

本文引用: 田 慧, 陈光宇, 瞿昊宇, 何 群, 谢梦洲. UPLC-Q-TOF-MS 结合网络药理学及实验验证探讨益气平喘豆乳粉药物成分及其干预 COPD 的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(11): 2092-2103.

## UPLC-Q-TOF-MS 结合网络药理学及实验验证探讨益气平喘豆乳粉药物成分及其干预 COPD 的作用机制

田 慧<sup>1,2,3</sup>, 陈光宇<sup>1,2,3</sup>, 瞿昊宇<sup>1,2,3</sup>, 何 群<sup>1,2,3</sup>, 谢梦洲<sup>1,2,3\*</sup>

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南省药食同源功能性食品工程技术研究中心, 湖南 长沙 410208;

3. 湖南中医药大学中医心肺病证辨证与药膳食疗重点实验室, 湖南 长沙 410208

**【摘要】目的** 运用 UPLC-Q-TOF-MS、网络药理学和实验验证探讨益气平喘豆乳粉干预慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)的作用机制。**方法** 采用 UPLC-Q-TOF-MS 解析益气平喘豆乳粉中药复方中的活性成分,在 SwissTargetPrediction 中筛选靶点;在 GeneCards 中收集 COPD 靶点,运用 Venny 2.1.0 平台,对活性成分靶点与 COPD 靶点取交集获得潜在靶点;将潜在靶点导入 STRING 和 DAVID 中进行蛋白质相互作用网络分析(protein-protein interaction, PPI)、GO 和 KEGG 分析。将 36 只小鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、高剂量组(12.0 mL/kg)、中剂量组(6.0 mL/kg)、低剂量组(3.0 mL/kg)、地塞米松组(1.0 mg/kg),每组 6 只。1 天 1 次,连续给药 30 d。除正常组外,其余小鼠采用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)联合香烟烟雾诱导法建立 COPD 小鼠模型。造模成功后,每周测量 1 次小鼠体质量,末次给药后,HE 染色观察肺组织及脂肪组织形态变化;ELISA 检测血清及支气管肺泡(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)灌洗液中炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平;RT-PCR 检测肺组织中 TNF- $\alpha$ 、ICAM-1、SELE mRNA 水平。**结果** UPLC-Q-TOF-MS 分析得到 143 个活性成分,297 个潜在交集靶点。PPI、GO 和 KEGG 分析发现,益气平喘豆乳粉可能通过作用于 TNF、AKT1、IL-6 等靶点,调节 TNF、PI3K-Akt、癌症等信号通路以干预 COPD 病理机制。动物实验结果显示,与正常组相比,模型组小鼠肺组织可见大量炎性细胞浸润,脂肪组织中空泡脂滴增多,体质量明显降低( $P<0.01$ ),血清中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 含量升高( $P<0.01$ )。与模型组相比,各用药组肺组织炎症细胞浸润程度减轻,脂肪细胞分布增多排列紧密,中剂量组小鼠体质量降低最少( $P<0.05$ ),高剂量组小鼠血清中 TNF- $\alpha$  含量显著降低( $P<0.05$ ),各用药组肺组织中 ICAM-1 mRNA 的相对表达量显著降低( $P<0.01$ )。**结论** 益气平喘豆乳粉可能通过干预 TNF、PI3K-Akt 通路,抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的释放,发挥抗炎、改善营养不良等作用。

**【关键词】** UPLC-Q-TOF-MS; 网络药理学; 益气平喘豆乳粉; COPD 小鼠模型; 营养不良; 药食同源

**【中图分类号】**R285.5

**【文献标志码】**A

**【文章编号】**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.11.023

## Pharmacological ingredients of Yiqi Pingchuan Soybean Milk Powder and its intervention mechanism on COPD based on UPLC-Q-TOF-MS combined with network pharmacology and experimental validation

TIAN Hui<sup>1,2,3</sup>, CHEN Guangyu<sup>1,2,3</sup>, QU Haoyu<sup>1,2,3</sup>, HE Qun<sup>1,2,3</sup>, XIE Mengzhou<sup>1,2,3\*</sup>

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Engineering Research Center of

**【收稿日期】**2023-04-17

**【基金项目】**2021 年湖南省研究生科研创新项目(CX20210706)。

**【第一作者】**田 慧,女,硕士研究生,研究方向:中医药膳学。

**【通信作者】**\* 谢梦洲,女,教授,博士研究生导师,E-mail:xiemz64@163.com。

*Medicine-Food Homologous Functional Food, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Key Laboratory of TCM Heart and Lung Pattern Differentiation, Medicated Diet & Dietotherapy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China*

**[Abstract] Objective** To explore the intervention mechanism of Yiqi Pingchuan Soybean Milk Powder (YQPCSMP) on chronic obstructive pulmonary disease (COPD) based on UPLC-Q-TOF-MS, network pharmacology, and experimental validation. **Methods** UPLC-Q-TOF-MS was used to analyze the active ingredients in TCM formula of YQPCSMP and screen the targets in SwissTargetPrediction. Venny 2.1.0 platform was used to intersect active ingredient targets and COPD targets collected in GeneCards to obtain potential targets, which were introduced into STRING and DAVID for Protein-Protein Interaction Networks (PPI), Gene Ontology (GO), and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analyses. A total of 36 mice were assigned into normal, model, high-dose (12.0 mL/kg), medium-dose (6.0 mL/kg), low-dose (3.0 mL/kg), and dexamethasone groups (1.0 mg/kg) by random number table method, with 6 mice in each group. The drug was administered once a day for 30 days. Except for the normal group, the other mice were applied with the "Lipopolysaccharide (LPS) and cigarette smoke induction method" to establish a COPD mouse model. The body mass of mice was measured once a week after successful modeling. The morphological changes of lung and adipose tissues were observed by HE staining after the last dose. Combined with the network pharmacology results obtained from previous studies, inflammatory factors of TNF- $\alpha$  and IL-6 in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were checked by ELISA, and the mRNA levels of TNF- $\alpha$ , ICAM-1, and SELE in lung tissue were tested by RT-PCR. **Results** A total of 143 active ingredients and 297 potential intersection targets were obtained by UPLC-Q-TOF-MS. PPI, GO, and KEGG analyses indicated that YQPCSMP might intervene in the pathological mechanism of COPD by acting on targets such as TNF, AKT1, and IL6 and regulating signal pathways such as TNF, PI3K-Akt, and cancer. The results of animal experiments showed that compared with the normal group, the mice in the model group showed a large number of inflammatory cells infiltration in the lung tissue, an increase in hollow vesicle lipid droplets in adipose tissue, a significant decrease in body mass ( $P<0.01$ ), and an increase of TNF- $\alpha$  and IL-6 content ( $P<0.01$ ) in serum. Compared with model group, each treatment group showed a reduction in the infiltration degree of inflammatory cells in the lung tissue as well as a rising distribution and tight arrangement of adipocytes. The body mass of the medium-dose group decreased the least ( $P<0.05$ ), while the content of TNF- $\alpha$  in serum of the high-dose group mice significantly was lower ( $P<0.05$ ). The relative expression of ICAM-1 mRNA in lung tissues of all treatment groups was significantly lower ( $P<0.01$ ). **Conclusion** YQPCSMP might inhibit the release of TNF- $\alpha$  and IL-6 by intervening TNF and PI3K-Akt pathways, and thus exert anti-inflammatory and malnutrition-improving effects.

