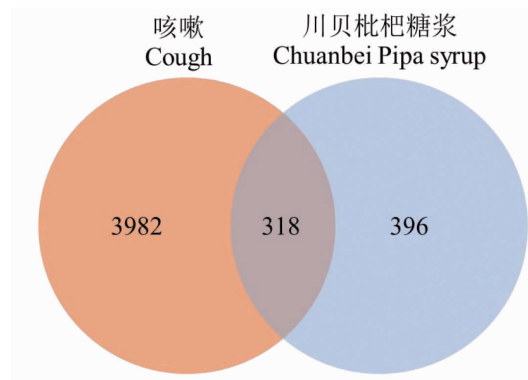


图 6 CPS 和咳嗽相关靶点韦恩图

Fig. 6 Venn diagram of related targets of CPS and cough

表 3 “咳嗽-药物-成分-核心靶点”网络 degree 值前 10 位靶点

Table 3 Top 10 targets of ‘cough-drug-component-core target’ network degree value

编号 No.	靶基因 Target gene	靶点名称 Target name
1	IGF1	胰岛素样生长因子 I
2	HSP90AA1	热休克蛋白 HSP 90- α
3	AKR1B1	醛基酮还原酶家族 1 成员 B1
4	SRC	原癌基因酪氨酸-蛋白激酶 Src
5	CDK2	循环蛋白依赖性激酶 2
6	MMP3	基质金属蛋白酶-3
7	F2	凝血因子 II
8	KIT	斑点性状蛋白
9	MAPK14	有丝分裂原激活的蛋白激酶 14
10	GSTP1	谷胱甘肽 S-转移酶 P

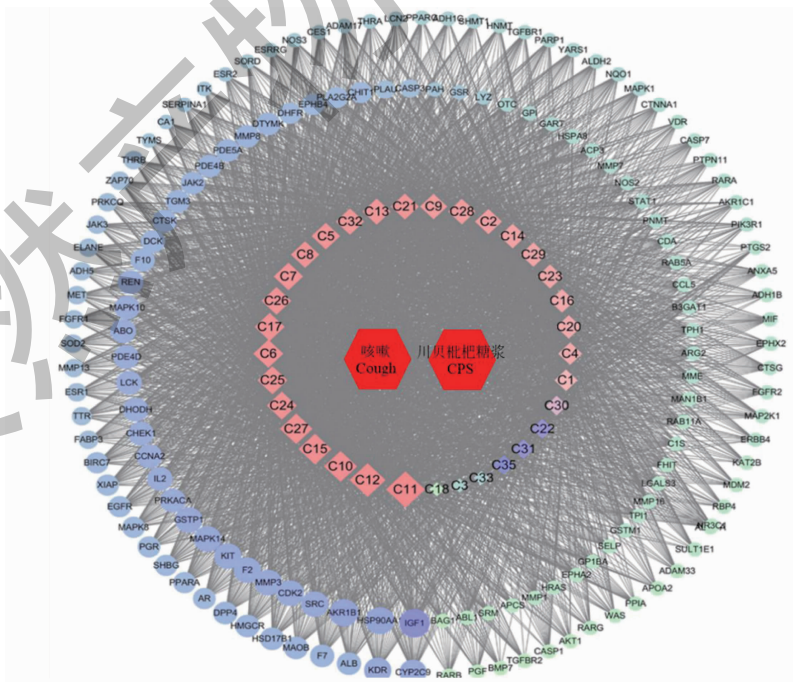


图 7 “咳嗽-药物-成分-核心靶点”网络

Fig. 7 Cough-drug-component-core target network

注:内圈为化学成分;中圈和外圈为核心靶点。Note:Inner circle were chemical constituents,middle and outer circle were core targets.

