

DOI 10.19656/j.cnki.1002-2406.20231103

信息工程

贝母瓜蒌散抑制炎症反应改善脂多糖诱导小鼠急性肺损伤的机制研究

吴鉴超¹, 赵源², 陈久林¹, 刘特¹, 郁志华^{1✉}

(1. 上海中医药大学, 上海市中医老年医学研究所, 上海 200031; 2. 上海中医药大学, 上海 201203)

【摘要】目的: 基于网络药理学和脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤模型探究贝母瓜蒌散干预急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的抗炎作用。方法: 通过中医药系统药理学数据库和分析平台, 以生物利用度和药物相似性为条件筛选贝母瓜蒌散活性成分和作用靶点; 在 GeneCards 数据库获取 ALI 相关靶基因。通过 STRING 平台构建化合物靶点-ALI 靶基因相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络, 运用 Cytoscape 3.8.0 软件构建药材-成分-靶点-通路网络, 利用 Metascape 平台进行基因本体(gene ontology, GO)分析, 应用通路数据库 Reactome 进行信号通路富集分析, 预测其分子机制。通过贝母瓜蒌散对脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠的干预实验, 对潜在靶点和通路进行验证。结果: 获得贝母瓜蒌散活性成分 44 个、靶点 606 个, 与 ALI 有关共同靶点 258 个。GO 功能富集分析发现, 贝母瓜蒌散对 ALI 的作用主要涉及激酶活性的正调控、受体复合物、蛋白激酶活性等过程; 通路富集分析指出, 贝母瓜蒌散可能从调控白细胞介素信号、白介素-4 和白介素-13 的信号、免疫系统中的细胞因子信号传递等信号通路发挥治疗作用。HE 染色及胶原纤维阳性染色结果显示, 贝母瓜蒌散能改善肺损伤; qPCR 结果显示, 贝母瓜蒌散能下调小鼠肺组织 IL-1 α 、IL-2、IL-6、IL-10、TNF- α mRNA 表达。结论: 贝母瓜蒌散可能通过抑制促炎细胞因子表达发挥治疗 ALI 的作用。

【关键词】 贝母瓜蒌散; 急性肺损伤; 网络药理学; 炎症因子; 脂多糖

【引用格式】

吴鉴超, 赵源, 陈久林, 等. 贝母瓜蒌散抑制炎症反应改善脂多糖诱导小鼠急性肺损伤的机制研究[J]. 中医药信息, 2023, 40(11): 13-22.

WU J C, ZHAO Y, CHEN J L, et al. Study on mechanism of inhibiting inflammatory response and improving lipopolysaccharide induced acute lung injury in mice with Beimu Gualou Powder[J]. Information on TCM, 2023, 40(11): 13-22.

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是临床上引起严重呼吸窘迫、供氧难治低氧性呼吸衰竭的重要原因, 发展到一定程度可以定义为急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)。ALI/ARDS 的病因有很多, 包括但不限于感染、胶原血管疾病、药物作用、摄入剂作用、吸入剂作用、休克、急性嗜酸性肺炎、免疫介导的肺出血和血管炎以及放射性肺炎等^[1]。

根据急性肺损伤的临床症状, 如咳嗽、呼吸困难, 喘息鼻张等, 可将其归于“喘脱”“结胸”“暴喘”等范畴^[2]。中医古籍中对本病亦有论述, 如《灵枢·五阅五使》^[3]言:“故肺病者, 喘息鼻张。”《中藏经》^[4]载:“不病而暴喘促者死。”《仁斋直指方·喘嗽方论》曰^[5]:“惟失邪气伏藏, 痰涎浮涌, 呼不得呼, 吸不得吸, 于是上气喘息。”贝母瓜蒌散出自清代程国彭所著《医学心悟·卷

基金项目: 上海市高校高峰学科建设项目(2021年)

第一作者简介: 吴鉴超(1995-), 男, 2022级中西医结合基础专业博士研究生, 主要从事中药抗感染、炎症、免疫机制研究工作。

✉通信作者简介: 郁志华(1974-), 男, 副研究员, 主要从事阿尔茨海默病的中医药防治研究工作。

三·痰饮》^[6],载其:“肺燥则润之,贝母瓜蒌散。”由贝母、瓜蒌、天花粉、桔梗、茯苓、化橘红6味药组成。具有润肺清热、化痰止咳之效,为润燥化痰之代表方。《慎斋遗书·虚损》^[7]有言:“如金衰卫弱而多外感之来,则气伤而肺损。”可知急性肺损伤的病机多为邪气入侵,正邪交争,伤及正气,邪盛正衰而致肺损。本研究基于网络药理学和实验验证的方法,分析贝母瓜蒌散治疗ALI干预效果及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 贝母瓜蒌散活性成分及其对应靶点筛选

贝母瓜蒌散的化学成分来自中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP, <http://tcmspw.com/tcmsp.php>)^[8]。按文献报道设定药物相似性($DL \geq 0.18$)和口服生物利用度($OB \geq 30\%$)^[9]作为筛选贝母瓜蒌散组方中药活性成分的标准。通过PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)^[10]得到活性成分的2D结构的SDF格式文件。利用活性成分的SDF格式文件使用瑞士靶点预测数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)^[11]进行预测,即可得到对应靶点信息,同时整合TCMSP数据库贝母瓜蒌散组方中药的靶点信息。最后再使用UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>)^[12]将靶点信息标准化。利用Cytoscape 3.8.0软件构建成分-靶点网络,筛选出贝母瓜蒌散活性成分的潜在靶点。

1.2 ALI靶基因收集和蛋白质相互作用网络构建

从GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)^[13]中以“acute lung injury”为关键词搜索与ALI有关的基因,得到ALI相关靶点。

将收集的贝母瓜蒌散组方活性成分靶点与ALI相关靶点,通过Venny 2.1.0在线软件筛选出二者共同靶点作为研究靶点,即贝母瓜蒌散治疗ALI可能的靶点。用STRING(<https://string-db.org/>)平台^[14]构建共同靶点的蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络。

