

网络药理学研究黄芪注射液次生成成分治疗白细胞减少症的机制

曲婷丽*, 张楠, 周小雪

(山西医科大学 药学院, 山西 太原 030001)

摘要:本研究基于网络药理学、分子对接及体内实验探究黄芪注射液次生成成分治疗白细胞减少症的活性成分及作用机制。根据质谱信息、对照品裂解规律及文献资料对黄芪注射液次生成成分中的化学成分进行指认;利用Swiss Target Prediction平台获取化学成分相关作用靶点;利用Gene cards和Disgenet数据库筛选白细胞减少症相关靶点;对得到的成分作用靶点与疾病相关靶点取交集,获得黄芪注射液次生成成分发挥升高白细胞作用的潜在靶点,采用Cytoscape 3.9.1软件构建“成分-疾病”靶点网络,分析活性成分;将共有靶点导入String网站,进行蛋白互作分析,构建蛋白-蛋白互作(Protein-Protein Interaction, PPI)网络,分析关键靶点;并对关键靶点进行基因本体(Gene Ontology, GO)功能及京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)分析;通过分子对接和白细胞减少症小鼠模型对网络药理学结果进行验证。黄芪注射液次生成成分中共鉴定25个化合物,其中黄酮类21个,皂苷类4个。黄芪注射液次生成成分升高白细胞作用的潜在作用靶点有121个,涉及486个生物过程、68个细胞组分、96个分子功能和155条信号通路。筛选得到异鼠李素-3-O- β -龙胆二糖苷、紫云英苷、6"-O-乙酰基毛蕊异黄酮苷、6"-O-乙酰基芒柄花苷、汉黄芩素等5个潜在活性成分,细胞肿瘤抗原p53(Cellular Tumor Antigen P53, TP53)、RAC-2 丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶(RAC- α Serine/threonine-Protein Kinase, AKT)、白细胞介素-6(Interleukin-6, IL6)等8个关键靶蛋白,以及磷脂酰肌醇3激酶-蛋白激酶B信号通路、Janus激酶-信号转导子和转录激活子信号通路等信号通路。5个潜在活性成分均与关键靶点有较强的结合活性,黄芪注射液次生成成分可回调白细胞减少症小鼠血清中IL-6和G-CSF的含量。黄芪注射液次生成成分可能是通过异鼠李素-3-O- β -龙胆二糖苷、紫云英苷、6"-O-乙酰基毛蕊异黄酮苷、6"-O-乙酰基芒柄花苷、汉黄芩素等活性成分,作用于TP53、AKT1、IL6等关键靶点,通过磷脂酰肌醇3激酶-蛋白激酶B信号通路和Janus激酶-信号转导子和转录激活子信号通路,发挥升高白细胞的作用。

关键词:黄芪注射液次生成成分;网络药理学;分子对接;体内实验;活性成分

中图分类号:R285 文献标志码:A 文章编号:0253-2395(2025)02-0252-13

Exploring the Mechanism of Secondary Components of Huangqi Injection in the Treatment of Leukopenia Using Network Pharmacology

QU Tingli*, ZHANG Nan, ZHOU Xiaoxue

(School of Pharmaceutical Science, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract: The objective of this study was to investigate the active components in secondary components of Huangqi injection and its mechanism for the effect on leukopenia using network pharmacology, molecular docking and in vivo experiments. According to the mass spectrometry information, the cleavage law of the reference substance and the reference literatures, the chemical compositions

收稿日期:2024-07-31;接受日期:2024-12-23

基金项目:山西省科技厅基础研究项目(20210302124586);山西省重点研发项目(202102130501023);太原市科技局“双百攻关行动”首批关键核心技术攻关“揭榜挂帅”项目(2024TYJB0150);山西省技术创新中心项目(202104010911006);山西省教育厅教改项目(J20230518)

* 通信作者:曲婷丽(1981-),女,山西运城人,博士,副教授,研究方向中药新药及代谢组学。E-mail:qutingli@126.com

引文格式:曲婷丽,张楠,周小雪.网络药理学研究黄芪注射液次生成成分治疗白细胞减少症的机制[J].山西大学学报(自然科学版),2025,48(2):252-264. DOI:10.13451/j.sxu.ns.2024171.

in secondary components of Huangqi injection were identified; Swiss Target Prediction platform was used to obtain the relevant targets of the druggable components; leukopenia-related targets was screened by Gene cards and Disgenet databases; the intersections between the obtained component targets and disease-related targets were used to obtain the potential targets of secondary components of Huangqi injection in treating leukopenia, and the "component targets-disease targets" network was constructed by Cytoscape 3.9.1 software to analyze the active ingredients; the common targets were imported into the String website for protein-protein interaction analysis to identify key targets; Gene Ontology (GO) function and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway were carried out through bioinformatics website; molecular docking and leukopenia mouse models were used to verify the results of network pharmacology. A total of 25 compounds were identified in secondary components of Huangqi injection, including 21 flavonoids and 4 saponins. There are 121 potential targets for secondary components of Huangqi injection in treating leukopenia, involving 486 biological processes, 68 cellular components, 96 molecular functions and 155 signaling pathways. Five potential active ingredients including Isorhamnetin-3-O- β -gentiobioside, Astragalin, 6"-O- acetylCalycosin-7-O-D-glycoside, 6"-O-acetylononin, and Wogonin, 8 key target proteins including TP53, AKT1, IL6 and signaling pathways such as Phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K-Akt) signaling pathway, Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) signaling pathway were obtained. The 5 potential active ingredients have strong binding affinity to the key targets. Secondary components of Huangqi injection could significantly regulate the contents of IL-6 and G-CSF in serum of leukopenia mice. Isorhamnetin-3-O- β -gentiobioside, Astragalin, 6"-O- acetylCalycosin-7-O-D-glycoside, 6"-O-acetylononin, and Wogonin are the active components of secondary components of Huangqi injection, which may act on key targets such as TP53, AKT1, IL6, etc, key pathways including PI3K-Akt signaling pathway, and JAK-STAT signaling pathway to play its therapeutic leukopenia.

Key words: secondary components of Huangqi injection; network pharmacology; molecular docking; *in vivo*; active components

0 引言

白细胞减少症是指外周血白细胞总数低于 $4.0 \times 10^9/L$ 的情况,是肿瘤患者放疗和化疗过程中的常见不良反应^[1]。白细胞减少症使得机体免疫功能低下,易诱发感染,严重的可危及生命^[2]。目前临床上治疗白细胞减少症的药物主要包括生物技术药物粒细胞集落因子(G-CSF)、西药、中药等,其中G-CSF效果较好,但费用昂贵,西药的毒副作用较多^[3],中药由于其副作用较少,在白细胞减少症治疗中得到广泛应用。中医将白细胞减少症归属于“虚损”“虚劳”等范畴,临床常以健脾益肾、补益气血等为治疗原则^[4-5],选用补中益气丸^[6]、驴胶补血颗粒^[7]、芪胶升白胶囊^[8]等方药进行治疗。

中药黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的根。黄芪注射液是由黄芪药材经水提醇沉法制备而成^[9]。文献^[10-13]及课题组前期研究发现^[14]:黄芪注射液具有升高白细胞的作用,但药效活性成分尚不明确。黄芪注射液中的成分可分为初生成分和次生成分,初生成分主要有有机酸类(如醋酸、苹果酸、富

马酸)、氨基酸类(如丙氨酸、脯氨酸、亮氨酸)、糖类(如葡萄糖、蔗糖)等,次生成分主要是黄酮类(如毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、紫檀烷苷)和皂苷类(如黄芪甲苷)成分^[15]。