**[Keywords]** UPLC-Q-TOF-MS; network pharmacology; Yiqi Pingchuan Soybean Milk Powder; COPD mouse model; malnutrition; homology of medicine and food

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是由炎症和气道重塑引起的持续气流阻塞,病程长,预后差。除呼吸系统症状外,COPD还会继发性造成全身性损害,包括营养不良、骨骼肌病变、骨质疏松、心血管疾病、全身炎症反应等<sup>[1]</sup>。世界卫生组织公布 COPD 是第四大死亡原因,并估计到 2030 年将上升到第三位<sup>[2]</sup>。COPD 属于中医学“肺胀”“喘证”等范畴,中医治疗常用中药汤剂、中成药、针灸等方法。近年来药食同源产品在相关政策的支持下,在市场上得到了大力推广。相较于传统汤剂口感差、难以坚持长期服用、患者依从性低、难以兼顾患者的营养补充等方面的不足,药食同源功能性食品主要采用药食两用的中药,在中医学、营养学、药剂学等多学科理论的指导下,与谷物、果蔬等食材一

同经过工艺优化制作而成,既具有防病保健的作用,又符合食品色香味俱全的属性。

针对 COPD 长期病程中出现的营养不良所提出的营养支持疗法是近些年研究的热点<sup>[3]</sup>。益气平喘豆乳粉是由湖南省药食同源功能性食品工程中心研发的一款针对 COPD 的药食同源功能性食品,中药部分基于补益脾肺、化痰平喘的治法组方,辅料为豆乳粉和鸭肉蛋白肽粉。本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS 结合网络药理学探讨益气平喘豆乳粉的中药部分干预 COPD 的潜在药效机制,并建立 COPD 小鼠模型,采用 ELISA、RT-PCR 等技术验证益气平喘豆乳粉干预 COPD 的靶点及作用机制,旨在阐明益气平喘豆乳粉可有效辅助改善 COPD 的临床病情,为功能性食品的工业化生产和应用提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

超高效液相色谱仪-四级杆-飞行时间质谱仪(美国 ABSCIEXDISTRIBUTION 公司);自制烟熏箱(80 cm×70 cm×60 cm);Galileo 38355 切片仪(意大利 DIAPATH 公司);BIOBASE BT-1/B 摊片机(山东博科医疗器械有限公司);iMaik 酶标仪(伯乐生命科学产品上海有限公司);Light Cycler 480 实时荧光定量 PCR 系统(上海罗氏诊断产品有限公司);N-3010 10L 旋转蒸发器(日本东京理化);SCIENTZ-10N 冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司);ZWL-PAI-10 超纯水机(湖南中沃水务环保科技);HTP-312 型 300g-0.01g-电子天平(上海花潮电器);TGL18W 高速冷冻离心机(长沙英泰仪器有限公司)。

### 1.2 主要试剂与药物

益气平喘豆乳粉由湖南省药食同源工程中心提供(含药量为 1.25 g/mL);红塔山香烟(焦油量:11 mg/支;烟气烟碱量:1.1 mg/支;烟气 CO 量:11 mg/支)由红塔烟草有限责任公司提供;脂多糖、DEPC 水由广州硕谱生物科技有限公司提供;醋酸地塞米松(批号:LB2185)由浙江仙据制药股份有限公司提供;反转录试剂盒(批号:05238502)由苏州近岸蛋白质科技股份有限公司提供;超纯总 RNA 提取试剂盒(批号:20220613)由杭州新景生物试剂开发有限公司提供;小鼠 IL-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )ELISA 试剂盒(批号 202211、202210)北京普利莱基因技术有限公司提供;PCR 引物设计由上海生工生物公司提供。

### 1.3 动物

36 只 8 周龄 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠,体质量 18~22 g,由湖南中医药大学实验动物中心订购。动物实验许可证号:SCXK(湘)2019-0004,质量合格证号:430727221101566954,于湖南中医药大学实验动物中心 SPF 级动物鼠房、室温(22±2)℃、相对湿度 65%~75%环境下适应性饲养 3 d 后开始进行实验。实验期间自由饮水、摄食,饲料为普通饲料。本实验经湖南中医药大学实验动物伦理委员会审查通过(伦理审批编号:LLBH-202207070001)。

## 2 方法

### 2.1 UPLC-Q-TOF-MS 分析检测药物化学成分

#### 2.1.1 UPLC-Q-TOF-MS 分析条件 色谱条件:以

十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(ACQUITY UPLC@BEH C<sub>18</sub> 型色谱柱,1.7  $\mu$ m,2.1 mm×100 mm);以甲醇为流动相 A,以 0.1%甲酸水溶液为流动相 B;柱温 35℃;流速 0.3 mL/min;梯度洗脱:0~10 min,10% A;10~40 min,10%→100% A;40~45 min,100% A;45~47.5 min,100%→10% A;47.5~60 min,10% A。

质谱条件:采用电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI),正、负离子模式;质量扫描范围 100~1000 m/z;喷雾电压 5500 V、-4500 V;雾化气温度 550℃;气帘气 35 psi;辅助气、雾化气 50 psi;碰撞能量|CE|=35±15 eV。TOF/MS 一级预扫描、TOF/MS/MS 二级扫描离子累积时间分别为 100 ms、1150 ms,触发二级扫描的方法为信息依赖扫描,条件为多重质量亏损、动态背景扣除,满足者优先进行。

2.1.2 供试品溶液制备 空白对照液取质谱级甲醇溶液,离心(12 000 r/min,10 min)即得;将各药材经本课题组前期优化完成的提取工艺进行有效成分提取,提取液经减压浓缩、过滤离心后冷冻干燥为干浸膏粉。精密称取中药复方干浸膏粉 0.1 g 置于 10 mL 离心管中,加水至 10 mL 刻度,超声(250 Hz,200 W)60 min,取上清液置于 2 mL 离心管中,离心(12 000 r/min)10 min,取上清液置于 1.5 mL 进样小瓶中,即得。

2.1.3 质谱分析 精密吸取上述空白对照液、中药复方供试液各 10  $\mu$ L,注入液质联用仪,分析各供试液成分。供试品溶液总离子流色谱图见图 1。

### 2.2 网络药理学分析

2.2.1 药物化学成分靶点与 COPD 疾病相关靶点的筛选<sup>[4]</sup> 采用 UPLC-Q-TOF-MS 分析益气平喘豆乳粉中药复方成分,将化学成分名输入 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行规范,并下载各成分 sdf 文件,通过 SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)搜索各成分作用靶点。以“COPD”为关键词在 GeneCards 数据库([www.genecards.org/](http://www.genecards.org/))中检索 COPD 相关靶点,把成分作用靶点和 COPD 相关靶点输入 Venny 2.1 软件取交集作用靶点作为益气平喘豆乳粉中药复方干预 COPD 的潜在靶点。

