中图分类号：R932；R285.5　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2025)13－0036－08
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2025.13.009

鬼点灯乙酸乙酯萃取物止咳作用机制挖掘与初步验证*

陈　寅[1]，程英歌[1]，周燕萍[2]，赵小超[3△]，纪　利[3]，商　勋[3]，葛竹妹[3]

（1. 江苏省宿迁市第一人民医院，江苏 宿迁　223800；2. 中国人民解放军东部战区空军医院，江苏 南京　210000；3. 南京中医药大学宿迁附属医院·江苏省宿迁市中医院，江苏 宿迁　223800）

摘要：目的　探讨鬼点灯乙酸乙酯萃取物的止咳作用机制及其对肺部组织的影响。**方法**　通过网络药理学挖掘鬼点灯乙酸乙酯萃取物发挥止咳作用的成分及靶点，并利用薛定谔分子对接（Maestro）软件进行分子对接验证。采用辣椒素引咳法复制咳嗽模型小鼠，将50只小鼠随机分为空白组（A组，灌胃4 mL/kg氯化钠溶液），格列本脲组（B组，腹腔注射20 mg/kg格列本脲药液），咳必清对照组（C组，灌胃50 mg/kg咳必清药液），实验组（D组，灌胃1.5 g/kg鬼点灯乙酸乙酯萃取物溶液），格列本脲＋实验组（E组，腹腔注射20 mg/kg格列本脲药液＋灌胃1.5 g/kg鬼点灯乙酸乙酯萃取物溶液），各10只，通过计算抑咳率研究鬼点灯乙酸乙酯萃取物对小鼠三磷酸腺苷敏感性钾（KATP）通道的影响，采用苏木素－伊红（HE）染色法观察鬼点灯乙酸乙酯萃取物对小鼠肺部组织形态的影响。**结果**　网络药理学分析结果显示，鬼点灯乙酸乙酯萃取物中毛蕊异黄酮、木犀草素、5，7－二羟基双氢黄酮等成分通过丝氨酸－苏氨酸蛋白激酶1（Akt1）、白细胞介素6（IL－6）、雌激素受体1（ESR1）、表皮生长因子受体（EGFR）、B淋巴细胞瘤－2（BCL2）等靶点发挥止咳作用，主要与蛋白酪氨酸激酶活性、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性、跨膜受体蛋白激酶活性、Akt活性、蛋白丝氨酸激酶活性等分子功能有关，主要涉及低氧诱导因子－1（HIF－1）、磷脂酰肌醇－3－激酶－Akt（PI3K－Akt）、糖尿病并发症中的晚期糖基化终末产物－晚期糖基化终末产物受体（AGE－RAGE）、Ras、环磷酸鸟苷－环磷酸鸟苷依赖性蛋白质激酶（cGMP－PKG）等信号通路。分子对接结果显示，化合物与关键靶点的结合能≤－5 kcal/mol，其中与Akt1的结合效果最好。动物实验结果显示，与B组比较，C组、D组、E组小鼠的抑咳率均显著升高（$P<0.05$）；与C组比较，E组小鼠的抑咳率显著降低（$P<0.05$）。HE染色结果显示，C组、D组、E组小鼠肺部组织的炎性细胞浸润减少。**结论**　鬼点灯乙酸乙酯萃取物可能通过KATP通道发挥止咳作用，可减弱肺部组织的炎性细胞浸润。

关键词：鬼点灯；乙酸乙酯萃取物；咳嗽；三磷酸腺苷敏感性钾通道；炎性细胞浸润

Mechanism Mining and Preliminary Verification of Antitussive Effect of Ethyl Acetate Extract from *Bothriospermum Zeylanicum*

CHEN Yin[1], *CHENG Yingge*[1], *ZHOU Yanping*[2], *ZHAO Xiaochao*[3], *JI Li*[3], *SHANG Xun*[3], *GE Zhumei*[3]

(1. Suqian First People's Hospital, Suqian, Jiangsu, China　223800;　2. Air Force Hospital of Eastern Theater of the PLA, Nanjing, Jiangsu, China　210000;　3. Suqian Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine · Suqian Traditional Chinese Medicine Hospital, Suqian, Jiangsu, China　223800)

Abstract: Objective　To investigate the mechanism of the antitussive effect of ethyl acetate extract from *Bothriospermum zeylanicum* and its effect on lung tissue. **Methods**　The components and targets of the ethyl acetate extract from *Bothriospermum zeylanicum* exerting antitussive effect were identified through network pharmacology, and molecular docking validation was performed by the Schrödinger molecular docking (Maestro) software. The capsaicin－induced cough method was used to replicate cough model mice, 50 mice were randomly divided into the blank group (group A, orally administered 4 mL/kg of Sodium Chloride Solution), glibenclamide group (group B, intraperitoneally injected 20 mg/kg of Glibenclamide Solution), Kebiqing control group (group C, orally administered 50 mg/kg of Kebiqing Solution), experimental group (group D, orally administered 1.5 g/kg of ethyl acetate extract from *Bothriospermum zeylanicum*), and glibenclamide + experimental group (group E, intraperitoneally injected 20 mg/kg of Glibenclamide Solution + orally administered 1.5 g/kg of ethyl acetate extract from *Bothriospermum zeylanicum*), with 10 mice in each group. The effect of ethyl acetate extract from *Bothriospermum zeylanicum* on adenosine triphosphate－sensitive potassium (KATP) channels in mice was studied by calculating the cough suppression rate. Hematoxylin－eosin (HE) staining method was used to observe the effect of ethyl acetate extract from *Bothriospermum zeylanicum* on the morphology of lung tissue in mice. **Results**　Network pharmacology analysis showed that components such as genistein, luteolin, and 5, 7－dihydroxydihydroflavone in the ethyl acetate extract from *Bothriospermum zeylanicum* exerted an antitussive effect through targets such as serine threonine－protein kinase 1 (Akt1), interleukin－6 (IL－6), estrogen receptor 1 (ESR1), epidermal growth factor receptor (EGFR), and B－lymphoma－2 (BCL2), mainly related to protein tyrosine kinase activity, transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity, and transmembrane receptor protein kinase activity, Akt activity, protein serine kinase activity and other molecular functions, mainly

*基金项目：江苏省中医药学会科研项目[ZXFZ2024130]；江苏省金华市卫生健康委员会中医药科学技术研究计划青年人才基金项目[2023KR03]。

第一作者：陈寅，男，大学本科，主管中药师，研究方向为中药药效物质基础及药理学，（电子信箱）409023138@qq.com。

△通信作者：赵小超，男，硕士，主管中药师，研究方向为中药药效物质基础及药理学，（电子信箱）515532094@qq.com。

involving HIF - 1, PI3K - Akt, AGE - RAGE, Ras, cGMP - PKG and other signal pathways. The molecular docking results showed that the binding energy between the components and the key targets was ≤ - 5 kcal / mol, with the best binding effect to Akt1. The animal experiment results showed that compared with those in group B, the antitussive effect rates in groups C, D, and E significantly increased ($P < 0.05$). Compared with those in group C, the antitussive effect rate in group E significantly reduced ($P < 0.05$). The HE staining results showed a decrease in inflammatory cell infiltration in the lung tissues of mice in groups C, D, and E. **Conclusion** Ethyl acetate extract from *Bothriospermum zeylanicum* may exert an antitussive effect through KATP channels and reduce inflammatory cell infiltration in lung tissue.