课题组前期采用液相色谱-质谱(LC-MS)代谢组学方法,确定黄芪注射液次生成分有升高白细胞的作用,且升白机制可能与干预亚油酸代谢途径、烟酸和烟酰胺代谢途径、三羧酸循环途径有关^[16],但前期研究只证明黄芪注射液次生成分有升白作用,对于次生成分中具体的化学成分及具有升白作用的药效成分并不清楚。本研究采用超高效液相色谱串联四极杆静电场轨道阱质谱(UPLC-Q Exactive Orbitrap-HRMS)方法对黄芪注射液次生成分中的化学成分进行鉴定,进一步采用网络药理学、分子对接及体内实验的方法,探究黄芪注射液次生成分升高白细胞的药效成分及作用机制,可为寻找黄芪注射液中具有升高白细胞作用的药效物质奠定基础。

1 材料与方法

1.1 药物及动物

黄芪注射液(规格:10 mL/支(2 g/mL),批号:230530B1,神威药业集团有限公司),注射

用环磷酸胺(规格:200 mg/瓶,批号:8J270A,axter Oncology GmbH)。雄性ICR小鼠(SPF级,体质量18 g~20 g,北京斯贝福技术有限公司)。色谱甲醇(色谱纯,LOT 230522,天津市康科德科技有限公司)。

1.2 数据库与软件

Disgenet 数据库(<http://www.disgenet.org/>)、GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)、Venny 2.1.0(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)、RCSB PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)、PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、String 网站(<https://string-db.org/>)、DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/>)数据库、Cytoscape 软件(版本号:3.9.1)、Pymol 软件(版本号:2.6.0)、AutoDock 软件(版本号:4.2.6)、微生信网站(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)。

1.3 黄芪注射液次生成成分中化学成分分析

参照课题组之前建立的方法^[16]制备黄芪注射液次生成成分。

对照品溶液的制备取毛蕊、异黄酮、紫檀烷苷等的对照品,精密称重,用色谱甲醇溶解,依次配成质量浓度分别为56.48 $\mu\text{g/mL}$ 、75.48 $\mu\text{g/mL}$ 、86.70 $\mu\text{g/mL}$ 、81.28 $\mu\text{g/mL}$ 、24.52 $\mu\text{g/mL}$ 、83.68 $\mu\text{g/mL}$ 、8.352 $\mu\text{g/mL}$ 、9.808 $\mu\text{g/mL}$ 、53.92 $\mu\text{g/mL}$ 、43.68 $\mu\text{g/mL}$ 、63.36 $\mu\text{g/mL}$ 、108.80 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准品溶液,备用。

供试品溶液制备取活化的SPE C₁₈固相萃取小柱(江苏汉邦科技股份有限公司)(甲醇活化,蒸馏水洗脱至无醇味),将10 mL黄芪注射液次生成成分上样,待完全吸附后,先用15 mL水洗脱,继续使用体积分数为70%甲醇15 mL洗脱,收集70%甲醇洗脱液,蒸干,加甲醇溶解,定容至1.0 mL容量瓶中。

色谱条件采用高分辨液质联用仪(美国Thermo Scientific Q Exactive公司),以ACQUITY UPLC®HSS T3为色谱柱(美国Waters公司,型号:2.1 mm×100 mm,1.8 μm),乙腈(色谱纯,LOT 230418,天津市康科德科技有限公司)(A)-水(B)为流动相,梯度洗脱如下:0~3 min,20%A;3~6 min,20%~27%A;6~10 min,27%A;10~12 min,27%~43%A;12~16 min,

43%~60%A;16~20 min,60%~100%A;20~24 min,100%A;24~26 min,100%~20%A,流速0.3 mL/min,进样量2.0 μL ,柱温35 $^{\circ}\text{C}$,检测波长230 nm。灭菌注射液用水(1903093205,石家庄四药有限公司)。IL-6试剂盒(202310),G-CSF试剂盒(202309)均购于江苏酶免实业有限公司。毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷(20120428),7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷(20100202),芒柄花素(20120528),3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀烷(20120505),黄芪皂苷IV(20120315),黄芪皂苷III(20120516),黄芪皂苷II(20110503),黄芪皂苷I(20111125):均购于上海永恒生物科技有限公司;毛蕊异黄酮(13082713),芒柄花苷(13021808):均购于成都曼思特生物科技有限公司。

质谱条件离子源为电喷雾电离(Electrospray Ionization, ESI),正负离子同时扫描,电离电压均为3 500 V,鞘气流速35个流量单位,辅助气流速10个流量单位,毛细管温度320 $^{\circ}\text{C}$,探头加热器温度300 $^{\circ}\text{C}$,数据采集范围 m/z 150~1 500,质量分辨率70 000。

1.4 网络药理学方法

1.4.1 疾病靶点和黄芪注射液次生成成分靶点的筛选

以leukopenia为检索词,分别在Genecards数据库(<https://www.genecards.org/>)和Disgenet数据库(<https://www.disgenet.org/>)中进行检索,合并去重后获得白细胞减少症相关靶点。

将鉴定好的黄芪注射液次生成成分名称输入到Pubchem有机小分子生物活性数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中检索Canonical SMILES,后将Canonical SMILES复制到Swiss Target Prediction平台行靶点预测,合并去重后获得黄芪注射液次生成成分的靶点。将白细胞减少症和黄芪注射液次生成成分的靶点利用Venny 2.1.0在线工具(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)进行相交,获得黄芪注射液次生成成分治疗白细胞减少症的靶点。

1.4.2 黄芪注射液次生成成分-疾病-作用靶点网络构建及蛋白-蛋白互作(protein-protein interaction,

PPI)网络构建

黄芪注射液次生成成分-疾病-作用靶点网络图通过 Cytoscape 3.9.1 软件构建,利用该软件的插件 CytoNCA 对节点的度中心性(Degree)值进行计算,选取 Degree 值排名前五的作为核心成分。

将上述交集靶点导入至 String 平台(<https://cn.string-db.org/>),种类选择“Homo sapiens”,隐藏网络中未被连接的靶点,其余参数保持默认,并将得到数据的“.tsv”文件导入 Cytoscape 3.9.1 软件对其进行可视化分析,利用 CytoNAC 插件对 PPI 网络的中介中心性(betweenness, BC)、接近中心性(closeness, CC)、度中心性(Degree, DC)进行计算,选择大于经过两次 BC、CC、DC 的均值筛选的靶点作为黄芪注射液次生成成分治疗白细胞减少症的关键靶点。

1.4.3 功能富集分析

将采用 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) 数据库对治疗白细胞减少症的靶点进行基因本体分析(Gene Ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析。并将结果导入在线绘图工具微生信(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)进行可视化。

1.5 分子对接

选取 PPI 网络的核心靶点与“黄芪注射液次生成成分-疾病-作用靶点网络”的活性成分进行分子对接,通过 RCSB PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)获得核心靶点的三维晶体结构的“.pdb”格式, PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获得活性成分三维结构,使用 AutoDock 软件进行对接,结合能 < -5 kcal/mol 表示具有较好的结合活性,结合能 < -7 kcal/mol 表明具有强烈的结合活性,使用 Pymol 2.6.0 对对接结果进行可视化。

1.6 体内验证实验

将小鼠适应性喂养 7 d 后,随机分为空白组、模型组和黄芪注射液次生成成分组,每组 10 只。模型组和次生成成分组小鼠均腹腔注射环磷酰胺 80 mg/kg 进行造模,空白组则注射相同体积的灭菌注射用水。造模 3 d 后给药,黄芪注射液次生成成分组给药剂量为 0.08 mL/10 g,空白组和模型

组腹腔注射等体积灭菌注射用水,连续给药 7 d。

在实验第 11 天将小鼠眼球摘取并收集血液,待血液自然沉降后于 4 °C、3 500 r/min 的转速下用高速冷冻离心机(上海力新仪器,型号:KDC-149HRNeofuge 15R)离心 15 min,吸取上清液于 0.2 mL EP 管中,置于 -80 °C 环境下储存。

