

[38] Lu S W, Zhao Q Q, Guan Y, *et al.* The communication mechanism of the gut-brain axis and its effect on central nervous system diseases; a systematic review[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 178: 117207.

[39] Guo C, Huo Y J, Li Y, *et al.* Gut-brain axis: focus on gut metabolites short-chain fatty acids[J]. *World J Clin Cases*, 2022, 10(6): 1754-1763.

[40] O’Riordan K J, Collins M K, Moloney G M, *et al.* Short chain fatty acids: microbial metabolites for gut-brain axis signalling[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2022, 546: 111572.

[41] Khaledi M, Sameni F, Gholipour A, *et al.* Potential role of gut microbiota in major depressive disorder: a review[J]. *Heliyon*, 2024, 10(12): e33157.

[42] Chen Y H, Bai J, Wu D, *et al.* Association between fecal microbiota and generalized anxiety disorder: severity and early treatment response[J]. *J Affect Disord*, 2019, 259: 56-66.

[43] Wang J, Fan L, Teng T, *et al.* Adolescent male rats show altered gut microbiota composition associated with depressive-like behavior after chronic unpredictable mild stress: differences from adult rats[J]. *J Psychiatr Res*, 2024, 173: 183-191.

基于网络药理学和代谢组学探讨青梅感冒颗粒治疗 SARS-CoV-2 假病毒感染的作用

张希宁¹, 吴振起^{2,3*}, 刘光华^{1*}, 唐 思², 杨 瑞², 张天宇¹, 武美彤¹, 于雪洁¹, 赵奚玉¹, 赵 烜¹

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110032; 2. 辽宁中医药大学附属第二医院, 辽宁 沈阳 110034; 3. 沈阳市中医外感病重点实验室, 辽宁 沈阳 110034)

摘要：**目的** 利用网络药理学联合 LC-MS 代谢组学技术探讨青梅感冒颗粒干预 SARS-CoV-2 假病毒感染 hACE2 转基因小鼠的调控机制。**方法** 基于青梅感冒颗粒的活性成分及其调控 SARS-CoV-2 假病毒感染的潜在靶点进行生物信息学方法预测，将 hACE2 转基因小鼠分为正常组、模型组和青梅感冒颗粒低、中、高剂量组（1.95、3.90、5.85 g/kg）进行干预，HE 染色观察肺组织形态，ELISA 法检测血清白细胞介素（IL）-6、IL-10、肿瘤坏死因子 α（TNF-α）水平。通过 PLS-DA 对小鼠血清代谢组学进行分析，筛选差异代谢物及富集通路，联合网络药理学和分子对接技术，进行关联分析，选取 PI3K/Akt 信号通路进行验证。**结果** 筛选出青梅感冒颗粒干预 SARS-CoV-2 感染的交集靶点共 96 个，KEGG 富集得到 177 条通路。动物实验发现，与正常组比较，模型组 IL-6、TNF-α 水平升高（ $P<0.01$ ），IL-10 水平降低（ $P<0.01$ ），肺泡形态不完整，有炎性渗出；与模型组比较，青梅感冒颗粒干预后肺组织病变均有不同程度减轻，高剂量组 IL-6、TNF-α 水平降低（ $P<0.01$ ），IL-10 水平升高（ $P<0.01$ ）。代谢组学 PCA 与 PLS-DA 结果显示，正常组、模型组与青梅感冒颗粒高剂量组之间代谢物有差异（ $P<0.01$ ），差异代谢物中共有 28 种下调，15 种上调，网络药理学及代谢组学富集到 PI3K/Akt 等信号通路。实验验证发现，与正常组比较，模型组肺组织 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达与 *PI3K*、*Akt* mRNA 表达均升高（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，青梅感冒颗粒高剂量组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达与 *PI3K*、*Akt* mRNA 表达均降低（ $P<0.01$ ）。**结论** 青梅感冒颗粒具有抗 SARS-CoV-2 感染的作用，其可能通过调控 PI3K/Akt 信号通路抑制炎症反应，影响机体代谢，发挥免疫调节作用。

关键词：青梅感冒颗粒；SARS-CoV-2 感染；网络药理学；代谢组学；炎症反应；免疫调节；PI3K/Akt 信号通路

中图分类号：R285.5；R966 **文献标志码：**B **文章编号：**1001-1528(2025)08-2774-09

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2025.08.047

新型冠状病毒（SARS-CoV-2）感染是一种急性呼吸道
传染性疾病，大多表现为咳嗽、发热、鼻塞、咽痛、乏力
等症状，严重或将引起急性呼吸窘迫综合征、休克等危及
生命^[1]，在世界范围内暂无方法对 SARS-CoV-2 免疫^[2]。
SARS-CoV-2 通过 ACE2 受体侵入靶细胞^[3-4]，使炎性细胞
积聚，机体各器官出现缺氧、高凝和微血栓状态，易出现
疲劳、乏力、呼吸困难等后遗症^[5]。SARS-CoV-2 感染的治
疗一般以抗病毒、抗感染、对症处理等为主，但疗效有限
且存在一定不良反应^[6]。

中医药具有多组分、多靶点等优势^[7]。SARS-CoV-2 感

收稿日期：2024-11-07

基金项目：国家自然科学基金面上项目（81373687，81874490，82074494）

作者简介：张希宁（1998—），女，硕士生，研究方向为中医药防治感染性疾病。Tel: 15841339043, E-mail: 815081891@qq.com

* 通信作者：吴振起（1974—），男，博士，研究方向为中医药防治感染性疾病。Tel: 18102456617, E-mail: zhenqiwu@163.com

染属中医“湿毒疫”范畴，感受“疫戾”之气而发，病位主要在肺，以“湿、毒、瘀、虚”为基本病机特点。可以通过中药、中成药联合针灸、推拿等多种方式防治^[8-9]。青梅感冒颗粒主要成分为青蒿、五指柑、香薷、狗肝菜、甘草、积雪草和岗梅，起源于广东“凉茶”，具有清热解表，化湿解毒之功效，常用于治疗发热、咳嗽、头痛等症状。本研究利用生物信息学、代谢组学结合动物实验验证探讨青梅感冒颗粒抗 SARS-CoV-2 感染的可能作用机制，以期为临床研究提供一定的实验基础参考。

1 材料与方法

1.1 网络药理学

1.1.1 青梅感冒颗粒干预 SARS-CoV-2 感染关键靶点的筛选 借助 TC MSP 数据库 (<https://old.tcmssp-e.com/tcmssp.php>) 获取青梅感冒颗粒主要成分的作用靶点，利用 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 获得上述筛选得到的标准化基因名称。利用 OMIM 数据库 (<https://omim.org/>) 和 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 以“COVID-19”及“novel coronavirus pneumonia”为关键词进行 SARS-CoV-2 感染相关的疾病靶点检索。将青梅感冒颗粒关键靶点与 SARS-CoV-2 感染关键靶点输入到韦恩图绘图工具 Venny 2.1.0 (<https://bioinfo.gp.cnic.ac.cn/tools/venny/index.html>)，得到共同靶点将其作为青梅感冒颗粒治疗 SARS-CoV2 感染的关键靶点，并绘图进行可视化展示。