2.2.2 PPI 网络构建与 GO、KEGG 分析 为研究靶点之间的相互作用,将筛选出的潜在靶点导入 STRING 平台(<https://string-db.org/>),设置蛋白种类为“Homo sapiens”,结果保存为“.tsv”格式并导入 Cytoscape 3.7.2 软件,运用其中的插件“Network An-

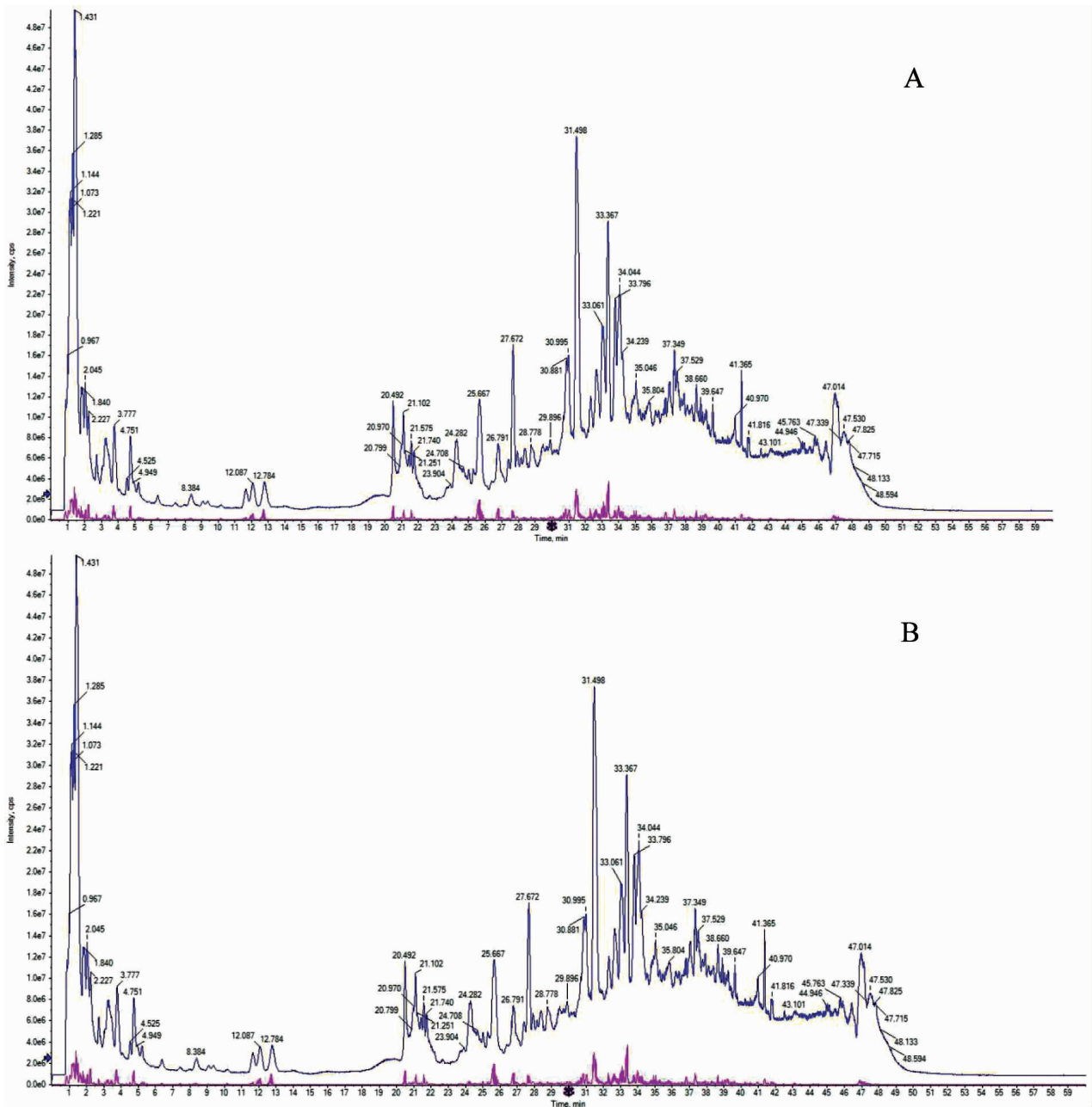


图1 总离子流色谱图

注:A.负离子模式;B.正离子模式。

alyzer”分析拓扑参数<sup>[5]</sup>,以节点度值(Degree)为标准筛选出关键靶点。按度值从大到小排序,确定益气平喘豆乳粉干预 COPD 的核心靶点。将关键靶点导入 DAVID 6.8 数据库进行 GO 和 KEGG 通路富集分析,探索益气平喘豆乳粉干预 COPD 的潜在作用机制。

### 2.3 动物实验验证

2.3.1 造模、分组及给药 将 36 只小鼠随机分为正常组、模型组、地塞米松组、高剂量组、中剂量组、低剂量组,每组 6 只。除正常组外,其余 5 组进行造模。本实验参照文献<sup>[6]</sup>采用鼻滴脂多糖联合香烟烟雾建立 COPD 模型:制作尺寸为 80 cm×70 cm×60 cm

的自制熏烟箱,烟箱设有进气孔和抽气孔,分别位于烟箱两上方侧壁,直径均为 10 cm。造模时,将点燃的 8 根香烟放入烟箱中,将模型小鼠放入烟箱,持续暴露于烟雾中,15 min 中重新点燃 8 支香烟放入烟箱,约 15 min 后待烟雾散尽,休息 30 min,重复上述操作。造模第 1 天和第 15 天将模型小鼠经鼻滴入脂多糖(50 μL/只,1 mg/mL),正常组小鼠滴入无菌生理盐水,当日不再进行熏烟操作,造模操作持续 60 d。造模第 31 天开始每天上午给药,下午造模,共给药 30 d,具体给药量见表 1。

2.3.2 动物取材及样本处理<sup>[7]</sup> 末次给药后禁食 12 h 不禁水。各组小鼠眼眶取血,室温静置 2 h 待血液分

表 1 动物实验分组及灌胃量(n=6)

组别	灌胃药物	剂量
正常组	生理盐水	6.0 mL/(kg·d)
模型组	生理盐水	6.0 mL/(kg·d)
高剂量组	益气平喘豆乳粉	12.0 mL/(kg·d)
中剂量组	益气平喘豆乳粉	6.0 mL/(kg·d)
低剂量组	益气平喘豆乳粉	3.0 mL/(kg·d)
地塞米松组	地塞米松	1 mg/(kg·d)