Key words: *Bothriospermum zeylanicum*; ethyl acetate extract; cough; ATP - sensitive potassium channel; inflammatory cell infiltration

咳嗽为一种呼吸系统症状，严重影响患者的生活质量。研究表明，我国咳嗽的患病率高达 15.06%[1]，20%～46% 的咳嗽患者病因不明[2-3]，且疗效不佳[4]。目前，多数镇咳药很难按适应证使用，疗效有限，或副作用明显[5]。需进一步研究治疗咳嗽的药物，以减轻患者的痛苦。鬼点灯有止咳和止血功效[6-7]，鬼点灯乙酸乙酯萃取物对非小细胞肺癌 A549 细胞的增殖有抑制作用[8]。检索国内外文献，暂无有关鬼点灯止咳机制的报道，需进一步研究。本研究中通过网络药理学挖掘中药鬼点灯止咳作用的分子机制，并通过动物实验验证，系统探讨鬼点灯乙酸乙酯萃取物的止咳作用机制及其对肺部组织形态学的影响。现报道如下。

1 仪器、试药与动物

1.1 仪器

XS205 型分析天平（瑞士 Mettler Toledo 公司，精度为十万分之一）；KQ - 250DA 型超声仪（昆山市超声仪器有限公司，功率为 250 W，频率为 40 kHz）；RE - 52AA 型旋转蒸发器，SHB - Ⅲ型循环水式多用真空泵，均购自郑州长城科工贸有限公司；HH - S 型恒温水浴锅（江苏省金坛市医疗仪器厂）；C28P 型超声雾化机（日本 Omron 公司）；HD - 310 型生物组织自动包埋机，HD - 310 型包埋机专用冷冻台，HD - 330 型轮转式切片机，HD - 330 型摊片烤片机，均购自湖北惠达仪器有限公司；IX73 型光学显微镜（日本 Olympus 光学技术株式会社）；DMI3000B 型倒置显微镜（徕卡显微系统有限公司）；Pico 17 型高速离心机，370 型 CO_2 培养箱，MULTISKAN FC 型全波长酶标仪，Hirayama HVE - 50 型高压灭菌器，均购自美国 Thermo Fisher 公司。

1.2 试药

鬼点灯采自江苏省宿迁市宿豫区曹集乡田间，经广西中医药研究院黄云峰副研究员鉴定为正品；枸橼酸喷托维林片（商品名咳必清，中国医药集团有限公司，批号为 20102411）；格列本脲片（山西云鹏制药有限公司，批号为 G201205）；辣椒素（巴斯夫生物科技有限公司，批号为 20279 - 06 - 5，纯度不低于 98%）；氯化钠溶液（华润双鹤药业股份有限公司，批号为 21120909M）；RMPI - 1640 培养基（以色列 Biological Industries 公司，批号为 0023019）；5% 乙醇、无水乙醇（分析纯，福晨化学试剂有限公司）；乙酸乙酯（分析纯，华大化学集团有限公司）；二甲苯（分析纯，无锡展望化工试剂有限公司）；吐温 - 80（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；4% 多聚甲醛（PFA）组织固定液，1% 盐酸乙醇，磷酸盐缓冲液（PBS，批号为 2021805A），均购自安研科技有限公司；苏木素染色液（批号为 160529），伊红染色液（批号为 970529），均购自伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司；软蜡（50～54 ℃）；硬蜡（58～62 ℃）；中性树胶（上海懿洋仪器有限公司）。

1.3 动物

SPF 级昆明小鼠 60 只，6 周龄，体质量 18～25 g，雌雄各半，购于常州卡文斯实验动物有限公司，动物许可证号 SCXK（苏）2021 - 2013。饲养环境温度 22～24 ℃，相对湿度 40%～60%，恒温、恒湿，12 h / 12 h 明暗交替，正常进食、进水。本实验经江苏省宿迁市中医院动物伦理学委员会审批通过（编号：2022080014）。

2 方法与结果

2.1 入血成分分析

将前期液质联用技术检测分析获得的 33 种化学成分输入中药血液和代谢物吸收成分网站数据库（DCABM - TCM，http：// bionet. ncpsb. org. cn / dcabm - tcm / ），共获得 15 个鬼点灯乙酸乙酯萃取物入血活性成分，分别为色氨酸、紫草素、芦丁、5，7 - 二羟基双氢黄酮、对香豆酸、异紫花前胡香豆素、四羟黄酮、橙皮素、香豆素、木犀草素、咖啡酸、7 - 羟基香豆素、秦皮乙素、4 - 羟基苯甲酸、2，3 - 二羟基苯甲酸。

2.2 网络药理学预测分子机制

方法：以口服生物利用度（OB）≥ 30%、药物相似性（DL）≥ 0.18 为筛选条件，通过中药系统药理学分析平台（TCMSP，https：// old. tcmsp - e. com / tcmsp. php）检索鬼点灯乙酸乙酯萃取物入血活性成分及其作用靶点；通过 GeneCards 数据库（https：// www. genecards. org / ）、OMIM 数据库（https：// www. omim. org / ）获取咳嗽的相关靶点；通过 Venny 2. 1 软件（https：// bioinfogp. cnb. csic. es / tools / venny / ）获取共有靶点。将鬼点灯乙酸乙酯萃取物入血活性成分和咳嗽的相关靶点导入 Cytoscape 3. 7. 1 软件（https：// cytoscape. org）进行可视化处理，构建药物 - 疾病 - 靶点网络。将共有靶点复制至