1.3 GO基因功能分析及信号通路富集分析

将共同靶点导入Metascape(<http://metascape.org/>)^[15]平台,进行Gene Ontology(基因本体)分析。Reactome(<https://reactome.org/>)数据库^[16]囊括NCBI、Ensembl、UniProt、UCSC基因组浏览器、KEGG化合物、ChEBI小分子数据库和PubMed文献数据库等多个不同的在线生物信息学资源库,借助Reactome平台对共同靶点进行信号通路富集分析。

1.4 实验验证

1.4.1 药品与试剂

贝母瓜蒌散由川贝母4.5 g,瓜蒌3 g,天花粉2.5 g,

茯苓2.5 g,化橘红2.5 g,桔梗2.5 g配伍组成,采用中药配方颗粒制剂(川贝母、瓜蒌、天花粉、茯苓、化橘红、桔梗批号分别为18120462、18020402、19050172、20020212、19080072、19110202,江苏江阴天江药业有限公司);连花清瘟颗粒(北京以岭药业有限公司);脂多糖(LPS,碧云天生物技术有限公司);TRIzol(Thermo);异丙醇、氯仿(国药);cDNA合成试剂盒、qPCR试剂盒(Servicebio)。

1.4.2 动物分组与模型制备

雄性6周龄C57小鼠48只,由维通利华有限公司提供,许可证号:SCXK(浙)2019-0001,饲养于上海中医药大学实验动物中心,具体饲养条件为:温度24~26℃,相对湿度50%~70%,12/12 h明暗周期,自由饮食,提供充足的食物和水。所有动物程序均经上海中医药大学机构动物伦理和使用委员会批准(批准号:PESHUTCM200703011),相关操作严格按照我国《实验动物管理条例》进行。

将小鼠随机分为4组,每组12只,分别为空白组(灌胃等量生理盐水)、模型组(腹腔注射1 mg/kg LPS),贝母瓜蒌散组(灌胃8 mL/kg贝母瓜蒌散药液,腹腔注射1 mg/kg LPS)作为治疗组,连花清瘟组(灌胃8 mL/kg连花清瘟药液,腹腔注射1 mg/kg LPS)作为阳性对照组。造模开始第1天注射1 mg/kg LPS,第2天起给予人等效剂量中药灌胃治疗,此后每两天注射1次LPS,连续给药30 d后,小鼠腹腔注射2.5%戊巴比妥钠50 mg/kg麻醉,收集肺组织,-80℃保存备用。

1.4.3 肺组织病理学检查

将小鼠肺组织固定于4%多聚甲醛,石蜡包埋,切成5 μm切片。然后,切片脱蜡至水,苏木素染液染色15 min,双蒸水漂洗5 min;1%盐酸酒精分化30 s,双蒸水室温浸泡15 min,将切片置于伊红染液染色2 min,双蒸水漂洗5 min;常规脱水,透明,封片。在显微镜(BX51, OLYMPUS, Japan)40倍显微镜物镜下观察肺组织病理学的变化并拍照。

1.4.4 肺组织MASSON染色

将小鼠肺组织石蜡切片用苏木素染色液染色5 min,双蒸水漂洗5 min;将切片于Masson蓝化液静置处理5 min,然后放入双蒸水漂洗1 min;丽春红酸性品红液染8 min;用0.2%冰醋酸水溶液洗1 min;用1%磷钼酸水溶液分化约5 min,然后重复用0.2%冰醋酸水溶液洗1 min;入苯胺蓝染液复染5 min,用0.2%冰醋酸水溶液洗1 min;最后脱水封片。封片后同样在显微镜40倍显微镜物镜下拍照。

1. 4. 5 肺组织细胞因子 RT-qPCR 检测

从肺组织中提取总 RNA, 定量后用 ReVertAid First Strand cDNA 合成试剂盒将分离的 mRNA 反向转录成 cDNA。用 LightCycler96 实时 PCR 系统和 2×SYBR Green

qPCR Master Mix 试剂盒进行实时荧光定量 PCR, 引物序列见表 1。检测肺组织中 IL-1α、IL-2、IL-6、IL-10、TNF-α mRNA 表达, 用 2^{-ΔΔCT} 方法测定候选基因的表达水平, 表达水平对照参考基因 18S 进行归一化。

表 1 引物序列表

Name	Forward(5'→3')	Reverse(5'→3')
IL-1α	TCTATGATGCAAGCTATGGCTCA	CGGCTCTCCTTGAAGGTGA
IL-2	TGAGCAGGATGGAGAATTACAGG	GTCCAAGTTCATCTTCTAGGCAC
IL6	CTGCAAGAGACTTCCATCCAG	ACTGGTATAGACAGGTCTGTTGG
IL-10	CTTACTGACTGGCATGAGGATCA	GCAGCTCTAGGAGCATGTGG
TNF-α	CAGGCGGTGCCTATGTCTC	CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG
18S	AGGGGAGAGCGGGTAAGAGA	GGACAGGACTAGGCGGAACA

1. 4. 6 统计学方法

MASSON 染色图片采用 ImageJ 进行图像分析。实验数据采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数±标准差表示, 若数据呈正态分布、方差齐, 则选用单因素方差分析或 t 检验, 否则采用秩和检验。检验水准取双侧 α=0.05, P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2. 1 贝母瓜蒌散组方潜在活性成分及其核心靶点