层后,4 ℃、2 000 r/min 离心 10 min,离心半径 8 cm,吸取上层血清于离心管中,-80 ℃冰箱保存。对颈部皮肤消毒脱毛后行纵切口,暴露小鼠气管,将无菌留置针插入气管,无菌缝合线打结固定,由注射器向内注入 1 mL 生理盐水,缓慢回抽 BALF,重复 3 次(1 mL 生理盐水约回收 0.6 mL 灌洗液)后注入无菌 EP 管于冰上保存,取材完成后 1 500 r/min 离心 15 min,取上清于-80 ℃冰箱保存待测。收集完 BALF 后,打开胸腔剪下肺组织,于生理盐水中浸洗后,左肺组织放入无菌 EP 管中于-80 ℃冰箱中保存;右肺组织放入多聚甲醛固定液中室温保存待用。肺组织剥离完成后取小鼠腹股沟白色脂肪及背脊部棕色脂肪于组织固定液待测。

**2.3.3 肺组织、脂肪组织病理学观察** 将固定好的右肺组织和脂肪组织脱水后进行浸蜡包埋,将包埋好的蜡块固定于切片机上切成薄片后烘干。用二甲苯脱去切片中的石蜡,对切片脱蜡后进行染色、脱水、透明、封片。将切片做好标记后镜下观察。

**2.3.4 ELISA 检测小鼠血清及 BALF 中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平** 严格按试剂盒操作检测血清及 BALF 上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平。

**2.3.5 RT-PCR 检测小鼠肺组织中 TNF- $\alpha$ 、ICAM-1、SELE mRNA 相对表达水平** 按试剂盒说明书从小鼠肺组织中提取总 RNA,参照反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA,进行 PCR 反应,以 GAPDH 为内参,引物序列见表 2。RT-PCR 结果分析采用 QuantStudio™ Design&Analysis Software 3.0 软件自动生成扩增曲线,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算 mRNA 的相对表达水平。

## 2.4 统计学分析

采用 SPSS 25.0 统计学软件分析实验数据,以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示各组数据实验结果。采用单因素方差分析进行组间比较, $P<0.05$  表示差异有统计学意义,统计图采用 GraphPad Prism 8.0.1 绘制。

表 2 引物序列表

基因	序列	引物长度/bp
TNF- $\alpha$	正向:5'-CCCTCAGACTCAGATCATCTTCT-3'	61
	反向:5'-GCTACGACGTGGGCTACAG-3'	
ICAM-1	正向:5'-GTGATGCTCAGGTATCCATCCA-3'	213
	反向:5'-CACAGTTCTCAAAGCACAGCG-3'	
SELE	正向:5'-ATGCCTCGCGCTTTCTCTC-3'	128
	反向:5'-GTAGTCCCGCTGACAGTATGC-3'	

## 3 结果

### 3.1 益气平喘豆乳粉中药复方成分识别

益气平喘豆乳粉中药复方供试液在拟定的分析条件下共鉴定出 143 个化学成分,成分鉴定结果见表 3。

### 3.2 益气平喘豆乳粉成分靶点与疾病靶点分析

根据 SwissTargetPrediction 数据库获得活性成分作用靶点 720 个,通过 GeneCards 数据库获取 COPD 作用靶点共 2 062 个,将成分作用靶点与 COPD 相关靶点导入 Venny2.1.0 软件,获得交集作用靶点 297 个,见图 2。

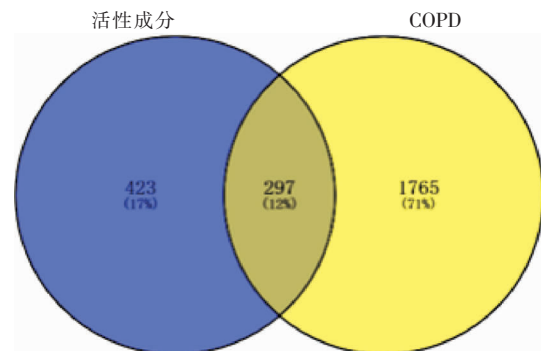


图 2 活性成分靶点与 COPD 疾病靶点维恩图

### 3.3 PPI 网络构建与分析

将筛选出的 297 个共有靶点导入 STRING 数据库,利用 Cytoscape 3.7.2 软件设置节点的大小、颜色随度值大小变化,构建 PPI 网络图,根据靶点的度值从大到小进行排序,前 3 个靶点分别是:TNF、AKT1、IL-6。详见图 3。

### 3.4 GO 与 KEGG 分析

利用 DAVID 平台进行 GO 富集分析和 KEGG 富集分析。依据  $P<0.001$  筛选出 GO 条目 1288 条,其中生物学过程(biological process, BP)共涉及 933 个,主要为凋亡负调控、蛋白质磷酸化、炎症反应、基因表达的正向调控等;得到细胞组成(cell composition, CC)108 个,主要为质膜、细胞外的外来体、

表3 益气平喘豆乳粉中药复方中的活性成分

编号	保留时间/min	相对分子质量	化合物	峰面积百分比/%	来源
1	4.75	712.10	水苏糖	1.51	负离子
2	5.24	169.99	没食子酸	1.87	负离子
3	5.76	347.00	腺苷酸	0.16	负、正离子
4	5.98	323.97	尿苷 5-单磷酸	0.24	负离子
5	7.09	666.10	耐斯糖	0.02	负离子
6	7.20	612.24	L-氧化型谷胱甘肽	0.05	正离子
7	7.62	176.13	5-羟基色胺	0.29	正离子
8	8.55	328.99	腺苷环磷酸酯	0.67	负、正离子
9	9.09	135.02	腺嘌呤	0.12	负离子
10	9.09	267.04	腺苷	0.11	负、正离子
11	9.35	165.04	苯丙氨酸	0.37	负、正离子
12	9.40	362.99	鸟苷酸	0.37	负离子
13	9.66	168.04	格列风内酯	0.04	正离子
14	9.81	251.14	虫草素	0.15	正离子
15	9.95	136.13	香叶醇	0.06	正离子
16	10.58	138.00	水杨酸	0.03	负离子
17	11.47	126.06	5-羟甲基糠醛	0.22	正离子
18	11.60	268.03	次黄苷	0.04	负离子
19	11.64	208.13	$\alpha$ -细辛脑	0.04	正离子
20	11.68	283.04	鸟苷	1.34	负、正离子
21	11.69	151.02	鸟嘌呤	0.11	负、正离子
22	12.78	874.13	麦芽五糖	0.56	负、正离子
23	12.93	138.00	对羟基苯甲酸	0.08	负离子
24	20.72	578.10	商陆皂苷元	0.09	负离子
25	21.13	219.07	D-泛酸	0.19	负、正离子
26	21.30	111.07	胞嘧啶	0.03	正离子
27	21.42	275.21	啞啞菌胺	0.07	正离子
28	21.43	138.00	原儿茶醛	0.07	负离子
29	21.43	168.01	香草酸	0.23	负离子
30	21.60	633.97	柯里拉京	1.05	负离子
31	21.75	204.05	L-色氨酸	2.02	负、正离子
32	22.08	354.03	新绿原酸	0.16	负离子
33	22.09	136.08	茴香醛	0.06	正离子
34	22.18	516.06	1,5-二咖啡酰奎宁酸	0.03	负离子
35	22.79	608.33	利血平	0.07	正离子
36	22.89	473.24	5-甲酰四氢叶酸	0.15	正离子
37	22.93	578.23	原花青素 B4	0.06	正离子
38	22.95	578.04	原花青素 B2	0.07	负离子
39	23.27	622.35	苯甲酰氧化芍药苷	0.03	正离子
40	24.29	166.03	对羟基苯丙酸	7.41	负离子
41	24.54	176.03	2-异苹果酸	0.33	负离子
42	24.62	290.02	儿茶素	0.36	负、正离子
43	25.17	626.00	白麻苷	0.06	负离子
44	25.57	354.03	绿原酸	0.55	负、正离子
45	26.71	122.01	苯甲酸	0.14	负离子
46	26.92	354.03	隐绿原酸	0.21	负离子
47	27.44	454.18	哈西奈德	0.23	正离子
48	27.67	180.01	咖啡酸	1.52	负离子
49	27.70	186.06	异补骨脂素	0.12	正离子
50	27.94	388.07	D-蔗糖	0.06	负离子