将 152 个核心靶点导入 STRING 数据库以物种 Homo sapiens, 0.9 置信度为筛选条件进行分析, 隐藏网络中断开的节点, 将生成的文件导入 Cytoscape

制得核心靶点 PPI 图 (见图 8), 同时进行网络拓扑分析, 筛选 degree 最高的 10 个靶点 (见表 4)。这些靶点可能在 CPS 止咳作用中起着非常关键的作用。

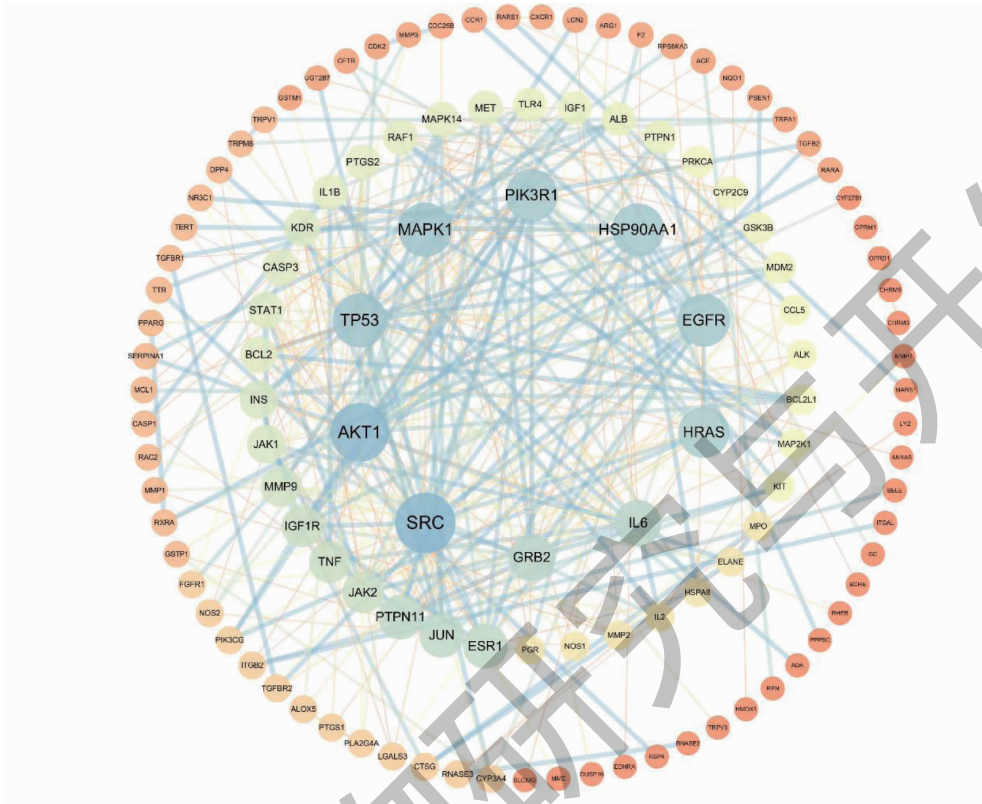


图 8 核心靶点 PPI 网络

Fig. 8 PPI network of core targets

表 4 核心靶点 PPI 网络 degree 值前 10 位靶点

Table 4 Top 10 targets of PPI network degree value of core targets

编号 No.	靶基因 Target gene	靶点名称 Target name
1	SRC	原癌基因酪氨酸-蛋白激酶 Src
2	AKT1	富含脯氨酸的 AKT1 底物 1
3	TP53	TP53 结合蛋白 1
4	MAPK1	有丝分裂原激活的蛋白激酶 1
5	PIK3R1	磷脂酰肌醇 3-激酶调节亚单位 α
6	EGFR	表皮生长因子受体
7	HSP90AA1	热休克蛋白 HSP 90- α
8	HRAS	GTP 酶 Hras
9	IL6	白细胞介素-6
10	GRB2	生长因子受体结合蛋白 2

对药物靶点与咳嗽相关靶点的交集靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 富集分析。通过 GO 功

能富集分析, 共获得 237 个分子功能条目, 其中内肽酶活性、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性, 跨膜受体蛋

白激酶活性、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性较为显著;KEGG 通路富集分析共得到 183 个条目,主要为与炎症和咳嗽相关的通路,包括 MAPK 信号通路、PI3K 信号通路、Ras 信号通路、脂质和动脉硬化、炎症介质对 TRP 通道的调节等。