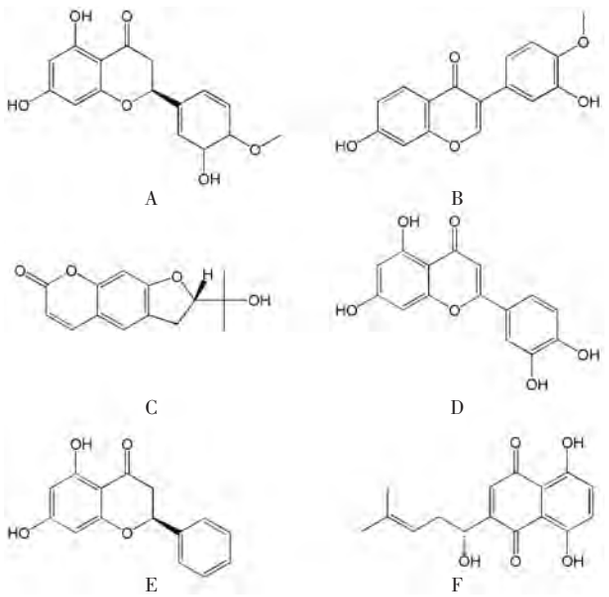
String 数据库（http：// stringdb. org / ），以“人”为研究对象，设置条件为 mendium confidence > 0. 9，剔除游离的蛋白靶点，构建蛋白 - 蛋白互作（PPI）网络，并根据度值（degree）筛选关键靶点。利用 R4. 4. 1 软件获得基因本体论（GO）功能分析及京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集分析数据，并进行可视化处理，以 P_{value} < 0. 01 为筛选阈值，取校正 P 值排名前 10 的条目。

共有靶点筛选：在 TCMSP 中检索获得鬼点灯乙酸乙酯萃取物潜在入血活性成分 6 个（化学结构见图 1），潜在药物靶点 155 个；通过检索 GeneCards 和 OMIM 数据库，筛选出咳嗽疾病靶点 6 018 个；通过 Venny 2. 1 软件，与潜在药物靶点绘制维恩图（见图 2），获得 147 个鬼点灯乙酸乙酯萃取物与咳嗽的共有靶点。

药物 - 疾病 - 靶点网络构建：将 6 个鬼点灯乙酸乙酯萃取物入血活性成分与 6 018 个咳嗽相关靶点导入 Cytoscape 3. 7. 1 软件，绘制药物 - 疾病 - 靶点网络（见图 3），共包含节点 242 个、相互联系的边 395 条，其中表现活跃的成分有毛蕊异黄酮、木犀草素、5，7 - 二羟基双氢黄酮等。

PPI 网络构建：为进一步分析鬼点灯乙酸乙酯萃取物治疗咳嗽的作用机制，采用 String 数据库及 Cytoscape 3. 7. 1 软件构建 147 个共有靶点的 PPI 网络（见图 4 A），筛选出 degree 排名靠前的关键靶点为丝氨酸 - 苏氨酸蛋白激酶 1（Akt1）、白细胞介素 6（IL - 6）、雌激素受体 1（ESR1）、表皮生长因子受体（EGFR）、B 淋巴细胞瘤 - 2（BCL2）等（见图 4 B），提示鬼点灯乙酸乙酯萃取物可能通过上述靶点发挥止咳作用。

GO 功能分析与 KEGG 通路富集分析：GO 功能分析结果显示，鬼点灯乙酸乙酯萃取物主要与蛋白酪氨酸激酶活性、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性、跨膜受体蛋白激酶活性、Akt 活性、蛋白丝氨酸激酶活性等分子功能有关（见图 5）。KEGG 通路富集分析结果显示，鬼点灯乙酸乙酯萃取物发挥止咳作用主要涉及低氧诱导因子 - 1



A. 橙皮素　B. 异紫花前胡香豆素　C. 香豆素　D. 木犀草素　E. 5，7 - 二羟基双氢黄酮　F. 紫草素

图 1　鬼点灯乙酸乙酯萃取物入血活性成分化学结构

A. Hesperetin　B. Ammijin　C. Coumarin　D. Luteolin　E. Chrysin　F. Shikonin

Fig. 1　Chemical structures of ethyl acetate extract from *Bothriospermum zeylanicum*

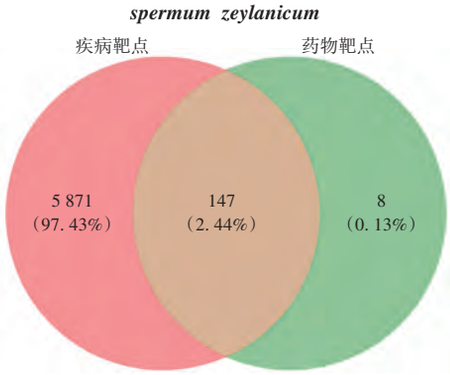


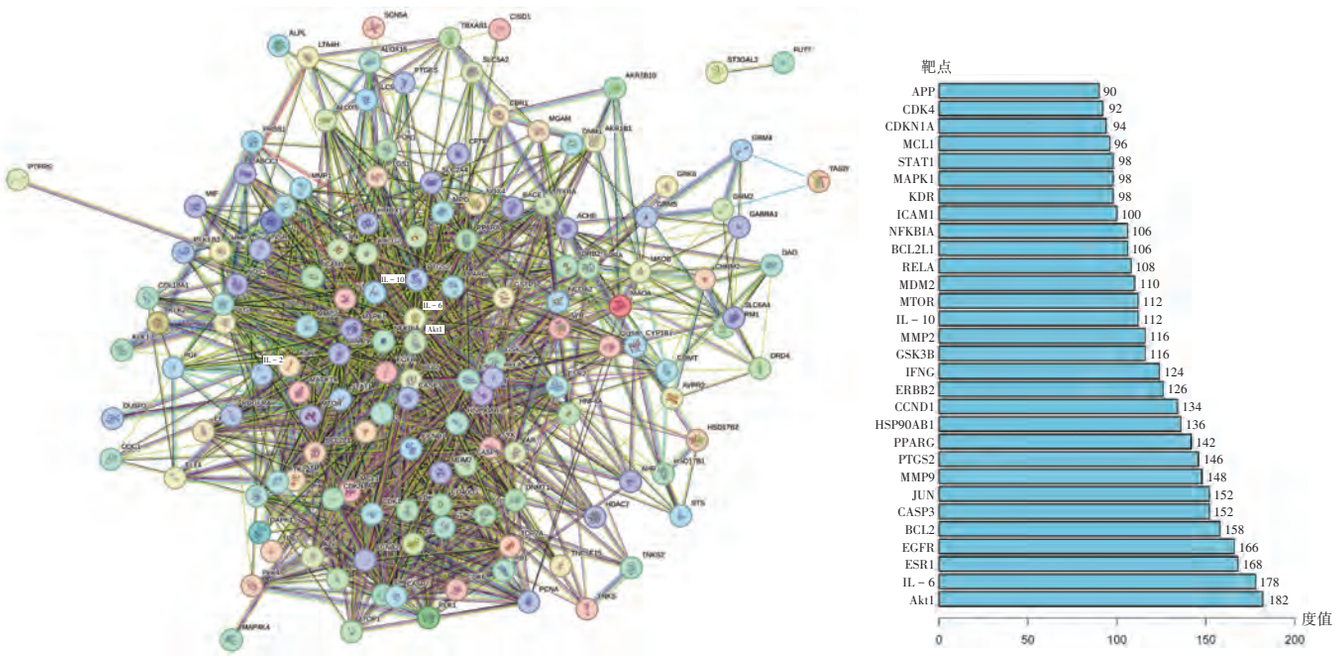
图 2　鬼点灯乙酸乙酯萃取物与咳嗽的共有靶点维恩图

Fig. 2　Venn diagram of ethyl acetate extract from *Bothriospermum zeylanicum* - cough common target