续表 3

编号	保留时间/min	相对分子质量	化合物	峰面积百分比/%	来源
51	28.13	290.02	(-)-儿茶素水合物	0.15	负离子
52	28.16	290.13	表儿茶	0.07	正离子
53	28.40	175.09	吡啶乙酸	0.10	正离子
54	29.17	376.20	维生素 B2	0.06	正离子
55	29.91	440.05	银杏内酯 C	0.39	负离子
56	29.97	164.01	对香豆酸	0.15	负离子
57	30.15	463.98	金丝桃苷	0.14	负、正离子
58	30.18	185.25	丁脞酰胺	0.64	正离子
59	30.40	222.09	8-羟基-6,7-二甲氧基香豆素	0.19	正离子
60	30.57	564.23	夏佛塔苷	0.39	正离子
61	30.58	564.05	异夏佛塔苷	0.53	负离子
62	30.71	434.14	京尼平苷	0.19	负离子
63	30.87	160.08	6-甲基香豆素	0.26	正离子
64	30.89	550.07	芹糖异甘草苷	1.99	负离子
65	30.90	194.02	异阿魏酸	1.63	负、正离子
66	31.02	492.04	毛蕊异黄酮苷	2.34	负、正离子
67	31.08	468.17	鸡屎藤苷	0.26	正离子
68	31.08	446.19	黄豆黄苷	4.50	正离子
69	31.44	418.05	甘草苷	11.67	负、正离子
70	31.53	550.07	甘草苷元-7-O-D-芹糖-4'-O-D-葡萄糖	11.82	负离子
71	31.70	284.17	黄豆黄素	1.51	正离子
72	31.82	416.04	大豆苷	0.08	负、正离子
73	32.25	568.14	桑皮苷 A	0.23	负离子
74	32.32	433.97	扁蓄苷	2.74	负离子
75	32.42	302.05	槲皮素	0.19	正离子
76	32.44	408.20	银杏内酯 A	0.12	正离子
77	32.48	188.08	丁烯基苯酚	0.28	正离子
78	32.53	580.08	芸香柚皮苷	0.37	负、正离子
79	32.66	424.06	银杏内酯 B	1.61	负、正离子
80	32.67	462.19	红车轴草素-7-O-D-葡萄糖苷	0.15	正离子
81	33.02	610.08	新橙皮苷	2.36	负离子
82	33.15	301.95	鞣花酸	8.14	负离子
83	33.17	610.28	橙皮苷	1.49	正离子
84	33.26	426.22	梔子苷	0.34	正离子
85	33.51	206.13	洋川芎内酯 H	5.74	正离子
86	33.53	224.14	洋川芎内酯 I	0.64	正离子
87	33.79	550.07	芹糖甘草苷	1.58	负、正离子
88	33.98	268.02	芒柄花黄素	1.24	负、正离子
89	33.98	476.05	芒柄花苷	2.94	负、正离子
90	34.06	418.05	异甘草苷	2.07	负、正离子
91	34.09	442.10	党参炔苷	2.43	负离子
92	34.14	300.15	(6 $\alpha$ R, 11 $\alpha$ R)-3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀烷	0.99	正离子
93	34.27	256.02	异甘草素	6.73	负、正离子
94	34.75	286.16	山柰酚	0.13	正离子
95	34.83	464.09	黄芪异黄酮苷	0.21	负离子
96	34.86	300.01	羟基芫花素	0.13	负离子
97	35.01	302.16	异微凸剑叶莎醇	0.21	正离子
98	35.07	284.01	毛蕊异黄酮	3.45	负、正离子
99	35.12	594.28	山柰酚-3-O-芸香糖苷	0.10	正离子
100	35.46	272.02	柚皮素	0.62	负、正离子

续表 3

编号	保留时间/min	相对分子质量	化合物	峰面积百分比/%	来源
101	35.93	270.10	芹菜素	0.12	正离子
102	36.68	514.35	Schizandriside	0.17	正离子
103	36.82	268.02	芒柄花素	2.53	负、正离子
104	36.88	286.13	龙血素 A	0.09	正离子
105	37.06	192.15	洋川芎内酯 A	0.42	正离子
106	37.56	194.16	新蛇床内酯	0.26	正离子
107	37.65	402.19	川陈皮素	1.42	正离子
108	37.67	322.06	光甘草素	0.11	负离子
109	37.93	295.26	甲苯咪唑	0.07	正离子
110	37.96	190.13	藜本内酯	8.24	正离子
111	38.12	230.17	去氢木香内酯	0.16	正离子
112	38.14	376.15	苯甲酸雌二醇	0.17	正离子
113	38.32	372.18	桔红素	0.43	正离子
114	38.36	794.27	竹节参皂苷 IV <sub>a</sub>	0.13	负离子
115	38.60	324.08	光甘草定	0.33	负、正离子
116	38.62	232.19	异土木香内酯	0.09	正离子
117	38.88	334.26	马钱子碱	1.42	正离子
118	38.90	830.32	黄芪甲苷	0.13	负离子
119	38.93	872.33	黄芪皂苷 II	0.26	负离子
120	39.10	380.26	洋川芎内酯 O	0.36	正离子
121	39.12	454.41	灵芝酸 Y	0.12	正离子
122	39.24	778.28	长春瑞滨	0.24	负离子
123	39.32	446.24	Smyrindioside	0.13	正离子
124	39.39	300.18	山柰素	2.11	正离子
125	39.39	148.04	肉桂酸	0.60	正离子
126	39.39	914.33	黄芪皂苷 I	0.25	负离子
127	39.52	316.25	异鼠李素	0.39	正离子
128	39.65	470.26	16 $\alpha$ -羟基松苓新酸	0.03	负离子
129	39.68	430.24	鲁斯可皂苷元	0.07	正离子
130	39.80	444.22	多西环素	0.11	正离子
131	39.85	956.34	人参皂苷 Ro	0.02	负离子
132	40.56	692.57	莫能菌素	0.14	正离子
133	40.90	298.11	烟曲霉文	0.22	负离子
134	40.92	456.28	齐墩果酸	0.03	负离子
135	40.93	266.11	接骨镰菌醇	1.72	负离子
136	41.16	300.25	磺胺噻恶啉	1.32	正离子
137	41.33	454.26	路路通酸	0.03	负离子
138	41.37	280.19	亚油酸	2.96	负离子
139	42.44	330.31	隐色孔雀石绿	0.83	正离子
140	43.14	346.19	银杏酸	0.70	负离子
141	43.20	958.70	大豆皂苷 Ba	0.04	正离子