采用酶联免疫吸附法检测小鼠血清中白细胞介素-6(IL-6)和粒细胞集落刺激因子(G-CSF)含量。动物实验已获得山西医科大学医学伦理委员会批准(编号:2024SJJLL156)。

2 实验结果

2.1 黄芪注射液次生成成分中化学成分分析

采用 UPLC-Q Exactive Orbitrap-HRMS 技术对黄芪注射液次生成成分中的化学成分进行研究,其总离子流图如图 1 所示,共鉴定了 25 个化合物,其中包括 21 个黄酮类成分,4 个皂苷类成分。首先对已有的 10 个对照品化合物(毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷(20120428), 7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷(20100202),芒柄花素(20120528), 3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀烷(20120505),黄芪皂苷 IV(20120315),黄芪皂苷 III(20120516),黄芪皂苷 II(20110503),黄芪皂苷 I(20111125);毛蕊异黄酮(13082713),芒柄花苷(13021808))的色谱保留时间、紫外吸收光谱图和质谱图进行了分析,对于其他化合物的指认,根据精确分子量,依据误差小于百万分之五,计算可能的化学组成,最后通过碎片离子峰与文献资料报道^[17-23],来推断可能的化学结构。经鉴定黄芪注射液次生成成分中含有 25 种成分,鉴定结果见表 1。

2.2 网络药理学

2.2.1 疾病靶点获取

在 Genecards 数据库中以相关值 Relevance > 1 作为筛选条件,共筛选到 729 个白细胞减少症相关靶点。在 Disgenet 数据库中检索到 440 个与白细胞减少症有关的靶点,合并去重后得到 947 个靶点。

2.2.2 黄芪注射液次生成成分治疗白细胞减少症的靶点获取

通过鉴定,从黄芪注射液中共获得 25 个次

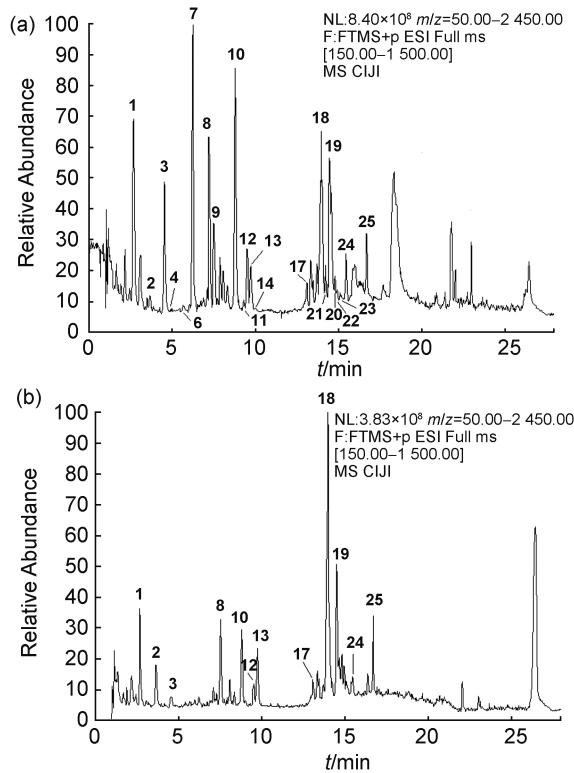


图1 黄芪注射液次生成成分总离子流图
(a) 正离子流图; (b) 负离子流图

Fig. 1 Total ion diagrams of secondary components of Huangqi injection

(a) diagram of positive ion; (b) diagram of negative ion

生成分。在 Swiss Target Prediction 平台进行靶点预测, 去除重复靶点后共获得 633 个黄芪注射液次生成成分的靶点。将白细胞减少症(947 个靶点)和黄芪注射液次生成成分的靶点进行相交, 共获得 121 个交集靶点(图 2)。

2.2.3 黄芪注射液次生成成分-疾病-作用靶点网络构建

利用 Cytoscape 3.9.1 软件, 构建黄芪注射液次生成成分-疾病-作用靶点网络(图 3), 共包括 148 个节点, 758 条边, Degree 值排名前 5 的成分分别为异鼠李素-3-O-β-龙胆二糖苷、紫云英苷、6''-O-乙酰基毛蕊异黄酮苷、6''-O-乙酰基芒柄花苷、汉黄芩素, 因此这 5 种成分可能是黄芪注射液次生成成分治疗白细胞减少症的关键成分。

2.2.4 PPI 网络构建

将 121 个交集靶点导入到 String 平台以获得 PPI 网络信息, 隐藏掉不被连接的靶点后该网络共包含 119 个节点和 1 650 条边, 对拓扑分析得出的 BC、CC、DC 数据进行均值计算, 以确定最终的

表1 化学成分鉴定结果

Table 1 The result of chemical composition identification

序号	成分
1	毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷
2	7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄酮-7,2'-二-O-β-D-葡萄糖苷
3	紫云英苷
4	异鼠李素-7-O-葡萄糖苷
5	异鼠李素-3-O-β-龙胆二糖苷
6	红车轴草素-7-O-吡喃葡萄糖苷
7	6''-O-乙酰毛蕊异黄酮-7-O-D-葡萄糖苷
8	紫檀烷苷
9	芒柄花苷
10	9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-葡萄糖苷
11	异鼠李素
12	7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷
13	甘草素
14	红车轴草素
15	毛蕊异黄酮
16	汉黄芩素
17	6''-O-乙酰基芒柄花苷
18	3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀烷
19	黄芪皂苷 IV
20	芒柄花素
21	黄芪皂苷 II
22	黄芪皂苷 V
23	黄芪皂苷 VII
24	7,2-二羟基-3,4-二甲氧基异黄酮
25	(3R)-8,2'-二羟基-7,4'-二甲氧基异黄酮

黄芪注射液次生成成分 白细胞减少症

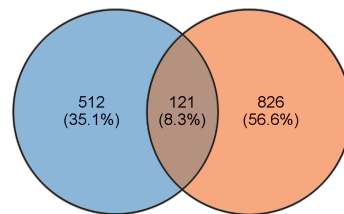


图2 黄芪注射液次生成成分-白细胞减少症交集靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of secondary components of Huangqi injection targets and leukopenia targets

核心靶点。第一次筛选: 在这个步骤中, 选取的是那些数值都高于各项均值的靶点, 总共得到 22 个符合条件的靶点。第二次筛选: 在第一次筛选的基础上, 再次进行筛选, 同样选取数值高于各项均值的靶点, 总共得到了 8 个符合条件的靶点。

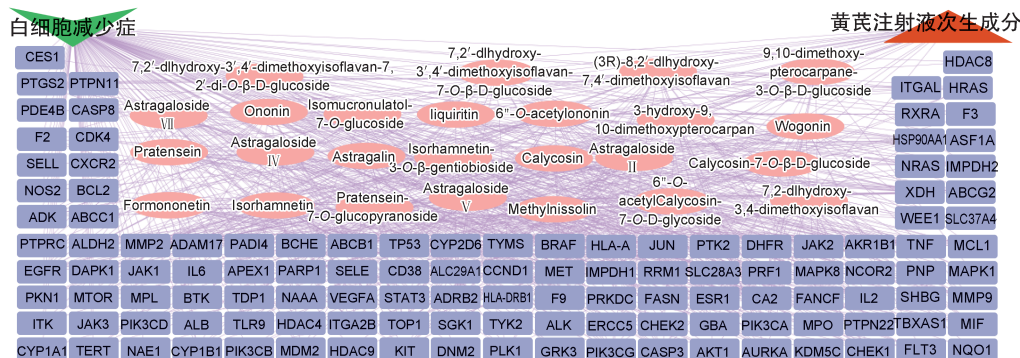


图3 黄芪注射液次生成分-疾病靶点网络图

注:粉色椭圆代表次生成分,紫色长方形代表交集靶点,绿色V形代表白细胞减少症,橙色三角形代表黄芪注射液次生成分。

Fig. 3 Network of secondary components of Huangqi injection targets-disease targets

Note: The Pink Ellipse represents the secondary components, the purple rectangle represents the intersecting targets, the Green V represents the leukopenia, and the orange triangle represents the secondary components of Huangqi injection.

