

基于网络药理学和实验验证探讨强力五虎合剂对肺炎的抑制作用

王艳平, 裴琳秀, 苏晓娟, 李霞, 丁启, 李新爱, 田杰*, 王小龙, 陈菲
[宁夏回族自治区中医医院(宁夏回族自治区中医研究院), 宁夏回族自治区中药制剂创新工程技术研究中心, 宁夏医科大学附属自治区中医医院, 宁夏银川 750021]

摘要: 目的 探讨强力五虎合剂对肺炎的抑制作用。方法 运用 LC-MS 技术鉴定强力五虎合剂入肺化学成分。基于 TCMS 等数据库获取强力五虎合剂入肺作用靶点和肺炎疾病靶点信息; 采用 STRING 数据库和 Cytoscape 3.10.2 软件构建强力五虎合剂治疗肺炎的交集作用靶点和“药物-成分-靶点-疾病”网络图; 采用 Metascape 数据库对核心靶点进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析。采用 LPS 诱导 BEAS-2B 细胞, 构建肺炎损伤模型, CCK-8 法检测细胞存活率并筛选最佳给药剂量。细胞分为对照组、模型组和强力五虎合剂组, ELISA 法检测细胞上清液 TGF- β 、IL-6、IL-18、IL-1 β 水平; RT-qPCR 和 Western blot 法检测 TGF- β 、TLR4、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 及蛋白表达。结果 共鉴定出入肺成分 19 种。网络药理学分析得到强力五虎合剂与肺炎核心交集靶点 96 个, 主要涉及 Toll 样受体信号通路。细胞实验显示, 10% 含药血清为最佳给药剂量。与对照组比较, 模型组细胞上清液 TGF- β 、IL-6、IL-18、IL-1 β 水平升高 ($P < 0.01$), 细胞中 TGF- β 、TLR4、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 及蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 强力五虎合剂组细胞上清液 TGF- β 、IL-6、IL-18、IL-1 β 水平降低 ($P < 0.01$), 细胞中 TGF- β 、TLR4、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 及蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 强力五虎合剂能有效地治疗肺炎, 其作用可能与下调 TGF- β 、MyD88、NF- κ B p65 蛋白表达有关。

关键词: 强力五虎合剂; 肺炎; BEAS-2B 细胞; 网络药理学; LC-MS; TGF- β ; MyD88; NF- κ B p65

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)02-0676-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.02.046

支气管肺炎是儿童时期最常见的呼吸道疾病, 3 岁以下儿童为最主要的高发群体, 更是儿童死亡的主要病因之一^[1-2]。该病全年多发, 临床上以发热、咳嗽、痰鸣、气促、呼吸困难、肺部固定中细湿啰音为共同表现, 具有发病急、变化快、复发率高的特点^[3], 若治疗不及时或者治疗不当, 可能导致儿童呼吸衰竭甚至死亡^[4]。目前, 抗生素的过度使用导致患者出现多种副作用及细菌耐药性增加, 如肝、肾损害、二重感染、过敏等^[5], 使得西药对于肺炎的治疗越来越局限, 而中药治疗肺炎历史悠久, 且疗效良好、安全性较高。因此, 从传统中草药或中药复方中寻找安全有效的肺炎治疗药物, 是治疗儿童肺炎并减弱人们对抗生素依赖的一种有效策略。

强力五虎合剂是经宁夏回族自治区药品监督管理局批准注册的院内制剂, 主要由麻黄、苦杏仁、黄芩、桑白皮等 12 味中药组成, 临床研究发现该药在治疗小儿支气管肺炎方面具有显著疗效^[6]。

课题组前期对强力五虎合剂制备工艺、化学成分等进行了研究^[7-9], 但未对其机制进行探讨。因此, 本实验通过联合 LC-MS 和网络药理学技术, 并结合体外细胞实验验证, 进一步考察强力五虎合剂对肺炎的抑制作用, 以期为临床合理用药提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠 16 只, 3 月龄, 雄性, 体质量 (180~220) g, 购买并饲养于宁夏医科大学实验动物中心 [实验动物使用许可证号 SYXK(宁)2025-0001], 环境温度 (20 \pm 3) $^{\circ}$ C, 相对湿度 50% \pm 10%, 12 h/12 h 光/暗循环, 自主进食、饮水。本研究经宁夏医科大学实验动物使用与管理委员会批准 (伦理号 IACUC-NYLAC-2024-113)。

1.2 细胞 人肺支气管上皮细胞 BEAS-2B (批号 359274) 购自商城北纳创联生物科技有限公司, 细胞生长条件为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂, 常规培养至 5 代后进行实验。

收稿日期: 2025-10-14

基金项目: 2023 年中央引导地方科技发展资金项目 (2023FRD05039); 宁夏自然科学基金 (2023AAC03701, 2023AAC03702)

作者简介: 王艳平 (1968—), 女, 主任药师, 从事中药炮制及制剂研究。E-mail: 13895013806@163.com

* 通信作者: 田杰 (1969—), 男, 主任药师, 从事中药鉴定、中药炮制及制剂研究。E-mail: 13995080812@163.com

1.3 药物与试剂 强力五虎合剂购自宁夏回族自治区中医医院(宁夏回族自治区中医研究院)制剂中心,批号20240605。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, 美国MCE公司,批号HY-D1056);胎牛血清(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号SA230316);1%青霉素-链霉素双抗(北京索莱宝科技有限公司,批号240005011);DMEM培养基(美国Gibco公司,批号6124366);磷酸盐缓冲液(美国Invigentech公司,批号P9160420206);CCK-8细胞增殖检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号20240419);人白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-18、IL-1 β 、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,批号112750004141131127、112750004192611127、112750004136621127、112750004200821127);全蛋白提取试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号20240419-3);MyD88、NF- κ B p65、TGF- β 抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号7、16、10); β -actin、山羊抗兔IgG多克隆抗体(美国Affinity公司,批号3k58427、56j9958)。

