

大承气汤治疗急性肺损伤的主要活性成分及潜在靶点研究

王蕴涵, 杜群, 李燕舞, 肖苏婷, 乔杨

(广州中医药大学科技创新中心, 广东广州 510405)

摘要:【目的】基于网络药理学与细胞实验的方法探讨大承气汤治疗急性肺损伤的作用机制。【方法】通过中药系统药理学数据库(TCMSP)获得大承气汤的主要化学成分,通过GeneCards、OMIM数据库搜集急性肺损伤的疾病靶点,结合Cytoscape 3.8.0软件构建药物-核心靶点-有效成分网络、靶标蛋白互作(PPI)网络,并利用Bioconductor中的R包对核心靶标进行基因本体论(GO)富集和京都基因与基因组百科(KEGG)通路分析。选择小鼠巨噬细胞RAW264.7,使用脂多糖(LPS)进行刺激,通过酶联免疫吸附分析(ELISA)检测各主要有效成分对RAW264.7细胞产生的炎症因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)与白细胞介素6(IL-6)的影响,并采用蛋白免疫印迹(Western Blot)法验证不同成分对预测靶点P53蛋白表达的影响。【结果】获得活性成分27个,主要成分为木犀草素、芦荟大黄素、柚皮素,药物靶点82个,获得疾病靶点2 801个,获得交集基因55个。PPI蛋白作用网络分析,核心蛋白涉及TP53、JUN、MYC等。GO富集到了1 957个GO条目。KEGG通路富集分析发现主要涉及P53信号通路。体外细胞实验证实,木犀草素、芦荟大黄素、柚皮素可下调P53蛋白表达,并抑制炎症刺激下细胞因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)与白细胞介素6(IL-6)的产生。【结论】大承气汤主要起效成分木犀草素、芦荟大黄素、柚皮素对于治疗急性肺损伤具有良好效果,且其主要作用靶点可能与P53相关。

关键词: 大承气汤; 急性肺损伤; 木犀草素; 芦荟大黄素; 柚皮素; P53; 网络药理学

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)12-2757-08

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.12.034

Study on Main Active Components and Potential Targets of *Dachengqi* Decoction in Treatment of Acute Lung Injury

WANG Yun-Han, DU Qun, LI Yan-Wu, XIAO Su-Ting, QIAO Yang

(Science and Technology Innovation Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To observe the mechanism of *Dachengqi* Decoction in the treatment of acute lung injury based on network pharmacology and cell experiment. **Methods** The main chemical components of *Dachengqi* Decoction were obtained through the Traditional Chinese Medicine Systematic Pharmacology Database (TCMSP), and the disease targets of acute lung injury were collected through GeneCards and OMIM databases, combined with Cytoscape 3.8.0 software to construct drug-core target-active component network and target protein interactions (PPI) networks, and the R package in Bioconductor was used for analysis of gene ontology (GO) enrichment and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway. Mouse macrophages RAW264.7 were selected and stimulated with lipopolysaccharide (LPS). The effect of each major active ingredient on the production of inflammatory factors tumour necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) by RAW264.7 cells was examined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and Western Blot was also used to verify the effect of different components on the expression of the predicted target P53 protein. **Results** Twenty-seven active components including luteolin, aloë-emodin and naringenin, 82 drug targets, 2 801 disease targets and 55 intersection genes were obtained. PPI protein action network analysis showed that the core proteins involved in TP53, JUN and MYC, etc.. There were 1 957 GO items. The enrichment analysis of KEGG pathway revealed that the P53 signaling pathway was mainly involved. *In vitro* cell experiments confirmed that luteolin, aloë-emodin and naringenin down-

收稿日期: 2021-05-18

作者简介: 王蕴涵(1995-),女,硕士研究生; E-mail: 544985762@qq.com

通讯作者: 杜群,男,博士,研究员; E-mail: duqun@gzucm.edu.cn

基金项目: 广东省教育厅高校科研项目(编号: 2018KZDXM024)

regulated the expression of P53 protein and inhibited the production of TNF- α and IL-6 induced by inflammatory stimuli. **Conclusion** The main active ingredients of *Dachengqi* Decoction including luteolin, aloë-emodin and naringerin are effective in the treatment of acute lung injury, and its main targets of action may be related to P53.