通过 TCMSP 数据库, 筛选出同时符合 DL≥0.18

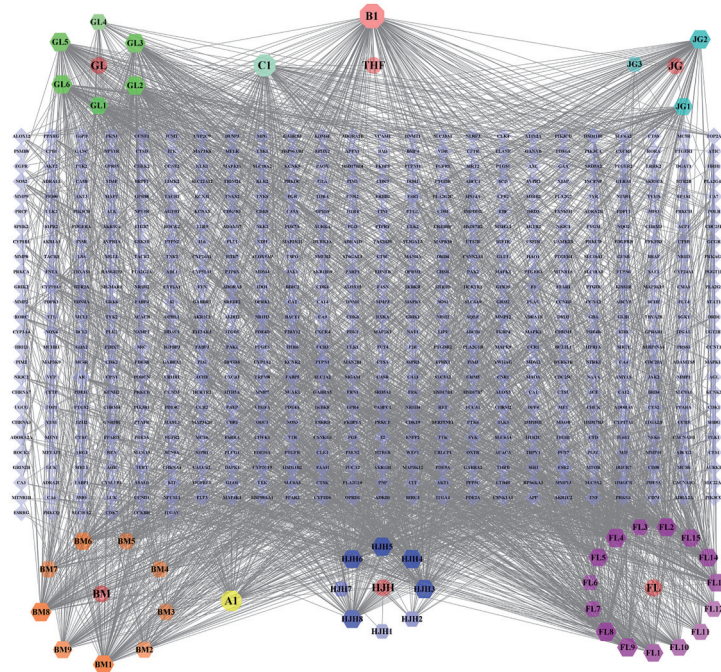
和 OB≥30% 这两个标准的贝母瓜蒌散化学成分 48 个, 其中贝母化学成分 10 个、瓜蒌化学成分 8 个、天花粉化学成分 2 个、茯苓化学成分 15 个、化橘红化学成分 9 个、桔梗化学成分 4 个, 合并重复项后得到 44 个活性成分, 见表 2。通过 TCMSP 数据库和 Swiss target prediction 平台预测这 44 个活性成分的靶点, 最终获得了 606 个靶点。利用 Cytoscape 3.8.0 软件构建“药材-成分-靶点”网络, 见图 1。

表 2 贝母瓜蒌散活性成分表

序号	药品名称	MOL ID	名称	相对分子质量	OB	DL
1	贝母	MOL001749	ZINC03860434	390.62	43.59	0.35
2	贝母、化橘红	MOL000358	beta-sitosterol	414.79	36.91	0.75
3	贝母	MOL000359	sitosterol	414.79	36.91	0.75
4	贝母	MOL004440	Peimisine	427.69	57.4	0.81
5	贝母	MOL009027	Cyclopamine	411.69	55.42	0.82
6	贝母	MOL009586	isoverticine	431.73	48.23	0.67
7	贝母	MOL009588	Korseveriline	431.73	35.16	0.68
8	贝母	MOL009589	Korseverinine	413.71	53.51	0.71
9	贝母	MOL009593	verticinone	429.71	60.07	0.67
10	贝母	MOL009596	sinpemie A	413.71	46.96	0.71
11	瓜蒌	MOL001494	Mandenol	308.56	42.00	0.19
12	瓜蒌	MOL002881	Diosmetin	300.28	31.14	0.27
13	瓜蒌、天花粉、桔梗	MOL004355	Spinasterol	412.77	42.98	0.76
14	瓜蒌	MOL005530	Hydroxygenkwanin	300.28	36.47	0.27
15	瓜蒌、天花粉	MOL006756	Schottenol	414.79	37.42	0.75
16	瓜蒌	MOL007171	5-dehydrokaroundiol	438.76	30.23	0.77
17	瓜蒌	MOL007179	Linolenic acid ethyl ester	306.54	46.10	0.20
18	瓜蒌	MOL007180	vitamin-e	490.69	32.29	0.70
19	茯苓	MOL000273	(2R)-2-[(3S,5R,10S,13R,14R,16R,17R)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-6-methylhept-5-enoic acid	470.76	30.93	0.81
20	茯苓	MOL000275	trametenolic acid	456.78	38.71	0.80
21	茯苓	MOL000276	7,9(11)-dehydropachymic acid	526.83	35.11	0.81
22	茯苓	MOL000279	Cerevisterol	430.74	37.96	0.77

续表2

序号	药品名称	MOL ID	名称	相对分子质量	OB	DL
23	茯苓	MOL000280	(2R)-2-[(3S,5R,10S,13R,14R,16R,17R)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoic acid	484.79	31.07	0.82
24	茯苓	MOL000282	ergosta-7,22E-dien-3beta-ol	398.74	43.51	0.72
25	茯苓	MOL000283	Ergosterol peroxide	430.74	40.36	0.81
26	茯苓	MOL000285	(2R)-2-[(5R,10S,13R,14R,16R,17R)-16-hydroxy-3-keto-4,4,10,13,14-pentamethyl-1,2,5,6,12,15,16,17-octahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoic acid	482.77	38.26	0.82
27	茯苓	MOL000287	3beta-Hydroxy-24-methylene-8-lanostene-21-oic acid	470.81	38.70	0.81
28	茯苓	MOL000289	pachymic acid	528.85	33.63	0.81
29	茯苓	MOL000290	Poricoic acid A	498.77	30.61	0.76
30	茯苓	MOL000291	Poricoic acid B	484.74	30.52	0.75
31	茯苓	MOL000292	poricoic acid C	482.77	38.15	0.75
32	茯苓	MOL000296	hederagenin	414.79	36.91	0.75
33	茯苓	MOL000300	dehydroeburicoic acid	453.75	44.17	0.83
34	桔梗	MOL001689	acacetin	284.28	34.97	0.24
35	桔梗	MOL000006	luteolin	286.25	36.16	0.25
36	桔梗	MOL006070	robinin	592.60	39.84	0.71
37	化橘红	MOL013276	poncirin	594.62	36.55	0.74
38	化橘红	MOL005849	didymin	286.30	38.55	0.24
39	化橘红	MOL013279	5,7,4'-Trimethylapigenin	312.34	39.83	0.30
40	化橘红	MOL001803	Sinensetin	372.40	50.56	0.45
41	化橘红	MOL013277	Isosinensetin	372.40	51.15	0.44
42	化橘红	MOL004328	naringenin	272.27	59.29	0.21
43	化橘红	MOL005828	nobiletin	402.43	61.67	0.52
44	化橘红	MOL001798	neohesperidin_qt	302.30	71.17	0.27



2.2 “贝母瓜蒌散-ALI”相关靶点的筛选及PPI网络构建

通过 GeneCards 数据库共搜集到 ALI 相关靶点 1 701 个,将 1 701 个靶点与贝母瓜蒌散 606 个候选靶点在 Venny 2. 1. 0 中映射筛选出 258 个共同靶点,结果见图 2。将 258 个基因带入 STRING 数据库进行分析(要求的最低互动分数 = 0. 96),结果形成包含 258 个节点, 477 条边的 PPI 网络,见图 3。