1.4 仪器 电子分析天平(美国奥豪斯公司,型号DV215CD);多功能酶标仪(德国PerkinElmer公司,型号Enspire);荧光定量基因扩增仪(德国耶拿公司,型号qTOWER³G);高速冷冻离心机(美国Sigma公司,型号2-16KL);小型垂直电泳槽、小型转印电泳槽(北京伯兰特仪器设备有限公司,型号BV-4、BT-2)。

2 方法

2.1 分组与给药 将16只SD大鼠适应性喂养1周后,随机分为空白组和强力五虎合剂组,每组8只。强力五虎合剂组每天灌胃给予8.5 g/kg药液(相当于生药量1.05 g/mL,根据人与动物体表面积换算,成人体质量以70 kg计),空白组小鼠每天灌胃给予等体积生理盐水,连续7 d。末次给药2 h后,腹腔注射1%戊巴比妥钠溶液麻醉小鼠,腹主动脉取血并收集肺组织样本。血液静置2 h,4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min离心20 min,收集血清,保存备用;肺组织在液氮中速冻并转移至-80 $^{\circ}$ C冰箱中保存备用。

2.2 强力五虎合剂入肺组织化学成分分析

2.2.1 供试品溶液制备 称取(100 \pm 5) mg肺组织样品,加入280 μ L提取液(甲醇:水=4:1),含4种内标(0.02 mg/mL L-2-氯苯丙氨酸、D4-琥珀酸、13C6-葡萄糖、氘代亮氨酸),冷冻组织研

磨仪研磨6 min(-10 $^{\circ}$ C, 50 Hz),低温超声提取30 min(5 $^{\circ}$ C, 40 kHz)。样品于-20 $^{\circ}$ C静置30 min后,4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min离心15 min,取上清液,即得。另外,每个样本分别取20 μ L上清液,混合后作为质控样本。

2.2.2 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C₁₈(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m)色谱柱;流动相水(含2%乙腈及0.1%甲酸)(A)-乙腈(含0.1%甲酸)(B),梯度洗脱(0~0.5 min, 2% B; 0.5~3.5 min, 2%~25% B; 3.5~7.5 min, 25%~35% B; 7.5~11 min, 35%~50% B; 11~13 min, 50%~95% B; 13~14.4 min, 95% B; 14.4~14.5 min, 95%~2% B; 14.4~16 min, 2% B);体积流量0.4 mL/min;柱温40 $^{\circ}$ C;进样量3 μ L。

2.2.3 质谱条件 电喷雾离子源;正负离子扫描;扫描范围 m/z 70~1 050 Da;喷雾电压3 500、-3 000 V;鞘气、辅助气体积流量50、13 rab;加热温度、毛细管温度450、320 $^{\circ}$ C。

2.2.4 数据处理 原始数据导入软件Progenesis QI v3.0(美国Waters公司)进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐等,最终得到含保留时间、质荷比和峰强度等信息的数据矩阵。其后采用该软件进行特征峰搜库鉴定,将MS和MS/MS质谱信息与上海美吉生物医药科技有限公司自建中药专属代谢物数据库(MJBIOTCM)进行匹配,MS质量误差设置为小于 10×10^{-6} ,同时根据二级质谱匹配得分鉴定化学成分。

2.3 网络药理学分析

2.3.1 强力五虎合剂入肺成分靶点和肺炎疾病靶点筛选 将“2.2”项下得到的化学成分导入中药系统药理学数据库分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP)数据库(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php/>)、CTD数据库(<http://ctdbase.org/>)、Herb数据库(<https://herb.ac.cn/>),获取强力五虎合剂入肺成分的靶点信息,使用Uniprot数据库对靶点进行校正,去除重复和没有对应靶点的成分。此外,以“pneumonia”为关键词在OMIM数据库(<https://www.omim.org/>)、GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)和DisGeNET数据库(<https://www.disgenet.org/>)中搜集肺炎相关疾病靶点,汇总各数据库靶点并剔除重复值,得到肺炎相关的疾病靶点,利用Venny 2.1.0软件绘制韦恩图,得到强力

五虎合剂与肺炎的交集靶点，最后通过 Cytoscape 3.10.2 软件构建“药物-活性成分-靶点-疾病”网络图。

2.3.2 强力五虎合剂成分与肺炎核心预测蛋白相互作用 (PPI) 网络构建 将“2.3.1”项下的交集靶点提交至 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 以建立 PPI 网络，通过 Cytoscape 3.10.2 软件进一步可视化。

2.3.3 基因本体 (GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析 采用 Metascape 数据库收集 GO 与 KEGG 信息，将核心靶点导入“微生信”平台进行 GO 功能与 KEGG 通路富集分析，得到分子功能 (MF)、生物学过程 (BP)、细胞组分 (CC) 和相信号通路关，分析获得强力五虎合剂中入肺成分治疗肺炎的主要生物学过程和关键通路。