1.1.2 蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络的构建 将交集靶点基因导入 STRING 网站 (<https://cn.string-db.org/>)，设置 minimum required interaction score 为 medium confidence (0.400)，选择物种为“*Homo sapiens*”，删除离节点，预测各基因间相互联系。

1.1.3 GO 和 KEGG 通路富集分析 将交集靶点输入 Metascape 网站 (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>)，物种设置为人类，设置富集分析的筛选阈值为 $P<0.01$ ，分别进行交集靶点的 GO 分析，包括生物学过程 (BP)、细胞定位 (CC) 和分子功能 (MF)，以及 KEGG 信号通路富集分析。将结果输入到微生信绘制 GO 富集分析柱状图和 KEGG 富集分析气泡图。

1.1.4 核心成分-靶点-通路网络构建 将青梅感冒颗粒活性成分、交集靶点和相关通路导入到 Cytoscape 3.7.0 软件，计算度值 (degree)，构建核心成分-靶点-通路网络，并进行可视化展示。

1.1.5 关键成分与核心靶点的分子对接验证 从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 和 Uniprot 数据库下载核心靶点的蛋白质三维结构数据，将筛选的关键成分和核心靶点信息输入 AutoDock Vina 软件，进行分子对接。

1.2 动物实验

1.2.1 实验动物及病毒 SPF 级 K18-hACE2 转基因小鼠，体质量 (20 ± 2) g。由江苏集萃药康生物科技股份有限公司 [SCXK (苏) 2018-0008] 在 C57BL/6 品系基础上进行

构建，由辽宁长生生物技术股份有限公司 [SCXK (辽) 2020-0001] 进行代繁代育，于辽宁中医药大学实验动物中心分笼饲养。饲养小鼠的食物及饮用水需灭菌后使用。饲养环境温度 $(21\pm 2)^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度 $(52\pm 3)\%$ ，明暗周期 12 h/12 h。假病毒订购于和元生物技术 (上海) 股份有限公司，涉及假病毒相关实验于辽宁中医药大学附属医院病毒实验室进行。所有实验均符合辽宁中医药大学实验伦理学要求 (审批号 21000042022041)。

1.2.2 药物、试剂和仪器 青梅感冒颗粒 (广东香山堂制药有限公司，国药准字 Z20027122)，依据青梅感冒颗粒说明书用法用量，折算出小鼠用药剂量，青梅感冒颗粒低、中、高剂量组分别为 1.95、3.90、5.85 g/kg。

异氟烷 (深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司，批号 R510-22-10)；甲醇、乙腈 (分析纯，美国 Honeywell 公司，批号 AH230、AH015-4)；甲酸 (分析纯，德国 Merck 公司，批号 1.00264)。HE 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司，批号 G1121)；小鼠 IL-6、IL-10、TNF- α ELISA 试剂盒 (欣博盛生物科技有限公司，批号 EMC004.96、EMC005.96、EMC102a.96)；GAPDH 抗体、Akt 抗体、p-Akt 抗体 (美国 Proteintech 公司，批号 60004-1-Ig、10176-2-AP、66444-1-Ig)；p-PI3K 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司，批号 bs-3332R)；PI3K 抗体 (英国 Abcam 公司，批号 ab182651)。

TP1020 自动组织脱水处理机、EG1150 石蜡包埋机、RM2235 手动石蜡切片机 (德国 Leica 公司)；LJH-4 双人超净工作台 (环中科技有限公司)；Biofuge 28RS 低温高速离心机 (美国 Heraeus 公司)；A110132 功能酶标仪、1645052 高压电泳仪电源 (美国 Bio-Rad 公司)；7500 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司)；5200 Tanon 化学发光成像系统 (上海天能科技有限公司)；NW10LVF 超纯水系统 (香港力康生物医疗科技控股有限公司)；UPLC 型超高效液相色谱仪与 XevoG2-XS-Q-TOF、UPLC BEH C_{18} 色谱柱 $(2.1\text{ mm}\times 100\text{ mm}, 1.7\text{ }\mu\text{m})$ (美国 Waters 公司)。

1.2.3 动物分组、造模及干预 40 只小鼠随机分为正常组、模型组、青梅感冒颗粒低、中、高剂量组，每组 8 只。各组小鼠异氟烷麻醉后，正常组小鼠滴鼻不含目的蛋白的空载假病毒，其余各组小鼠移液器滴鼻 $50\text{ }\mu\text{L }1\times 10^9\text{ PFU/mL}$ 的假病毒，建立假病毒感染小鼠模型。造模成功后，正常组和模型组灌胃给予生理盐水；青梅感冒颗粒低、中、高剂量组灌胃给予青梅感冒颗粒溶液，每次 0.2 mL，每天 1 次，连续 7 d。第 7 天给药后小鼠禁水、禁食，4 h 后取全血及肺组织。

1.2.4 组织学形态观察 肺组织经多聚甲醛固定，脱水，石蜡包埋后切成厚度约 $5\text{ }\mu\text{m}$ 的切片，待 HE 染色后进行观察。通过生物显微镜拍摄图片，记录各组小鼠肺组织的病理学变化特征，并对其进行病理学评估。

1.2.5 ELISA 法检测小鼠血清 IL-6、IL-10、TNF- α 水平 各组小鼠全血高速离心后取上层血清，冷冻保存备用。按

照 ELISA 试剂盒说明书步骤操作，检测小鼠血清 IL-6、IL-10、TNF- α 水平。

1.2.6 血清非靶向代谢组学分析 选取正常组、模型组和青梅感冒颗粒高剂量组进行代谢组学检测。

1.2.6.1 样本制备 小鼠血液样本在冰上静置 1 h 后，4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min 离心 15 min，小心吸取上层血清转移至 EP 管中，于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待测。取血清于-4 $^{\circ}\text{C}$ 下复融，各组血清取 70 μL 分装于 1.5 mL EP 管中，加入 80% 甲醇 280 μL ，涡旋振荡后于冰中静置 5 min，15 000 $\times g$ 离心 20 min，小心吸取上层清液，每组样本取 55 μL 等量清液混匀制作成 QC 样本，各组样本取清液 100 μL 放入进样瓶中进行液相色谱-质谱（LC-MS）分析。

