

# 网络药理学联合灰色关联分析黄芩抗呼吸道合胞病毒小鼠肺炎的药效物质基础研究

高燕<sup>1</sup>, 吕凌<sup>2</sup>, 翟阳<sup>3</sup>, 贾明倩<sup>1</sup>, 赵瀚年<sup>1</sup>, 宋勇<sup>4\*</sup>(1.山东中医药大学, 济南 250355; 2.山东省红十字会备灾救护中心, 济南 250014; 3.山东省肿瘤医院, 济南 250117; 4.东营市疾病预防控制中心, 山东 东营 257092)

**摘要:** 目的 探讨黄芩抗呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)的药效物质基础。方法 运用网络药理学分析黄芩抗 RSV 的作用靶点; UPLC-QTOF-MS/MS 定量表征黄芩的共有成分, 建立 RSV 肺炎小鼠模型, 检测小鼠体质量、肺指数、肺部病理切片以及 IL-6 的含量, 采用灰色关联度方法对 50 批次黄芩样品谱-效数据进行关联分析, 挖掘黄芩抗 RSV 肺炎小鼠的有效成分。结果 蛋白互作网络结果确定黄芩抗 RSV 核心靶点为 AKT1、IL-6、TNF、MAPK3、SRC、HSP90AA1、PTGS2; 整体动物实验证明, 黄芩可不同程度地下调肺指数及炎症因子 IL-6 含量; 灰色关联度分析显示黄芩中抗 RSV 的化学成分主要为黄酮苷类成分。结论 采用网络药理学方法确定药效靶点, 灰色关联度分析成分-靶标数据, 挖掘药效物质基础的方法可行, 黄芩苷、汉黄芩苷、白杨素-6-C-阿拉伯糖-8-C-葡萄糖苷、白杨素-6-C-阿拉伯糖-8-C-阿拉伯糖苷、白杨素-7-O-葡萄糖醛酸苷等黄酮苷类成分可作为黄芩的 Q-Markers 用于质量评价。

**关键词:** 黄芩; 呼吸道合胞病毒; 网络药理学; Q-Markers; 药效物质基础; 灰色关联度分析

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)15-2056-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20221591

引用本文: 高燕, 吕凌, 翟阳, 等. 网络药理学联合灰色关联分析黄芩抗呼吸道合胞病毒小鼠肺炎的药效物质基础研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(15): 2056-2063.

## Pharmacodynamic and Material Basis of *Scutellaria Baicalensis* Against Respiratory Syncytial Virus Pneumonia in Mice by Network Pharmacology Combined with Grey Relational Analysis

GAO Yan<sup>1</sup>, LYU Ling<sup>2</sup>, ZHAI Yang<sup>3</sup>, JIA Mingqian<sup>1</sup>, ZHAO Bonian<sup>1</sup>, SONG Yong<sup>4\*</sup>(1.Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2.Shandong Red Cross Disaster Preparedness and Rescue Center, Jinan 250014, China; 3.Shandong Cancer Hospital, Jinan 250117, China; 4.Dongying Center for Disease Control and Prevention, Dongying 257092, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore the anti-respiratory syncytial virus(RSV) pharmacodynamic material basis of *Scutellaria Baicalensis*. **METHODS** Network pharmacology method was used to analyze the anti-RSV targets of *Scutellaria baicalensis*. UPLC-QTOF-MS/MS was used to characterize the consensus components in *Scutellaria Baicalensis*. A mouse model of RSV pneumonia was established, and the changes of mouse body weight, lung index, lung pathological sections and IL-6 were detected. The gray correlation method was used to analyze the spectrum-effect data of 50 batches of *Scutellaria baicalensis* samples, and the effective components of *Scutellaria baicalensis* against RSV pneumonia mice were mined. **RESULTS** The protein-protein interaction network results determined that the core targets of *Scutellaria baicalensis* against RSV were AKT1, IL-6, TNF, MAPK3, SRC, HSP90AA1 and PTGS2; overall animal experiment proved that lung index of *Scutellaria baicalensis* decreased to varying degrees, and the inflammatory factor IL-6 had significant differences; grey correlation analysis showed that the anti-RSV chemical components in *Scutellaria baicalensis* were mainly flavonoid glycosides. **CONCLUSION** Using the network pharmacology method to determine the pharmacodynamic target, the gray correlation degree analysis component-target data, the method of mining the pharmacodynamic material basis is feasible, baicalin, wogonin, chrysin-6-C-arabinose-8-C-flavonoid glycoside, chrysin-6-C-arabinose-8-C-arabinoside and chrysin-7-O-glucuronide can be used as Q-Markers of *Scutellaria baicalensis* for quality evaluation.

**KEYWORDS:** *Scutellaria Baicalensis*; respiratory syncytial virus; network pharmacology; Q-Markers; pharmacodynamic material basis; grey relational analysis

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)是婴幼儿下呼吸道感染主要病原体。RSV 与流感病毒也是成人慢性心肺疾病和急性呼吸衰竭

最常见的病因<sup>[1]</sup>。RSV 感染后, 主要病变部位为毛细支气管、气管和肺泡, 因其呼吸道上皮细胞坏死、脱落进而导致肺炎<sup>[2]</sup>。

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1701501); 山东省重点研发计划(2017CXGC1306, 2016GSF202005, 2021CXGC010511)

作者简介: 高燕, 女, 博士, 副教授 E-mail: gaoyaningsy@163.com 共同第一作者: 吕凌, 女, 副研究员 E-mail: lvlinging@163.com