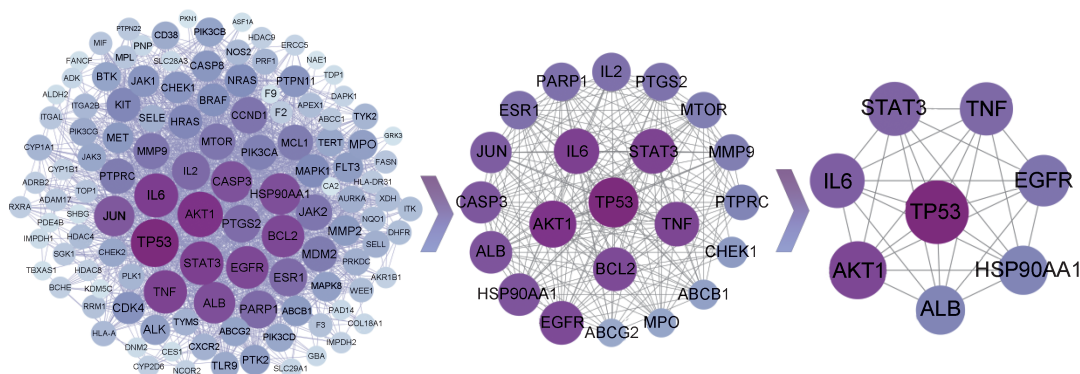


图4 黄芪注射液次生成分治疗白细胞减少症交集靶点的PPI网络图

注:Degree值越高,节点颜色越深,面积越大;Degree值越低,节点颜色越淡,面积越小。

Fig. 4 PPI network for common targets of secondary components of Huangqi injection in the effects on leukopenia

Note: The higher the Degree value, the darker the node color, the larger the area; the lower the Degree value, the lighter the node color, the smaller the area.

因此核心靶点分别为细胞肿瘤抗原p53 (TP53)、丝氨酸/苏氨酸激酶1 (AKT1)、白细胞介素-6 (IL6)、信号传导及转录激活蛋白3 (STAT3)、肿瘤坏死因子(TNF)、表皮生长因子受体(EGFR)、白蛋白 (ALB)、热休克蛋白90 α 家族A类成员1 (HSP90AA1),图4为核心靶点筛选的可视化过程。

2.2.5 功能富集分析

将黄芪注射液次生成分治疗白细胞减少症的交集靶点进行GO和KEGG富集分析。KEGG中共获得155条信号通路,图5(a)给出了P值最小的前20条通路,结果显示,黄芪注射液次生成分治疗白细胞减少症主要与癌症、白血病、病毒感染、免疫细胞等相关途径相关,

主要包括高级糖基化终末产物-受体、磷脂酰肌醇3激酶-蛋白激酶B信号通路、EGFR酪氨酸激酶抑制剂耐药、人类T细胞白血病病毒1感染、Janus激酶-信号转导子和转录激活子信号通路、Toll样受体信号通路和叉头框蛋白O信号通路。GO分析结果显示生物过程(BP)占486条,细胞组成(CC)占68条,分子功能(MF)占96条,图5(b)给出了P值最小的前10个结果,在BP方面,黄芪注射液次生成分能够调节炎症反应、凋亡过程的负调节、磷酸化等;在CC方面,黄芪注射液次生成分调控的蛋白主要定位在细胞核、细胞质、质膜等;在MF方面,黄芪注射液次生成分主要富集在蛋白结合、相同蛋白结合、ATP结合等。

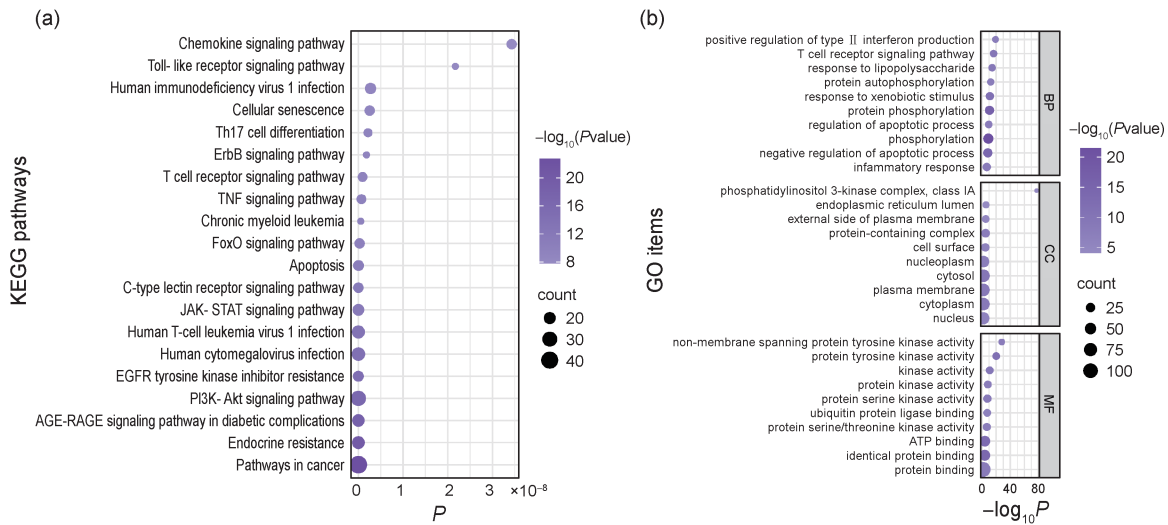


图5 功能富集分析图

(a) 交集靶点的KEGG通路富集分析; (b)交集靶点的GO分析。

Fig. 5 Diagram of functional enrichment analysis

(a) KEGG pathway enrichment analysis of intersecting targets; (b) GO analysis of intersecting targets.

2.3 分子对接

PPI网络的核心靶点和PDB数据库检索号分别为TP53 (PDBID: 3D06)、AKT1 (PDBID: 1UNQ)、IL6 (PDBID: 1ALU)、STAT3 (PDBID: 5AX3)、TNF (PDBID: 1A8M)、EGFR (PDBID: 3VRP)、ALB (PDBID: 1AO6)、HSP90AA1 (PDBID: 1BYQ)。“黄芪注射液次生成成分-疾病-作用靶点网络”的活性成分为异鼠李素-3-O- β -龙胆二糖苷、紫云英苷、6''-O-乙酰基毛蕊异黄酮苷、6''-O-乙酰基芒柄花苷、汉黄芩素,作为分子对接化合物。

对接结果显示(表2):5个成分均能与8个蛋白较好的结合(结合能 ≤ -5.0 kcal/mol),5个成分与EGFR靶点、ALB靶点结合能力强,说明这5个成分可能为黄芪注射液次生成成分发挥升高白细胞作用的活性成分,EGFR、ALB可能为黄芪注射液次生成成分发挥作用的关键靶标。使用PyMOL 2.6软件将8个靶点与结合能最低的活性成分进行对接结果的可视化分析(图6),TP53与异鼠李素-3-O- β -龙胆二糖苷在ARG-110、SER-269、PHE-113位形成氢键,AKT1与异鼠李素-3-O- β -龙胆二糖苷在SER-56、TRP-80位形成氢键,IL-6与异鼠李素-3-O- β -龙胆二糖苷在GLN-127、LYS-120、VAL-96、ASN-144、PRO-139位形成氢键,STAT3与6''-O-乙酰基毛蕊异黄酮苷在ASP-140、ARG-

58、TYR-27、GLN-96位形成氢键,TNF与紫云英苷在GLN-125、ASN-34、ASP-31、ASN-30位形成氢键,EGFR与6''-O-乙酰基芒柄花苷在LEU-44、SER-40、ASP-245位形成氢键,ALB与6''-O-乙酰基毛蕊异黄酮苷在LYS-351、SER-232位形成氢键,HSP90AA1与异鼠李素-3-O- β -龙胆二糖苷在GLY-132、ASN-51、PHE-138、ASN-106位形成氢键。