等离子体膜等;得到分子功能(molecular function, MF)247个,主要为酶结合、蛋白激酶活性、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性等,部分条目(靶点数 $\geq 10$ ),详见图4A。KEGG富集通路显示共有172条信号通

路,利用微生信平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/login/>)对结果进行可视化,排名前20的KEGG通路气泡图见图4B。结果显示,益气平喘豆乳粉干预COPD主要涉及癌症通路、化学致癌作用-受体激



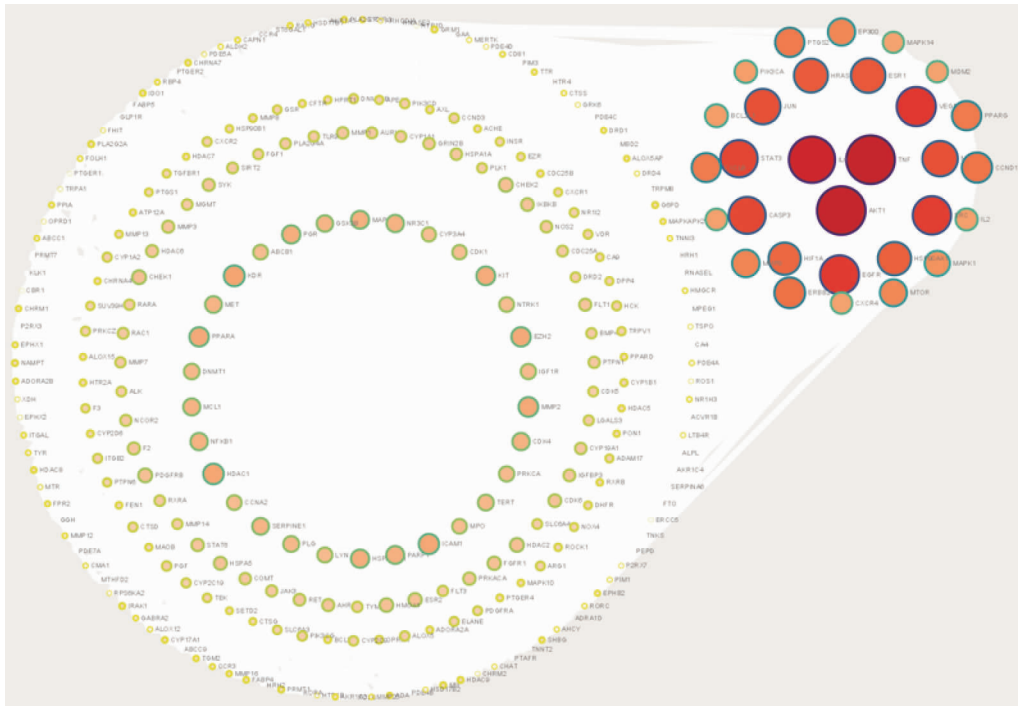


图 3 交集靶点 PPI 网络

注: 节点颜色越深代表度值越大。

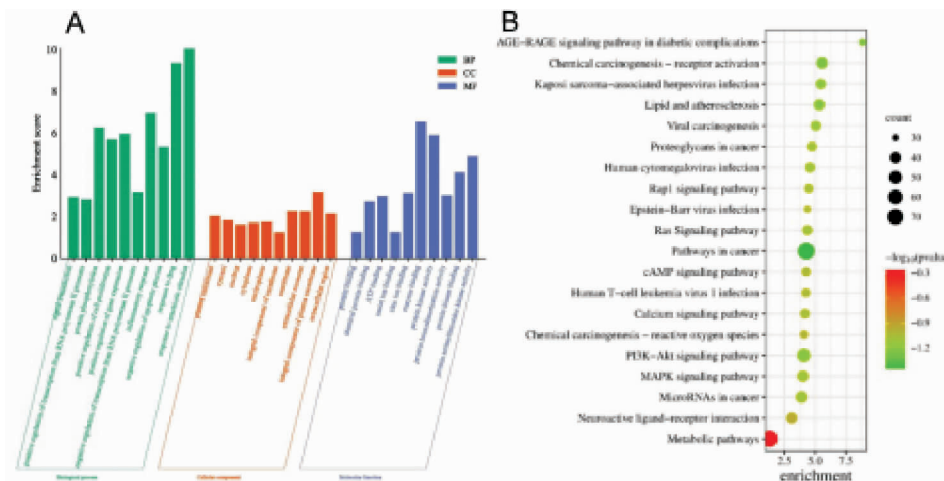


图 4 GO 功能富集分析(A)与 KEGG 通路富集分析(B)

活通路、脂质与动脉粥样硬化、PI3K-Akt 等信号通路。以 COPD 通路为例,可以观察到 PPI 网络中排名靠前的作用靶点均在此通路中被富集, 例如TNF- $\alpha$ 、IL-6、CASP 等,见图 5。

### 3.5 动物实验验证

3.5.1 益气平喘豆乳粉对 COPD 模型小鼠行为学及体重影响 实验期间,正常组小鼠毛发光亮柔顺,饮食正常,与正常组小鼠相比,其他造模小鼠可见毛发干枯发黄,易于脱落,弓背蜷缩,活动减弱,各给药组小鼠用药后相比模型组小鼠毛发干枯掉落现象、神情倦怠情况有所好转。