\*通信作者: 宋勇, 男, 主管药师 E-mail: wsjsy@sina.cn

黄芩是唇形科黄芩属植物 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根黄芩。黄芩是清热燥湿药, 药理作用广泛, 抗病毒作用尤为显著<sup>[3]</sup>。根据古代医籍中记载, 黄芩常用于治疗肺部疾病<sup>[4]</sup>。现代研究也显示黄芩在治疗 RSV 引起的肺部炎症反应方面作用显著。王剑等<sup>[5]</sup>采用细胞体外抗病毒试验, 通过细胞病变效应(cytopatho-genic effect, CPE)法结合 MTT 法得出 TC50、EC50, 并且以治疗指数作为评价指标, 结果表明, 黄芩提取物对 RSV 有抗病毒活性。高燕等<sup>[6]</sup>采用 CPE 法对黄芩抗病毒疗效进行筛选, 发现黄芩对 RSV 作用明显。詹铀超等<sup>[7]</sup>通过研究黄芩苷对 RSV 感染的 BALB/c, 以小鼠 IFN- $\alpha$  及 IFN- $\beta$  位检测指标, 发现黄芩苷抗 RSV 的作用可以通过调控小鼠体内干扰素的表达来实现。李岚等<sup>[8]</sup>通过研究和解抗敏煎对 RSV 感染诱发哮喘小鼠 TLR3 及 NF- $\kappa$ B/IRF3 信号通路的调控作用, 发现和解抗敏煎各剂量组能有效降低哮喘小鼠气道高反应性, 改善肺组织损伤和炎症细胞浸润, 降低肺泡灌洗液中巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、中性粒细胞数量和 IgE、CD31、IL-4、TNF- $\alpha$ 、MPO 的含量, 并有效降低肺组织 TLR3、NF- $\kappa$ B、IRF3 的表达。施恒飞<sup>[9]</sup>通过建立小鼠 RSV 感染模型, 探究黄芩苷抗病毒作用机制, 结果表明黄芩苷可以有效改善因 RSV 感染造成的肺损伤, 并能够降低小鼠肺组织中的病毒滴度。网络药理学作为一种新的科学方法, 运用网络方法分析药物与疾病和靶点之间“多成分、多靶点、多途径”协同作用关系的药理学分支学科。本研究为阐明黄芩抗 RSV 的药效物质基础, 采用 UPLC-QTOF/MS 技术和整体动物实验, 对 50 批次黄芩化学成分和抗 RSV 药效指标进行检测, 运用灰色关联分析的方法进行谱-效数据分析, 推测药效物质基础, 同时应用网络药理学的方法构建成分-疾病-靶点网络, 分析黄芩抗 RSV 作用的关键靶点, 从而推测其作用机制。

## 1 材料

### 1.1 仪器

X500 UPLC-QTOF-MS/MS 高效液相色谱-质谱联用仪(美国 AB Sciex 公司); SB4200DTS 超声双频清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); ZKO72 真空干燥机(上海实验仪器厂); FW-80 高速万能粉碎机(北京市光明医疗仪器有限公司); BP211D 型天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; VS-1300-U 型洁净工作台(苏州安泰工控技术有限公司); Milli-Q IQ 7000 超纯水系统(南京科麟

得科学仪器有限公司); KDM-A 控温电热套(金坛市医疗仪器厂)。

### 1.2 试剂

黄芩药材(从全国范围内收集黄芩药材, 经山东省中医药研究院林慧彬研究员鉴定均为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根); RSV(山东省医科院提供); 肝素钠注射液(江苏万邦生化医药集团有限公司, 批号: 51803104); 戊巴比妥钠(山东省食品药品检验研究院, 批号: 20180316)。苯甲基磺酰氟(PMSF)溶液(索莱宝生物有限科技公司, 批号: 20201214); 磷酸盐缓冲液(Biological Industries, 批号: 0030219); IL-6 酶联免疫试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司, 批号: A20600934)。对照品: 黄芩苷(批号: 200514)、汉黄芩素(批号: 200403)、黄芩素(批号: 200301)、野黄芩苷(批号: 200504)均购自中国食品药品检定研究院, 纯度均>98%; 千层纸素(批号: 14062410)、白杨素(批号: 13080712)、汉黄芩苷(批号: 13120401)均购自成都普瑞法科技开发有限公司, 纯度均>98%; 去甲汉黄芩素(成都普思生物科技有限公司, 批号: PS011183; 纯度>98%); 利韦巴林颗粒[(新博林)四川百利药业有限责任公司, 批号: 171276]色谱纯乙腈、甲醇均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

### 1.3 动物

SPF 级 BALB/c 小鼠, 390 只, 10~12 g, 2 周龄, 雄性, 购自济南朋悦实验动物繁育有限公司, 动物生产许可证号: SCXK(鲁)20190003, 动物使用许可证号: SYXK(鲁)20170022。

### 1.4 数据库

Pubchem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>), GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>), GenCLiP3 数据库(<http://ci.smu.edu.cn/genclip3/analysis.php>), STRING 数据库 (<https://string-db.org/>), KEGG 数据库 (<https://www.genome.jp/kegg/>)。

## 2 方法

### 2.1 网络药理学分析黄芩抗 RSV 作用靶点

**2.1.1 成分-靶点数据库筛选** 将检测出的黄芩成分录入 Pubchem 数据库, 获取检索成分的 Canonical SMILES, 录入 Swiss Target Prediction 数据库, 选择 Homo sapiens, 获取其对应靶点及 Uniprot ID, 筛选 Probability>0 的靶点, 获得黄芩

活性成分作用靶点信息。以“Respiratory syncytial virus infection”(RSVI)为关键词,在 GeneCards 数据库中,以相关分数(Relevance score)>10 为标准进行筛选,2 个靶点信息取交集后获得黄芩活性成分抗 RSV 肺炎的潜在靶点信息。

**2.1.2 蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络构建及靶点类型归属** 将药物靶点基因与疾病靶点基因映射筛选取交集,得到黄芩治疗 RSV 肺炎的潜在作用靶点,为了说明潜在作用靶点在蛋白系统水平上的作用,将其上传至 STRING 数据库,限定物种选择人为“Homo sapiens”,得到 PPI 信息,设置高置信度(High confidence) $\geq 0.900$ ,将信息导出,再导入 Cytoscape 3.6.1 软件,构建 PPI 可视化网络。

## 2.2 灰色关联度分析黄芩抗 RSV 药效物质基础

### 2.2.1 黄芩 UPLC-QTOF-MS/MS 成分分析及定量表达

**2.2.1.1 供试品溶液制备** 精密称取黄芩粉末 0.5 g,精密加入 40 mL 沸水,称重,加热回流提取 40 min,每 10 min 振摇 1 次,取出放冷至室温,用蒸馏水补足失重,过滤,滤液离心(573 $\times$ g) 15 min,精密取上清液与等量甲醇混溶后用 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜滤过,续滤液用于黄芩药材的化学成分定性定量检测。