2.4 黄芪注射液次生成成分对白细胞减少症小鼠血清中IL-6及G-CSF含量的影响

IL-6及CSF是磷脂酰肌醇3激酶-蛋白激酶B信号通路和Janus激酶-信号转导子和转录激活子信号通路中的重要因子,因此实验通过测定白细胞减少症小鼠血清中IL-6及G-CSF的含量,对网络药理学结果进行验证,结果如图7所示:与空白组比较,使用环磷酸腺苷后小鼠血清中的IL-6和G-CSF质量浓度分别从 $88.68 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $955.04 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 显著升高至 $215.21 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1228.40 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.01$),黄芪注射液次生成成分能回调环磷酸腺苷所致的IL-6 ($P < 0.01$)及G-CSF ($P < 0.01$)的升高。说明黄芪注射液次生成成分可调节小鼠血清中IL-6及G-CSF的水平,从而作用于磷脂酰肌醇3激酶-蛋白激酶B信号通路和Janus激酶-信号转导子和转录激活子信号通路发挥升高白细胞的作用,验证了网络药理学结果。

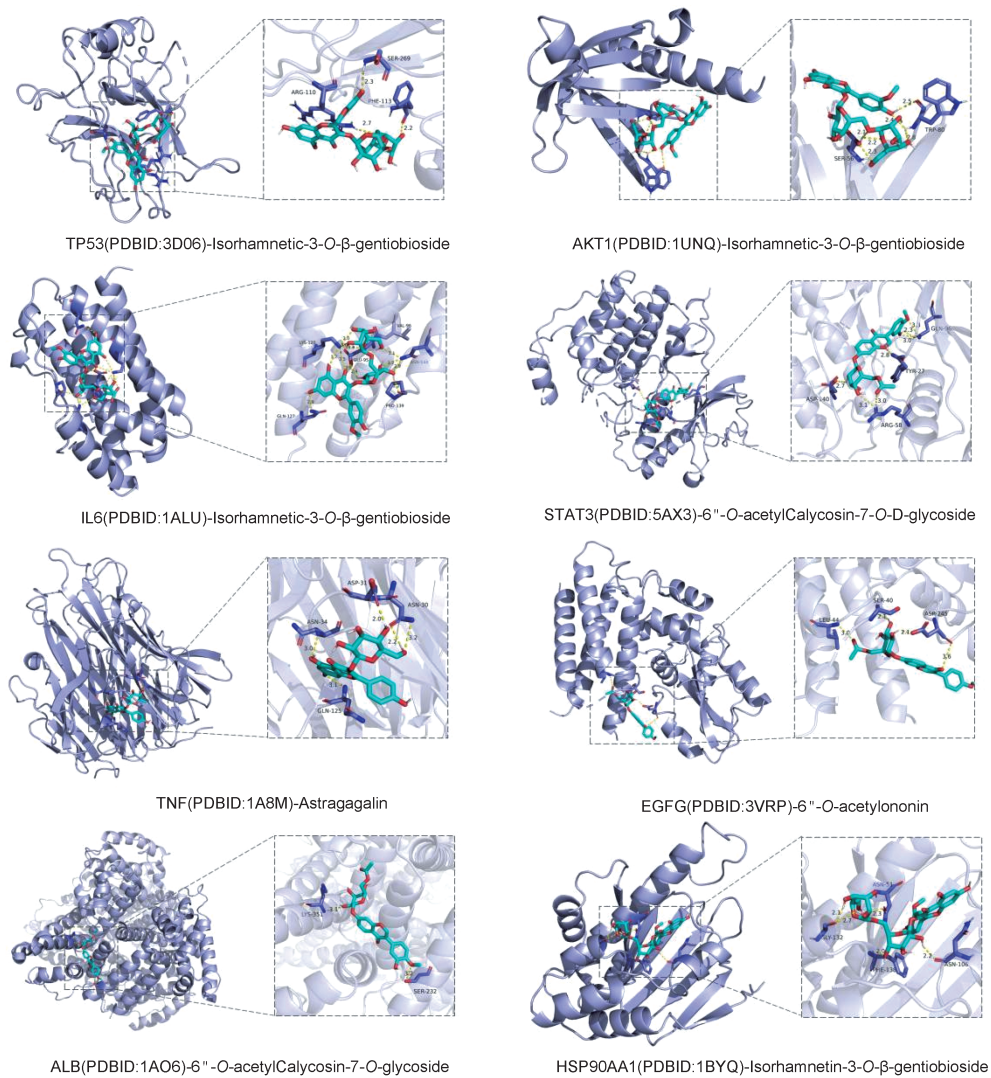


图6 活性成分与核心靶点的分子对接结果可视化

Fig. 6 Visualization of molecular docking results of active components and key targets

表2 活性成分与核心靶点的分子对接结果

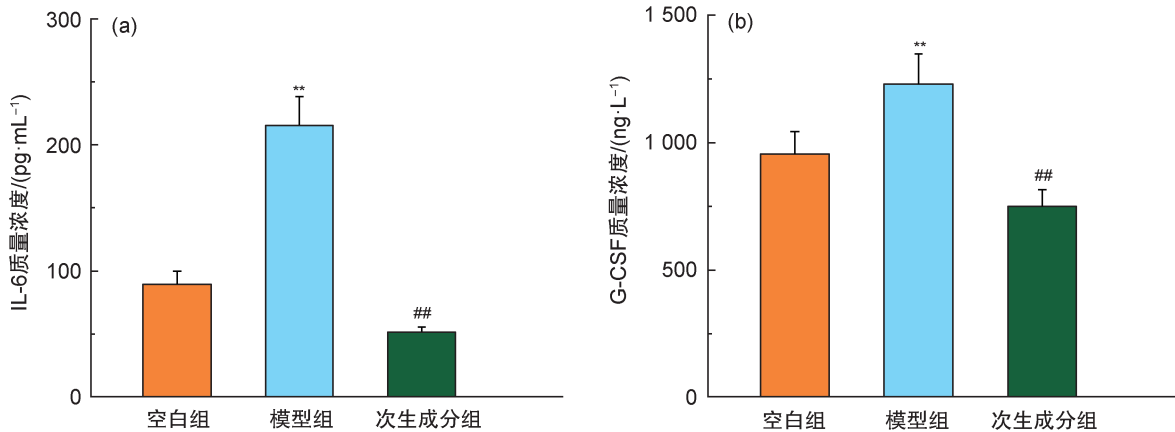
Table 2 Molecular docking between core active components and key targets

活性成分	结合能/(kcal·mol ⁻¹)							
	TP53 (3D06)	AKT1 (1UNQ)	IL6 (1ALU)	STAT3 (5AX3)	TNF (1A8M)	EGFR (3VRP)	ALB (1AO6)	HSP90AA1 (1BYQ)
异鼠李素-3-O-β-龙胆二糖苷	-7.9	-7.5	-7.3	-7.8	-7.2	-8.2	-8.9	-8.7
紫云英苷	-7.7	-7.3	-6.7	-7.0	-7.6	-8.2	-8.6	-7.5
6''-O-乙酰基毛蕊异黄酮苷	-7.5	-6.8	-7.0	-8.4	-7.2	-8.5	-9.3	-7.9
6''-O-乙酰基芒柄花苷	-7.8	-6.9	-7.1	-8.2	-7.0	-8.7	-9.1	-7.6
汉黄芩素	-7.3	-6.2	-6.3	-7.7	-6.5	-7.2	-7.7	-7.8