对 GO 和 KEGG 富集分析的前 20 个结果进行可视化,结果如图 9 和图 10 所示,其中气泡越大,富含的基因越多, P 调整值越小,气泡的颜色越红。具体的富集靶点数和 P 调整值见表 5 和表 6。

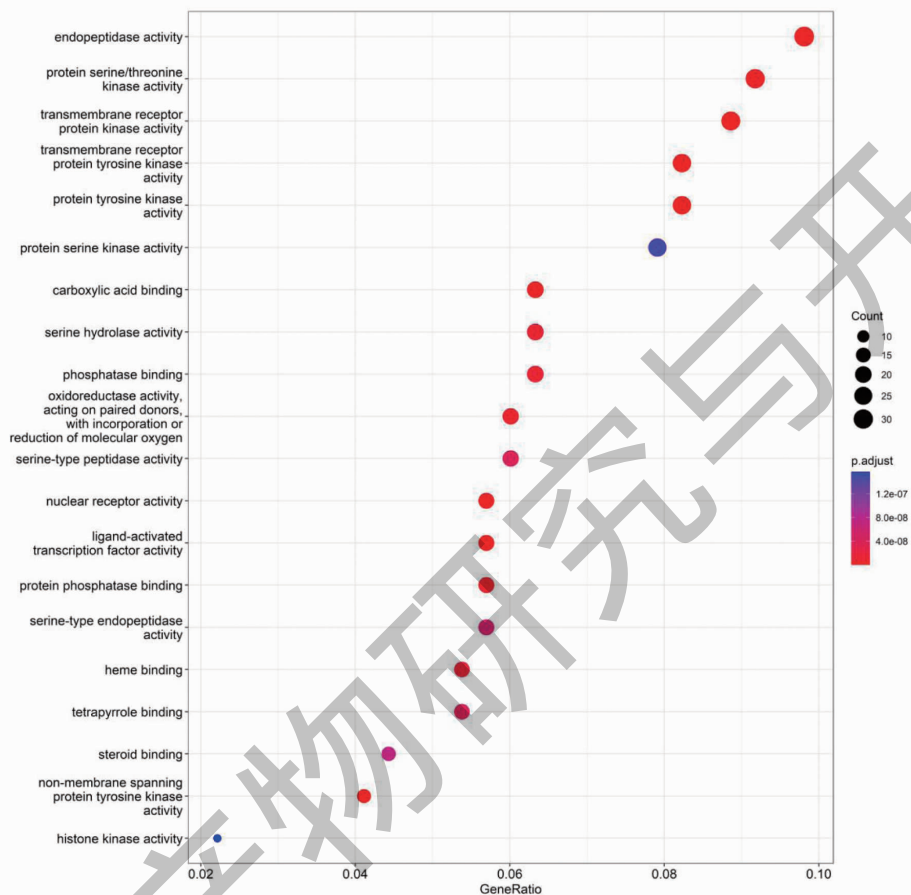


图 9 GO 功能富集分析

Fig. 9 GO functional enrichment analysis

3 讨论与结论

动物实验表明,CPS 的止咳作用与阳性药(磷酸可待因)相当。中剂量的 CPS(10 mL/kg)可略降低(但无统计学意义)IL-10 和 IL-17A 的释放;部分高剂量的 CPS(15 mL/kg)可显著升高 IL-10 和 IL-17A 释放,但是存在较大个体差异,提示我们 CPS 的用药量不能过高。炎症因子 IL-10 和 IL-17A 释放的变化,可能是 CPS 药理作用的下游或者作用通路的外围表现。所以,CPS 不是通过抑制促炎因子 IL-10 和 IL-17A 的释放发挥止咳作用,具体作用机制还有待进一步研究。据此,本研究提示 CPS 作为中药复方制剂,在咳嗽感受、咳嗽信号传导、中枢镇咳等咳嗽的全过程均有一定的作用,表明其具有多靶点协