图 3　鬼点灯乙酸乙酯萃取物治疗咳嗽的药物 - 疾病 - 靶点网络

Fig. 3　Drug - disease - target network of ethyl acetate extract from *Bothriospermum zeylanicum* in the treatment of cough



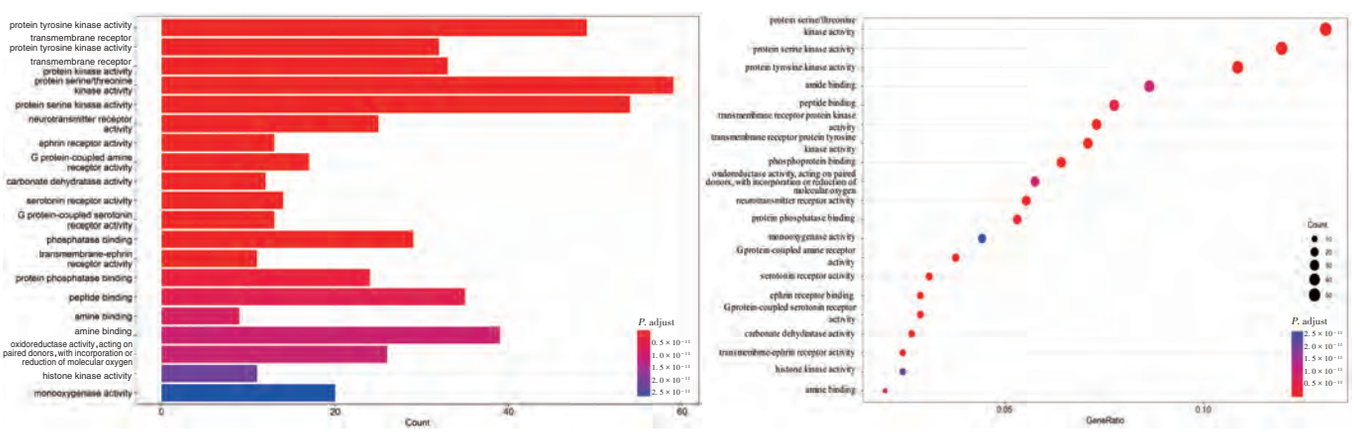
A　　B

A. PPI 网络　B. 度值排名前 30 的靶点柱状图

图 4　鬼点灯乙酸乙酯萃取物治疗咳嗽的关键靶点筛选结果

A. PPI network　B. Bar chart of top 30 targets in degree value

Fig. 4　Screening results of key targets of ethyl acetate extract from *Bothriospermum zeylanicum* in the treatment of cough



A　　B

A. 柱状图　B. 气泡图

图 5　鬼点灯乙酸乙酯萃取物治疗咳嗽的 GO 功能分析柱状图与气泡图

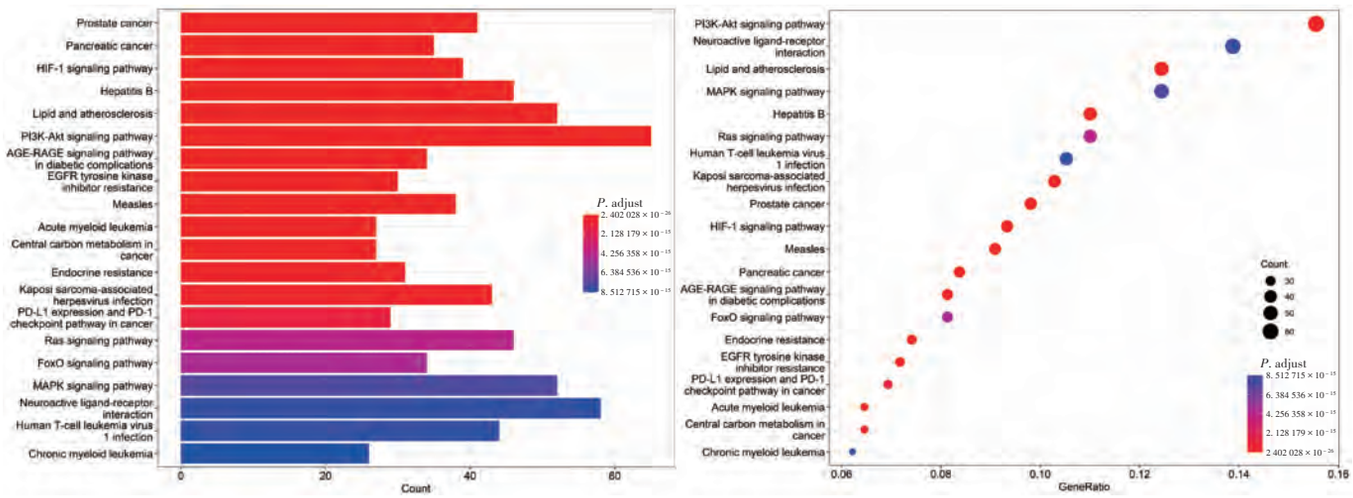
A. Bar chart　B. Bubble chart

Fig. 5　Bar chart and bubble chart of GO functional analysis of ethyl acetate extract from *Bothriospermum zeylanicum* in the treatment of cough

(HIF－1)、磷脂酰肌醇－3－激酶－Akt(PI3K－Akt)、糖尿病并发症中的晚期糖基化终末产物－晚期糖基化终末产物受体(AGE－RAGE)、Ras、环磷酸鸟苷－环磷酸鸟苷依赖性蛋白质激酶(cGMP－PKG)等信号通路(见图 6)。从富集的信号通路中发现，cGMP－PKG 信号通路包含三磷酸腺苷敏感性钾(KATP)通道分子机制路径(见图 7)。