**2.2.1.2 对照品溶液制备** 精密称量汉黄芩苷、千层纸素、黄芩素、白杨素、黄芩苷、汉黄芩素、野黄芩苷、去甲汉黄芩素等对照品,分别置于 50 mL 量瓶中,用 50%的甲醇溶液溶解,超声处理 30 min,用 50%甲醇定容至刻度(浓度分别为 19.6, 19.2, 19.0, 21.4, 21.2, 20.6, 20.8, 19.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),过滤,备用。

**2.2.1.3 色谱条件** Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ),流动相 A(0.05%的甲酸水溶液)-流动相 B(0.05%的甲酸乙腈溶液)按表 1 进行梯度洗脱;流速:0.3 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ ;柱温:30  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量:1  $\mu\text{L}$ 。

表 1 流动相梯度洗脱表

Tab. 1 Mobile phase gradient elution table

t/min	流动相 A	流动相 B
0~15	85% $\rightarrow$ 70%	15% $\rightarrow$ 30%
15~16	70% $\rightarrow$ 58%	30% $\rightarrow$ 42%
16~25	58% $\rightarrow$ 30%	42% $\rightarrow$ 70%
25~30	30% $\rightarrow$ 0%	70% $\rightarrow$ 100%
30~35	0%	100%
35~40	85%	15%

**2.2.1.4 质谱条件** 电喷雾离子源(ESI),雾化器:55 psi;辅助气:60 psi;气帘气:35 psi;雾化器温度:600  $^{\circ}\text{C}$ 。IDA 模式,正离子模式,离子源电压为 5 500 V;一级质谱母离子  $m/z$  扫描范围 200~1 000、累积时间 150 ms;二级质谱子离子  $m/z$  扫描范围 50~1 000、碰撞能量(CE)60 ev、碰撞能量扩展(CES)40 ev、累积时间 150 ms。

**2.2.1.5 黄芩样品检测** 收集 50 批黄芩样品,药材来源见表 2,分别制备供试品溶液,进入质谱仪检测,以葛根素为内标,计算相对峰面积值=(目标峰面积/样品取样量)/内标峰面积。

### 2.2.2 黄芩抗 RSV 肺炎小鼠药效作用研究

**2.2.2.1 黄芩灌胃液的制备** 根据课题组前期实验,选择 2 倍人日均给药剂量进行给药。取黄芩粉末 5.6 g,精密加入 80 倍量的沸水,称定重量后热回流提取 40 min,取出放至室温,用蒸馏水补足失重,离心 15 min(573 $\times$ g),取上清液用蒸发皿浓缩至 10 mL,离心管冻存备用。小鼠灌胃液体积 100  $\mu\text{L}\cdot(10\text{ g})^{-1}$ 。

**2.2.2.2 黄芩抗 RSV 肺炎小鼠的药效试验** 随机选取黄芩(批号:20171227)样品进行药效指标筛选,根据前期预试验结果,BALB/c 小鼠接收后,适应性生长 3 d,随机分为正常组、模型组、利巴韦林阳性对照组[0.638 1  $\text{mg}\cdot(10\text{ g})^{-1}$ ]、黄芩给药组[56  $\text{mg}\cdot(10\text{ g})^{-1}$ ,共 50 批次],每组 6 只;给药 2 d 后,模型组、利巴韦林阳性对照组、黄芩给药组采用滴鼻方式接种 RSV(TCID<sub>50</sub>=10<sup>-6</sup>) 35  $\mu\text{L}$ ,建立 RSV 肺炎模型;利巴韦林阳性对照组给予利巴韦林颗粒 1 d,黄芩给药组继续给予黄芩提取物 3 d。正常组、模型组给予等量的生理盐水。每日记录体质量变化。于给药结束后 6 h 解剖,取小鼠肺称重,计算肺指数;小鼠左肺以 4%多聚甲醛溶液固定,石蜡包埋,切片,HE 染色,于光学显微镜下观察其病理变化;小鼠右肺匀浆研磨,取上清液,试剂盒检测 IL-6 因子含量。肺指数(%)=肺质量/小鼠体质量 $\times 100\%$ 。

**2.2.3 灰色关联度分析黄芩抗 RSV 药效物质基础** 采用灰色关联度分析方法,计算炎症抑制率=

$$\frac{C_{\text{模型组}} - C_{\text{给药组}}}{C_{\text{模型组}}} \times 100\% (C_{\text{模型组}} \text{ 为模型组炎症因子}$$

IL-6 浓度,  $C_{\text{给药组}}$  为给药组炎症因子 IL-6 浓度)为药效指标,谱效数据采用均值化变换做无量纲处理,对化学成分和药效的关联度及关联极性进行分析。

表 2 50 批黄芩药材批次信息

Tab. 2 Batch information of 50 batches of *Scutellaria baicalensis*

编号	产地	批号	采购地
1	内蒙古	20180712	同仁堂
2	山东	20170615	博杏霖中医门诊部
3	陕西	1702001	同兴堂
4	山西	170201	立健药店
5	山西	1709241	立健药店
6	山东	20180301	平嘉大药店
7	山东	20180521	中鲁医院中药部
8	内蒙古	20180501	建联中药
9	山东	20170505	宏仁堂店
10	山东	1806102	漱玉平民大药房
11	内蒙古赤峰(野生)	20180302	安徽亳州康美中药城
12	陕西渭南(野生)	20170724	安徽亳州康美中药城
13	陕西	20170413	安徽亳州康美中药城
14	甘肃	20170413	安徽亳州康美中药城
15	甘肃	20170912	安徽亳州康美中药城
16	山西	20170624	安徽亳州康美中药城
17	山西运城	20170327	安徽亳州康美中药城
18	甘肃	20170726	安徽亳州康美中药城
19	山西晋城	20170426	安徽亳州康美中药城
20	山西澄城县	20170306	安徽亳州康美中药城
21	山西运城	20170711	安徽亳州康美中药城
22	内蒙古赤峰	20180322	安徽亳州康美中药城
23	山西万荣	20171115	安徽亳州康美中药城
24	陕西渭南	20171112	安徽亳州康美中药城
25	甘肃(陈)	20170224	安徽亳州康美中药城
26	山西运城(小粒)	20170512	安徽亳州康美中药城
27	内蒙古(野生)	20171110	安徽亳州康美中药城
28	内蒙古海拉尔区	20171207	安徽亳州康美中药城
29	甘肃陇西	20170617	安徽亳州康美中药城
30	陕西(多年生)	20171026	安徽亳州康美中药城
31	山西运城	20170512	安徽亳州康美中药城
32	内蒙古赤峰(野生)	20170423	安徽亳州康美中药城
33	山西运城(大粒)	20170911	安徽亳州康美中药城
34	河北	170310	广东天诚中药饮片有限公司
35	亳州	20171215	济南宏仁堂药店
36	内蒙古	20171227	徽都中药材
37	山西	20170702	广西仙棊中药科技有限公司
38	山东	17100702	山东博康中药饮片有限公司
39	河北	20171001	济南三源药业有限公司
40	内蒙古	20171213	山东建联中药店 1 店
41	内蒙古	20171214	山东建联中药店 2 店
42	-	20171213	中鲁医院
43	内蒙古	1805011132	博杏霖中医门诊部
44	陕西	1901005	海洲大药房
45	内蒙古	111609011	三九药店
46	内蒙古	2018001	建联中药店
47	山东	181001	方成大药房
48	陕西	18072601	仁和药房网
49	内蒙古	20190305	同仁堂
50	河北	3809171-01	海洲大药房