1.2.6.2 色谱条件 UPLC BEH C_{18} 色谱柱（2.1 mm $\times$ 100 mm，1.7 μm ）；正离子流动相 0.1% 甲酸（A）-甲醇（B）；负离子流动相 5 mmol/L 醋酸铵（pH 9.0）（A）-甲醇（B），梯度洗脱（0~1.5 min，2% B；1.5~3 min，2%~85% B；3~10 min，85%~100% B；10~10.1 min，100% B~98% A；10.1~12 min，98% A）；体积流量 0.2 mL/min；柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量 2 μL 。

1.2.6.3 质谱条件 电喷雾离子源（ESI），正、负离子扫描；扫描范围 m/z 100~1 500；喷雾电压 3.5 kV；鞘气 35 psi（1 psi=6.895 kPa）；辅助气体积流量 10 L/min；离子传输管温度 320 $^{\circ}\text{C}$ ；离子导入射频电平 60；辅助气加热器温度 350 $^{\circ}\text{C}$ ；MS/MS 二级扫描为数据依赖性扫描。

1.2.6.4 数据分析 LC-MS 原始数据导入 Progenesis Q1 代谢组学处理软件中进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐，最终得到保留时间、质荷比和峰强度的数据矩阵，同时将 MS 和 MS/MS 质谱信息与代谢公共数据库 HMDB 得到代谢物信息。预处理后的数据矩阵进行主成分分析（PCA）和偏最小二乘判别分析（PLS-DA）。差异代谢物的选择基于 PLS-DA 模型得到的变量权重值（VIP）和 Student's t 检验 P 值来确定，VIP>1， $P<0.05$ 的代谢物为差异代谢物。差异代谢物通过 KEGG 数据库进行代谢通路注释，获得差异代谢物参与的通路。

1.3 实验验证

1.3.1 RT-qPCR 法检测小鼠肺组织 *PI3K*、*Akt* mRNA 表达 将各组小鼠肺组织制作匀浆液，提取总 RNA，测定其浓度，反转录合成 cDNA，配制扩增反应体系，于 PCR 仪中进行 PCR 扩增。反应结束后进行扩增曲线分析，获得各检测样本的 C_t 值。以 *GAPDH* 为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对定量计算。引物由宝生物工程（大连）有限公司合成，序列见表 1。

1.3.2 Western blot 法检测肺组织 *PI3K*、*Akt*、p-*PI3K*、p-*Akt* 蛋白表达 取各组小鼠肺组织，使用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液进行肺组织裂解，提取总蛋白，应用 BCA 法测定蛋白浓度并调整为统一浓度，并进行蛋白变性，冷冻保存备用。采用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白，湿转法转移至 PVDF 膜上，于 8% 奶粉溶液中室温封

表 1 引物序列

基因	引物序列
<i>GAPDH</i>	正向 5'-AAATGCTGAAGGTCGGTGTGAAC-3'
	反向 5'-CAACAATCTCCACTTTGCCACTG-3'
<i>PI3K</i>	正向 5'-ACTGTAGCCAACAACAGCATGAA-3'
	反向 5'-AAGGTCCCATCAGCAGTGTCTC-3'
<i>Akt</i>	正向 5'-TGAGGTTGCCACACGCCTA-3'
	反向 5'-CCCCTTGGCATACTCCATGAC-3'

闭 2 h，加一抗 *PI3K*（1：6 000）、p-*PI3K*（1：1 000）、*Akt*（1：10 000）、p-*Akt*（1：10 000）、*GAPDH*（1：40 000）4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日用 TBST 洗膜 3 次，加入二抗（1：10 000）室温孵育 1 h，TBST 洗膜 3 次后滴加 ECL 发光液曝光，保存图片，通过 Image J 软件分析条带灰度值，以 *GAPDH* 为内参，计算蛋白相对表达量。

1.4 统计学分析 通过 GraphPad Prism 9.5 软件进行处理，计量资料以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，符合正态分布和方差齐性，组间比较采用方差分析。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 青梅感冒颗粒干预 SARS-CoV-2 感染关键靶点筛选 筛选得到青梅感冒颗粒主要成分 119 种，潜在靶点 257 个；筛选得到 SARS-CoV-2 感染疾病靶点 680 个。绘制成分靶点与疾病靶点交集韦恩图，取交集后共得到 96 个共有靶点，见图 1。

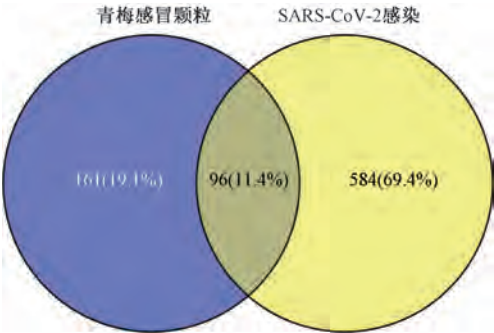


图 1 青梅感冒颗粒干预 SARS-CoV2 感染关键靶点韦恩图

2.2 PPI 网络构建 将筛选得到的 96 个共有靶点导入 STRING 数据库，构建 PPI 网络图，见图 2。每个参与互作的节点用一个圆形表示，圆形面积越大，其度值越大。度值排序前 10 位的核心基因分别为 TNF、Akt1、IL6、IL1B、JUN、TP53、HIF1A、STAT3、MMP9。推测它们是青梅感冒颗粒治疗 SARS-CoV-2 感染的潜在核心靶点。

2.3 GO 功能富集分析与 KEGG 通路分析 共得到 1 911 条 GO 富集结果，其中 BP 主要涉及细胞迁移的正调控（positive regulation of cell migration）、对活性氧的反应（response to reactive oxygen species）、对细菌来源分子的反应（response to molecule of bacterial origin）等；CC 主要涉及膜筏（membrane raft）、内质网内腔（endoplasmic reticulum lumen）、转录调节复合体（transcription regulator complex）等；MF 主要涉及激酶结合（kinase binding）、细



图 2 PPI 网络

胞因子受体结合（cytokine receptor binding）、泛素样蛋白连接酶结合（ubiquitin-like protein ligase binding）等过程，见图 3。KEGG 富集得到糖尿病并发症 AGE-RAGE 信号通路（AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications）、PI3K-Akt 信号通路（PI3K-Akt signaling pathway）等 177 条通路。选取富集程度最高的 20 条 KEGG 通路展示，见图 4。

2.4 “核心成分-靶点-通路”网络构建 “核心成分-靶点-通路”网络中共有 291 个节点（包括药物名称 1 个，核心成分 20 个，共有靶点 81 个，通路 20 个），见图 5，提示青梅感冒颗粒可能通过多成分、多靶点、多途径发挥治疗 SARS-CoV-2 感染的作用，其中槲皮素、山柰酚、木犀草素、7-甲氧基-2-甲基异黄酮、芒柄花黄素等成分可能为潜