同作用的特点,但其止咳作用机制还有待进一步的研究。

UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS 和 HS-SPME-GC-MS 分析共鉴定出了 33 个成分,包括川贝母的西贝素、浙贝乙素、贝母素甲;桔梗的桔梗皂苷 D、桔梗酸 A;枇杷叶的山柰酚、黄芪苷和薄荷醇等活性成分。基于数据库的筛选,获得成分和疾病相关靶点,取二者交集得到 318 个交集基因,网络拓扑分析后选取 degree 值高于中位数的 152 个基因作为核心靶点,在此基础上绘制核心靶点 PPI 图和“咳嗽-药物-成分-核心靶点”网络图。其中刺槐素、山柰酚、桔梗皂苷 A、桔梗皂苷 D、桔梗酸 A、西贝母碱苷等成分的在“咳嗽-药物-成分-核心靶点”网络图中的 degree

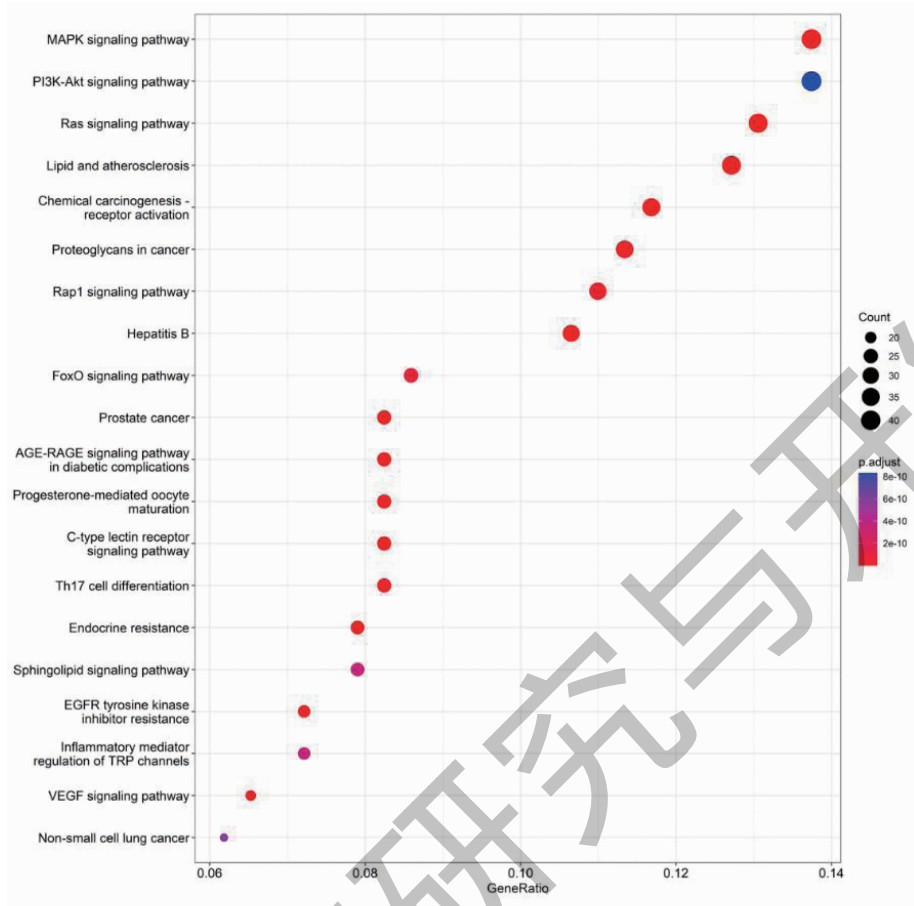


图 10 KEGG 通路富集分析

Fig.10 KEGG pathway enrichment analysis

表 5 GO 功能富集结果前 20 位

Table 5 Top 20 GO functional enrichment results

编号 No.	分子功能 Molecular function	Log P	富集靶点数 Number of enriched targets
1	内肽酶活性 Endopeptidase activity	-8.72	31
2	蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性 Protein serine/threonine kinase activity	-8.59	29
3	跨膜受体蛋白激酶活性 Transmembrane receptor protein kinase activity	-18.18	28
4	跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性 Transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity	-17.81	26
5	蛋白酪氨酸激酶 Protein tyrosine kinase activity	-16.90	26
6	蛋白丝氨酸激酶活性 Protein serine kinase activity	-6.83	25
7	羧酸结合 Carboxylic acid binding	-8.59	20
8	丝氨酸水解酶活性 Serine hydrolase activity	-7.95	20
9	磷酸酶结合 Phosphatase binding	-7.95	20