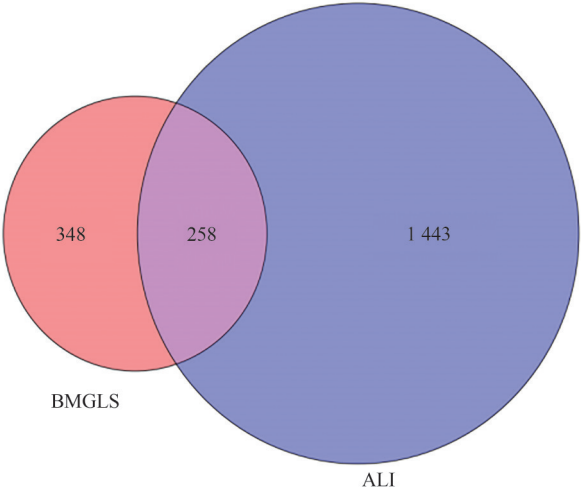


图2 贝母瓜蒌散-ALI 靶点交集韦恩图

将网络导入到 Cytoscape 3. 8. 0 并分析,其中度值(Degree) > 26 的靶点有 20 个,可能为“贝母瓜蒌散”治疗 ALI 的核心靶点,见表 3。

2.3 共同靶点的 GO 分析和信号通路富集分析

利用 Metascape 平台对 258 个共同靶点进行 GO 分析, $P < 0. 05$ 前 10 条见图 4,生物过程主要涉及激酶活性的正调控、细胞运动的正调控、创伤反应等过程;细胞组分主要涉及受体复合物、膜筏、黏着斑等过程;分子功能主要涉及蛋白激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性、激酶结合等过程。

将 258 个共同靶点输入到 Reactome 数据库中,得到 238 条通路($P < 0. 01$),对其进行富集分析并查阅相关文献,对排名前 40 的通路进行可视化处理,图中节点大小反映 P 值的大小,见图 5。信号通路的基因富集分析发现,主要有白细胞介素信号、白介素-4 和白介素-13 的信号、癌症中的 PI3K/Akt 信号、负调控 PI3K/Akt 网络、受体酪氨酸激酶的信号、核外雌激素信号、免疫系统中的细胞因子信号传递等通路。

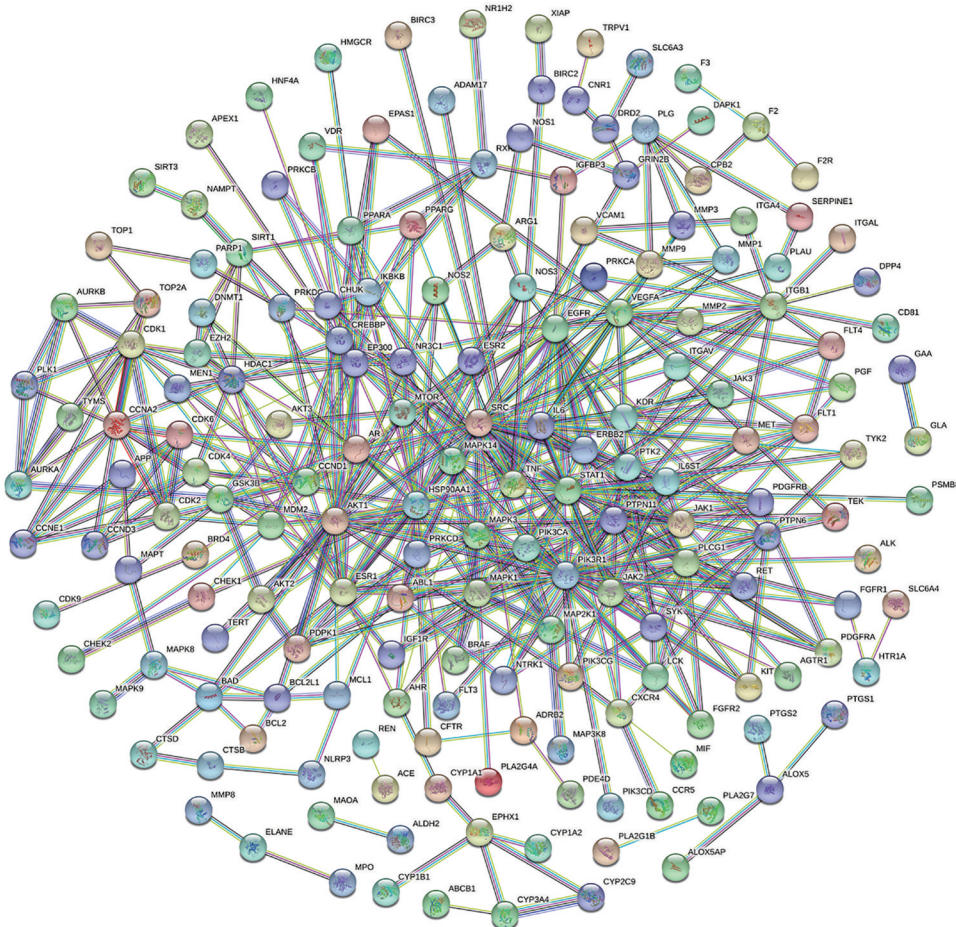


图3 贝母瓜蒌散-ALI 靶点蛋白 PPI 网络图

表3 贝母瓜蒌散组方治疗ALI的核心靶点及参数

靶点	BC	CC	Degree	靶点	BC	CC	Degree
HSP90AA1	0.147 656 605	0.419 023 136	60	VEGFA	0.061 913 670	0.379 069 767	36
SRC	0.215 354 628	0.441 734 417	58	PLCG1	0.032 999 278	0.345 338 983	34
PIK3R1	0.085 275 773	0.392 771 084	58	CREBBP	0.041 772 024	0.366 292 135	30
PTPN11	0.047 167 920	0.387 173 397	54	TNF	0.065 586 113	0.346 072 187	28
AKT1	0.124 992 572	0.420 103 093	50	JAK2	0.028 785 960	0.359 823 400	28
STAT1	0.099 037 203	0.404 466 501	42	AR	0.067 461 473	0.399 509 804	28
EP300	0.091 496 392	0.391 826 923	42	ITGB1	0.057 232 670	0.343 157 895	28
EGFR	0.084 438 246	0.412 658 228	42	IL6	0.027 354 300	0.349 785 408	28
ESR1	0.069 512 558	0.409 547 739	38	MDM2	0.045 013 058	0.359 823 400	26
PIK3CA	0.021 336 583	0.374 712 644	38	CDK1	0.041 967 770	0.300 184 162	26