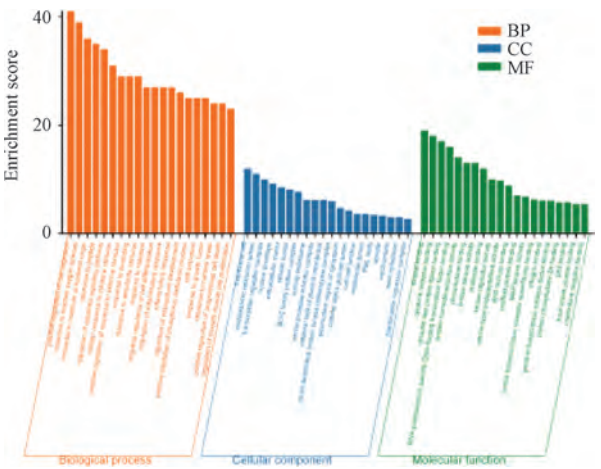


图 3 GO 功能富集

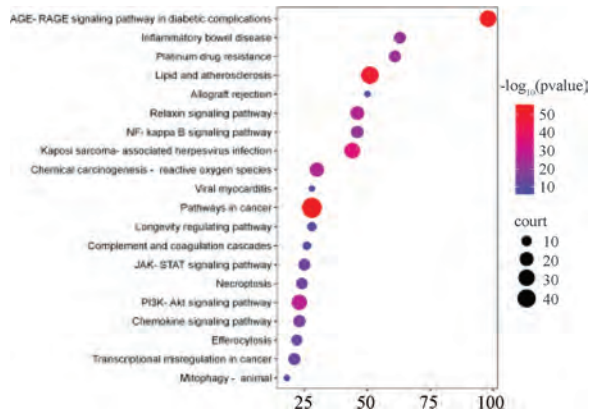


图 4 KEGG 通路

在活性成分，TNF、Akt1、IL6、IL1B、JUN 等可能为潜在关键靶点。

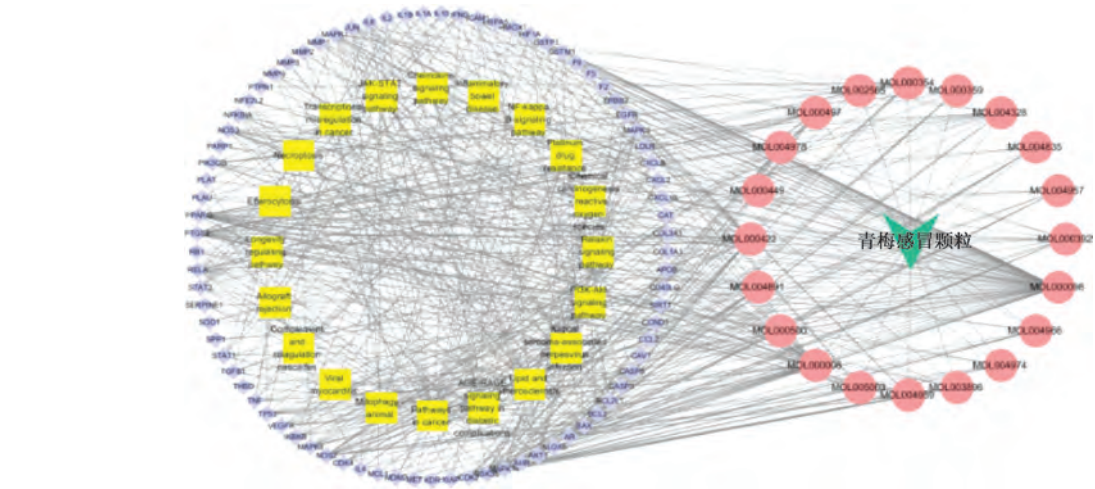


图 5 “核心成分-靶点-通路”网络

2.5 关键成分与核心靶点的分子对接验证 对关键成分与核心靶点蛋白进行分子对接，结合能越小说明成分与靶点越易结合，见图 6。选择 5 个结合能较低的成分绘制分子对

接过程，见图 7。关键成分与核心靶点的结合能均小于-5 kcal/mol，以上结果充分说明关键成分与核心靶点结合较为紧密，生物亲和力较高，具有良好的药效活性。

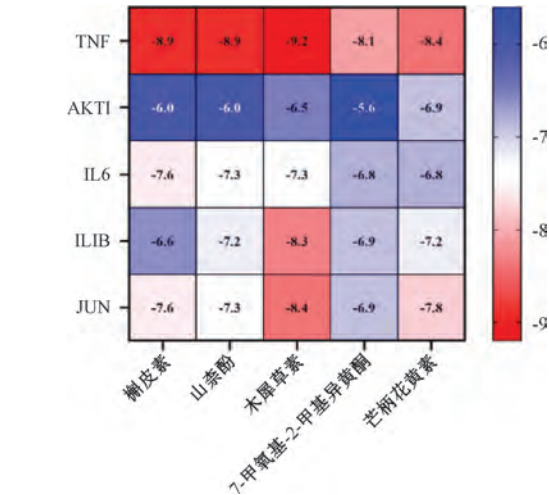


图 6 分子对接结合能

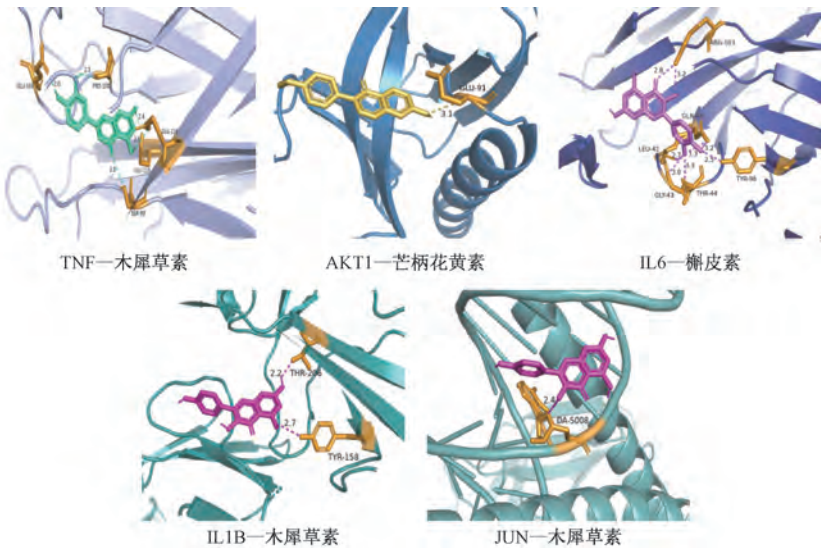
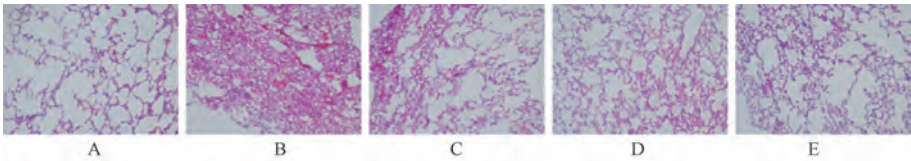