3 分析与讨论

本研究先通过网络药理学对黄芪注射液次生成分中升白的药效成分、靶点、通路进行预测,接着通过分子对接对预测的药效成分及靶点的对接情况进行评价,最后采用白细胞减少

症小鼠模型分析黄芪注射液次生成分对预测的关键通路中细胞因子的影响,以寻找黄芪注射液次生成分中治疗白细胞减少症的药效成分,并对其发挥作用的机制进行分析。结果显示黄芪注射液次生成分中的异鼠李素-3-O-β-龙胆二糖苷、紫云英苷、6''-O-乙酰基毛蕊异黄酮



注:**:与空白组比较, $P<0.01$;#:与模型组比较, $P<0.01$ 。

图7 黄芪注射液次生成成分对小鼠血清中IL-6和G-CSF含量的影响

Fig. 7 Effect of secondary components of Huangqi injection on the contents of IL-6 and G-CSF in serum of mice

苷、6"-O-乙酰基芒柄花苷、汉黄芩素5种活性成分可通过干预TP53、AKT1、IL6、STAT3、TNF、EGFR、ALB、HSP90AA1等关键靶点,作用于磷脂酰肌醇3激酶-蛋白激酶B信号通路、Janus激酶-信号转导子和转录激活子信号通路等信号通路,发挥升高白细胞的作用。

根据本研究建立的“成分-疾病-作用靶点”网络图,筛选得到Degree值高的活性成分有异鼠李素-3-O- β -龙胆二糖苷、紫云英苷、汉黄芩素是黄酮类成分,6"-O-乙酰基毛蕊异黄酮苷、6"-O-乙酰基芒柄花苷为异黄酮类成分,5种活性成分在黄芪注射液次生成成分中的含量均较低,但Degree值高于含量较高的毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、紫檀烷苷。文献[24]报道:毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷具有升高白细胞的作用,前期研究发现^[25]:黄芪中的总黄酮具有升高白细胞的作用。本研究分析中也发现,毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、紫檀烷苷能与白细胞减少症相关靶点很好结合,但Degree值小于上述的5种成分,这说明黄芪注射液次生成成分中除了含量较高的黄酮类成分具有升高白细胞的作用外,对于微量成分其升白的作用也不容忽视,因此我们应关注此类微量成分。

在以上筛选的关键靶点及通路中,TP53是一种抑癌基因^[26],是细胞应激反应和造血干细胞稳态的中枢调节因子^[27],TP53编码产生的p53蛋白在诱导细胞凋亡、调控细胞周期方面发挥重要的作用^[28];AKT1激活后会磷酸化下游的靶蛋白,调控其活性,而抵抗细胞凋亡^[29],

对白细胞存活具有重要意义^[30];IL-6在自身免疫、慢性炎症、肿瘤等疾病中均具有重要作用^[31],与淋巴细胞、粒细胞在内的白细胞生长和分化有关^[32],会破坏骨髓造血的微环境,导致骨髓抑制,抑制造血干细胞增殖分化,从而导致白细胞降低^[33];STAT3是信号转导及转录激活因子的家族成员之一,在肿瘤细胞增殖、侵袭和迁移以及免疫逃逸等方面发挥重要的作用^[34],可被多种细胞因子和生长因子激活而发挥功能,如G-CSF可通过激活STAT3促进粒细胞增殖^[35],IL-6可激活STAT3刺激B细胞增殖^[36]。TNF主要由活化的巨噬细胞、T淋巴细胞和自然杀伤细胞产生,为炎症和细胞死亡等生物学功能传递分子信号^[33, 37-38];EGFR主要与白细胞增殖、调节免疫等功能相关^[39-41],对细胞的生长、增殖和分化等生理过程发挥重要作用^[40]。

磷脂酰肌醇3激酶-蛋白激酶B信号通路在细胞增殖、细胞凋亡等细胞反应中起关键作用^[42],可维持造血干细胞的稳态和定向分化,与白细胞减少症密切相关^[43],参与白细胞等各种细胞的生长发育过程^[44],研究表明:重组灵芝免疫蛋白、苗方芪胶升白胶囊均可通过磷脂酰肌醇3激酶-蛋白激酶B信号通路治疗白细胞减少症^[45-46];Janus激酶-信号转导子和转录激活子信号通路可转导多种信号并调节多重生物学过程,如参与包括白细胞和血小板在内的各种细胞的生长发育过程,并调控一系列免疫应答行为^[44, 47]。

4 结论

本论文采用 UPLC-Q Exactive Orbitrap-HRMS 方法对黄芪注射液次生成分中的化学成分进行鉴定,共鉴定了 25 个成分,通过网络药理学对黄芪注射液次生成分中的活性化学成分进行预测分析,以 Degree 值筛选出 5 个活性成分,主要为黄酮类化合物;黄芪注射液次生成分可通过多靶点、多通路的协调机制来治疗白细胞减少症,可作用于磷脂酰肌醇 3 激酶-蛋白激酶 B 信号通路(与造血系统相关),通过恢复造血系统稳态、促进骨髓造血来升白;可作用于 Janus 激酶-信号转导子和转录激活子信号通路(与免疫调节相关)促进相关免疫应答来治疗白细胞减少症。后续课题组将通过分离或购买 5 种活性成分,分别对其升白作用进行研究;且进一步通过分子生物学技术对通路中的关键蛋白进行分析,确定黄芪注射液次生成分升高白细胞的作用机制。

参考文献:

- [1] WANG L, LI H, SHEN X, *et al.* Elucidation of the Molecular Mechanism of *Sanguisorba* Officinalis L. Against Leukopenia Based on Network Pharmacology[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, **132**: 110934. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110934.
- [2] ESCRIHUELA-VIDAL F, LAPORTE J, ALBASANZ-PUIG A, *et al.* Update on the Management of Febrile Neutropenia in Hematologic Patients[J]. *Rev Esp Quimioter*, 2019, **32**(Suppl 2): 55-58.
- [3] 白雪, 陆明. 中医药防治化疗后白细胞减少症的临床研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2020, **39**(9): 165-167.
BAI X, LU M. Clinical Research Progress on Prevention and Treatment of Leukopenia After Chemotherapy with Traditional Chinese Medicine[J]. *Inn Mong J Tradit Chin Med*, 2020, **39**(9): 165-167.
- [4] 中国中西医结合学会血液病专业委员会. 肿瘤放化疗后白细胞减少症中西医结合治疗专家共识(2022年版)[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2022, **29**(23): 1641-1646. DOI: 10.16073/j.cnki.cjcp.2022.23.01.
Committee of Hematology. China Society of Integrated Traditional Chinese and Western medicine. Expert Consensus on the Treatment of Leukopenia After Tumor Radiotherapy and Chemotherapy with Integrated Traditional Chinese and Western Medicine[J]. *Chin J Cancer Prev Treat*, 2022, **29**(23): 1641-1646. DOI: 10.16073/j.cnki.cjcp.2022.23.01.
- [5] 唐镛镛, 邹德宏, 何向明, 等. 中药复方治疗恶性肿瘤放化疗后白细胞减少症用药规律研究[J]. 中医学报, 2018, **33**(10): 1838-1842. DOI: 10.16368/j.issn.1674-8999.2018.10.436.
TANG B B, ZOU D H, HE X M, *et al.* Study on Medication Rule of TCM Compound Prescription in Treatment of Leukopenia After Radiotherapy and Chemotherapy for Malignant Tumor[J]. *Acta Chin Med*, 2018, **33**(10): 1838-1842. DOI: 10.16368/j.issn.1674-8999.2018.10.436.
- [6] 何浩麟, 张延峰, 陶琴, 等. 基于网络药理学及分子对接探讨补中益气丸治疗白细胞减少症的作用机制[J]. 江西科技师范大学学报, 2023(6): 67-72.
HE H L, ZHANG Y F, TAO Q, *et al.* Mechanism of Bu-zhong Yi-qi Pill on Leukopenia Based on Network Pharmacology and Molecular Docking[J]. *Jiangxi Sci Technol Normal Univ*, 2023(6): 67-72.
- [7] 颜磊, 何小燕, 高耀, 等. 基于网络药理学的驴胶补血颗粒升高白细胞作用机制研究[J]. 药理学报, 2018, **53**(10): 1660-1669. DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0346.
YAN L, HE X Y, GAO Y, *et al.* An Exploration into Mechanism of Leukocyte Elevation Activity of Lvjiao Buxue Granules Based on Network Pharmacology[J]. *Acta Pharm Sin*, 2018, **53**(10): 1660-1669. DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0346.
- [8] 杨浩, 毛旭文. 芪胶升白胶囊治疗白细胞减少症的作用机制研究[J]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2024, **33**(5): 543-554. DOI:10.3969/j.issn.1672-8513.2024.05.001.
YANG H, MAO X W. Study on the Mechanism of Qiji-aoshengbai Capsule in Treating Leukopenia Based on Network Pharmacology and Clinical Efficacy Analysis [J]. *J Yunnan Minzu Univ (Nat Sci Edi)*, 2024, **33**(5): 543-554. DOI:10.3969/j.issn.1672-8513.2024.05.001.
- [9] 中国药典委员会. 中药成方制剂: 第 17 册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Traditional Chinese Medicine Drugs Preparation: Vol 17[M]. Beijing: People Health Press, 1998.
- [10] 张友山, 闻后钧, 刘雪银. 黄芪注射液治疗白细胞减少症 112 例临床观察[J]. 时珍国医国药, 2000, **11**(10): 935. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2000.10.082.
ZHANG Y S, WEN H J, LIU X Y. Clinical Observation on 112 Cases of Leukopenia Treated with *Astragalus* Injection[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2000, **11**(10): 935. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2000.10.082.
- [11] ZHANG C S, ZHU C T, LING Y, *et al.* The Clinical Value of Huangqi Injection in the Treatment of Leucopenia: A Meta-analysis of Clinical Controlled Trials[J]. *PLoS One*,