注:BC为介数中心性;CC为紧密中心性;Degree为连接度。

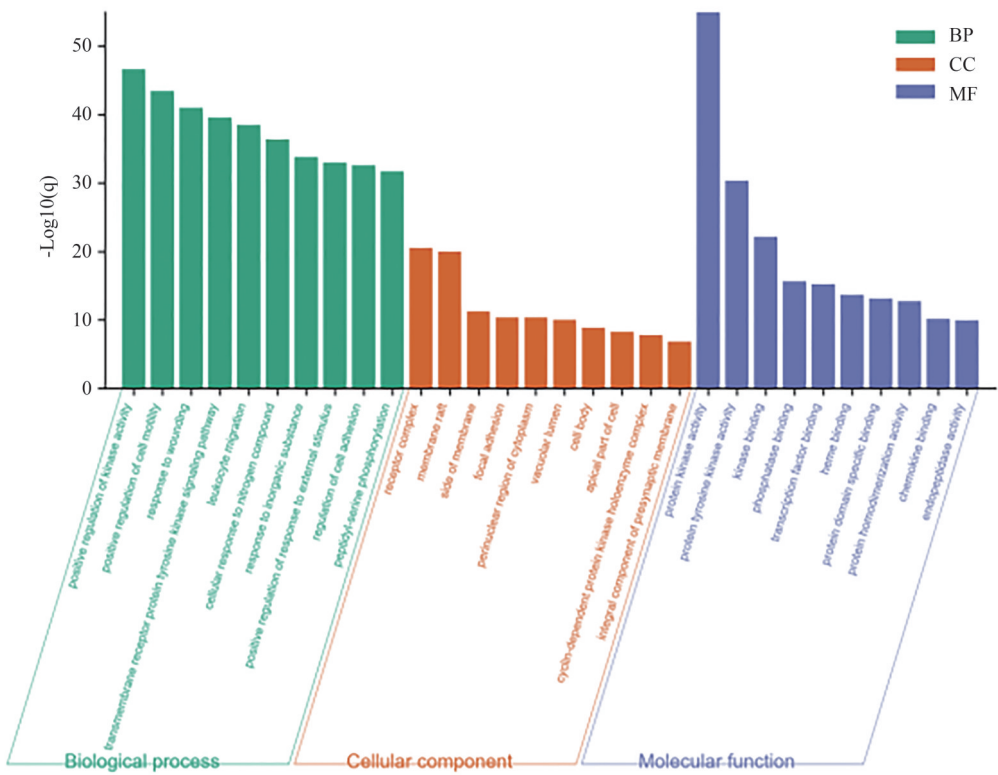


图4 贝母瓜蒌散靶向基因GO分析

2.4 各组小鼠肺组织病理形态改变

肺组织HE染色结果显示,模型组小鼠肺组织肺泡增厚情况明显,肺泡组织结构损伤和炎症细胞浸润增加,肺泡水肿液积累、肺泡毛细血管充血;与模型组相比,贝母瓜蒌散组较模型组肺泡增厚情况减轻,镜下肺泡结构破坏程度减少,肺间质和肺泡充血水肿较模型组减轻,肺泡内有炎症细胞浸润,但程度较模型组亦有所减轻。提示贝母瓜蒌散减轻了LPS引起的肺损伤。见图6。

2.5 各组小鼠肺组织MASSON染色变化

空白组仅可见少量胶原纤维阳性染色;与空白组比较,模型组小鼠肺组织水肿严重且有大量炎症细胞

浸润,并且胶原纤维染色阳性明显($P < 0.001$),提示肺组织炎症伴纤维化;贝母瓜蒌散组肺组织蓝染的胶原纤维表达少量存在,较模型组上述肺组织水肿、损伤和纤维化有显著改善,胶原纤维染色面积减少($P < 0.01$)。见图7、图8和表4。

2.6 各组小鼠肺组织细胞因子mRNA变化

与空白组比较,模型组小鼠肺组织IL-1 α 、IL-2、IL-6、IL-10、TNF- α mRNA表达增加($P < 0.01$);与模型组比较,贝母瓜蒌散组和连花清瘟组小鼠IL-1 α 、IL-2、IL-6、IL-10、TNF- α mRNA表达下降($P < 0.01$)。见表5。