图 7 分子对接示意



注：A 为正常组，B 为模型组，C~E 分别为青梅感冒颗粒低、中、高剂量组。

图 8 各组小鼠肺组织病理学变化（HE 染色，×200）

子水平的变化较青梅感冒颗粒低、中剂量组更明显（ $P<0.01$ ），见表 2。故选取该组进行血清代谢组学检测。

表 2 各组小鼠血清中 IL-6、IL-10、TNF-α 水平比较（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=6$ ）

分组	IL-6/(pg·L ⁻¹)	IL-10/(pg·L ⁻¹)	TNF-α/(pg·L ⁻¹)
正常组	35.87±13.53	81.15±3.70	154.11±23.16
模型组	103.86±7.28**	30.91±8.21**	329.51±2.26**
青梅感冒颗粒低剂量组	99.88±20.21	34.12±5.22	311.71±13.41
青梅感冒颗粒中剂量组	74.01±1.41##	38.41±6.63	299.48±27.78
青梅感冒颗粒高剂量组	70.10±10.18##	44.72±6.32##	275.30±70.66##

注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ 。

2.8 血清代谢组数据 PCA 分析与 PLS-DA 分析 PCA 分析显示，正常组、模型组与青梅感冒颗粒高剂量组样本代谢

2.6 青梅感冒颗粒对 SARS-CoV-2 感染 hACE2 转基因小鼠肺组织形态学的影响 正常组小鼠肺组织结构维持正常状态，未见组织病理学改变；模型组小鼠肺组织呈现出上皮细胞损伤伴出血现象，肺泡形态结构遭到破坏，且伴有少量炎性细胞的浸润；青梅感冒颗粒各剂量组小鼠肺组织病理变化均得到了不同程度缓解和改善，具体表现为出血情况减轻，以及炎性细胞的渗出量减少，以青梅感冒颗粒高剂量组的缓解与改善最为明显，见图 8。

2.7 青梅感冒颗粒对 SARS-CoV-2 感染 hACE2 转基因小鼠血清 IL-6、IL-10、TNF-α 水平的影响 小鼠造模后，模型组小鼠血清中 IL-6、TNF-α 水平较正常组升高（ $P<0.05$ ），IL-10 水平下降（ $P<0.05$ ）；青梅感冒颗粒干预后，青梅感冒颗粒各剂量组小鼠血清 IL-6、TNF-α 水平较模型组均下降，IL-10 水平均升高，青梅感冒颗粒高剂量组血清炎症因

成分呈现分离趋势，说明 3 组存在差异，见图 9。PLS-DA 分析显示，正常组、模型组与青梅感冒颗粒高剂量组分离

明显，聚集程度和分类效果较好，说明血清代谢物在 3 组之间存在着差异，见图 10。通过 200 次置换检验对 PLS-DA 模型进行统计验证，置换检验负离子模式 Q^2 为 -0.948 7，

正离子模式 Q^2 为 -0.835 4，截距小于 0 表明模型稳健可靠，未发生过拟合，见图 11。

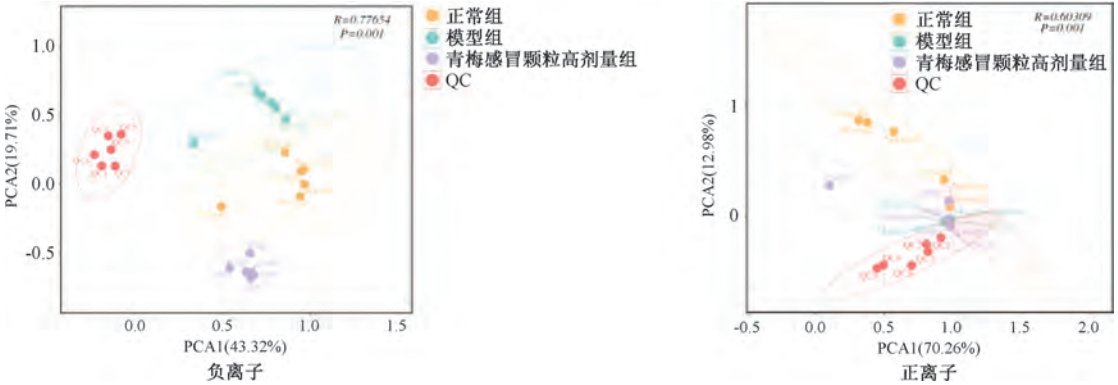


图 9 PCA 评分图

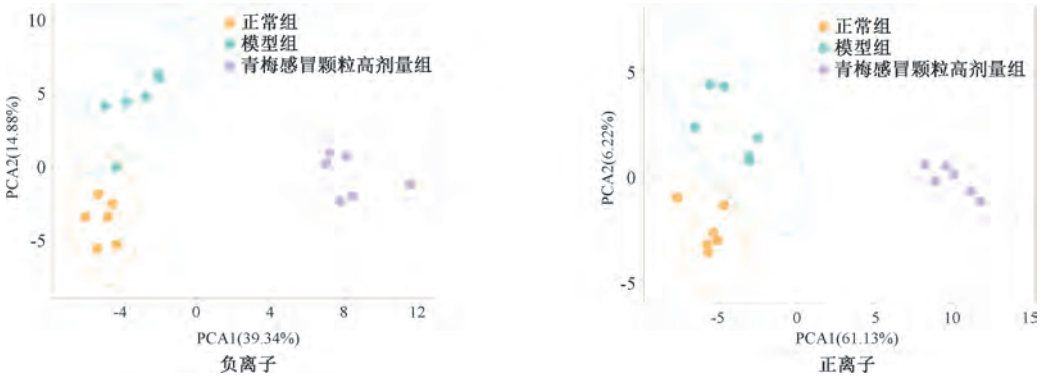


图 10 PLS-DA 图

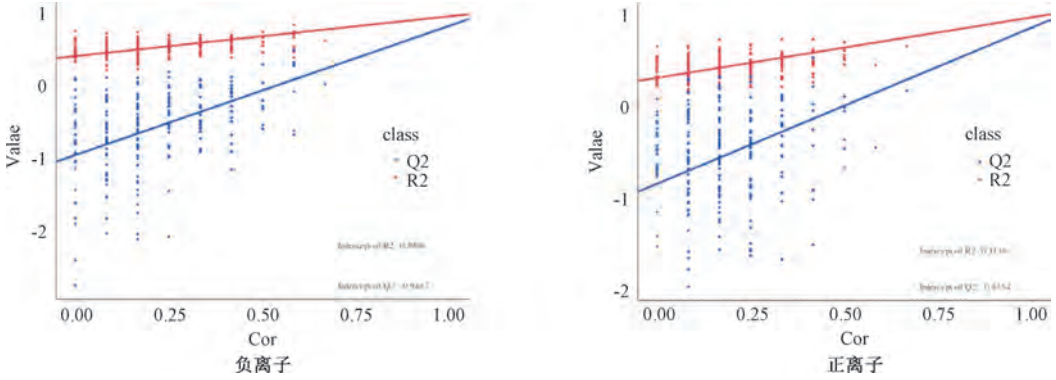


图 11 置换检验

2.9 血清差异物代谢筛选 依据 PLS-DA 模型，以 $VIP>1$ 且 $P<0.05$ 为标准进行组间差异代谢物的筛选。负离子模式下，共筛选出变化趋势相反的差异代谢物差异代谢物 32 个，其中 22 个下调，10 个上调；正离子模式下，共筛选出变化趋势相反的差异代谢物 11 个，其中 6 个下调，5 个上调。对筛选出的差异代谢物绘制聚类热图，见图 12。