各组小鼠第 1 天、造模第 30 天、造模第 45 天(灌胃第 15 天)及造模第 60 天(灌胃第 30 天)的体质

量如表 4 所示。本研究通过比较各组在实验过程中的体质量变化量考察益气平喘豆乳粉对小鼠营养状态的影响,每个时期相比上个阶段的体质量变化量结果如表 5 所示,造模 30 d 后正常组体质量有明显增长,其余造模组体质量增长缓慢,与正常组差异具有统计学意义( $P < 0.01$ );开始灌胃 15 d 后,各组体质量变化幅度有所减小,中剂量组与低剂量组的体质量增长幅度较大[(1.89 $\pm$ 0.46) g,(2.07 $\pm$ 0.36) g]( $P < 0.05$ );灌胃 30 d 时,与正常组比较,模型组呈明显负增长[(-2.61 $\pm$ 0.53) g]( $P < 0.01$ );与模型组比较,灌胃 30 d 后中剂量组和地塞米松组的体质量下降量较少(-1.50 $\pm$ 0.20 g,-1.57 $\pm$ 0.25 g)( $P < 0.05$ )。

3.5.2 肺组织病理学 正常组小鼠肺泡组织结构完



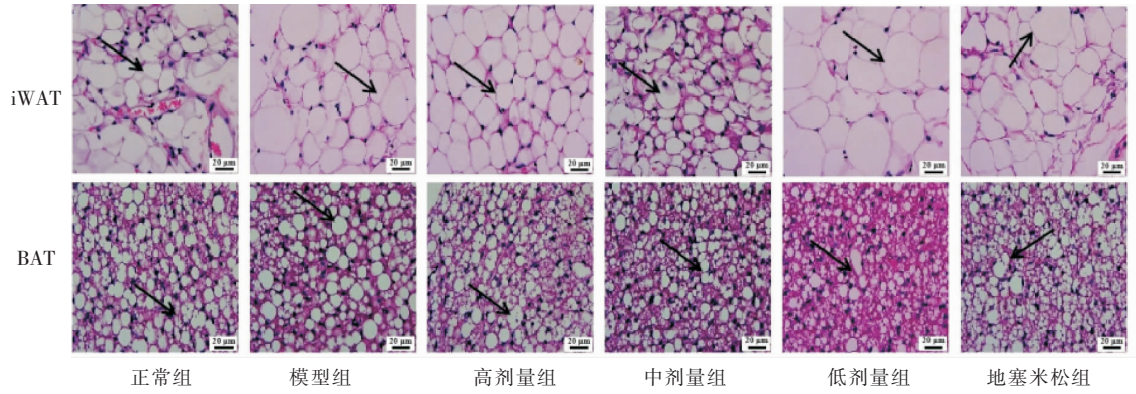


图 7 脂肪组织 HE 染色 (×400)

3.5.3 脂肪组织病理学 HE 染色结果显示,相对于正常组,模型组小鼠皮下 iWAT 较为松散,脂肪细胞直径较大,高、中、低剂量组及地塞米松组白色脂肪组织细胞变小紧致,具有棕色化趋势。模型组小鼠相对于正常组脂肪组织中空泡脂滴增多,高、中、低剂量组及地塞米松组则细胞分布增多排列紧密,具有较为明显的棕色细胞形态特征。详见图 7。

3.5.4 益气平喘豆乳粉对 COPD 小鼠炎症因子表达的影响 ELISA 结果显示,与正常组比较,模型组血清中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的浓度均升高 ( $P < 0.05$ ),BALF 中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 浓度无显著差异。与模型组相比,高剂量组血清中 TNF- $\alpha$  浓度降低 ( $P < 0.05$ ),中剂量组、低剂量组小鼠血清及 BALF 中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 浓度较低 ( $P > 0.05$ )。详见图 8。

3.5.5 益气平喘豆乳粉对 COPD 小鼠肺组织 TNF- $\alpha$ 、ICAM-1、SELE mRNA 表达的影响 与正常组相比,模型组小鼠肺组织 SELE mRNA 表达水平升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比,各用药组小鼠肺组织 SELE mRNA 表达水平降低 ( $P < 0.05$ ),其中益气平喘豆乳粉中剂量组小鼠肺组织 SELE mRNA 表达水平最低。详见图 9。

#### 4 讨论

本研究基于 UPLC-Q-TOF-MS 对益气平喘豆

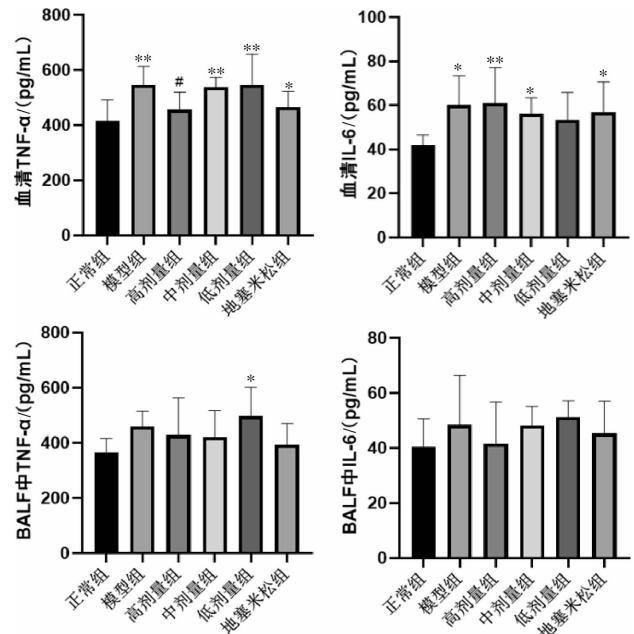


图 8 血清和 BALF 中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平 (pg/mL,  $\bar{x} \pm s, n=6$ )  
注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;模型组比较,# $P < 0.05$ 。

乳粉中药复方进行成分分析,得到 143 个中药复方中活性成分,PPI 网络图表明益气平喘豆乳粉中药复方主要通过调节炎症通路上的 TNF、AKT1、IL-6 等靶蛋白表达,从而抑制炎症因子表达和炎症反应、改善氧化应激、调控细胞凋亡等以延缓 COPD 进展<sup>[8]</sup>。富集分析显示 GO 条目 1 288 条,KEGG 通路 172

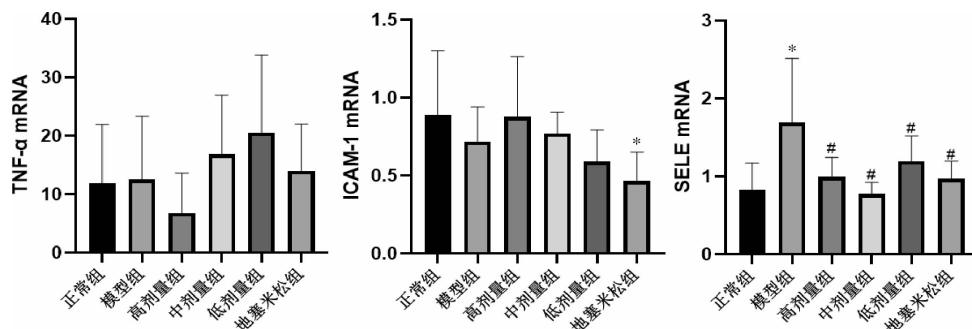


图 9 TNF- $\alpha$ 、ICAM-1 及 SELE mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )  
注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ;模型组比较,# $P < 0.05$ 。