续表 5 (Continued Tab. 5)

编号 No.	分子功能 Molecular function	Log P	富集靶点数 Number of enriched targets
10	氧化还原酶活性, 作用于成对供体, 结合或还原分子氧 Oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	-8.10	19
11	丝氨酸型肽酶活性 Serine-type peptidase activity	-7.39	19
12	核受体活性 Nuclear receptor activity	-16.39	18
13	配体激活的转录因子活性 Ligand-activated transcription factor activity	-16.39	18
14	蛋白磷酸酶结合 Protein phosphatase binding	-8.10	18
15	丝氨酸内肽酶活性 Serine-type endopeptidase activity	-7.25	18
16	血红素结合 Heme binding	-7.84	17
17	四吡咯结合 Tetrapyrrole binding	-7.39	17
18	类固醇结合 Steroid binding	-7.14	14
19	非跨膜蛋白酪氨酸激酶活性 Non-membrane spanning protein tyrosine kinase activity	-10.30	13
20	组蛋白激酶活性 Histone kinase activity	-6.80	7

表 6 KEGG 通路富集结果前 20 位

Table 6 Top 20 KEGG pathway enrichment results

编号 No.	通路名称 Pathway name	Log P	富集靶点数 Number of enriched targets
1	MAPK 信号通路 MAPK signaling pathway	-11.40	40
2	PI3K-Akt 信号通路 PI3K-Akt signaling pathway	-9.08	40
3	Ras 信号通路 Ras signaling pathway	-12.72	38
4	脂质与动脉粥样硬化通路 Lipid and atherosclerosis	-12.75	37
5	化学致癌 - 受体激活通路 Chemical carcinogenesis-receptor activation	-11.49	34
6	癌症蛋白多糖 Proteoglycans in cancer	-11.30	33
7	Rap1 信号通路 Rap1 signaling pathway	-10.39	32
8	乙型肝炎 Hepatitis B	-12.11	31
9	FOXO 信号通路 FOXO signaling pathway	-10.15	25
10	前列腺癌 Prostate cancer	-11.74	24
11	高级糖基化终末产物-受体(AGE-RAGE)信号通路 AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	-11.52	24
12	孕酮介导的卵母细胞成熟通路 Progesterone-mediated oocyte maturation	-11.49	24

续表 6(Continued Tab. 6)

编号 No.	通路名称 Pathway name	Log P	富集靶点数 Number of enriched targets
13	C-型凝集素受体信号通路 C-type lectin receptor signaling pathway	-11.40	24
14	Th17 细胞分化 Th17 cell differentiation	-11.17	24
15	内分泌抵抗 Endocrine resistance	-11.18	23
16	鞘脂信号通路 Sphingolipid signaling pathway	-9.44	23
17	EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性 EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	-11.24	21
18	TRP 通道的炎症介质调节 Inflammatory mediator regulation of TRP channels	-9.44	21
19	VEGF 信号通路? VEGF signaling pathway	-11.49	19
20	非小细胞肺癌 Non-small cell lung cancer	-9.22	18

值较大,表明其在 CPS 的止咳作用中起较大作用,推测为 CPS 的有效成分。两图中 degree 值排名前 10 的靶点基因在调控网络起着关键作用,其中 HSP90AA1 基因可编码热休克蛋白 90 α (Hsp90 α),在人类 T 细胞中,HSP90AA1 的表达受细胞因子 IL-2、IL-4、IL-13 和 IL-4 的影响而增加。此外,Hsp90 α 水平在慢性阻塞性肺病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 患者中升高,在 COPD 中,Hsp90 α 表达的升高可能作为一种预后指标。SRC 可编码 Src 激酶蛋白,这是一种酪氨酸蛋白激酶,能调节细胞代谢、存活和增殖。Src 激酶可被多种途径激活,并与 PI3K 和 G 蛋白偶联受体 (G-protein-coupled receptors) 结合。其在巨噬细胞的功能激活中发挥多种作用,如吞噬作用、炎症细胞因子的产生、细胞迁移的诱导等。因此,调控 SRC、HSP90AA1 的表达可能是 CPS 干预咳嗽的潜在途径。