Keyword: *Dachengqi* Decoction; acute lung injury; luteolin; aloë-emodin; naringerin; P53; network pharmacology

急性肺损伤(acute lung injury)是由感染、创伤、有害气体吸入、休克、中毒等多种因素所导致的以肺弥散功能障碍为特征的肺部疾病^[1],在临床中病死率较高,常危及生命^[2]。目前,除了传统的治疗原发病、呼吸支持及使用糖皮质激素外,国内外关于其生理病理机制的研究也在不断开展,旨在为急性肺损伤提供更好的治疗方法。中医学并无“急性肺损伤”这一疾病名称,而是根据其发病时的症状、体征将其归属于“喘脱”“结胸”“暴喘”等病证的范畴^[3]。临床上急性肺损伤患者多为阳明燥实,热毒结于大肠,腑气不通,形成阳明腑实之证,基于中医藏象理论“肺与大肠相表里”“肺合大肠”,临床上多采用肺肠同治之法^[4]。大承气汤出自《伤寒论》,是肺肠同治法临床应用的代表方剂,被广泛应用于急性肺损伤的治疗,效果显著^[5-8];但其作用机制尚不清楚。因此,本研究通过网络药理学的方法初步探讨大承气汤治疗急性肺损伤的主要活性成分及潜在靶点,并加以体外实验验证,以期阐明其作用机理。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 网络药理学预测

1.1.1 大承气汤药物化学成分收集及药物靶点预测 登录中药系统网络药理学数据库选择TCMSPTM(网址 <http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php>),设置搜索条目为Herb name。设置筛选条件为口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 、类药性指数(DL) ≥ 0.18 ,筛选大承气汤的目标靶点(targets information)。数据库所获得的药物有效化学成分及靶点信息应用Drugbank (<https://www.drugbank.ca/>)使其格式标准化。因TSMSP数据库中尚未收录芒硝的药物成分及靶点,登录BATMAN数据库(网址: <http://bionet.ncpsb.org.cn>),在搜索条目下以“mang xiao”为关键词搜索,收集芒硝的药物成分靶点。

1.1.2 疾病靶点来源 登录GeneCards人类基因数据库^[9](THE HUMAN GENE DATABASE),网址 <https://www.genecards.org/>。设置搜索条目为关键词搜索人类孟德尔遗传数据库(Online Mendelian Inheritance in Man)^[10],网址 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>。搜索条目下以“acute lung injury”为关键词筛选,设置物种为人(Homo sapiens),获取急性肺损伤的疾病靶点。对数据库检索到的疾病靶点进行合并去重,作为最终的疾病靶点来源。

1.1.3 复方-疾病交集基因的获取 应用R语言中的在线程序Draw Venn Diagrams对“1.1.1”项与“1.1.2”项中获取到的大承气汤药物靶点与急性肺损伤疾病靶点进行匹配,获得交集基因靶点,作为大承气汤治疗急性肺损伤的潜在作用靶点并绘制韦恩图。

1.1.4 化学成分-靶点网络图的构建 将“1.1.3”项中获取到的交集基因导入到网络可视化软件Cytoscape 3.8.0,构建化学成分-靶点作用网络。对网络进行分析,以度值参数作为评价节点在网络中重要性的标准。

1.1.5 大承气汤治疗急性肺损伤的蛋白相互作用(PPI)网络构建及核心蛋白筛选 登录String数据库,网址 <https://string-db.org/>。选择Multiple proteins,在搜索条目下输入“1.1.3”项获取到的交集基因,限定物种为人(Homo Sapiens),其余设置保持不变,构建PPI功能网络,并绘制网络图。为筛选核心蛋白,将生成的PPI条目Node1、Node2以及Combined-score导入到Cytoscape 3.8.0,应用Network Analyse插件分析网络,选择APP条目下的CytoNCA插件进行网络拓扑分析。