- 2013, **8**(12): e83123. DOI: 10.1371/journal.pone.0083123.
- [12] 张扶莉, 杨利生. 升白方与黄芪注射液治疗化疗后白细胞减少症疗效观察[J]. 陕西中医, 2011, **32**(8): 1023–1024. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7369.2011.08.053.
- ZHANG F L, YANG L S. Observation on Therapeutic Effect of Shengbai Recipe and Huangqi Injection on Leukopenia after Chemotherapy[J]. *Shaanxi J Tradit Chin Med*, 2011, **32**(8): 1023–1024. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7369.2011.08.053.
- [13] 高永盛, 李燕, 符发年. 直肠癌新辅助化疗前应用黄芪注射液预防白细胞减少的效果观察[J]. 中国肛肠病杂志, 2018, **38**(5): 17–19. DOI: 10.3969/j.issn.1000-1174.2018.05.005.
- GAO Y S, LI Y, FU F N. Preventing Leukopenia with Huangqi Injection before Neoadjuvant Chemotherapy for Rectal Carcinoma Patients: Efficacy Observation[J]. *Chin J Coloproctology*, 2018, **38**(5): 17–19. DOI: 10.3969/j.issn.1000-1174.2018.05.005.
- [14] QU T L, LI Z Y, ZHAO S J, *et al.* A Metabonomic Analysis Reveals Novel Regulatory Mechanism of Huangqi Injection on Leucopenia Mice[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2016, **38**(2): 113–123. DOI: 10.3109/08923973.2015.1128950.
- [15] 曲婷丽, 闫丽秋, 周小雪, 等. 黄芪注射液中初生成分的鉴定及氨基酸类成分的含量测定[J]. 山西医科大学学报, 2024, **55**(6): 753–762.
- QU T L, YAN L Q, ZHOU X X, *et al.* Identification of Primary Components and Assay of Amino Acids in Astragalus Injections Based on LC-MS/MS[J]. *J Shanxi Med Univ*, 2024, **55**(6): 753–762.
- [16] 曲婷丽, 刘腾, 郑茜, 等. 黄芪注射液中次生成分作用于白细胞减少症模型小鼠的代谢组学研究[J]. 中国药房, 2021, **32**(17): 2091–2096. DOI: 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.17.08.
- QU T L, LIU T, ZHENG Q, *et al.* Metabonomics Study on the Effects of Secondary Components of *Astragalus membranaceus* Injection on Leukopenia Model Mice[J]. *China Pharm*, 2021, **32**(17): 2091–2096. DOI: 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.17.08.
- [17] 窦辉, 付铁军, 张帆, 等. 黄芪注射液的化学成分[J]. 天然产物研究与开发, 2002, **14**(6): 14–17. DOI: 10.3969/j.issn.1001-6880.2002.06.005.
- DOU H, FU T J, ZHANG F, *et al.* Chemical Constituents of Huangqi Injection[J]. *Nat Prod Res Dev*, 2002, **14**(6): 14–17. DOI: 10.3969/j.issn.1001-6880.2002.06.005.
- [18] 王浩, 刘艳琴, 杨红梅, 等. 液相色谱-质谱联用技术测定无糖食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖[J]. 分析化学, 2010, **38**(6): 873–876. DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.00873.
- WANG H, LIU Y Q, YANG H M, *et al.* Determination of Glucose, Fructose, Sucrose, Maltose and Lactose in Sugar-free Products by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry[J]. *Chin J Anal Chem*, 2010, **38**(6): 873–876. DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.00873.
- [19] ZHANG J, XU X J, XU W, *et al.* Rapid Characterization and Identification of Flavonoids in *Radix Astragali* by Ultra-high-pressure Liquid Chromatography Coupled with Linear Ion Trap-orbitrap Mass Spectrometry[J]. *J Chromatogr Sci*, 2015, **53**(6): 945–952. DOI: 10.1093/chromsci/bmu155.
- [20] YAN Z X, CHEN Y, LI T X, *et al.* Identification of Metabolites of Si-NI-San, a Traditional Chinese Medicine Formula, in Rat Plasma and Urine Using Liquid Chromatography/Diode Array Detection/Triple-quadrupole Spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012, **885/886**: 73–82. DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.12.017.
- [21] 芮雯, 冯毅凡, 石忠峰, 等. 不同产地黄芪药材的UPLC/Q-TOF-MS指纹图谱研究[J]. 药物分析杂志, 2012, **32**(4): 607–611.
- RUI W, FENG Y F, SHI Z F, *et al.* UPLC/Q-TOF-MS Study on Fingerprint of *Astragalus membranaceus* Obtained from 7 Different Origin[J]. *J Pharm Ana*, 2012, **32**(4): 607–611.
- [22] LIU M H, LI P L, ZENG X, *et al.* Identification and Pharmacokinetics of Multiple Potential Bioactive Constituents After Oral Administration of *Radix Astragali* on Cyclophosphamide-induced Immunosuppression in Balb/c Mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, **16**(3): 5047–5071. DOI: 10.3390/ijms16035047.
- [23] 陈婷, 田丰, 唐跃年, 等. HPLC-ESI-TOF/MS对黄芪药材中24种化学成分的快速分离与鉴别[J]. 中国药师, 2014, **17**(4): 593–596.
- CHEN T, TIAN F, TANG Y N, *et al.* Quick Separation and Identification of 24 Chemical Constituents in *Radix Astragali* by HPLC-ESI-TOF/MS[J]. *China Pharm*, 2014, **17**(4): 593–596.
- [24] 王倩, 姜俊, 许霞, 等. 指纹图谱及网络药理学联合分析芪胶升白胶囊的药效成分及机制[J]. 中国中药杂志, 2023, **48**(6): 1526–1534. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20221127.301.
- WANG Q, JIANG J, XU X, *et al.* Effective Components and Mechanism of Qijiao Shengbai Capsules Based on Fingerprinting and Network Pharmacology[J]. *China J Chin Mater Med*, 2023, **48**(6): 1526–1534. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20221127.301.