2.3　分子对接验证

选取 degree 靠前的小分子活性成分作为核心配体，根据 PPI 网络选择排名靠前的 4 个靶标蛋白作为核心受体，并依据预试验结果选择 KATP 通道作为对接靶标蛋白，通过 RCSB PDB 数据库(https：// www. rcsb. org /)获取核心受体的晶体结构及三维(3D)结构，条件设置为人源、构象分辨率≤2. 5 Å、构象序列完整且有小分子配体信息、pH 值接近人体正常生理范围，导入薛定谔分子对接(Maestro)11. 9 版软件(https：// www. schrodinger. com / platform / products / maestro /)，采用半柔性对接，用 Docking Score 评价药物活性成分与靶点间的结合活



A. 柱状图　B. 气泡图

图 6　鬼点灯乙酸乙酯萃取物治疗咳嗽的 KEGG 通路富集分析柱状图与气泡图

A. Bar chart　B. Bubble chart

Fig. 6　Bar chart and bubble chart of KEGG pathway enrichment analysis of ethyl acetate extract from *Bothriospermum zeylanicum* in the treatment of cough

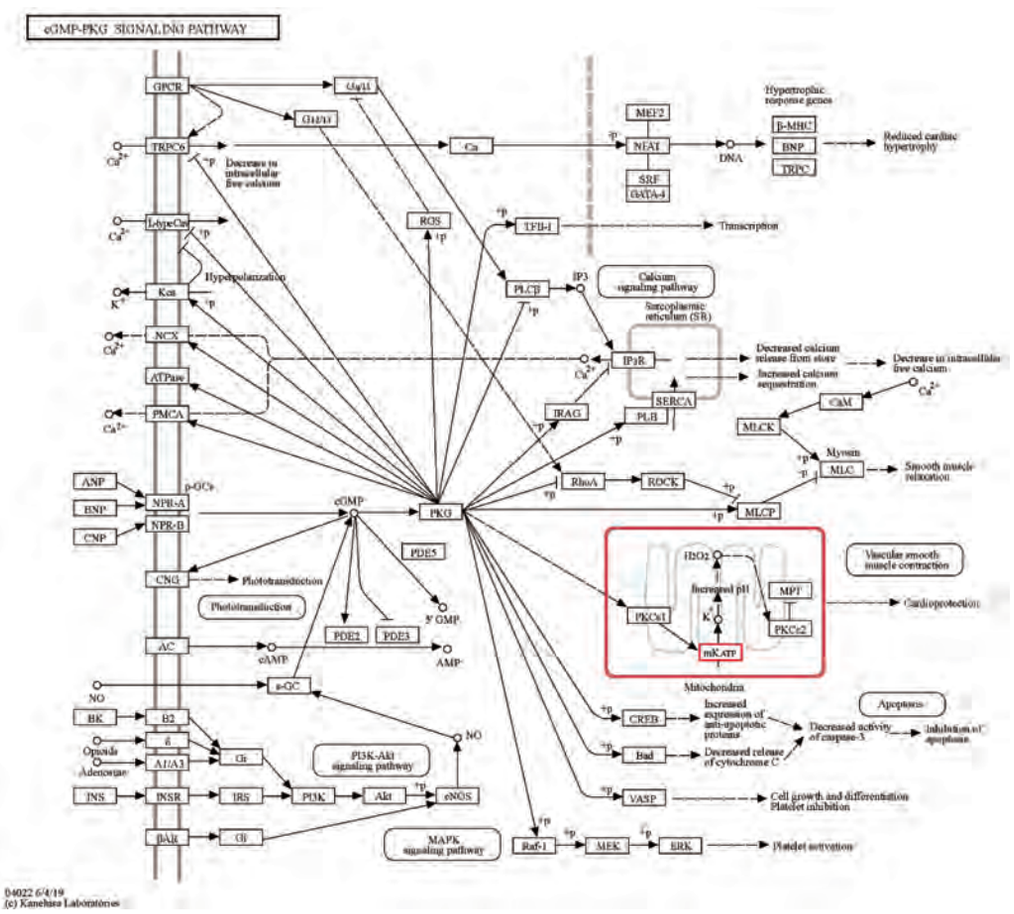


图 7　鬼点灯乙酸乙酯萃取物治疗咳嗽的 cGMP－PKG 信号通路

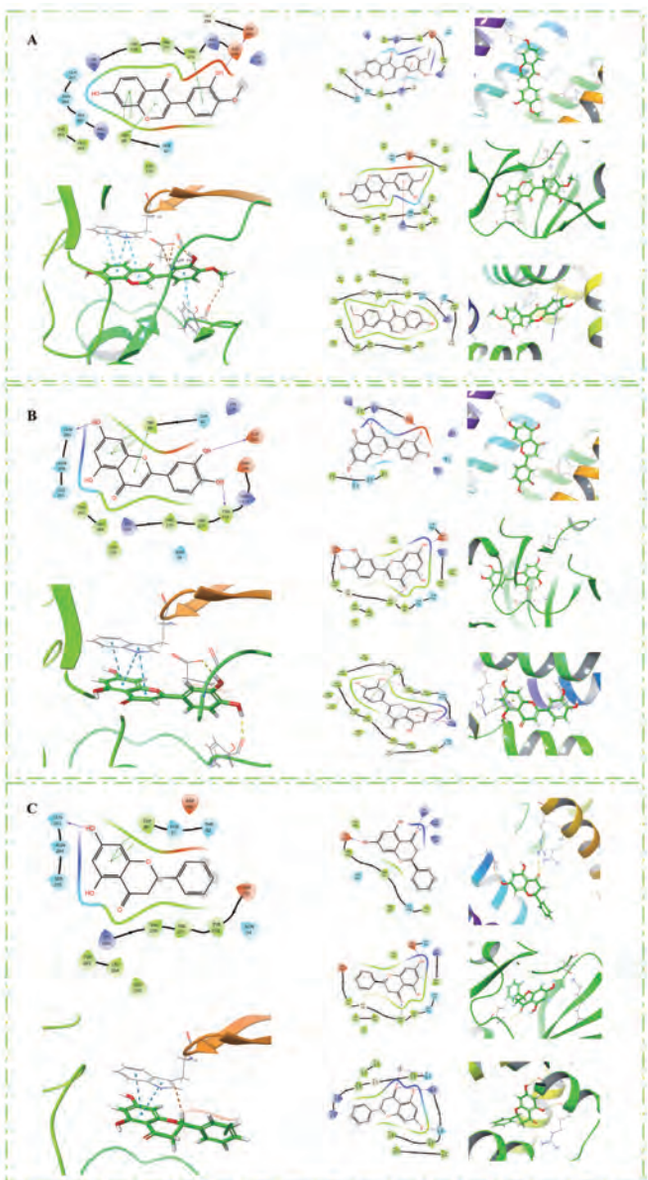
Fig. 7　cGMP－PKG signal pathway of ethyl acetate extract from *Bothriospermum zeylanicum* in the treatment of cough