条,涉及凋亡负调控、蛋白质磷酸化(protein phosphorylation)、炎症反应、蛋白激酶活性、PI3K-Akt等多个过程和通路,PI3K-Akt通路的营养感觉失调随着年龄增长而发生,该通路涉及营养可用性信号以调节细胞生长<sup>[9]</sup>。

有研究表明,TNF- $\alpha$ 可促进肺胶原纤维增生,增加细胞外基质分泌,导致肺纤维化病理改变,同时可刺激炎症因子,增强炎症反应<sup>[10]</sup>,是机体炎症反应和免疫应答的重要介质,在COPD的疾病发展进程中血清TNF- $\alpha$ 呈升高趋势<sup>[11]</sup>。IL-6被认为是一种与年龄相关的促炎细胞因子,与负面健康结果和死亡率相关,与慢性炎症的持续有关<sup>[12]</sup>。COPD急性加重患者IL-6升高,并与COPD患者肺气肿的发展相关<sup>[13-14]</sup>。COPD肺细胞表现出“衰老相关分泌表型”,特征是衰老的肺细胞分泌IL-6、IL-8、单核细胞趋化蛋白-1等促炎分子进一步促进COPD的发展。相关研究<sup>[15]</sup>表明,IL-6等细胞因子介导的炎症反应可对COPD大鼠营养状态造成一定影响,大鼠体质量明显降低时,IL-6水平升高。与模型组相比,高剂量组小鼠血清中TNF- $\alpha$ 及IL-6浓度降低差异显著,中、低剂量组无显著差异,但浓度均有降低;支气管灌洗液中TNF- $\alpha$ 、IL-6浓度无显著差异,说明该药食同源食品在部分COPD相关指标上有改善作用,但相对药物疗效较弱。

SELE可介导白细胞或单核细胞于内皮细胞粘附并向炎症部位积聚<sup>[16]</sup>,与TNF- $\alpha$  mRNA共同作为益气平喘豆乳粉改善COPD炎症效果的评估指标。此外,营养不良小鼠脂肪组织会呈现空泡脂滴增多现象<sup>[17]</sup>,高、中、低剂量组在给药后各组脂肪组织可见空泡脂滴数量减少,体重降低趋势减缓。

综上所述,本研究通过UPLC-Q-TOF-MS及网络药理学技术,分析益气平喘豆乳粉中药复方的活性成分、靶点、通路与COPD的作用关系,通过动物实验验证上述结果并证明其对COPD小鼠模型营养状态的改善作用,发现益气平喘豆乳粉可能通过影响TNF通路,抑制TNF- $\alpha$ 、IL-6从而改善COPD气道炎症及肺部损伤状态。本研究可为益气平喘豆乳粉的进一步研发和生产提供理论依据,同时为药食同源功能性食品的开发提供参考借鉴。本研究存在的不足主要是由于设备原因缺乏肺功能指标的检测,以及未明确益气平喘豆乳粉改善营养不良的机制,组别之间存在显著差异结果较少;未明确益气平喘豆乳粉与纯食材辅料相比是否具有同等营养价值或发挥更优作用。

## 参考文献

- [1] 赵子铤, 刘海英, 卢林, 等. 慢性阻塞性肺疾病合并营养不良认识的研究进展[J]. 中国当代医药, 2021, 28(14): 31-34.
- [2] DECRAMER M, JANSSENS W, MIRAVITLLES M. Chronic obstructive pulmonary disease[J]. Lancet, 2012, 379(9823): 1341-1351.
- [3] 周伊南, 陈飞喃, 汤丽新, 等. 营养支持策略对慢阻肺患者营养状况影响的研究进展[J]. 老年医学与保健, 2020, 26(6): 1103-1105.
- [4] 李时超, 陈腾, 秦凤凤, 等. 基于网络药理学和分子对接研究华蟾素治疗胃癌的作用机制[J]. 中成药, 2023, 45(10): 3475-3482.
- [5] 于天怡, 焦广洋, 黄豆豆, 等. 基于UHPLC-Q-TOF/MS和网络药理学分析肺炎二号方预防新冠肺炎的有效成分和机制[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2021, 26(10): 1127-1145.
- [6] 符秀曼, 张美萃, 范良, 等. 基于NF- $\kappa$ B通路和COX-2水平探讨小青龙汤加减方对LPS联合香烟烟雾诱导的COPD小鼠气道炎症和气道重塑的影响[J]. 中药材, 2021, 44(11): 2692-2696.
- [7] 施静, 罗勇. 疏风解毒胶囊对COPD小鼠肺部氧化损伤组织修复作用及其免疫功能影响[J]. 解剖科学进展, 2021, 27(5): 561-564, 569.
- [8] 阮欢荣, 张海龙, 韩伟红. 基于网络药理学的中药治疗慢性阻塞性肺疾病作用机制研究进展[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2022, 24(10): 3926-3931.
- [9] MACNEE W. Is chronic obstructive pulmonary disease an accelerated aging disease? [J]. Annals of the American Thoracic Society, 2016, 13(Suppl 5): S429-S437.
- [10] 李宁, 陈谨, 何耀红, 等. COPD合并肺间质纤维化患者临床特点及血清TGF- $\beta$ 1、CTGF、TNF- $\alpha$ 检测意义分析[J]. 现代生物医学进展, 2022, 22(24): 4644-4647, 4626.
- [11] 陈灿, 郑林鑫, 麦玉梅, 等. 慢性阻塞性肺疾病并骨质疏松患者血清IL-6、TNF- $\alpha$ 水平的变化及其对OPG、RANKL表达的影响[J]. 临床肺科杂志, 2023, 28(1): 35-38.
- [12] GARTH J, BARNES J W, KRICK S. Targeting cytokines as evolving treatment strategies in chronic inflammatory airway diseases[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(11): 3402-3402.
- [13] WEDZICHA J A, SEEMUNGAL T A, MACCALLUM P K, et al. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease are accompanied by elevations of plasma fibrinogen and serum IL-6 levels[J]. Thrombosis and Haemostasis, 2000, 84(2): 210-215.
- [14] SONG W, ZHAO J, LI Z. Interleukin-6 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with COPD[J]. Chinese Medical Journal, 2001, 114(11): 1140-1142.
- [15] LOCHLAINN M N, BOWYER R C E, STEVES C J. Dietary protein and muscle in aging people: The potential role of the gut microbiome[J]. Nutrients, 2018, 10(7): 929-929.
- [16] 乔波. 益气涤痰破瘀方治疗慢阻肺调控ACE-Ang II-AT1R轴的机制研究[D]. 昆明: 云南中医药大学, 2021.
- [17] 贺润铖, 黄芷棋, 冯倩倩, 等. 天山雪莲对老年脂质代谢异常(气虚血瘀型)小鼠的改善作用及机制研究[J]. 中草药, 2022, 53(17): 5433-5444.

(本文编辑 苏维)