2.4 细胞炎症实验

2.4.1 强力五虎合剂含药血清制备 将“2.1”项下血清置于 56℃ 恒温水浴锅中灭活 30 min，0.22 μm 微孔滤过膜过滤除菌，分装后置于 -80℃ 冰箱保存备用。

2.4.2 细胞培养 BEAS-2B 细胞置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养，待细胞长至 80%~90% 时，进行 1:3 传代，每周传代 2~3 次。

2.4.3 肺炎损伤模型构建 取生长至 80% 左右的 BEAS-2B 细胞，消化收集，调整细胞密度为 5 000 个/孔，接种于 96 孔板中，于培养箱中培养 24 h，待细胞完全贴壁，以不同质量浓度 (0、1、5、10、25 μg/mL) LPS 分别作用于细胞 12、24 h 后，每孔加入 10 μL CCK-8 溶液，于培养箱中继续孵育 2 h，采用酶标仪测定 450 nm 波长处各孔光密度 (OD)，计算细胞存活率，公式为细胞存活率 = $[(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白对照组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白对照组}})] \times 100\%$ (实验组为不同浓度的 LPS 处理组，空白对照组为不含细胞的空白培养基组，对照组为含细胞的正常培养基组)。根据细胞存活率计算结果，筛选 LPS 最佳作用浓度及作用时间，以获得 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞肺炎损伤模型，以细胞存活率为 60% 左右为佳^[10-11]。

2.4.4 CCK-8 法检测细胞存活率 以“2.4.3”项下筛选得到的 LPS 给药剂量干预一定时间后，弃去原培养液，加入不同体积分数 (2.5%、5%、7.5%、10%) 的含药血清，同时设置正常血清对照组、模型组 (1 μg/mL LPS)，每孔设置 6 个复

孔。培养 24 h 后，CCK-8 法检测细胞活力，筛选最佳给药浓度用于后续实验。

2.4.5 ELISA 法检测细胞上清液 TGF-β、IL-6、IL-18、IL-1β 水平 根据“2.4.3”项下筛选得到的 LPS 给药剂量干预一定时间后，弃去原培养液，加入“2.4.4”项下筛选得到的最佳体积分数含药血清进行培养，同时设置对照组、模型组，每孔设置 6 个复孔，培养 24 h 后，吸取各组细胞上清液，按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作，检测 TGF-β、IL-6、IL-18、IL-1β 水平。

2.4.6 RT-qPCR 法检测细胞中 TGF-β、TLR4、MyD88、NF-κBp65 mRNA 的表达 TRIzol 法提取各处理组细胞总 RNA，将总 RNA 逆转录成 cDNA，再进行 RT-qPCR，根据 SYBR® Green Pro TaqHS qPCR Kit (Rox Plus) 试剂盒说明书操作，扩增程序为 95℃ 预变性 30 s；95℃ 变性 5 s，60℃ 退火/延伸 30 s，循环 40 次。以 β-actin 为内参，采用 2^{-ΔΔCT} 法计算目的基因相对表达量，引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司设计与合成，序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	序列
TGF-β	正向 5'-GGAATTGAGGGCTTTCGCC-3'
	反向 5'-CCGCTAGTGAACCCGTTGAT-3'
TLR4	正向 5'-GCCGTTTTATACGGAGGTG-3'
	反向 5'-GCCTAAATGCCTCAGGGGAT-3'
MyD88	正向 5'-AGTTGTGTGTCTGTGACCGC-3'
	反向 5'-TGGCCTTCTAGCCAACCTCT-3'
NF-κB p65	正向 5'-GACCGCTGCATCCACAGTTT-3'
	反向 5'-CAGCTGCTCTTCTTGAAGG-3'
β-actin	正向 5'-AGCCTCGCCTTTGCCGAT-3'
	反向 5'-TGCTCGATGGGTACTTCAG-3'

2.4.7 Western blot 法检测细胞 TGF-β、MyD88、NF-κB p65 蛋白表达 取各组细胞，加入 300 μL 裂解液，离心后收集上清液，采用 BCA 法检测蛋白浓度。取适量上清，加入上样缓冲液，经变性、电泳、转膜、封闭后加入相应一抗稀释液 (1:1 000)，4℃ 孵育过夜，次日用 TBST 漂洗 5 次，再分别加入二抗 (1:2 000) 室温孵育 1 h 后，用 TBST 漂洗 5 次，采用 ECL 超敏发光试剂，置于凝胶成像系统中显影，采集图像，通过 Image J 软件分析目标条带的灰度值，以 β-actin 为内参，计算蛋白相对表达量。

2.4.8 统计学分析 通过 SPSS 23.0 软件进行处理，计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，事后两两比较采用 LSD 检验。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 强力五虎合剂成分分析