性。Docking Score 的绝对值越大，表明亲和力越大。degree 靠前的 3 个活性成分分别为毛蕊异黄酮、木犀草素、5,7－二羟基双氢黄酮，排名前 4 的核心靶点分别为 Akt1（PDB：7nh4）、ESR1（PDB：7nfw）、EGFR（PDB：1xkk）、BCL2（PDB：6u65）。分子对接结果显示，配体与受体间的结合活性良好（结合能 ≤－5 kcal / mol），其中

表 1　分子对接结果

Tab. 1　Results of the molecular docking

活性成分	化学式	相对分子质量 (g/mol)	结合能(kcal/mol)				
			ESR1_7nfw	Akt1_7nh4	EGFR_1xkk	BCL2_6u65	KATP_7S5V
毛蕊异黄酮	$C_{16}H_{12}O_5$	284.26	-4.45	-7.70	-7.55	-7.61	-7.15
木犀草素	$C_{15}H_{10}O_6$	286.24	-5.76	-8.40	-7.80	-7.78	-6.67
5,7-二羟基双氢黄酮	$C_{15}H_{12}O_4$	256.25	-4.82	-7.14	-6.95	-6.77	-5.48



A. 毛蕊异黄酮与各核心靶点　B. 木犀草素与各核心靶点
C. 5,7 - 二羟基双氢黄酮与各核心靶点

图 8　分子对接图

A. Calycosin and its core targets　B. Luteolin and its core targets
C. Chrysin and its core targets

Fig. 8　Results of the molecular docking

活性成分与 Akt1 的结合最好。详见表 1 和图 8。

2.4　KATP 通道作用验证[9-10]

鬼点灯乙酸乙酯萃取物制备：将鬼点灯剪成 2 ~ 4 cm 的段，加 10 倍量 95% 乙醇，回流提取 3 次，收集、合并提取液，浓缩，回收溶剂，得浸膏。浸膏用 1.5 倍量纯水混悬，超声混匀，倒入分液漏斗，加 3 倍量石油醚，常温萃取 3 次，合并，浓缩，混悬液继续用 3 倍量乙酸乙酯常温萃取 3 次，合并，浓缩，回收溶剂，得浓缩物，即为鬼点灯乙酸乙酯萃取物。

供试品溶液制备：取吐温 - 80 和无水乙醇各 1 mL，混匀，取 30.5 mg 辣椒素，精密称定，置混合溶液中，搅拌均匀，加氯化钠溶液 8 mL，配制成浓度为 10 mmol / L 的原液，分装，储存于 - 20 ℃，备用。临用前取原液 60 μL，加氯化钠溶液 20 μL，配制成浓度为 30 μmol / L 的辣椒素溶液。取咳必清粉末 20 mg，精密称定，加 10 mL 氯化钠溶液，超声使溶解，即得咳必清药液。取鬼点灯乙酸乙酯萃取物 1.5 g，加氯化钠溶液 10 mL，超声使溶解，即得鬼点灯乙酸乙酯萃取物溶液。取格列本脲粉末 40 mg，精密称定，加氯化钠溶液 10 mL，超声使溶解，即得格列本脲药液。

建模、分组与给药：小鼠适应性饲养 1 周后放入特制容器，在此容器中，用超声雾化机以 1 mL / min 的速率通入 30 μmol / L 的辣椒素溶液雾化 2 min，并记录 5 min 内每只小鼠的咳嗽次数。筛选出 8 次 < 咳嗽次数 < 35 次的小鼠 50 只[采用 SPSS 22.0 统计学软件分析给药前各组小鼠咳嗽次数，差异无统计学意义（$P > 0.05$），即各组小鼠给药前质量分配合理]，随机分为空白组（A 组，灌胃 4 mL / kg 氯化钠溶液），格列本脲组（B 组，腹腔注射 20 mg / kg 格列本脲药液），咳必清对照组（C 组，灌胃 50 mg / kg 咳必清药液），实验组（D 组，灌胃 1.5 g / kg 鬼点灯乙酸乙酯萃取物溶液），格列本脲 + 实验组（E 组，腹腔注射 20 mg / kg 格列本脲药液 + 灌胃 1.5 g / kg 鬼点灯乙酸乙酯萃取物溶液），各 10 只。各组小鼠均连续给药 3 d，最后 1 次给药后禁食但允许饮水 12 h。

抑咳率计算：A 组，灌胃氯化钠溶液 1 h 后，记录 5 min 内的咳嗽次数；B 组，腹腔注射格列本脲药液 15 min 后，记录 5 min 内的咳嗽次数；C 组，灌胃咳必清药液 1 h 后，记录 5 min 内的咳嗽次数；D 组，灌胃鬼点灯乙酸乙酯萃取物溶液 1 h 后，记录 5 min 内的咳嗽次数；E 组，灌胃鬼点灯乙酸乙酯萃取物溶液 45 min 后腹腔注射格列本脲药液，15 min 后记录 5 min 内的咳嗽次数。记录完成后，处死小鼠并提取肺部组织。计算抑咳率，抑咳率（%）=（给药前小鼠咳嗽次数 - 给药后小鼠咳嗽次数）/ 给药前小鼠咳嗽次数 × 100%。

统计学处理：采用 SPSS 22.0 统计学软件分析。计量资料以 $\overline{X} \pm s$ 表示，行 t 检验，组间比较行单因素方差分析。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

试验结果：与本组给药前比较，C 组、D 组、E 组小鼠给药后的咳嗽次数均显著减少（$P < 0.05$）；与 A 组给

药后比较，C组、D组、E组小鼠的咳嗽次数均显著减少（$P < 0.05$）；与B组比较，C组、D组、E组小鼠的抑咳率均显著升高（$P < 0.05$）；与C组比较，E组小鼠的抑咳率显著降低（$P < 0.05$）。详见表2。可见，鬼点灯乙酸乙酯萃取物有明显止咳作用，但与格列本脲联用时止咳效果会减弱，表明格列本脲能干扰鬼点灯乙酸乙酯萃取物的止咳作用。格列本脲为KATP通道抑制剂，故鬼点灯乙酸乙酯萃取物止咳作用与KATP通道开放有关。

表2 各组小鼠咳嗽次数与抑咳率比较（$\bar{X} \pm s$，$n = 10$）

Tab. 2 Comparison of cough frequency and antitussive effect rate in each group（$\bar{X} \pm s$，$n = 10$）