1.1.6 基因本体论(GO)和京都基因与基因组百科(KEGG)通路富集分析 基于R语言对“1.1.3”项中获取到的交集基因的细胞成分、分子功能、生物学过程以及信号通路进行富集分析。首先将基因Symbol转化为基因ID,选择物种为人(Homo

sapiens), 设定阈值为 $P < 0.05$, 输出富集结果并绘制条形图与气泡图。

1.2 体外实验验证

1.2.1 药物、试剂与仪器 木犀草素(luteolin)[高效液相色谱(HPLC) > 98%, 成都普菲德生物技术有限公司]; 芦荟大黄素(aloe-emodin)(HPLC > 97%, 成都普菲德生物技术有限公司); 柚皮素(naringenin)(HPLC > 99%, 成都普菲德生物技术有限公司)。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(大肠杆菌 055:B5)(美国 Sigma-Aldrich 公司); 四甲基偶氮唑盐(MTT)试剂盒、小鼠肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)酶联免疫吸附分析(ELISA)试剂盒、小鼠白细胞介素6(interleukin 6, IL-6) ELISA 试剂盒(碧云天生物技术公司); P53兔多克隆抗体(Protein-Tech Group 公司); GAPDH兔多克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)偶联的兔免疫球蛋白(IgG)抗体(ABCAM 公司)。酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司)。

1.2.2 细胞培养 本实验选用小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7(购自上海中科院细胞库)。在实验开始前先把 RAW264.7 细胞放置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 的培养箱中, 给予体积分数 10% 胎牛血清(FBS) DMEM 培养基处理以提供必要的生长条件。培养 2~3 d 达到 90% 聚集, 再以 1:5 的比例传代培养用于实验。

1.2.3 MTT 实验 本研究采用 MTT 法分析评估木犀草素、芦荟大黄素、柚皮素对 RAW264.7 细胞活力的影响, 并由此确定合理的药物浓度。首先将细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种在 96 孔板中, 待细胞贴壁后, 培养 12 h, 然后用含有不同浓度木犀草素、芦荟大黄素、柚皮素(0、1.562 5、3.125、6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$)的培养基处理细胞 24 h。接着, 将 20 μL MTT(5 mg/mL)添加到每个孔中, 于 37 °C 中温育 4 h 后弃去培养基, 于每个孔中加入 100 μL 二甲基亚砷(DMSO)溶解已经形成的甲瓩晶体, 应用酶标仪, 选择最佳测量波长 570 nm, 测量每个孔的吸光度。

1.2.4 ELISA 实验 本研究采用 ELISA 法检测细胞培养基上清 TNF- α 和 IL-6 水平。根据实验需求将 RAW264.7 细胞以 3×10^6 个/孔的密度接种在 6 孔板中, 给予与“1.2.3”项相同浓度、时间的药物刺激, 收集 RAW264.7 细胞培养基上清, 根据说明

书方法进行的操作。最后应用酶标仪, 选择最佳测量波长 450 nm, 测量每个孔的吸光度。

1.2.5 蛋白免疫印迹(Western Blot)实验 同“1.2.4”项的细胞培养及刺激方式。去掉 RAW264.7 细胞培养基上清, 使用预冷的 PBS 洗涤 2 次, 加入结合蛋白酶抑制剂混合物的放射免疫沉淀分析(RIPA)缓冲液裂解处理后的 RAW264.7 细胞, 提取总蛋白。通过 8%~12% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白, 并将蛋白转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜, 用 50 g/L 脱脂牛奶封闭。将 PVDF 膜与 P53 抗体 4 °C 孵育过夜后, 再与 HRP 标记的 IgG 抗体孵育。应用 GE ImageQuant LAS4000mini(美国 GE Healthcare 公司)观察目的条带, 并应用 Gel Doc XR 系统(美国 Bio-Rad Laboratories)采用光密度法定量, 最后应用 Quantity One 蛋白质分析软件(美国 Bio Rad 公司)进一步分析。