2.10 血清代谢通路富集分析 将差异代谢物进行代谢通路富集分析，发现青梅感冒颗粒主要影响的血清代谢通路包括视黄醇代谢 (retinol metabolism)、抗坏血酸和醛缩酯代谢 (ascorbate and aldarate metabolism)、戊糖和葡萄糖醛

酸相互转化 (pentose and glucuronate interconversions)、脂肪酸降解 (fatty acid degradation)、脂肪酸延长 (fatty acid elongation)、泛醌和其他萜类醌生物合成 (ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis)、果糖和甘露糖代谢 (fructose and mannose metabolism) 等，见图 13。

2.11 药物-疾病-代谢物共同靶点及 KEGG 富集分析 获得差异代谢物靶点 676 个，与青梅感冒颗粒关键靶点、SARS-CoV-2 感染关键靶点的共同靶点共 58 个，见图 14。通过 KEGG 富集分析得到糖尿病并发症 AGE-RAGE 信号通路 (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、脂

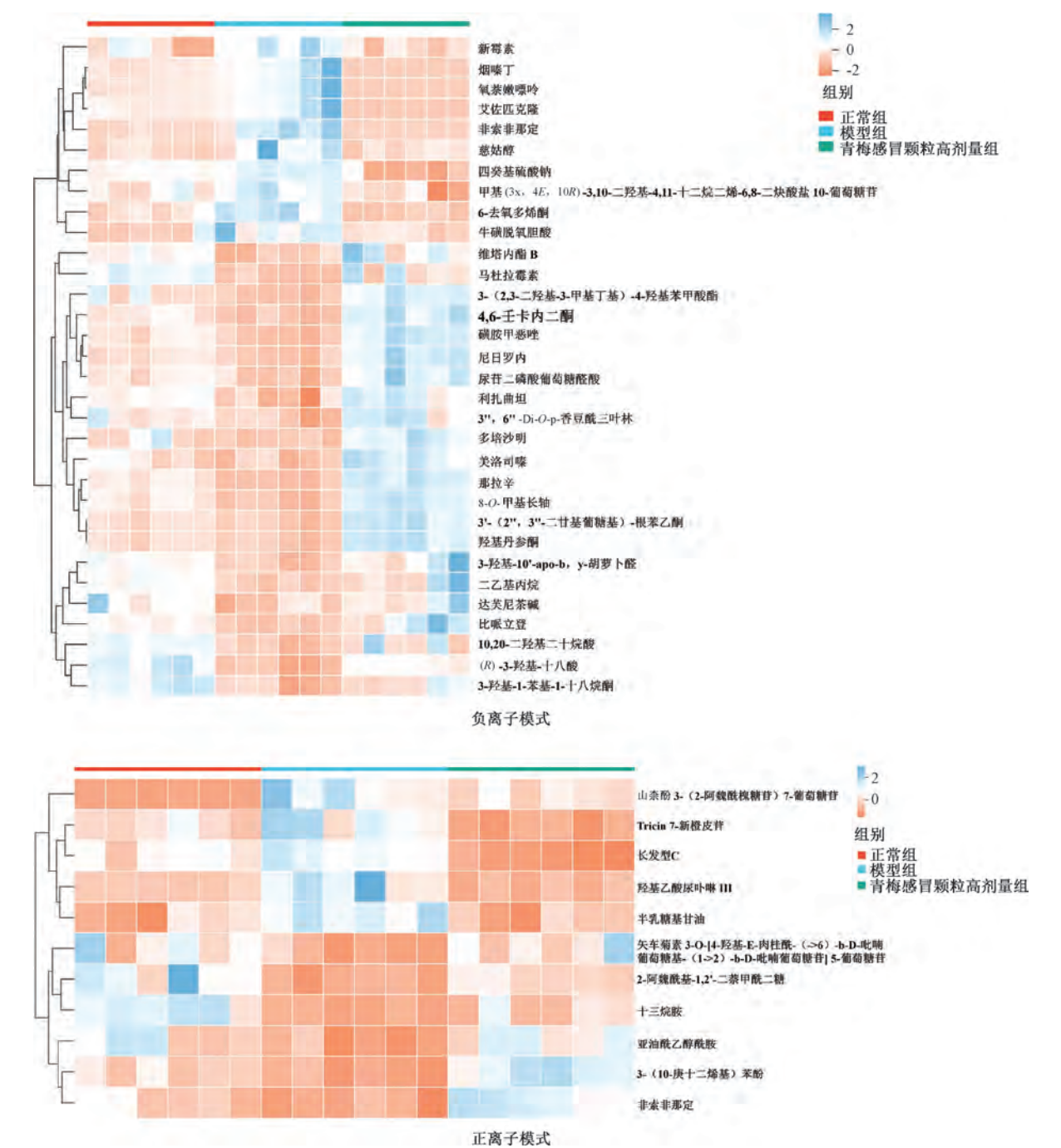


图 12 差异代谢物聚类热图

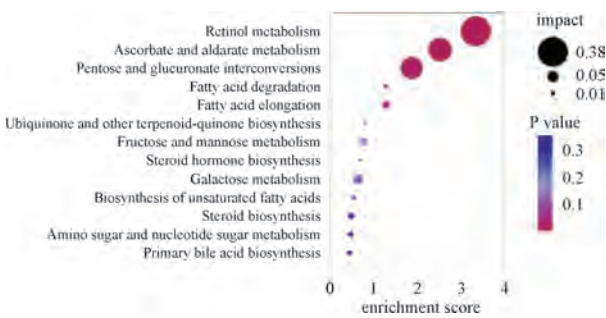


图 13 代谢通路富集

质与动脉粥样硬化 (lipid and atherosclerosis)、PI3K-Akt (PI3K-Akt signaling pathway)、NF- κ B (NF-kappa B signaling pathway)、细胞衰老 (cellular senescence)、细胞清除 (efferocytosis) 等信号通路, 见图 15。