组别	咳嗽次数（次）		抑咳率（%）
	给药前	给药后	
A组	16.70 ± 5.76	17.00 ± 5.31	
B组	15.30 ± 5.42	14.80 ± 5.77	3.46 ± 9.76
C组	16.60 ± 4.93	5.70 ± 1.34*#	64.51 ± 6.49△
D组	17.30 ± 5.42	6.50 ± 1.27*#	61.13 ± 6.01△
E组	14.90 ± 4.89	10.50 ± 3.44*#	28.92 ± 6.73△▲

注：与本组给药前比较，*$P < 0.05$；与A组给药后比较，#$P < 0.05$；与B组比较，△$P < 0.05$；与C组比较，▲$P < 0.05$。

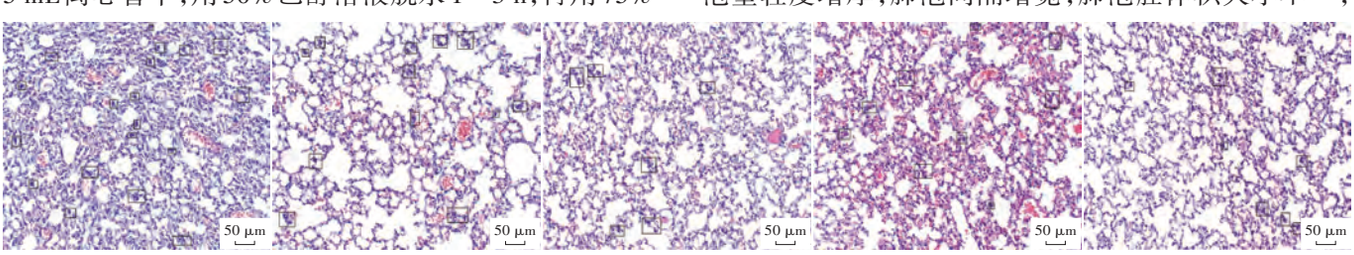
Note: Compared with those before medication, *$P < 0.05$; Compared with those in group A, #$P < 0.05$; Compared with those in group B, △$P < 0.05$; Compared with those in group C, ▲$P < 0.05$.

2.5 肺部组织形态学影响验证[11]

溶液制备：1）常用固定液。4%甲醛溶液（40%甲醛∶水 = 1∶9，V/V）。2）PBS。10 × PBS，即氯化钠79 g，氯化钾20 g，磷酸氢二钾18 g，磷酸二氢钾14.4 g，定容至1 L，调pH至7.4。稀释10倍可得PBS。3）不同体积分数乙醇。50%乙醇溶液（无水乙醇∶水 = 1∶1，V/V）；75%乙醇溶液（无水乙醇∶水 = 3∶1，V/V）；80%乙醇溶液（无水乙醇∶水 = 4∶1，V/V）；90%乙醇溶液（无水乙醇∶水 = 9∶1，V/V）；95%乙醇溶液（无水乙醇∶水 = 19∶1，V/V）。

石蜡切片制备：1）取样。提取2.4项下小鼠的肺部组织。2）固定。将收集到的肺部组织置固定液中，用脱脂棉球将肺部组织压入固定液面以下，使其沉入底部。3）脱水。用蒸馏水冲洗肺部组织3次，每次20 min，置5 mL离心管中，用50%乙醇溶液脱水1～3 h，再用75%乙醇溶液、80%乙醇溶液、90%乙醇溶液分别脱水1～2 h，继续用95%乙醇溶液脱水0.5 h或过夜，最后用无水乙醇按含水量脱水20～60 min。为防止脱水不彻底及进行过渡，选择无水乙醇－二甲苯（1∶1，V/V）处理5 min。4）透明。在二甲苯Ⅰ中进行透明处理2 min，在二甲苯Ⅱ中进行透明处理2 min。5）浸蜡。分别在蜡缸Ⅰ及蜡缸Ⅱ中各浸泡2 h。6）组织包埋。实验前备好包埋模具，模具中倒入熔蜡，镊子预热并迅速夹取组织块，切面朝下平放于模具底部，轻拿平放在冰冻台上，使其迅速冷却凝固，10 min后取出。7）切片。切片过程中，右手转动转轮，左手持毛笔，将刀口稍下端接住已切好的片子，并托住切下的蜡带。当蜡带达到一定长度后，右手停止转动转轮，然后用另一支毛笔轻轻将蜡带挑起，平放在盒子里，盒子上面铺有黑纸。切忌切片的速度不宜过快，转动转轮的力量应均匀，以防切片机震动过大导致切片的厚度不均匀；还应留意转动的方向，以免标本台向后移动而无法切割片子。切片完成后，立即用氯仿擦拭切片机的相关部分，保持清洁。8）展片。将样本切片分割开，置水浴（温度为42 ℃）中，使切片浮在水面上，自然展平，使用具有黏附性的载玻片，将其斜插入水面，以将切片捞取到合适的位置，使其贴附在载玻片上，然后将载玻片置60 ℃烘箱中至少烤片30 min，之后进行脱蜡和复水处理。将切片浸泡在二甲苯中20 min，再用二甲苯处理20 min；之后将切片转移到无水乙醇中浸泡5 min，再用无水乙醇处理5 min；将切片转移到95%乙醇溶液中浸泡5 min，再用70%乙醇溶液处理5 min。

苏木素－伊红（HE）染色：用蒸馏水冲洗切片，滴加苏木素染料染色1 min（染色时间的长短主要取决于组织类型和染料情况），再用蒸馏水将组织洗净至呈蓝紫色，滴加1%盐酸乙醇分化剂，使组织在分化液中浸泡2 s至组织变为红色，再用蒸馏水洗净组织，使其恢复蓝紫色，用伊红染料染色2～8 s（染色时间根据组织染色程度而定），再用蒸馏水冲洗切片，完成全部染色步骤后，将切片脱水，滴加中性树胶封片，置显微镜下观察并拍照。结果显示各组小鼠的肺泡壁均可见粒细胞浸润，肺泡壁轻度增厚，肺泡间隔增宽，肺泡腔体积大小不一，



A B C D E

注：黑框标注的地方为炎性细胞浸润。

图9 各组小鼠肺部组织炎性细胞浸润情况（× 200）

Note: The areas marked with black boxes indicate the inflammatory cell infiltration.