2 结果

2.1 复方化学成分及药物靶点 本次研究经过合并去重, 共收集大承气汤药物化学成分 27 个, 预测靶点 82 个。

2.2 疾病靶点的获取 在 GeneCards、OMIM 数据库中以“acute lung injury”为关键词进行检索, 通过 R 软件的 venn 程辑包将 2 个数据库中所得到的疾病靶点汇总并删除重复。为保证数据的准确性, GeneCards 数据库按照 Relevance Score > 10 筛选, 共获得 2 801 个疾病靶点, 通过 UniProt 数据库对疾病靶基因进行校正, 将其作为候选靶标来源。

2.3 获取复方-疾病交集基因 基于 R 语言 3.6.0 软件, 在 R 语言中 Bioconductor(<https://www.bioconductor.org/>)网站安装 VennDiagram 程辑包, 将“1.1.1”项与“1.1.2”项中获得的复方药物靶点与疾病靶点数据导入到 R 软件, 应用 Draw Venn Diagrams 在线程序获取交集基因并绘制韦恩图, 见图 1。共获得复方-疾病交集基因 55 个。

2.4 构建有效成分-靶点网络图 运用 Cytoscape 3.8.0 软件中 Import Network 插件构建复方有效化学成分-靶点作用网络, 见图 2。网络共有 145 个节点, 297 条边。核心靶标显示为方形, 活性化学成分显示为圆形, 不同药物显示为不同颜色, 其中, 大黄显示为红色, 芒硝显示为绿色, 枳实显

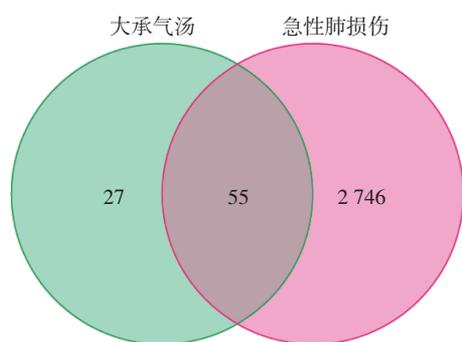


图1 大承气汤-急性肺损伤交集基因韦恩图
Figure 1 Venn diagram of intersection between *Dachengqi* Decoction-acute lung injury

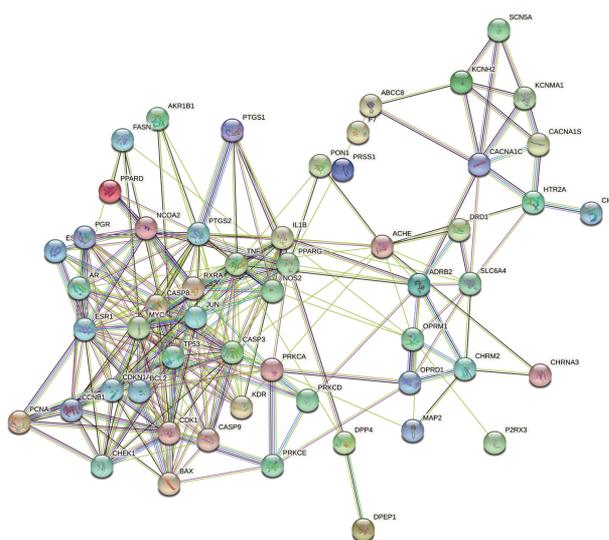


图3 大承气汤与急性肺损伤的PPI网络图
Figure 3 PPI network diagram of *Dachengqi* Decoction and acute lung injury