鉴定出 19 种入肺活性成分，鉴定结果见表 2，成分分类及占比见图 1，总离子流图见图 2。

表 2 强力五虎合剂入肺成分鉴定结果

序号	归属	化合物	t_R/min	分子式	m/z	模式	类型
1	麻黄	去甲伪麻黄碱	2.221 4	$\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}$	152.107 0	$[\text{M}+\text{H}]^+$	生物碱
2	麻黄	麻黄碱	2.387 4	$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}$	166.122 7	$[\text{M}+\text{H}]^+$	生物碱
3	麻黄	香叶木素	7.957 5	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$	299.055 6	$[\text{M}-\text{H}]^-$	黄酮类
4	麻黄	苜蓿素	7.761 0	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$	322.066 3	$[\text{M}-\text{H}]^-$	黄酮类
5	麻黄	泽兰林素	10.815 4	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$	343.810 9	$[\text{M}-\text{H}]^-$	黄酮类
6	麻黄	木犀草素	4.836 1	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	285.040 2	$[\text{M}-\text{H}]^-$	黄酮类
7	炒苦杏仁	野黑樱苷	3.724 0	$\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_6$	294.091 8	$[\text{M}-\text{H}]^-$	碳水化合物类
8	黄芩	白杨素	5.865 9	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$	255.065 0	$[\text{M}+\text{H}]^+$	黄酮类
9	黄芩	二氢木蝴蝶素 A	10.428 9	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$	285.076 4	$[\text{M}-\text{H}]^-$	黄酮类
10	黄芩	桉叶油醇	3.689 3	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$	155.143 0	$[\text{M}+\text{H}]^+$	萜类
11	蜜桑白皮	血根碱	7.535 6	$\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{NO}_4^+$	315.086 0	$[\text{M}+\text{H}]^+$	生物碱类
12	蜜桑白皮	鸢尾黄素	7.694 4	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$	299.055 6	$[\text{M}-\text{H}]^-$	黄酮类
13	蜜桑白皮	7-羟基香豆素	4.310 3	$\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3$	161.023 3	$[\text{M}-\text{H}]^-$	香豆素类
14	钩藤	钩藤碱	5.319 5	$\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$	385.211 6	$[\text{M}+\text{H}]^+$	生物碱类
15	钩藤	毛钩藤碱	7.427 9	$\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3$	369.216 9	$[\text{M}+\text{H}]^+$	生物碱类
16	钩藤	四氢鸭脚木碱	5.528 0	$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$	353.185 6	$[\text{M}+\text{H}]^+$	生物碱类
17	浙贝母	贝母素甲	5.447 3	$\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{NO}_3$	432.347 0	$[\text{M}+\text{H}]^+$	生物碱类
18	浙贝母	贝母辛	4.425 9	$\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{NO}_3$	428.315 5	$[\text{M}+\text{H}]^+$	生物碱类
19	蜜百部	氧化对叶百部碱	4.283 6	$\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{NO}_5$	390.227 1	$[\text{M}+\text{H}]^+$	生物碱类

■ 生物碱类 ■ 黄酮类 ■ 香豆素类 ■ 萜类 ■ 碳水化合物类

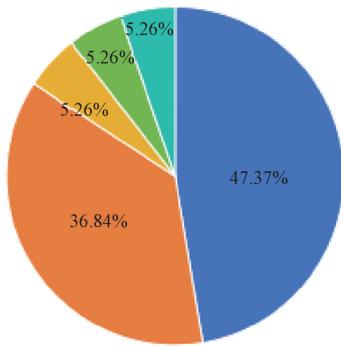


图 1 强力五虎合剂入肺成分分类占比图

3.2 网络药理学分析

3.2.1 强力五虎合剂入肺成分靶点与疾病靶点分析 利用 TCMSP、CTD、Herb 数据库，获取强力五虎合剂入肺成分靶点共 879 个。同时，通过 GeneCards 与 OMIM 数据库共获取肺炎相关疾病靶点 344 个。将强力五虎合剂入肺成分靶点与疾病靶点导入 Venny 2.1.0 数据库，获取交集靶点 96 个，见图 3。采用 Cytoscape 3.10.2 软件构建“药物-活性成分-靶点-疾病”网络图，见图 4，其中紫色为强力五虎合剂入肺成分，粉色为交集靶点。

3.2.2 PPI 网络构建 利用 STRING 在线平台工具获得 96 个基因的 PPI 网络，将得到的 96 个靶点

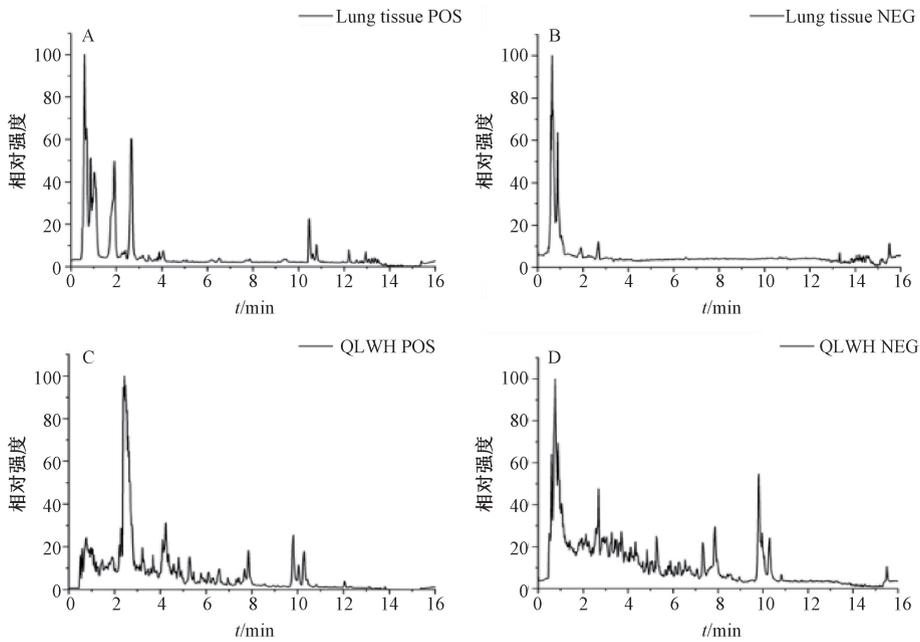
结果导入 Cytoscape 3.10.2 软件进行可视化分析，见图 5。圆越大、颜色越深则表示该靶点抗肺炎相关性越强。