### 3 结果

#### 3.1 网络药理学分析黄芩抗 RSV 作用靶点

在 TCMSP 数据库中检索黄芩 LC-QTOF/MS 表征成分对应的靶点, 经过 Uniprot 将所有靶标进

行汇总、去重后, 共得到 789 个靶标基因, 通过检索 GeneCards、GenCLiP3 数据库, 分别收集到 RSV 相关靶点基因 390 个。进行 Venn 分析, 获得 28 个交集基因, 即为黄芩抗 RSV 的潜在作用靶点。将交集基因导入 Cytoscape 3.6.1 软件构建 PPI 相互作用网络, 见图 1。根据 Dgree>20, 筛选出黄芩抗 RSV 核心靶点为 AKT1、IL-6、TNF、MAPK3、SRC、HSP90AA1、PTGS2。

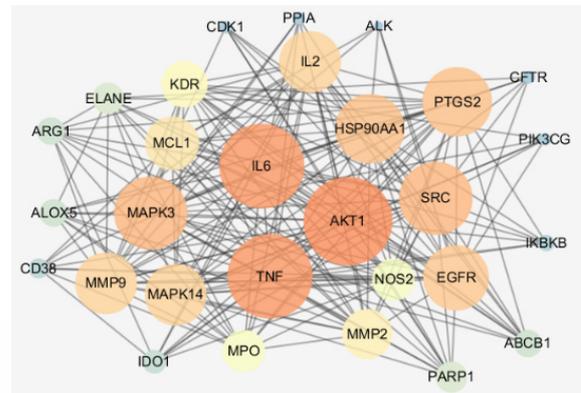


图 1 黄芩抗 RSV 靶点蛋白 PPI 网络图

Fig. 1 PPI network diagram of *Scutellaria baicalensis* anti-RSV target protein

#### 3.2 LC-QTOF/MS 检测结果

根据国内外专业数据库 Pubchem Compound、TCMSP 以及相关文献研究、对照品比对, 共筛选出 26 个出峰稳定的成分作为共有峰, 方法学考察 26 个共有峰线性关系良好 ( $R^2 > 0.95$ ), 精密度、稳定性、重复性均符合要求 ( $RSD\% \text{均} < 3\%$ )。黄芩药材的 LC-Q-TOF/MS 的总离子流图(TIC 图)见图 2, 成分归属结果见表 3, 50 批次黄芩样品指纹图谱见图 3。

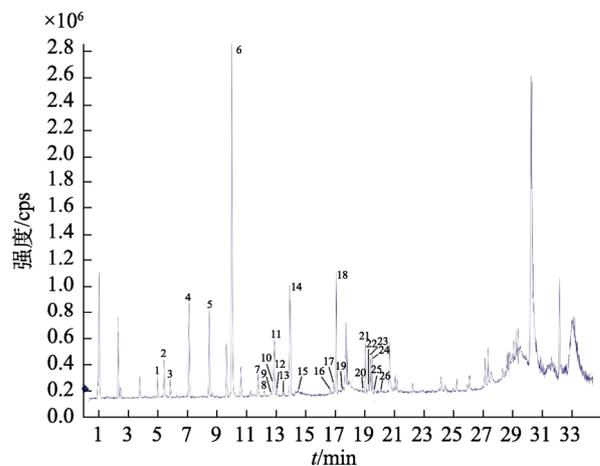


图 2 黄芩 LC-QTOP/MS 总离子流图

Fig. 2 *Scutellaria baicalensis* LC-QTOF/MS TIC diagram

表 3 黄芩 UPLC-QTOF-MS/MS 化学成分检测归属结果

Tab. 3 Detection attribution results of chemical composition of *Scutellaria baicalensis* detected by UPLC-QTOF-MS/MS