KEGG 通路富集分析表明,CPS 的止咳作用主要涉及 MAPK 信号通路、PI3K 信号通路、炎症介质对 TRP 通道的调节。PI3K 信号通路是一个能调控多种细胞功能的信号转导网络,研究表明,PI3K 信号级联能调控人的气道和肺动脉气道平滑肌 (VSM) 细胞增殖。同时 PI3K 是参与多种途径的关键靶蛋白,可激活 VEGF 信号通路、趋化因子信号通路,并参与哮喘的发生。丝裂原活化蛋白激酶 (MAPKs) 是细胞内激酶的成员,作为各种细胞外刺激的焦点,具有调节各种细胞过程的功能。p38 MAPK 信号级联参与各种生物反应,在炎症反应中

发挥重要作用,p38 MAPK 可以作为治疗炎症疾病一个潜在的目标。而 MAPK 的另一亚型 JNK 参与哮喘气道炎症和气道重塑的过程,诱导 Th2 细胞转化,参与嗜酸性粒细胞的凋亡。PI3K、p38 和 JNK 均够诱导炎症基因转录,进而介导 Th2 细胞反应和嗜酸性粒细胞的产生和激活。TRP 离子通道中一些表达在气道感觉神经末梢表达,当 TRP 通道蛋白被各种内源或外源物质刺激后,导致大量阳离子内流,细胞去极化,产生动作电位刺激感觉神经元,导致慢性咳嗽症状。综上所述,CPS 可能通过多成分多靶点的方式影响咳嗽的病理生理过程,而对 MAPK 信号通路、PI3K 信号通路、TRP 通道的调节可能是其发挥止咳作用的重要机制。

参考文献

- Brooks SM. Perspective on the human cough reflex [J]. Cough, 2011, 7: 10.
- Yang XC, Liu MW, Meng XL. Qingxuan Zhike Granule for children with exogenous wind-heat cough; summary of phase II clinical trial [C] // The ninth National Pediatric academic conference of Integrated Chinese and Western Medicine (中西医结合第九次全国儿科学术会议), 2000.
- Li LS. Observation on the curative effect of compound Folcodine oral liquid in treating bronchiolitis [J]. Guide Chin Med (中国医药指南), 2013, 11: 534-535.
- Yang XY. Clinical observation on the treatment of chronic cough with meridians diagnosis combined with acupoint embedding [J]. Chin Foreign Med Res (中外医学研究), 2018,