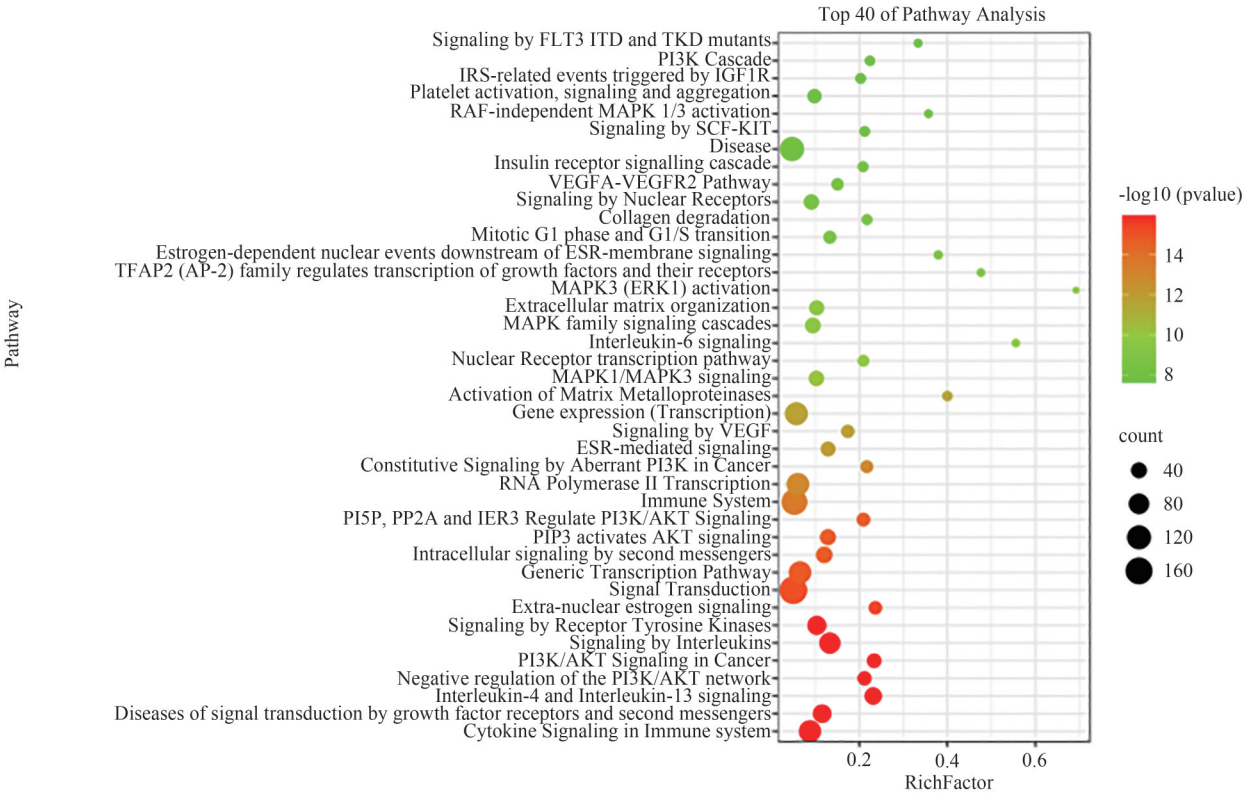


图5 信号通路的基因富集分析

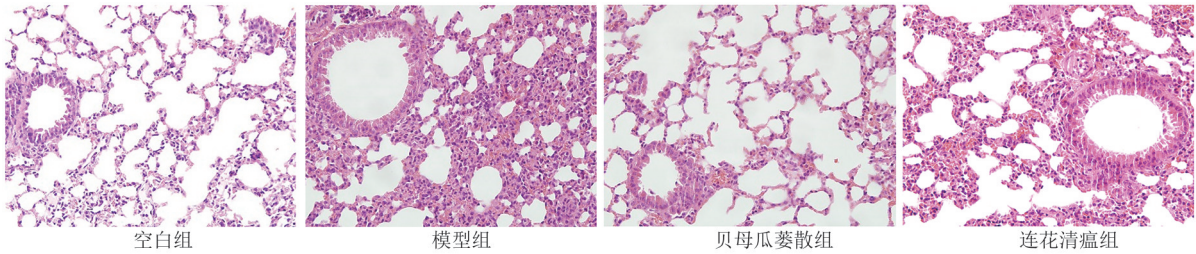


图6 各组小鼠肺组织 HE 染色(×400)

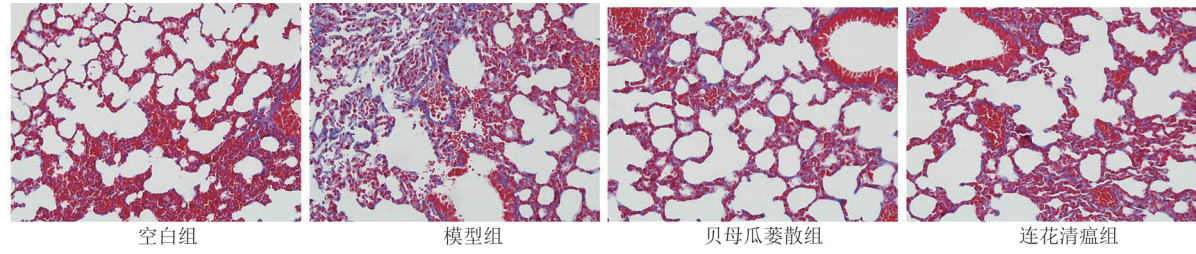


图7 各组肺组织 Masson 染色图(×400)

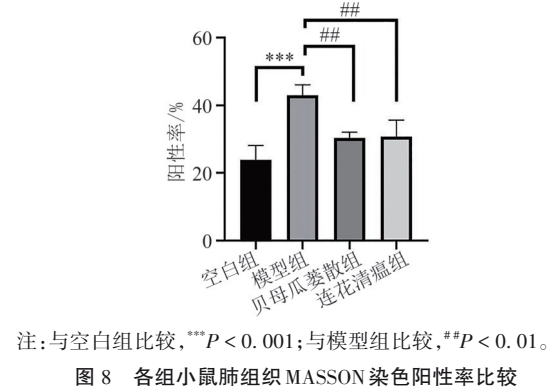


图8 各组小鼠肺组织 MASSON 染色阳性率比较

表4 各组小鼠肺组织 MASSON 染色阳性率比较($\bar{x} \pm s$)		
组别	<i>n</i>	阳性率/%
空白组	3	23.87 ± 4.236
模型组	3	42.96 ± 3.115***
贝母瓜蒌散组	3	30.31 ± 1.766##
莲花清瘟组	3	30.75 ± 4.855##

注:与空白组比较,*** $P < 0.001$;与模型组比较,## $P < 0.01$ 。

表 5 各组小鼠肺组织 IL-1 α 、IL-2、IL-6、IL-10、TNF- α mRNA 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-1 α	IL-2	IL-6	IL-10	TNF- α
空白组	4	1.014 $\pm$ 0.185	1.008 $\pm$ 0.145	1.010 $\pm$ 0.158	1.026 $\pm$ 0.259	1.005 $\pm$ 0.112
模型组	4	36.529 $\pm$ 8.341**	2.909 $\pm$ 0.456**	14.389 $\pm$ 1.454**	8.646 $\pm$ 2.388**	11.231 $\pm$ 0.917**
贝母瓜蒌散组	4	1.678 $\pm$ 0.285##	1.821 $\pm$ 0.231##	0.809 $\pm$ 0.144##	0.772 $\pm$ 0.234##	1.296 $\pm$ 0.325##
连花清瘟组	4	8.710 $\pm$ 2.428##	0.739 $\pm$ 0.096##	0.167 $\pm$ 0.031##	0.024 $\pm$ 0.005##	0.038 $\pm$ 0.004##