编号	分子式	理论分子量	一级	保留时间/ min	名称	二级
1	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>13</sub>	549.160 0	549.160 4	4.52	白杨素-6-C-阿拉伯糖-8-C-葡萄糖苷	411.108 9, 279.065 3, 393.096 2
2	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>	463.086 7	463.087 5	5.08	野黄芩苷*	287.054 5, 123.007 5
3	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>13</sub>	549.160 8	549.161 1	5.37	白杨素-6-C-阿拉伯糖-8-C-阿拉伯糖苷	363.084 4, 321.074 4, 531.150 4
4	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	416.378 1	417.117 6	7.00	白杨素-8-C-葡萄糖苷	267.065 5, 297.075 2, 168.060 2
5	C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	477.103 3	477.103 8	8.28	5,7,2'-三羟基-6-甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸苷	301.070 5, 286.044 5, 168.007 4
6	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	447.092 7	447.091 2	9.63	黄芩苷*	271.057 7, 123.007 8
7	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	447.092 7	447.092 9	11.72	黄芩苷异构体	271.060 0, 149.022 8
8	C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	477.103 3	477.103 6	12.15	5,7,8-三羟基-6-甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸苷	301.070 5, 286.046 8, 184.001 0
9	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	447.129 1	447.125 2	12.36	千层纸素 A-5-O 葡萄糖苷	271.060 0, 285.079 9
10	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	431.097 8	431.097 1	12.48	白杨素-7-O-葡萄糖醛酸苷	255.064 7, 153.017 4
11	C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	461.108 4	461.106 7	12.58	千层纸素 A-7-O 葡萄糖醛酸苷	285.074 5, 270.051 7
12	C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	477.103 3	477.103 7	12.77	5,6,7-三羟基-8-甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸苷	301.071 3, 286.047 6, 72.022 7
13	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	447.092 7	447.092 6	13.20	黄芩苷异构体	271.060 5, 149.022 4, 285.073 9, 123.008 2
14	C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	461.108 4	461.107 7	13.69	汉黄芩苷*	285.075 1, 270.052 7
15	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	491.119 0	491.119 6	14.25	5,7-二羟基-6,8-二甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸苷	315.085 4, 285.037 8, 300.072 5
16	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	301.070 7	301.070 5	16.88	芩黄芩素 II	286.046 5, 184.001 6
17	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	271.059 8	271.058 9	17.05	黄芩素*	123.008 0, 150.045 3, 253.048 1
18	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	331.082 2	331.080 7	17.06	三羟基-二甲氧基黄酮	316.055 5, 169.009 1
19	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	301.072 4	301.071 4	17.48	三羟基-单甲氧基黄酮	286.049 7, 66.012 0, 168.005 2
20	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	285.077 0	285.076 3	19.09	汉黄芩素*	270.052 2, 151.054 7
21	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	255.066 8	255.065 0	19.33	白杨素*	153.018 1, 67.016 3
22	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	315.087 5	315.086 2	19.34	二羟基-二甲氧基黄酮	285.040 7, 71.015 2, 154.998 1
23	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	375.105 4	375.105 7	19.46	黄芩黄酮 II	345.060 5, 197.008 8, 169.013 7
24	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	285.076 5	285.075 3	19.62	千层纸素*	270.049 4, 168.005 1, 140.010 8
25	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	315.087 5	315.087 4	19.66	二羟基-二甲氧基黄酮(异构体)	271.061 8, 253.054 0, 171.136 0
26	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	345.095 9	345.096 5	20.15	二羟基-三甲氧基黄酮	315.053 4, 197.008 9

注: \*表示使用对照品比对。

Note: \*Indicated the use of reference substance for comparison.

### 3.3 黄芩抗 RSV 肺炎小鼠药效作用

**3.3.1 各组小鼠肺指数结果** 肺指数能够反映机体炎性损伤的程度, 根据数据检测结果可知, 与正常组比较, 模型组小鼠肺指数均有升高, 黄芩给药干预后, 较模型组有显著性降低( $P < 0.01$ ), 结果见表 4。

表 4 各组小鼠肺指数结果( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Tab. 4 Results of lung index of mice in each group( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

分组	肺指数/%
正常组	0.62±0.03
模型组	1.03±0.10 <sup>1)</sup>
利巴韦林阳性对照组	0.98±0.06 <sup>2)</sup>
黄芩给药组	0.93±0.08 <sup>2)</sup>

注: 与正常组比较, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the normal group, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; compared with the model group, <sup>2)</sup> $P < 0.01$ .

**3.3.2 肺组织病理切片结果** 正常组肺泡及各级支气管结构清晰且完整; 模型组肺泡隔增厚、局灶性肺泡隔增厚, 血管周围、小血管周围炎性细胞浸润, 弥漫性肺脏炎性细胞浸润(中性粒细胞、淋巴细胞为主), 肺泡及血管周围细胞出现破损情况; 利巴韦林阳性对照组血管周围、小血管周围炎性细胞浸润, 多灶性肺组织炎性细胞浸润, 肺泡隔增厚、肺泡隔炎性细胞浸润, 推测与利巴韦林药物的不良反应和药物代谢时间有关<sup>[10-12]</sup>; 黄芩给药组肺组织炎性损害相较于模型组有较好改善, 肺泡隔变薄, 血管周围、小血管周围炎性细胞浸润减少, 弥漫性肺脏炎性细胞浸润程度降低(中性粒细胞、淋巴细胞为主), 肺泡及血管周围细胞破损情况有所改善, 病理切片见图 4。