- 16;3-5.
- 5 Qiu J. Chuanbei loquat syrup, promethazine and ribavirin for the treatment of intractable cough [J]. *Mil Med J Southeast Chin* (东南国防医药), 2012, 14; 288.
- 6 Lu QF, Sui JJ, Wang SL. Prevention and therapy of PM_{2.5}-induced acute lung injury with two antitussive drugs in rats [J]. *Central South Pharmacy* (中南药学), 2020, 18; 199-204.
- 7 Dong LY. Evaluation research on the effective chemomics and mechanism action of Zhike Chuanbeipipa dropping pills [D]. Tianjin; Tianjin University (天津大学), 2012.
- 8 Zheng HF, Xu ZW, Chen JM, et al. Antitussive effect and mechanism of allicin on experimental cough induced by ammonia in mice [J]. *J Sun Yat-sen Univ: Med Sci* (中山大学学报: 医学科学版), 2015, 36; 821-826.
- 9 Wang JK, Yang BK, Zhang H, et al. Study on antitussive effect of loquat flower extract [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2009, 40; 1106-1109.
- 10 Zheng CL. Effect of Shufeng Xuanfei decoction on IL-33, IL-10, airway inflammation and airway remodeling in cough variant asthma model rats [D]. Guilin; Guilin Medical University (桂林医学院), 2022.
- 11 Kang L. Effect of Shufeng Xuanfei decoction on IL-5, IL-6, IL-17 and lung tissue pathology in rats with cough variant asthma and its clinical significance [D]. Guilin; Guilin Medical University (桂林医学院), 2021.
- 12 Chen B, Long P, Sun Y, et al. The chemical profiling of loquat leaf extract by HPLC-DAD-ESI-MS and its effects on hyperlipidemia and hyperglycemia in rats induced by a high-fat and fructose diet [J]. *Food Funct*, 2017, 8; 687-694.
- 13 Mamun MA, Gonzalez TV, Islam A, et al. Analysis of potential anti-aging beverage Pru, a traditional Cuban refreshment, by desorption electrospray ionization-mass spectrometry and FTICR tandem mass spectrometry [J]. *J Food Drug Anal*, 2019, 27; 833-840.
- 14 Deng Y, Ye X, Chen Y, et al. Chemical characteristics of *Platycodon grandiflorum* and its mechanism in lung cancer treatment [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11; 609825.
- 15 Chang Y, Zhang D, Yang G, et al. Screening of anti-lipase components of *Artemisia argyi* leaves based on spectrum-effect relationships and HPLC-MS/MS [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12; 675396.
- 16 Mohammad A, Yili A, Aisa HA. Rapid quantification and quantitation of alkaloids in Xinjiang *Fritillaria* by ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Molecules*, 2017, 22; 719.
- 17 Fernández-Fernández AM, Dellacassa E, Nardin T, et al. In vitro bioaccessibility of bioactive compounds from citrus pomaces and orange pomace biscuits [J]. *Molecules*, 2021, 26; 3480.
- 18 Silinsin M, Bursal E. UHPLC-MS/MS phenolic profiling and in vitro antioxidant activities of *Inula graveolens* (L.) Desf. [J]. *Nat Prod Res*, 2018, 32; 1467-1471.
- 19 Jiang YL, Xu ZJ, Cao YF, et al. HPLC fingerprinting-based multivariate analysis of chemical components in *Tetragium Hemsleyanum* Diels et Gilg; correlation to their antioxidant and neuraminidase inhibition activities [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 205; 114314.
- 20 Fan Y, Zhao L, Huang X, et al. UPLC-MS/MS Method for the simultaneous quantification of eight compounds in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study after oral administration of veratrum (*Veratrum nigrum* L.) extract [J]. *Biomed Res Int*, 2020; 8883277.
- 21 Zhou JL, Xin GZ, Shi ZQ, et al. Characterization and identification of steroidal alkaloids in *Fritillaria* species using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217; 7109-7122.
- 22 Brito JAGd, Pinto LdS, Chaves CF, et al. Chemophenetic significance of *Anomalocalyx uleanus* metabolites are revealed by dereplication using molecular networking tools [J]. *Molecules*, 2021, 26; 925.
- 23 Zhao Y, Lu H, Wang Q, et al. Rapid qualitative profiling and quantitative analysis of phenolics in *Ribes meyeri* leaves and their antioxidant and antidiabetic activities by HPLC-QTOF-MS/MS and UHPLC-MS/MS [J]. *J Sep Sci*, 2021, 44; 1404-1420.
- 24 Geng Z, Liu Y, Gou Y, et al. Metabolomics study of cultivated *Bulbus Fritillariae Cirrhosae* at different growth stages using UHPLC-QTOF-MS coupled with multivariate data analysis [J]. *Phytochem Anal*, 2018, 29; 290-299.
- 25 Li JM, Xu W, Zhang X, et al. HPLC-MS/MS analysis of water-extracted components of loquat leaves and structural identification of terpenoids [J]. *Sci Tech Food Ind* (食品工业科技), 2022, 43; 295-303.
- 26 Ma XQ, Li SM, Chan CL, et al. Influence of sulfur fumigation on glycoside profile in *Platycodonis Radix* (Jiegeng) [J]. *Chin Med*, 2016, 11; 32.