3.2.3 GO 与 KEGG 富集分析 利用 Metascape 平台对 96 个潜在靶点进行 GO 分析，采用“微生信”平台进行可视化分析，筛选 P 值排名前 10 位的条目，结果 BP 主要涉及炎症反应、先天性免疫反应等；CC 主要涉及细胞膜、细胞外基质等；MF 主要涉及细胞因子受体结合、细胞因子活性等，见图 6。利用 Metascape 平台对 96 个潜在靶点进行 KEGG 富集分析，筛选条件为 $P < 0.01$ ，其中 P 值排名前 20 位的通路主要为 Toll 样受体信号通路、TNF 信号通路等，见图 7，这些通路可能是强力五虎合剂治疗肺炎的关键通路。

3.3 细胞实验

3.3.1 LPS 造模浓度筛选 如图 8 所示，当质量浓度为 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、干预时间为 12 h 时，细胞存活率为 $63.71\% \pm 1.93\%$ ，为适宜的造模浓度，且在显微镜下明显观察到细胞有部分萎缩死亡、且贴壁细胞较少。故选用 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 诱导 BEAS-2B 细胞 12 h，建立肺炎损伤模型。

3.3.2 最佳含药血清体积分数筛选 如表 3 所示，与对照组比较，模型组细胞活力降低 ($P < 0.01$)，细胞损伤较大；与模型组比较，5%、7.5%、10%



注：A、B分别为正、负离子模式下肺组织总离子流图，C、D分别为正、负离子模式下强力五虎合剂的总离子流图。

图2 强力五虎合剂体内外样品的总离子流图

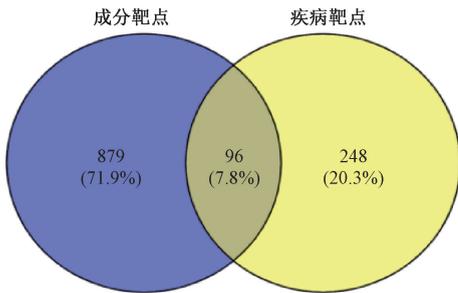


图3 强力五虎合剂入肺成分靶点和肺炎靶点交集韦恩图

含药血清组细胞存活率升高 ($P < 0.01$), 其中10%含药血清组效果最佳, 故选择10%含药血清用于后续实验。

3.3.3 强力五虎合剂对细胞上清液中 TGF- β 、IL-6、IL-18、IL-1 β 水平的影响 如表4所示, 与对照组比较, 模型组细胞上清液中 TGF- β 、IL-6、IL-18、IL-1 β 水平升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 强力五虎合剂组细胞上清液中 TGF- β 、IL-6、IL-18、IL-1 β 水平降低 ($P < 0.01$)。

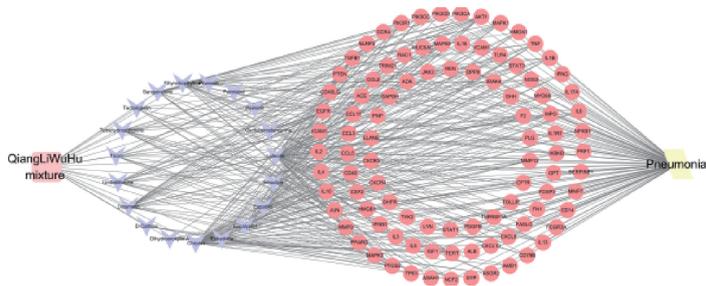


图4 药物-活性成分-靶点-疾病网络图

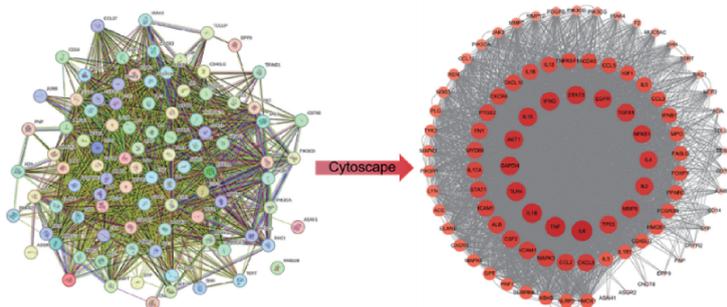


图5 强力五虎合剂活性成分与肺炎交集靶点的 PPI 网络 (左) 及可视化分析图 (右)