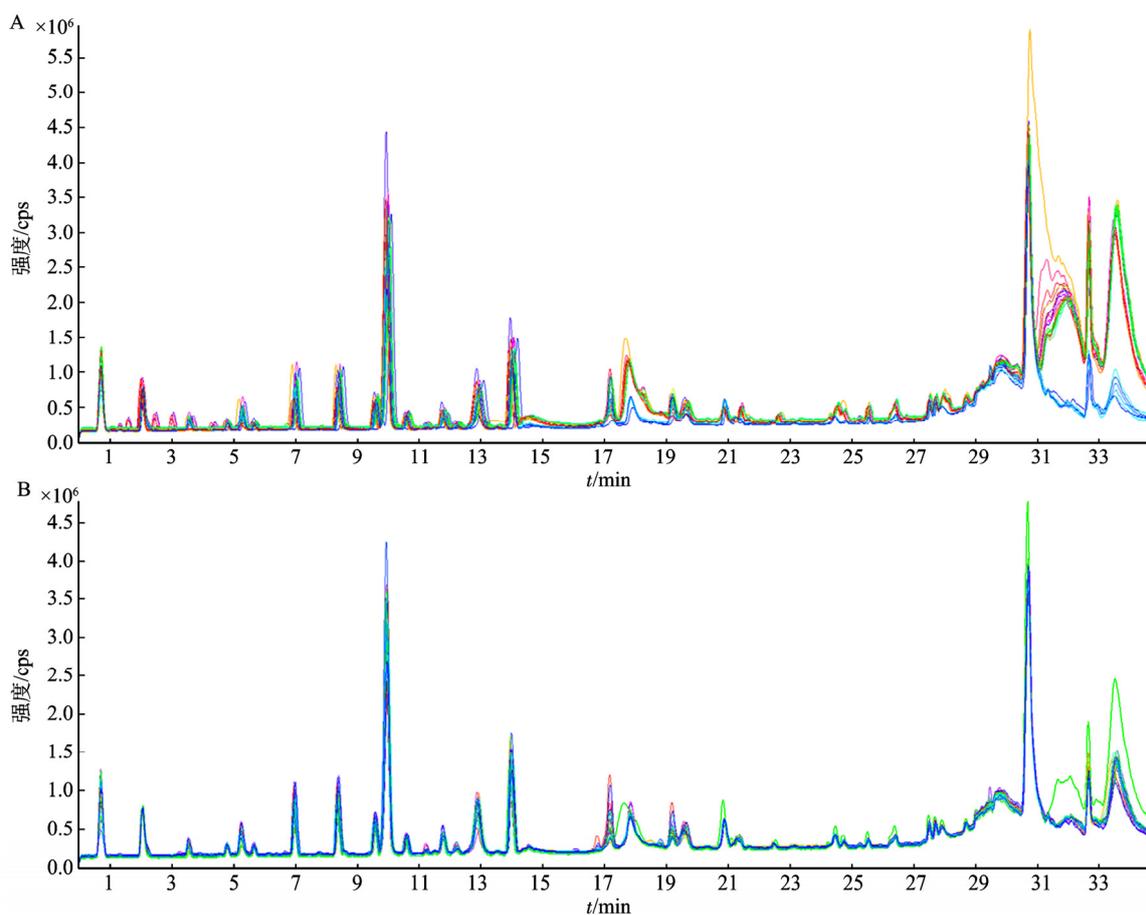


图3 50批次黄芩样品成分指纹图谱典型图谱  
A-1~25批; B-26~50批。

Fig. 3 Typical compositional fingerprints of 50 batches of *Scutellaria baicalensis* samples  
A-batch 1-25; B-batch 26-50.

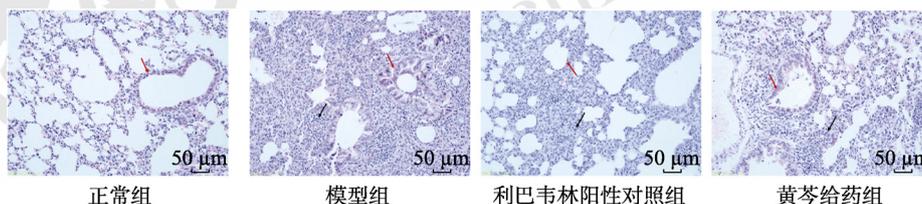


图4 小鼠肺组织 HE 染色结果图(200×)

红色↓-肺泡隔; 黑色↓-炎症浸润。

Fig. 4 HE staining results of lung tissue of mice(200×)

Red ↓ -alveolar septa; black ↓ -inflammatory infiltration.

**3.3.3 药效指标检测** 根据前期课题组实验基础及网络药理学靶点预测, 选择 IL-6 进行药效指标检测。根据试剂盒要求进行线性范围检测, 结果显示线性良好( $R^2 > 0.99$ ), IL-6 含量检测均符合线性标准。与正常组比较, 模型组小鼠肺组织中 IL-6 含量显著性升高( $P < 0.01$ ); 50 批黄芩给药组与模型组对比, IL-6 含量均有不同程度的下降, 说明黄芩能够降低小鼠体内 IL-6 含量, 结果见表 5。

**3.4 灰色关联度分析黄芩抗 RSV 药效物质基础**  
通过对 50 批全国各地购买的不同批次黄芩与

体内炎症因子指标 IL-6 灰色关联分析发现: 黄芩中的这 26 个化学成分与体内炎症因子指标 IL-6 均呈正相关, 除黄芩素外, 其余 25 个成分的药效关联度均  $> 0.9$ , 表明有显著抑制 IL-6 因子的作用, 结果见表 6。

灰色关联分析结果中, 排序在前 11 位的均为黄酮苷类成分, 关联度  $> 0.95$  的分别是: 黄芩苷  $>$  汉黄芩苷  $>$  白杨素-6-C-阿拉伯糖-8-C-葡萄糖苷  $>$  白杨素-6-C-阿拉伯糖-8-C-阿拉伯糖苷  $>$  白杨素-7-O-葡萄糖醛酸苷  $>$  黄芩苷异构体(9 号峰)。

表 5 50 批次药理实验各组小鼠 IL-6 含量( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Tab. 5 Content of 50 batches of IL-6 in mice in each group of pharmacological experiments( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