- [25] 曲婷丽. 黄芪注射液升白药效成分及作用机制研究[D]. 太原: 山西大学, 2017.
QU T L. Study on the Effective Ingredients and Mechanism on Leucopenia of Huangqi Injection[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2017.
- [26] CHECLER F, GOIRAN T, ALVES DA COSTA C. Nuclear TP53: An Unraveled Function as Transcriptional Repressor of PINK1[J]. *Autophagy*, 2018, **14**(6): 1099–1101. DOI: 10.1080/15548627.2018.1450022.
- [27] YE H, QIAN L, ZHU S Y, *et al.* IL-1Ra Protects Hematopoietic Cells from Chemotoxicity Through P53-induced Quiescence[J]. *FASEB J*, 2019, **33**(11): 12135–12145. DOI: 10.1096/fj.201900788RR.
- [28] 吴燕慧. 加味当归补血汤治疗白细胞减少症的药效物质基础和网络药理学研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2023.
WU Y H. Study on the Pharmacodynamic Material Basis and Network Pharmacology of Modified Danggui Buxue Decoction in Treating Leukopenia[D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2023.
- [29] EDWARDS L A, THIESSEN B, DRAGOWSKA W H, *et al.* Inhibition of ILK in PTEN-mutant Human Glioblastomas Inhibits PKB/Akt Activation, Induces Apoptosis, and Delays Tumor Growth[J]. *Oncogene*, 2005, **24**(22): 3596–3605. DOI: 10.1038/sj.onc.1208427.
- [30] JR C M M. The *AKT* Genes and Their Roles in Various Disorders[J]. *Am J Med Genet A*, 2013, **161A**(12): 2931–2937. DOI: 10.1002/ajmg.a.36101.
- [31] TANAKA T, NARAZAKI M, KISHIMOTO T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, **6**(10): a016295. DOI: 10.1101/cshperspect.a016295.
- [32] 张君威, 唐志书, 刘妍如, 等. 正源方干预化疗后白细胞减少症的网络药理学研究及实验验证[J]. 中草药, 2021, **52**(21): 6586–6597. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.21.017.
ZHANG J W, TANG Z S, LIU Y R, *et al.* Network Pharmacology Study on Zhengyuan Prescription's Intervention in Leukopenia after Chemotherapy and Experimental Verification[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, **52**(21): 6586–6597. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.21.017.
- [33] 杨淑艳, 吴茂林, 吴昕. 二仙升白汤联合黄芪鳝鱼汤治疗化疗后白细胞减少症及对免疫功能的调节作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, **26**(16): 125–130. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20200532.
YANG S Y, WU M L, WU X. Effect of Erxian Shengbai Decoction Combined with Huangqi Huanagshan Soup on Leukopenia after Chemotherapy and Regulatory Effect on Immunity[J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2020, **26**(16): 125–130. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20200532.
- [34] 赵丽萍, 宋丹青, 汪燕翔. IL-6/STAT3 信号通路小分子抑制剂的研究进展[J]. 药学学报, 2021, **56**(9): 2472–2484. DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0233.
ZHAO L P, SONG D Q, WANG Y X. Advances in Small Molecular Inhibitors of IL-6/STAT3 Signaling Pathway[J]. *Acta Pharm Sin*, 2021, **56**(9): 2472–2484. DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0233.
- [35] MCLEMORE M L, GREWAL S, LIU F, *et al.* STAT-3 Activation is Required for Normal G-CSF-dependent Proliferation and Granulocytic Differentiation[J]. *Immunity*, 2001, **14**(2): 193–204. DOI: 10.1016/s1074-7613(01)00101-7.
- [36] HIRANO T, ISHIHARA K, HIBI M. Roles of STAT3 in Mediating the Cell Growth, Differentiation and Survival Signals Relayed through the IL-6 Family of Cytokine Receptors[J]. *Oncogene*, 2000, **19**(21): 2548–2556. DOI: 10.1038/sj.onc.1203551.
- [37] MATSUI K, GIRI N, ALTER B P, *et al.* Cytokine Production by Bone Marrow Mononuclear Cells in Inherited Bone Marrow Failure Syndromes[J]. *Br J Haematol*, 2013, **163**(1): 81–92. DOI: 10.1111/bjh.12475.
- [38] JANG D I, LEE A H, SHIN H Y, *et al.* The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(5): 2719. DOI: 10.3390/ijms22052719.
- [39] ZHU H, LONG M H, WU J, *et al.* Ginseng Alleviates Cyclophosphamide-induced Hepatotoxicity via Reversing Disordered Homeostasis of Glutathione and Bile Acid[J]. *Sci Rep*, 2015, **5**: 17536. DOI: 10.1038/srep17536.
- [40] SHENG J, YANG Y P, ZHAO Y Y, *et al.* The Efficacy of Combining EGFR Monoclonal Antibody with Chemotherapy for Patients with Advanced Nonsmall Cell Lung Cancer: A Meta-analysis from 9 Randomized Controlled Trials[J]. *Medicine*, 2015, **94**(34): e1400. DOI: 10.1097/MD.0000000000001400.
- [41] 刘芳, 张红, 谢人明. 珠子参对环磷酰胺所致小鼠白细胞减少的影响[J]. 现代中医药, 2015, **35**(5): 164–168. DOI: 10.13424/j.cnki.mtcm.2015.05.062.
LIU F, ZHANG H, XIE R M. Effect of Zhuzishen on Leucocytopenia in Mice Induced by Cyclophosphamide [J]. *Mod Tradit Chin Med*, 2015, **35**(5): 164–168. DOI: 10.13424/j.cnki.mtcm.2015.05.062.
- [42] ANDRADE G M, DA SILVEIRA J C, PERRINI C, *et al.* The Role of the PI3K-Akt Signaling Pathway in the

- Developmental Competence of Bovine Oocytes[J]. *PLoS One*, 2017, **12**(9): e0185045. DOI: 10.1371/journal.pone.0185045.
- [43] 胡伟, 李晨, 王晨光, 等. 基于UPLC-Q-Orbitrap HRMS和网络药理学探究芪胶升白胶囊治疗白细胞减少症的作用机制[J]. *现代药物与临床*, 2023, **38**(2): 289-299. DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.02.006.
- HU W, LI C, WANG C G, *et al.* Mechanism of Qijiao Shengbai Capsules in Treatment of Leukopenia Based on UPLC-Q-Orbitrap HRMS Combined with Network Pharmacology[J]. *Drugs Clin*, 2023, **38**(2): 289-299. DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.02.006.
- [44] KOYASU S. The Role of PI3K in Immune Cells[J]. *Nat Immunol*, 2003, **4**(4): 313-319. DOI: 10.1038/ni0403-313.
- [45] 胡伟, 李晨, 王晨光, 等. 苗方芪胶升白胶囊治疗白细胞减少症的网络药理学研究和实验验证[J]. *中国医院药学杂志*, 2023, **43**(12): 1312-1319. DOI: 10.13286/j.1001-5213.2023.12.03.
- HU W, LI C, WANG C G, *et al.* Network Pharmacology and Experimental Verification of the Treatment of Leukopenia with Qijiao Shengbai[J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2023, **43**(12): 1312-1319. DOI: 10.13286/j.1001-5213.2023.12.03.
- [46] 周慧. 重组灵芝免疫调节蛋白对环磷酰胺致小鼠白细胞减少症模型治疗及其机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- ZHOU H. Effect and Mechanism of Recombinant Ganoderma Lucidum Immunoregulatory Protein on Mouse Models of Cyclophosphamide-Induced Leukopenia[D]. Changchun: Jilin University, 2013.
- [47] KIU H, NICHOLSON S E. Biology and Significance of the JAK/STAT Signalling Pathways[J]. *Growth Factors*, 2012, **30**(2): 88-106. DOI: 10.3109/08977194.2012.660936.