2. 12 青梅感冒颗粒对 SARS-CoV-2 感染 hACE2 转基因小鼠肺组织 *PI3K*、*Akt* mRNA 表达的影响 与正常组比较, 模型组小鼠肺组织 *PI3K*、*Akt* mRNA 升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 青梅感冒颗粒各剂量组小鼠肺组织 *PI3K*、*Akt* mRNA 表达降低 ($P<0.01$), 见表 3。

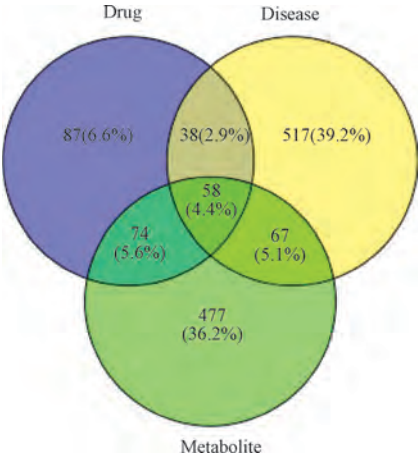


图 14 药物-疾病-代谢物共同靶点

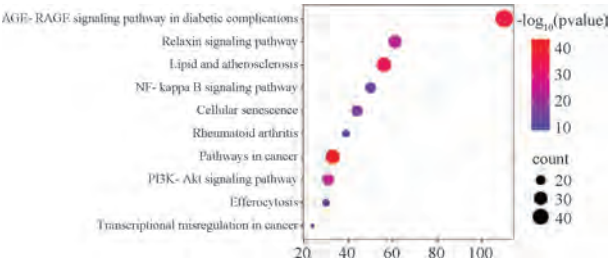


图 15 药物-疾病-代谢物共同靶点 KEGG 富集

表 3 各组小鼠肺组织 *PI3K*、*Akt* mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	<i>PI3K</i> mRNA	<i>Akt</i> mRNA
正常组	1.00±0.11	1.00±0.07
模型组	1.87±0.10**	1.33±0.03**
青梅感冒颗粒低剂量组	0.47±0.02##	0.73±0.02##
青梅感冒颗粒中剂量组	0.32±0.04##	0.38±0.02##
青梅感冒颗粒高剂量组	0.27±0.01##	0.19±0.01##

注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ 。

2.13 青梅感冒颗粒对 SARS-CoV-2 感染 hACE2 转基因小鼠肺组织 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达的影响 与正常组比较，模型组小鼠肺组织 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达均升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，青梅感冒颗粒中、高剂量组小鼠肺组织 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达降低 ($P<0.01$)，青梅感冒颗粒低剂量组小鼠肺组织 p-Akt/Akt 蛋白表达降低 ($P<0.05$)，见图 16、表 4。

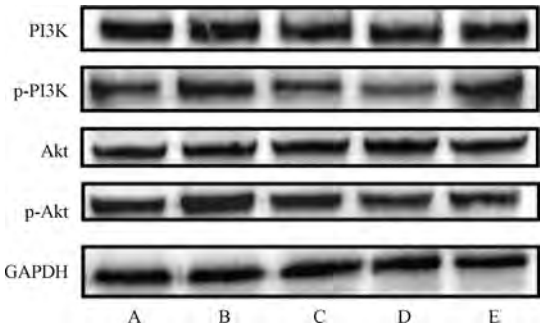
表 4 各组小鼠 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt
正常组	1.00±0.04	1.00±0.05
模型组	1.26±0.01**	1.23±0.05**
青梅感冒颗粒低剂量组	1.20±0.05	1.09±0.01#
青梅感冒颗粒中剂量组	1.12±0.04##	1.07±0.06##
青梅感冒颗粒高剂量组	1.06±0.04##	1.04±0.05##

注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

3 讨论

SARS-CoV-2 感染具有反复性、传染性强、长新冠等特



注：A 为正常组，B 为模型组，C~E 分别为青梅感冒颗粒低、中、高剂量组。

图 16 各组小鼠 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白条带图

点，主要表现为咳嗽、发热、乏力等症状，中医认为 SARS-CoV-2 感染属“湿毒疫”范畴，以“湿、毒、瘀、虚”为基本病机特点，治疗以逐秽解毒为贯穿始终基本治则，同时兼以清热化湿，扶正固本^[10-11]。青梅感冒颗粒由青蒿、五指柑、香薷、狗肝菜、积雪草、岗梅、甘草组成，青蒿、岗梅、狗肝菜为方中清熱解毒主药，香薷祛風解表，化湿和中，积雪草清熱化湿解毒，五指柑祛痰止咳平喘，甘草缓急止痛，诸药合用清熱解表、化湿解毒，具有抗病毒、降血糖血脂、解热镇痛等作用^[12-13]。

青梅感冒颗粒主要活性成分有槲皮素、山柰酚、木犀草素等，干预 SARS-CoV-2 感染与 TNF、Akt1、IL6、IL1B、HIF1A 等相关。槲皮素是抑制多种 SARS-CoV-2 关键蛋白酶的潜在成分^[14]。山柰酚作为 SARS-CoV-2 RdRp 的稳定抑制剂，有良好的抗病毒特性^[15]。木犀草素通过抑制 S 蛋白诱导的血小板扩散抑制 S 蛋白与 ACE2 的结合^[16]。TNF-α 的高表达刺激肺组织产生活性氧加重氧化应激，促进 HIF-1α 表达，促进 SARS-CoV-2 感染^[17]，随后激活的促炎和促氧化转录因子及蛋白大量增多，通过共同刺激增加 IL-6、IL-1β 等炎症因子的表达^[18]，因此控制 TNF-α 表达可防治肺损伤的发生^[19]。筛选出的差异代谢物可能是青梅感冒颗粒干预 SARS-CoV-2 感染的潜在生物标志物，涉及视黄醇、糖类和脂肪酸代谢等。过量的脂肪酸会导致 ACE2 的高表达，促进病毒感染^[20]，抑制脂肪酸的合成，增强脂肪酸的降解和代谢，能够有效阻断 SARS-CoV-2 的复制^[21]。

网络药理学展现中药多成分、多靶点、多途径的特点^[22]，代谢组学通过药物-差异代谢物-代谢途径探索中药复方机制，但具有异质性、复杂性等局限^[23]，本研究联合分析，获得 PI3K-Akt、NF-κB 等信号通路可能是青梅感冒颗粒抗 SARS-CoV-2 感染的可能机制。磷脂具有调节局部免疫和炎症反应、降低肺泡表面张力，保持肺泡液平衡作用^[24]。PI3K 是一个重要的磷脂转化调节器，激活控制细胞活动的 Akt 信号传导。PI3K/Akt 信号通路是抗 SARS-CoV-2 感染的潜在靶点，也是预防细胞因子风暴、呼吸并发症和凝血并发症的靶点^[25]。研究表明，PI3K/Akt 信号通路参与多种生物功能，信号分子包括接头蛋白、激酶及 G 蛋白偶联受体，均具备激活 PI3K 的能力，并触发磷酸化级联反