组别	IL-6/pg·mL <sup>-1</sup>	组别	IL-6/pg·mL <sup>-1</sup>	组别	IL-6/pg·mL <sup>-1</sup>
正常组	153.94±59.60	黄芩给药组 16	404.83±116.69 <sup>2)4)</sup>	黄芩给药组 34	423.83±95.10 <sup>2)4)</sup>
模型组	731.59±110.59 <sup>2)</sup>	黄芩给药组 17	353.10±75.39 <sup>2)4)</sup>	黄芩给药组 35	322.58±28.03 <sup>2)4)</sup>
利巴韦林阳性对照组	424.02±95.10 <sup>2)4)</sup>	黄芩给药组 18	354.83±141.71 <sup>2)4)</sup>	黄芩给药组 36	361.75±104.00 <sup>2)4)</sup>
黄芩给药组 1	280.56±84.67 <sup>4)</sup>	黄芩给药组 19	294.48±107.21 <sup>1)4)</sup>	黄芩给药组 37	399.25±83.83 <sup>2)4)</sup>
黄芩给药组 2	378.47±82.36 <sup>2)4)</sup>	黄芩给药组 20	508.28±138.08 <sup>2)4)</sup>	黄芩给药组 38	573.00±67.43 <sup>2)</sup>
黄芩给药组 3	282.99±98.01 <sup>4)</sup>	黄芩给药组 21	491.42±126.97 <sup>2)4)</sup>	黄芩给药组 39	405.08±160.26 <sup>2)4)</sup>
黄芩给药组 4	356.60±94.70 <sup>2)4)</sup>	黄芩给药组 22	515.58±68.92 <sup>2)4)</sup>	黄芩给药组 40	193.83±55.86 <sup>4)</sup>
黄芩给药组 5	437.15±83.89 <sup>2)4)</sup>	黄芩给药组 23	479.75±106.05 <sup>2)4)</sup>	黄芩给药组 41	450.09±80.13 <sup>2)4)</sup>
黄芩给药组 6	301.39±139.80 <sup>1)4)</sup>	黄芩给药组 24	395.58±150.07 <sup>2)4)</sup>	黄芩给药组 42	674.20±86.24 <sup>2)</sup>
黄芩给药组 7	429.51±123.41 <sup>2)4)</sup>	黄芩给药组 25	377.25±109.18 <sup>2)4)</sup>	黄芩给药组 43	578.66±71.45 <sup>2)</sup>
黄芩给药组 8	309.72±140.97 <sup>1)4)</sup>	黄芩给药组 26	468.08±112.63 <sup>2)4)</sup>	黄芩给药组 44	542.50±66.09 <sup>2)3)</sup>
黄芩给药组 9	245.83±77.64 <sup>4)</sup>	黄芩给药组 27	390.58±111.17 <sup>2)4)</sup>	黄芩给药组 45	576.43±144.20 <sup>2)</sup>
黄芩给药组 10	285.76±71.98 <sup>4)</sup>	黄芩给药组 28	392.25±98.04 <sup>2)4)</sup>	黄芩给药组 46	591.61±111.37 <sup>2)</sup>
黄芩给药组 11	233.71±77.40 <sup>4)</sup>	黄芩给药组 29	295.58±117.95 <sup>2)4)</sup>	黄芩给药组 47	642.05±104.71 <sup>2)</sup>
黄芩给药组 12	286.72±114.48 <sup>4)</sup>	黄芩给药组 30	232.25±103.64 <sup>4)</sup>	黄芩给药组 48	623.75±75.12 <sup>2)</sup>
黄芩给药组 13	389.74±104.21 <sup>2)4)</sup>	黄芩给药组 31	448.00±116.97 <sup>2)4)</sup>	黄芩给药组 49	304.11±109.91 <sup>1)4)</sup>
黄芩给药组 14	525.95±83.95 <sup>2)4)</sup>	黄芩给药组 32	487.58±94.95 <sup>2)4)</sup>	黄芩给药组 50	340.71±116.84 <sup>1)4)</sup>
黄芩给药组 15	520.78±69.57 <sup>2)4)</sup>	黄芩给药组 33	495.08±104.29 <sup>2)4)</sup>		

注: 与正常组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with the normal group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; compared with the model group, <sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$ .

表 6 黄芩中化学成分与体内炎症因子指标 IL-6 抑制作用的关联度

Tab. 6 Correlation between chemical components in *Scutellaria baicalensis* and the inhibitory effect of IL-6, an inflammatory factor index *in vivo*

序号	给药组别	名称	关联度
1	6	黄芩苷	0.954 6
2	14	汉黄芩苷	0.953 9
3	1	白杨素-6-C-阿拉伯糖-8-C-葡萄糖苷	0.953 8
4	3	白杨素-6-C-阿拉伯糖-8-C-阿拉伯糖苷	0.952 7
5	10	白杨素-7-O-葡萄糖醛酸苷	0.950 9
6	8	黄芩苷异构体	0.950 3
7	13	黄芩苷异构体	0.948 4
8	12	5,6,7-三羟基-8-甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸苷	0.946 7
9	5	5,7,2'-三羟基-6-甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸苷	0.945 7
10	11	千层纸素 A-7-O-葡萄糖醛酸苷	0.945 7
11	7	5,7,8-三羟基-6-甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸苷	0.940 1
12	26	二羟基-三甲氧基黄酮	0.938 3
13	15	5,7-二羟基-6,8-二甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸苷	0.938 2
14	4	白杨素-8-C-葡萄糖苷	0.937 2
15	19	三羟基-单甲氧基黄酮	0.935 5
16	22	二羟基-二甲氧基黄酮	0.935 1
17	25	二羟基-二甲氧基黄酮(异构体)	0.932 9
18	9	千层纸素 A-5-O-葡萄糖苷	0.930 4
19	23	黄芩黄酮 II	0.930 1
20	18	三羟基-二甲氧基黄酮	0.927 6
21	2	野黄芩苷	0.926 2
22	24	千层纸素	0.923 5
23	21	白杨素	0.919 4
24	16	韧黄芩素 II	0.918 7
25	20	汉黄芩素	0.914 4
26	17	黄芩素	0.881 5

#### 4 讨论

目前研究表明, 感染 RSV 致病是由于机体感染了 RSV 后所引起的过度免疫反应对自身造成的免疫病理损害<sup>[13]</sup>。RSV 能够在上呼吸道细胞中不断复制增殖, 刺激支气管细胞不断分泌炎症因子、促炎性细胞因子、活性氧等活性生物介质, 引发炎症反应<sup>[14]</sup>。

本研究中, 模型组小鼠以滴鼻方式感染 RSV 后, 肺部病理切片显示肺部支气管细胞破裂, 且有炎性细胞浸润情况。而给药组小鼠肺部病理切片炎性浸润情况减轻, 肺组织肺泡间隔变薄, 说明黄芩对 RSV 感染引发的肺炎有治疗作用。IL-6 是机体在炎症急性期合成的一种重要的非特异性炎症因子<sup>[15-17]</sup>, 能够促进巨噬细胞分化<sup>[18]</sup>, 参与肺部炎症病理过程<sup>[19]</sup>, 且网络药理学结果也显示 IL-6 是黄芩抗 RSV 的主要作用靶点。

通过灰色关联度分析黄芩中共有成分与 IL-6 的相关性, 显示黄芩对炎症指标 IL-6 起主要作用的是黄芩苷、汉黄芩苷、白杨素-6-C-阿拉伯糖-8-C-葡萄糖苷、白杨素-6-C-阿拉伯糖-8-C-阿拉伯糖苷、白杨素-7-O-葡萄糖醛酸苷等黄酮苷类成分; 网络药理学预测分析显示, 与炎症指标 IL-6 靶点相关的成分主要有黄芩苷、黄芩素、杨素-6-C-阿拉伯糖-8-C-葡萄糖苷和汉黄芩苷等, 与上述灰色关联度