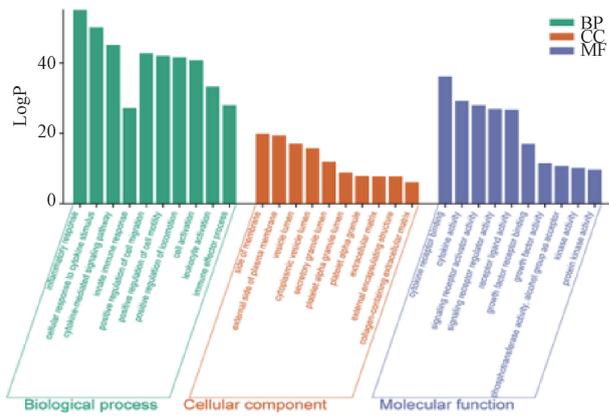
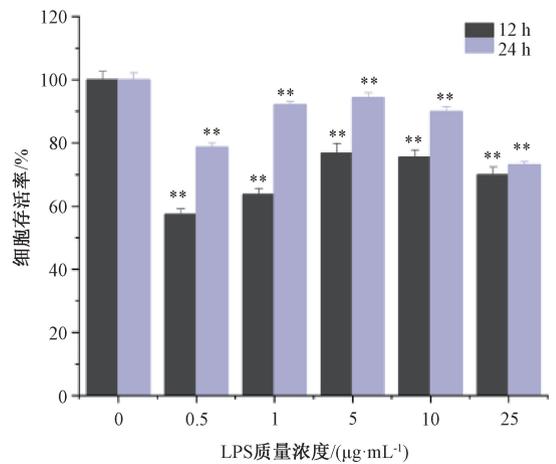


图6 GO功能富集分析



注：与0 μg/mL LPS比较，** $P < 0.01$ 。
图8 LPS干预12、24 h对BEAS-2B细胞存活率的影响

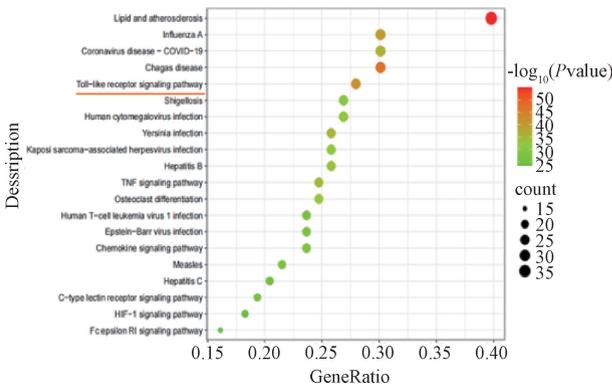


图7 KEGG通路富集分析

表3 各组细胞存活率比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	细胞存活率/%
对照组	100.00 ± 1.48
模型组	62.65 ± 1.60**
2.5%含药血清组	65.13 ± 5.16
5%含药血清组	74.12 ± 3.81###
7.5%含药血清组	78.98 ± 4.59###
10%含药血清组	89.09 ± 4.25###

注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，### $P < 0.01$ 。

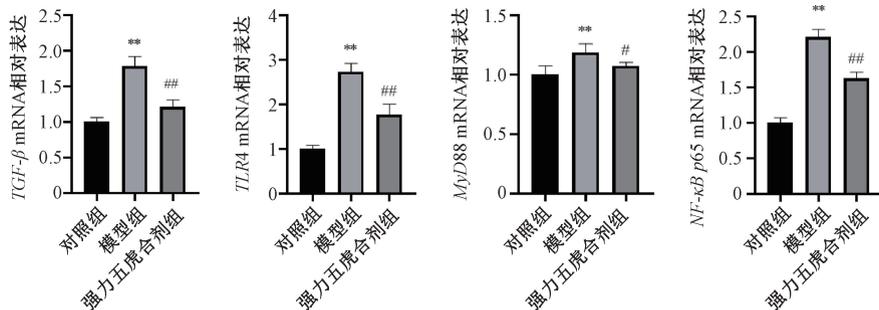
表4 各组细胞上清液中TGF-β、IL-6、IL-18、IL-1β水平比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	TGF-β	IL-6	IL-18	IL-1β
对照组	1 103.69 ± 29.03	175.66 ± 5.76	28.74 ± 0.47	38.65 ± 3.85
模型组	1 408.09 ± 13.29**	234.71 ± 4.37**	78.82 ± 0.96**	97.72 ± 5.01**
强力五虎合剂组	1 209.53 ± 11.71###	183.99 ± 2.93###	34.13 ± 0.45###	60.26 ± 2.05###

注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，### $P < 0.01$ 。

3.3.4 强力五虎合剂对BEAS-2B细胞TGF-β、TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA表达的影响 如图9所示，与对照组比较，模型组细胞TGF-β、TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA表达升高 ($P < 0.01$)；与

模型组比较，强力五虎合剂组细胞TGF-β、TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA表达降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