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

3 讨论

急性肺损伤(ALI)存在多种免疫细胞共同介导的过度、失控的肺部炎症反应,同时肺部和全身炎症之间的相互影响促进了ALI的发展,是ALI发病过程中重要病理因素^[17-19]。有研究者观察临床ALI患者的中医证候发现,痰热壅肺证是其中最主要的证型^[2]。贝母瓜蒌散,载于《医学心悟·卷三·痰饮》,主治燥痰涩而难出;由贝母1钱5分,瓜蒌1钱,天花粉8分,茯苓8分,橘红8分,桔梗8分组成;有润肺清热、理气化痰之效。方以贝母清热润肺、止咳化痰为君;瓜蒌、天花粉清热涤痰而润燥为臣;茯苓、橘红健脾理气以祛痰为佐;桔梗载诸药入肺,宣肺利气为使;共奏清热润肺、理气化痰之功,使肺阴得润而燥痰可除,清肃有权则咳逆可止。宗绍波等^[20]研究发现,具有祛痰止咳作用的中成药金振口服液能够有效改善LPS诱导的ALI小鼠肺组织间质性水肿及降低致炎细胞因子的含量。贝母瓜蒌散中君药贝母具有祛痰、镇咳和抗炎作用^[21-22]。基于以上原因,本研究利用网络药理学对贝母瓜蒌散治疗ALI进行预测分析,筛选贝母瓜蒌散治疗ALI的靶点和通路,并进行实验验证。

本研究采用腹腔注射LPS模拟全身感染,间接导致炎性反应性ALI。现有研究发现,脓毒血症患者也极易发生ALI,因此以LPS为代表的生物因素诱导脓毒血症致ALI是最常见的ALI造模方法^[23-24]。此外,本研究参考既往文献报道,采取了小剂量间断腹腔注射LPS,在保证小鼠存活率的同时观察到了ALI炎症反应和肺纤维化表现^[25-26]。

本研究通过网络药理学筛选出贝母瓜蒌散活性化合物44个,相对应靶点606个。急性肺损伤关联分析确定了258个共同靶点,PPI网络分析表明,HSP90AA1、IL-6、TNF- α 等免疫与炎症相关蛋白均具有较高的度值(≥ 28),处于网络的中心位置,可能是贝母瓜蒌散治疗ALI的关键靶点。在一项输血相关急性肺损伤患者预后的研究中^[27],患者入院时血清促炎因子IL-6、TNF- α 的表达水平和发生肺损伤患者存活和死亡呈正相关,存活组IL-6和TNF- α 表达水平均显著低于死亡组。本研究的动物实验中,通

过实时荧光定量PCR(qPCR)法检测各组小鼠肺组织IL-1 α 、IL-2、IL-6、IL-10、TNF- α mRNA表达,相较空白组,模型组中这些细胞因子的mRNA表达显著升高。同时,这些在模型组中显著高表达的炎症性细胞因子mRNA,经贝母瓜蒌散干预后,均呈现低表达。提示贝母瓜蒌散能够抑制LPS引起的小鼠肺组织IL-1 α 、IL-2、IL-6、IL-10、TNF- α mRNA过度表达。

同时GO分析结果显示,贝母瓜蒌散对ALI的作用主要涉及了激酶活性的正调控、受体复合物、蛋白激酶活性等过程。从信号通路的基因富集分析结果来看,贝母瓜蒌散可能调控白细胞介素信号、IL-4和IL-13的信号、免疫系统中的细胞因子信号传递等信号通路发挥ALI治疗作用。白介素是目前发现种类最多,调控作用最广泛的一类细胞因子,而研究发现许多中药对白介素类细胞因子具有干预作用,通过抗炎、抗病毒、改善免疫状态等,可以减轻或抑制炎症反应对机体的损伤^[28]。贝母瓜蒌散可能从改善机体细胞因子风暴方向发挥对急性肺损伤的治疗作用。细胞因子风暴,即炎症风暴,最早由FERRARA等^[29]于1993年在graft-versus-host disease(GVHD)中提出,是由感染、药物或某些疾病引起的机体过度免疫。本研究中的HE染色结果提示,与模型组相比,贝母瓜蒌散减轻了LPS引起的小鼠肺组织损伤,改善了LPS引起的肺组织形态学异常。

4 结论

本研究利用网络药理学方法研究贝母瓜蒌散治疗急性肺损伤可能的作用机制,发现贝母瓜蒌散可能通过多靶点多途径发挥对急性肺损伤的治疗作用,其作用机制或许和白细胞介素信号密切相关,特别是白细胞介素信号通路的调控可能是关键机制之一。本研究还通过动物实验发现贝母瓜蒌散对LPS诱导的小鼠急性肺损伤有潜在的治疗作用,贝母瓜蒌散可减少模型小鼠肺组织细胞因子IL-1 α 、IL-2、IL-6、IL-10、TNF- α 释放,抑制肺组织炎症反应和纤维化,避免炎症反应对肺组织的进一步损伤,发挥急性肺损伤治疗作用。