分析结果相似,推测黄芩苷、汉黄芩苷、白杨素-6-C-阿拉伯糖-8-C-葡萄糖苷等成分可能为黄芩抗 RSV 的活性成分。检索文献,发现黄芩苷可通过抑制 p38 MAPK/NLRP3 信号通路减轻炎症反应<sup>[20-22]</sup>。汉黄芩苷明显抑制炎症通路中重要核转录因子 NLRP3、SOCS3、TLR4 和 NF- $\kappa$ B, 并减弱下游炎症效应因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达<sup>[23-24]</sup>。其余成分未见药效活性研究报道, 但各成分对药效指标贡献度差异不大, 提示这些成分可共同作为黄芩抗 RSV 肺炎的质量评价 Q-Markers。本研究只是基于 IL-6 的抑制作用进行的灰色关联分析, 尚未对网络药理学挖掘的其他靶点进行检测关联分析, 不能全面反映黄芩抗 RSV 所有有效成分情况, 应该在后续的研究中继续补充相关数据, 为黄芩不同组中药的开发和利用奠定基础。

## REFERENCES

- [1] QIN L, QIU K Z, HU C P, et al. Bronchial epithelial cells promote the differentiation of Th2 lymphocytes in airway microenvironment through jagged/Notch-1 signaling after RSV infection[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2019, 179(1): 43-52.
- [2] WANG X, SHI M. Network pharmacology analysis of Jinchan oral liquid against respiratory syncytial virus infection[J]. *Jiangxi J Tradit Chin Med(江西中医药)*, 2021, 52(3): 62-65.
- [3] TAN C M, ZHANG W T, DONG T, et al. Study on fingerprint quality evaluation of lanqin granules based on orbitrap ultra-high resolution mass spectrometry[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2022, 39(9): 1203-1207.
- [4] 罗燕子. 中药黄芩的化学成分及药理作用的相关研究进展[J]. *临床合理用药杂志*, 2018, 11(30): 180-181.
- [5] 王剑, 侯林, 陈亚乔, 等. 黄芩提取物体外抗病毒药效学研究[J]. *中成药*, 2017, 39(9): 1924-1927.
- [6] GAO Y, WANG B L, ZHAO B N. Effects of water extracts of *Scutellariae Radix* against respiratory syncytial virus[J]. *Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志)*, 2015, 35(2): 104-107.
- [7] ZHAN Y C, QIN S, CHEN F. Study on effect and mechanism of baicalin on antiviral effects about respiratory syncytial virus[J]. *Int J Lab Med(国际检验医学杂志)*, 2017, 38(14): 1907-1909.
- [8] LI L, YU C H, CHEN Y Q, et al. Study on the regulation of conciliatory antiallergic decoction on TLR3 and NF- $\kappa$ B/IRF<sub>3</sub> signaling pathway in asthmatic mice induced by respiratory syncytial virus[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2020, 37(23): 2839-2844.
- [9] SHI H F. Baicalin is a naturally occurring flavone that efficiently inhibits RSV replication[D]. Nanjing: Nanjing University, 2016.
- [10] XIE J, GAO S, LI L, et al. Research progress and application strategy on network pharmacology in Chinese materia medica[J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2019, 50(10): 2257-2265.
- [11] 祁建锋. 对用干扰素和利巴韦林治疗慢性丙型肝炎的副作用分析[J]. *当代医药论丛*, 2015, 13(4): 158-159.
- [12] 黄东慧, 高志勇. 利巴韦林的含量测定以及人体药代动力学的分析研究[J]. *中国医药指南*, 2014, 12(17): 87-88.
- [13] LIU D W, YAN G L, FANG Y, et al. Utility of UPLC-ESI-TOF/MS for rapid analysis of the constituents in *Scutellariae Radix*[J]. *Inf Tradit Chin Med(中医药信息)*, 2012, 29(4): 20-24.
- [14] CHEN P D, XU D Y, LI F, et al. Changes of chemical constituents in *Scutellaria baicalensis* Georgi before and after processing by UPLC-MS analysis[J]. *Chin Tradit Pat Med(中成药)*, 2013, 35(4): 784-788.
- [15] ZHANG L, ZHANG R W, LI Q, et al. Development of the fingerprints for the quality evaluation of *Scutellariae Radix* by HPLC-DAD and LC-MS-MS[J]. *Chromatographia*, 2007, 66(1/2): 13-20.
- [16] 杨培树, 张娜, 郝文立. 电喷雾串联质谱法鉴定黄芩药材的化学成分[J]. *中药材*, 2017, 40(2): 369-372.
- [17] YAN G L, FANG Y, LIU S M, et al. Studies on UPLC-MS characteristic fingerprint of *Scutellaria baicalensis*[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2012, 18(24): 89-93.
- [18] LIU G Z, MA J Y, CHEN Y Z, et al. Investigation of flavonoid profile of *Scutellaria baicalensis* Georgi by high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(23): 4809-4814.
- [19] YUN Y, WANG C Z, GUI L, et al. Baicalin inhibits TLR4 signaling pathway in RAW<sub>264.7</sub> cells following respiratory syncytial virus infection[J]. *Chin Tradit Pat Med(中成药)*, 2013, 35(6): 1116-1121.
- [20] ZHOU J, ZENG Q L, CHEN D P. Elevated serum IL-17B in children with severe pneumonia and mediates IL-6 expression in human bronchial epithelial cells[J]. *Chin J Cell Biol(中国细胞生物学学报)*, 2019, 41(12): 2282-2290.
- [21] WEI J C, XIE Z, CHEN Y, et al. Influence of water extract of *Urena lobata* on levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in mice with bacterial abdominal cavity infection[J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报)*, 2020, 22(1): 29-32.
- [22] 宋琳, 洪祖健. 清热解毒、养阴活血法联合乌司他丁治疗脓毒症疗效及对血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 CRP 的影响研究[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(A1): 148-149.
- [23] XIA J C, CONG R Y, YUAN J, et al. Baicalin alleviates LPS-induced acute lung injury in rats through p38 MAPK/NLRP3 pathway[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2022, 28(2): 79-86.
- [24] ZHU S L, WU Q H, TU J. Study on regulation of NLRP3/SOCS<sub>3</sub>-TLR4-NF- $\kappa$ B inflammatory pathway by wogonoside to improve hepatic insulin resistance[J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2019, 44(20): 4504-4510.

收稿日期: 2022-04-30

(本文责编: 沈倩)