Fig. 9 Inflammatory cell infiltration in lung tissue of mice in each group（× 200）

细支气管上皮细胞水肿。其中，A 组和 B 组小鼠有大量炎性细胞浸润，C 组、D 组、E 组小鼠炎性细胞浸润有所减少。表明鬼点灯乙酸乙酯萃取物有减弱炎性细胞浸润的作用。详见图 9。

3 讨论

通过入血活性成分的网络药理学研究发现，鬼点灯乙酸乙酯萃取物发挥止咳作用主要与蛋白酪氨酸激酶活性、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性、跨膜受体蛋白激酶活性、Akt 活性、蛋白丝氨酸激酶活性等分子功能及 HIF－1、PI3K－Akt、糖尿病并发症中的 AGE－RAGE、Ras、cGMP－PKG 等信号通路有关，并通过分子对接验证其止咳作用明显，且与 KATP 通道有关。网络药理学分析发现，其与止咳相关的 cGMP－PKG 信号通路中涉及 KATP 通道，数据挖掘与分子对接结果相互验证，故推测鬼点灯发挥止咳作用可能与 cGMP－PKG 信号通路的 KATP 通道开放有关，并可减弱肺部组织的炎性细胞浸润。

格列本脲是一种 KATP 通道抑制剂[12]，本身对咳嗽没有作用，但当其与 KATP 通道开放剂联用时就会抑制开放剂的作用，又因 KATP 通道开放剂有明显止咳作用[10]，故本研究中通过鬼点灯乙酸乙酯萃取物与格列本脲联用的方法探讨提取物止咳的作用机制是有据可循的。动物实验发现，格列本脲可抑制鬼点灯乙酸乙酯萃取物的止咳作用，故推断鬼点灯乙酸乙酯萃取物为 KATP 敏感通道开放剂，即鬼点灯发挥止咳作用与 KATP 敏感通道密切相关。鬼点灯乙酸乙酯萃取物可减弱肺部组织的炎性细胞浸润，提示其可能有抗炎作用。鬼点灯乙酸乙酯萃取物的止咳作用与咳必清相当，减弱肺部炎性细胞浸润的能力较咳必清弱。HE 染色结果显示，鬼点灯乙酸乙酯萃取物与格列本脲联用，小鼠肺部组织的炎性细胞浸润减少。分析原因，可能是因为格列本脲为磺酰脲类化合物，磺胺类化合物为第 1 类人工合成抗菌药物[13]，故格列本脲减弱肺部组织炎性细胞浸润有一定的科学依据。

入血活性成分中，木犀草素与疾病靶点的结合最活跃，可能因其有抗菌消炎、免疫增强等作用[14]，可通过抑制 IL－36γ 分泌介导的促分裂原活化的蛋白激酶（MAPK）通路减轻中性粒细胞性哮喘[15]。另外，网络药理学研究结果中，多个通路均与咳嗽密切相关，如 HIF－1、PI3K－Akt 信号通路[16]。丘琴等[17]通过辣椒素引咳法建立动物咳嗽模型，观察龙利叶提取物的止咳机制发现，其止咳作用主要与 KATP 通道有关。本研究中再次发现同样的止咳机制，说明 KATP 通道在咳嗽机制方面有一定开发潜力，并与分子对接共同验证了网络药理学结果，可为鬼点灯的开发利用提供参考。

综上所述，鬼点灯乙酸乙酯萃取物可能通过 KATP 通道发挥止咳作用，可减弱肺部组织的炎性细胞浸润。

参考文献

[1] 魏文海，李兴芳，赵　琼，等．中医药治疗咳嗽的研究进展[J]．实用中医内科杂志，2022，36(11)：11－15.
[2] MCGOVERN AE，SHORT KR，KYWE MOE AA，et al. Translational review：Neuroimmune mechanisms in cough and emerging therapeutic targets[J]. J Allergy Clin Immunol，2018，142(5)：1392－1402.
[3] 侯　玉．咳嗽证治理论研究[D]．上海：上海中医药大学，2019.
[4] KANG SY，WON HK，LEE SM，et al. Impact of cough and unmet needs in chronic cough：A survey of patients in Korea[J]. Lung，2019，197(5)：635－639.
[5] ON PC. Overview of chronic cough[J]. Am J Manag Care，2022，28(9)：S152－S158.
[6] 赵小超，胡筱希，程英歌，等．鬼点灯药材脂溶性成分及抗氧化活性研究[J]．中国药业，2023，32(4)：55－58.
[7] 苏钰岚．广西荔浦市药用植物资源调查与评价[D]．桂林：广西师范大学，2021.
[8] ZHAO XC，GE ZM，LIAO CP，et al. The Activity，Composition and Molecular Mechanism of *Bothriospermum zeylanicum*（Hornem.）Fisch. Et Mey Alleviation of Nonsmall Cell Lung Cancer[J]. Natural Product Communications，2024，19(4)：1－13.
[9] LIN CC，XU ZY，WANG BH，et al. Relaxation Effect of Schisandra Chinensis Lignans on the Isolated Tracheal Smooth Muscle in Rats and Its Mechanism[J]. J Med Food，2021，24(8)：825－832.
[10] 梁　婷，黄　露，曹征宇．清宣止咳颗粒止咳、祛痰、抗炎作用评价[J]．中成药，2022，44(2)：410－415.
[11] WANG Y，WANG Y，MA J，et al. YuPingFengSan ameliorates LPS－induced acute lung injury and gut barrier dysfunction in mice[J]. J Ethnopharmacol，2023，312：116452.
[12] KONG DW，DU LD，LIU RZ，et al. Baicalein attenuates rotenone－induced SH－SY5Y cell apoptosis through binding to SUR1 and activating ATP－sensitive potassium channels[J]. Acta Pharmacol Sin，2024，45(3)：480－489.
[13] 王　娟．唑类磺胺新衍生物的设计合成及其抗菌活性研究[D]．重庆：西南大学，2021.
[14] 冯　爽，姜亚玲，刘金海，等．木犀草素衍生物研究进展[J]．化学通报，2024，87(3)：300－309.
[15] QIAO XR，FENG T，ZHANG D，et al. Luteolin alleviated neutrophilic asthma by inhibiting IL－36γ secretion－mediated MAPK pathways[J]. Pharm Biol，2023，61(1)：165－176.
[16] DONG Y，LIU Y，TANG J，et al. Zhisou powder displays therapeutic effect on chronic bronchitis through inhibiting PI3K/Akt/HIF－1α/VEGFA signaling pathway and reprograming metabolic pathway of arachidonic acid[J]. J Ethnopharmacol，2024，319(Pt 1)：117110.
[17] 丘　琴，赵应学，范秀春，等．龙利叶止咳活性部位筛选及其作用机制研究[J]．中草药，2019，50(6)：1430－1434.

（收稿日期：2024－04－29；修回日期：2025－02－07）