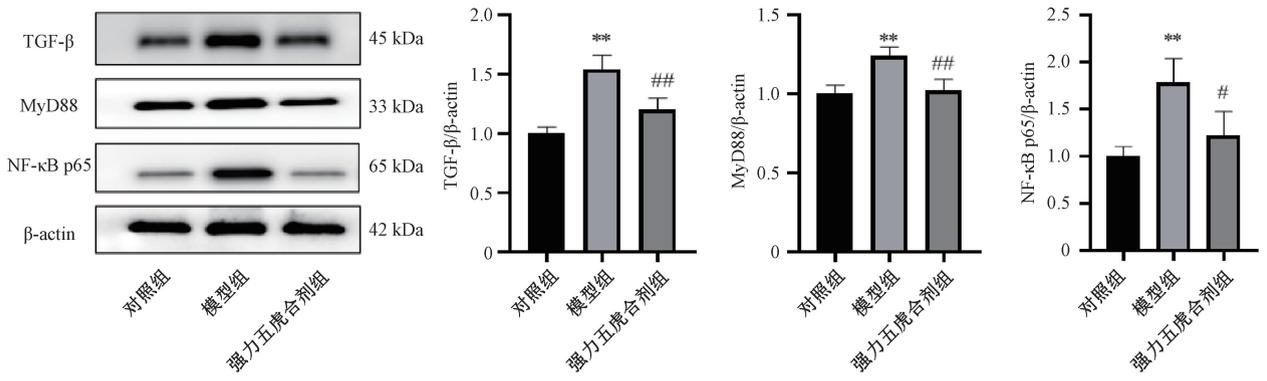


注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05, ###P < 0.01$ 。

图9 各组细胞中TGF-β、TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.3.5 强力五虎合剂对BEAS-2B细胞TGF-β、MyD88、NF-κB p65蛋白表达的影响 如图10所示，与对照组比较，模型组细胞TGF-β、MyD88、

NF-κB p65蛋白表达升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，强力五虎合剂组细胞TGF-β、MyD88、NF-κB p65蛋白表达降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。



注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

图10 各组细胞中 TGF-β、MyD88、NF-κB p65 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

小儿支气管肺炎可归结于中医“肺炎喘嗽”的范畴，病机关键为肺气郁闭，痰热是主要病理产物，病变部位主要在肺^[12]。强力五虎合剂源于中医经典方剂麻杏石甘汤，基于“肺肠同治”并结合多年临床经验加减而成，其良好的治疗效果作用已经被证实^[6]。本研究基于 LC-MS 技术从强力五虎合剂中鉴定出 19 种入肺成分，包括麻黄碱、去甲伪麻黄碱、钩藤碱、木犀草素等，这些活性成分在抗炎、抗氧化方面发挥关键作用^[13-15]。中药复方通常涉及多成分、多靶点、多途径等相互协同作用，从而多维度发挥抗肺炎的作用。近年来，网络药理学通过提供整体视角，探索有效成分和疾病靶点之间的复杂相互作用，让中医整体治疗观和辨证论治的特点与其巧妙的联系起来，成为目前探索中药药理机制的有效方法^[16]。本研究采用网络药理学探究强力五虎合剂治疗肺炎的潜在作用机制，KEGG 通路富集分析发现，强力五虎合剂治疗肺炎主要涉及 Toll 样受体信号通路、TNF 信号通路等，该结果为强力五虎合剂可能通过多靶点和多途径治疗肺炎提供了科学依据。

本研究通过进一步建立 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞肺炎损伤模型，探讨了强力五虎合剂对炎症反应的调控作用。LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分，经常被用作炎症模型的诱导剂^[17]。本研究给予不同质量浓度 LPS (0 ~ 25 μg/mL) 干预 BEAS-2B 细胞，发现 1 μg/mL LPS 作用 12 h 时，细胞存活率为 63.71% ± 1.93%，且细胞贴壁数量减少、形态萎缩，符合炎症损伤模型的标准。该质量浓度与既往研究报道的 LPS 诱导支气管上皮细胞炎症的剂量范围一致^[18-19]。

LPS 能够通过激活 TLR4 信号通路，从而进一

步激活下游 MyD88、NF-κB p65 蛋白，产生级联反应，促进 TNF-α、IL-6、IL-18、IL-1β 炎症因子的大量释放，加重肺部炎症反应^[20-21]。其中，TNF-α 是炎症反应的早期关键介质，IL-18、IL-1β 属于 IL-1 家族，TNF-α 又协同 IL-1 诱导 IL-6 的产生，是经典的促炎症细胞因子，并最终通过激活 NLRP3 炎症小体促进炎症反应，参与放大炎症级联反应^[22-24]。而 TGF-β 不仅参与炎症反应，还促进纤维化进程，在慢性气道疾病中发挥重要作用^[25]。本研究结果显示，强力五虎合剂能显著降低模型细胞中 TGF-β 基因和蛋白表达，这表明强力五虎合剂不仅能够缓解急性炎症，还可能具备抑制肺炎后期组织重塑和纤维化的潜力，这为其临床疗效提供了更多的作用机制解释。因此，TGF-β/TLR4/MyD88/NF-κB p65 信号通路可能是治疗小儿支气管肺炎的重要通路。为探究强力五虎合剂对小儿支气管肺炎治疗的潜在增效机制，本研究对 TGF-β/TLR4/MyD88/NF-κB p65 信号通路相关 mRNA 和蛋白表达进行了检测，结果显示，强力五虎合剂可抑制该通路蛋白表达，表明强力五虎合剂可能通过调控该信号通路实现对支气管肺炎的治疗作用。

综上所述，本研究通过 LC-MS 联合网络药理学、体外细胞实验，验证了强力五虎合剂通过减少促炎症因子分泌和调节 TGF-β/TLR4/MyD88/NF-κB p65 信号通路，发挥治疗支气管肺炎的作用，为强力五虎合剂在临床上的合理应用提供理论依据，并为进一步研究其增效机制奠定基础。

参考文献：

- [1] 严斌娟, 陈 宴, 赵超英. 中医情志护理联合穴位按摩对支气管肺炎患儿预后及生活质量的影响[J]. 中国防痨杂志, 2024, 46(S2): 274-276.