应。PI3K 催化位于细胞膜内层的 PIP2 磷酸化，生成 PIP3。PIP3 作为第二信使，招募细胞内的 PDK1 和 Akt 蛋白至质膜区域。PDK1 通过磷酸化作用部分激活 Akt，完成信号转导。活化的 Akt 诱导炎症因子的表达，使大量的炎症细胞浸润、聚集在炎症部位，加速炎症的发生发展^[26-27]。本研究发现，青梅感冒颗粒干预后 IL-6、TNF- α 水平降低，IL-10 水平升高；肺组织中 *PI3K*、*Akt* mRNA 表达和 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比值均降低，肺组织病变损伤较模型组减轻，炎性渗出、出血减少。

综上所述，本研究通过网络药理学联合非靶向代谢组学分析及实验验证对青梅感冒颗粒干预 SARS-CoV-2 感染的药效成分、潜在作用靶点、差异代谢物等进行研究，初步揭示了青梅感冒颗粒具有抗 SARS-CoV-2 感染的作用，其可能通过调控 PI3K/Akt 信号通路抑制炎症反应，影响机体代谢，发挥免疫调节作用。

参考文献：

[1] Xie N N, Zhang W C, Chen J, *et al.* Clinical characteristics, diagnosis, and therapeutics of covid-19: a review[J]. *Curr Med Sci*, 2023, 43(6) : 1066-1074.

[2] Wang C, Horby P W, Hayden F G, *et al.* A novel coronavirus outbreak of global health concern[J]. *Lancet*, 2020, 395 (10223) : 470-473.

[3] Jackson C B, Farzan M, Chen B, *et al.* Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(1) : 3-20.

[4] Ochani R, Asad A, Yasmin F, *et al.* COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. a comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management[J]. *Infez Med*, 2021, 29(1) : 20-36.

[5] Sinha N, Chawla M P S, Deepak D, *et al.* Post COVID-19 syndrome and new onset diseases: a prospective observational study[J]. *Singapore Med J*, 2023; SMJ-2022-055.

[6] Yang H, Rao Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(11) : 685-700.

[7] 郭 然, 曾 典, 胡裕涵, 等. 价值医疗视角下的中医药优势评价思路与方法[J]. *科技导报*, 2023, 41(14) : 14-21.

[8] Wasilewicz A, Bojkova D, Beniddir M A, *et al.* Molecular networking unveils anti-SARS-CoV-2 constituents from traditionally used remedies[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319 (Pt 2) : 117206.

[9] 邹吉宇, 王世文, 臧凝子, 等. 基于 CiteSpace 和 VOSviewer 知识图谱的中医药防治新型冠状病毒感染研究状况及趋势的可视化分析[J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42(12) : 11-14; 280-284.

[10] 苏右竹, 王 烁, 廖 星, 等. 中医药防治新型冠状病毒感染专家共识[J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42(10) : 251-258.

[11] 张馨月, 庞立健, 吕晓东, 等. 基于湿毒疫辨析 SARS-CoV-2

感染后神经系统病变[J]. *中华中医药学刊*, 2023, 41(12) : 12-18; 278.

[12] 梁 艳, 瞿水清, 李 玉, 等. 青蒿素及其衍生物对神经系统疾病的保护作用研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(23) : 292-299.

[13] 蔡家瀚, 翁浪仁, 齐 英, 等. 岗梅化学成分、药理作用及质量控制的研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42(3) : 24-35.

[14] Saakre M, Mathew D, Ravisankar V. Perspectives on plant flavonoid quercetin-based drugs for novel SARS-CoV-2[J]. *Beni Suef Univ J Basic Appl Sci*, 2021, 10(1) : 21.

[15] Medoro A, Benedetti F, Intrieri M, *et al.* Kaempferol as a novel inhibitor of SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase[J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2024, 11: 1-10.

[16] Zhu J, Yan H, Shi M, *et al.* Luteolin inhibits spike protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) binding to angiotensin-converting enzyme 2[J]. *Phytother Res*, 2023, 37(8) : 3508-3521.

[17] Tian M, Liu W, Li X, *et al.* HIF-1 α promotes SARS-CoV-2 infection and aggravates inflammatory responses to COVID-19 [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1) : 308.

[18] Tripathy A S, Vishwakarma S, Trimbake D, *et al.* Pro-inflammatory CXCL-10, TNF- α , IL-1 β , and IL-6: biomarkers of SARS-CoV-2 infection[J]. *Arch Virol*, 2021, 166 (12) : 3301-3310.

[19] Mukhopadhyay S, Hoidal J R, Mukherjee T K. Role of TNF α in pulmonary pathophysiology[J]. *Respir Res*, 2006, 7(1) : 125.

[20] Cano L, Desquilles L, Ghukasyan G, *et al.* SARS-CoV-2 receptor ACE2 is upregulated by fatty acids in human MASH[J]. *JHEP Rep*, 2024, 6(1) : 100936.

[21] Chu J, Xing C, Du Y, *et al.* Pharmacological inhibition of fatty acid synthesis blocks SARS-CoV-2 replication[J]. *Nat Metab*, 2021, 3(11) : 1466-1475.

[22] 张 琪, 常 久, 季巍巍, 等. 网络药理学在中医药领域的研究进展[J]. *中国中医药信息杂志*, 2024, 31(11) : 186-190.

[23] 徐 杨, 何芷绮, 刘晓凤, 等. 代谢组学在中药复方制剂领域的研究进展及面临的挑战[J]. *中草药*, 2024, 55(4) : 1354-1364.

[24] Karki P, Birukov K G. Oxidized phospholipids in healthy and diseased lung endothelium[J]. *Cells*, 2020, 9(4) : 981.

[25] Fattahi S, Khalifehzadeh-Esfahani Z, Mohammad-Rezaei M, *et al.* PI3K/Akt/mTOR pathway: a potential target for anti-SARS-CoV-2 therapy[J]. *Immunol Res*, 2022, 70(3) : 269-275.

[26] 李 梅, 王 丽, 夏亚飞, 等. 基于 PI3K/Akt/NF- κ B 通路探讨复方甘草酸苷对病毒性肺炎小鼠肺损伤的保护作用[J]. *中成药*, 2023, 45(11) : 3775-3779.

[27] 魏晨浩, 张秀英, 王雪峰, 等. 基于网络药理学及实验验证探讨定喘颗粒干预呼吸道合胞病毒肺炎机制研究[J]. *世界科学技术 (中医药现代化)*, 2023, 25(9) : 2996-3010.