【参考文献】

- [1] BUTT Y, KURDOWSKA A, ALLEN T C. Acute lung injury: a clinical and molecular review [J]. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2016, 140(4): 345–350.
- [2] 杨英伟, 李建, 刘恩顺, 等. 204 例 ALI/ARDS 患者中医证候分布与演变特征研究[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(3): 911–913.
- [3] 灵枢经[M]. 田代华, 刘更生, 整理. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 83.
- [4] 谭春雨. 中藏经(中医临床必读丛书)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 11.
- [5] 杨士瀛. 仁斋直指方[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2006: 257.
- [6] 程国彭. 医学心悟(中医临床必读丛书)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 184.
- [7] 周之干. 慎斋遗书临证综合 27 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 116.
- [8] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. J Cheminform, 2014, 6(1): 13.
- [9] LI J, ZHAO P, LI Y, et al. Systems pharmacology – based dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Bufeī Yishen as an effective treatment for chronic obstructive pulmonary disease [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 15290.
- [10] KIM S, CHEN J, CHENG T, et al. PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces [J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(D1): D1388–D1395.
- [11] DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. Swiss target prediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(W1): W357–W364.
- [12] CONSORTIUM U P. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021 [J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(D1): D480–D489.
- [13] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The gene cards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. Curr Protoc Bioinformatics, 2016, 54: 1. 30. 1–1. 30. 33.
- [14] SZKLARCZYK D, GABLE A L, NASTOU K C, et al. The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user – uploaded gene/measurement sets [J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(D1): D605–D612.
- [15] ZHOU Y, ZHOU B, PACHE L, et al. Metascape provides a biologist – oriented resource for the analysis of systems – level datasets [J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 1523.
- [16] FABREGAT A, SIDIROPOULOS K, VITERI G, et al. Reactome diagram viewer: data structures and strategies to boost performance [J]. Bioinformatics (Oxford, England), 2018, 34(7): 1208–1214.
- [17] PATEL B V, WILSON M R, O'DEA K P, et al. TNF – induced death signaling triggers alveolar epithelial dysfunction in acute lung injury [J]. J Immunol, 2013, 190(8): 4274–4282.
- [18] FAN K Y, FAN J. Regulation of alveolar macrophage death in acute lung inflammation [J]. Respir Res, 2018, 19(1): 50.
- [19] 李超然, 王智刚, 朱运奎. 内毒素所致急性肺损伤发病机制的研究进展 [J]. 中国医药科学, 2011, 1(10): 47–49.
- [20] 宗绍波, 孙兰, 吕耀中, 等. 金振口服液对 LPS 致急性肺损伤模型小鼠 NF – κ B, MAPK 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(9): 155–159.
- [21] 巴珂, 李颖, 何文楷, 等. 不同川贝母制剂镇咳、祛痰和抗炎作用实验研究 [J]. 西南民族大学学报: 自然科学版, 2018, 44(1): 52–55.
- [22] 李媛, 王玉娥, 白关亚, 等. 基于主成分与止咳祛痰功效比较研究平贝母、伊贝母和川贝母 [J]. 中医药导报, 2018, 24(13): 46–49, 56.
- [23] 付静怡, 汪雷, 杨昇. 急性肺损伤动物模型建立的研究进展 [J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2021, 41(5): 690–694.
- [24] WEPLER M, PREUSS J M, MERZ T, et al. Impaired glucocorticoid receptor dimerization aggravates LPS – induced circulatory and pulmonary dysfunction [J]. Front Immunol, 2019, 10: 3152.
- [25] 何征宇, 朱也森, 姜虹. 间断腹腔注射脂多糖制作内毒素诱导的小鼠急性肺损伤肺纤维化动物模型 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2010, 9(1): 76–80.
- [26] 罗艳, 李清香, 曹云涛. 内毒素经不同给药途径建立新生鼠急性肺损伤模型对比分析 [J]. 现代医药卫生, 2018, 34(21): 32–36.
- [27] 赵容, 王基策, 严小平. IL – 1, IL – 6, IL – 8 和 TNF – α 对输血相关急性肺损伤患者预后的影响 [J]. 标记免疫分析与临床, 2018, 25(6): 839–842.
- [28] 黄晶, 张冰, 林志健. 中药对白介素类细胞因子的影响及其在防治 COVID – 19 炎症风暴中的思考 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(2): 23–28.
- [29] FERRARA J L, ABHYANKAR S, GILLILAND D G. Cytokine storm of graft – versus – host disease: a critical effector role for interleukin – 1 [J]. Transplant Proc, 1993, 25(1/2): 1216–1217.

(收稿日期: 2023 – 04 – 07)

Study on Mechanism of Inhibiting Inflammatory Response and Improving Lipopolysaccharide Induced Acute Lung Injury in Mice with Beimu Gualou Powder

WU Jianchao¹, ZHAO Yuan², CHEN Jiulin¹, LIU Te¹, YU Zhihua^{1✉}

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine and Shanghai Geriatric Institute of Chinese Medicine, Shanghai 200031, China; 2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

【Abstract】 Objective: To explore the anti-inflammatory effect of Beimu Gualou Powder (BGP) in acute lung injury (ALI) based on network pharmacology and lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. Methods: The active ingredients and targets of BGP were screened based on the conditions of bioavailability and drug similarity through the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), and ALI related target genes were obtained from GeneCards database. A compound target-ALI target gene interaction (protein-protein interaction, PPI) network was constructed through STRING platform; a medicinal material-component-target-pathway network was created using Cytoscape 3.8.0 software; gene ontology (GO) analysis was performed through Metascape platform; enrichment analysis of Signaling pathway was conducted using pathway database Reactome to predict its molecular mechanism. The intervention experiment of BGS on lipopolysaccharides-induced acute lung injury in mice was carried out to verify the potential targets and pathways. Results: We obtained 44 active components and 606 targets of BGS, and 258 of the targets have common targets with ALI. We found through Go functional enrichment analysis that the effects of BGS on ALI mainly involve processes such as positive regulation of kinase activity, receptor complex, and protein kinase activity. Pathway enrichment analysis indicated that BGS may exert therapeutic effects by the regulation of signaling pathways such as interleukin signaling, interleukin-4, interleukin-13 signaling, and cytokine signaling in the immune system. The results of HE staining and positive staining of collagen fibers showed that BGS could improve lung injury; and the results of qPCR showed that BGS could downregulate mRNA expressions of IL-1 α , IL-2, IL6, IL-10, and TNF- α in mouse lung tissues. Conclusion: Beimu Gualou Powder may exert therapeutic effects against ALI by inhibiting proinflammatory cytokine expression.

【Key words】 Beimu Gualou Powder; Acute lung injury; Internet pharmacology; Inflammatory factors; Lipopolysaccharide