- [2] Ling Y Y, Yang D, Yang S. Clinical characteristics, early blood biochemical indicators, and prognostic status of children with bronchopneumonia[J]. *Medicine*, 2023, 102(47): e36162.
- [3] 殷雅婕, 何相池, 罗 慧, 等. 4 种中药注射液联合常规西药治疗儿童支气管肺炎的网状 Meta 分析[J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(18): 5032-5044.
- [4] 彭建新, 任 方. 小儿重症肺炎的临床特征及预后影响因素分析[J]. *临床医学研究与实践*, 2021, 6(20): 40-42.
- [5] Anon. More on communiy acquired pneumonia: antibiotic resistance[J]. *Arch Dis Child*, 2022, 107(3): 258-258.
- [6] 马 力, 马军梅, 王小龙, 等. 强力五虎合剂治疗儿童肺炎合并胃肠积热的临床研究[J]. *云南中医中药杂志*, 2023, 44(6): 32-37.
- [7] 王艳平, 李新爱, 张燕娣, 等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 强力五虎合剂的化学成分分析[J]. *辽宁中医杂志*, 2025, 52(9): 130-137.
- [8] 田 杰, 宁 娱, 徐 竞, 等. 强力五虎合剂纯化工艺的研究[J]. *宁夏医学杂志*, 2018, 40(4): 355-357.
- [9] 田 杰, 王艳平, 宁 娱, 等. 正交试验法优选强力五虎合剂的水提取工艺[J]. *中国现代中药*, 2016, 18(6): 789-792.
- [10] 李 然, 王振裕, 王燕丽, 等. 三参通脉合剂通过上调 microRNA-146a 改善大鼠心肌细胞 H9C2 的氧化损伤[J]. *四川大学学报 (医学版)*, 2024, 55(3): 630-634.
- [11] 秦思源, 屠秋霞, 郑 乾, 等. 依达拉奉对帕金森病模型 PC12 细胞和秀丽隐杆线虫氧化应激、自噬水平及 α -突触核蛋白表达的影响[J]. *贵州医科大学学报*, 2023, 48(10): 1117-1128.
- [12] 李毓赟, 李 阳, 王瑞杰, 等. 口服中成药治疗儿童支气管肺炎的网状 Meta 分析[J]. *中草药*, 2022, 53(1): 176-195.
- [13] 张 哲, 苏志伟, 武萌萌. 麻黄碱调节 Keap1/Nrf2 信号通路对脑缺血再灌注模型小鼠神经细胞凋亡的影响[J]. *中国细胞生物学学报*, 2025, 47(1): 47-57.
- [14] 胡卫华. 钩藤碱对 OGD/R 诱导的 BV-2 小胶质细胞中 Notch1/NF κ B 通路蛋白及炎症因子 mRNA 的影响[D]. 南昌: 南昌大学, 2021.
- [15] 史朋晓, 宋媛媛, 闫洪娟. 木犀草素对心力衰竭大鼠心肌炎症反应和 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2022, 20(4): 627-632.
- [16] Ren R, Wang F, Zhao G, *et al.* Deciphering the mechanism of Sang Ju Yin in ameliorating acute lung injury: An integrated systems pharmacology approach encompassing chemical composition analysis, network pharmacology, metabolomics, molecular docking and molecular biology[J]. *Chin J Anal Chem*, 2025, 53(5): 100527.
- [17] 任自敬, 吴国俊, 王静娴, 等. S1PR5 对脂多糖诱导小鼠认知行为和炎症反应的影响及其抗炎机制[J]. *中国病理生理杂志*, 2024, 40(10): 1916-1925.
- [18] Uzunhisarcikli E, Gürbüz P, Yerer B M. Investigation of antiinflammatory effects of *Origanum majorana* L. extract in LPS-induced Beas-2b and A549 cells[J]. *Proceedings*, 2019, 40(1): 8.
- [19] 康建英, 颜丽珊, 顾春宇, 等. 基于 TLR4/PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路探讨热毒宁注射液抑制脂多糖刺激的 BEAS-2B 细胞炎症因子表达的作用机制[J]. *中国现代中药*, 2024, 26(11): 1938-1946.
- [20] 叶凯利, 曾梦楠, 郝凤霄, 等. 山药中熊果苷对急性肺损伤的保护作用及其代谢调控机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2025, 50(15): 4100-4109.
- [21] Yukitake H, Takizawa M, Kimura H. Macrophage migration inhibitory factor as an emerging drug target to regulate antioxidant response element system[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 8584930.
- [22] Tian J, Wang X L, Wang L C, *et al.* Qiangli Wuhu Mixture alleviates LPS-induced pneumonia by inhibiting the TLR4/NF- κ B/NLRP3 pathway: a study based on network pharmacology [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 1331-1340.
- [23] 靳玉红, 付存虎. 阿奇霉素联合转移因子口服溶液治疗小儿肺炎支原体肺炎的临床疗效及对 IL-1 β 、IL-6、IL-8 及 TNF- α 的影响[J]. *中国妇幼保健*, 2018, 33(6): 1310-1312.
- [24] 王 芳, 孙耀贵, 尹 伟, 等. 苦参碱联合黄芩苷对 LPS 诱导小鼠肺炎的影响[J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(8): 1105-1109.
- [25] 潘小翠, 符 青, 符顺丹, 等. 支气管肺炎患儿血清基质金属蛋白酶-9、转化生长因子- β 1 表达水平及临床意义[J]. *中国临床医生杂志*, 2022, 50(10): 1245-1248.