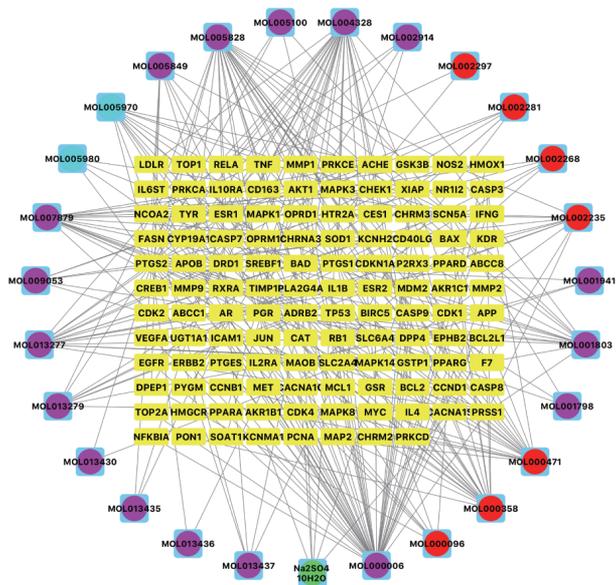


图2 大承气汤化学成分-靶点作用网络
Figure 2 Active ingredient-target network of *Dachengqi* Decoction

示为紫色，厚朴显示为蓝色。网络中化合物与靶点的关系用每条边来显示。一个化学成分与多个交集基因靶点对应，且一个交集基因与靶点也同时对应多个化学成分，化学成分又从属于不同的中药，这说明大承气汤治疗急性肺损伤的过程是多成分、多靶点的。

2.5 核心蛋白相互作用网络构建及核心蛋白筛选 应用String数据库对交集基因初步构建蛋白作用网络，见图3。节点代表蛋白，边代表蛋白与蛋白之间的作用关系。网络连接程度越高说明蛋白之间关系越密切。将String数据库得到的string_interactions.txt文件导入到Cytoscape 3.8.0软件，应用Network Analyse插件构建网络，选择

CytoNCA插件进行网络拓扑分析，筛选网络中的关键节点。核心蛋白筛选参数：介度中心性 (Betweenness Centrality)，紧密中心性 (Closeness Centrality)，节度中心性 (Degree Centrality)，特征向量 (Eigenvector Centrality)，局部连通性 (Local Average Connectivity-based method, LAC)。筛选条件：应用R软件的在线编辑包，对各交集基因上述核心蛋白筛选参数数值进行测算，各组数值中大于本组中位值的基因予以保留，运行R脚本，筛选核心蛋白，见表1，筛选流程见图4。

2.6 交集基因的GO功能富集分析 基于R软件3.6.0对大承气汤治疗急性肺损伤的55个作用靶点进行GO功能富集分析。富集内容包括细胞成分 (cellular component, CC)、生物学过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF)。富集条件为P值=0.05且Q值=0.05。通过分析发现，富集到了1957个GO条目，细胞成分83个，生物学过程1714个，分子功能160个。选取各排名前10位的富集条目，并根据每个项目的P值、Q值及富集在其上的基因数目绘制条形图，见图5。横坐标表示靶点数，左边表示BP、CC、MF，颜色表示P值，P值越小颜色越偏向红色，P值越大则越偏向蓝色。

2.7 交集基因的KEGG通路富集分析 基于R语言对交集基因进行KEGG通路富集分析。分析结果可见，55个复方疾病交集基因共富集到了126条通

表 1 核心蛋白拓扑分析
Table 1 Topological analysis of core proteins

序号	蛋白名称	间距中心度(Betweenness)	紧密中心度(Closeness)	节度中心度(Degree)	特征向量(Eigenvector)	位置区码(LAC)
1	TP53	168.389 474 600	0.559 139 785	27	0.288 566 649	11.555 555 560
2	CASP3	266.073 486 100	0.590 909 091	26	0.280 566 365	11.230 769 230
3	MYC	92.958 503 280	0.536 082 474	24	0.273 285 598	11.75
4	TNF	391.859 762 400	0.604 651 163	23	0.230 579 957	8.956 521 739
5	JUN	74.947 684 800	0.536 082 474	23	0.268 825 948	11.913 043 480
6	PTGS2	153.995 919 500	0.541 666 667	21	0.237 787 306	10.285 714 290
7	ESR1	50.745 814 220	0.504 854 369	20	0.244 816 691	11.8
8	IL1B	205.113 364 100	0.559 139 785	18	0.196 732 014	8.888 888 889
9	PPARG	350.028 395 000	0.547 368 421	17	0.152 775 645	5.647 058 824
10	CDKN1A	26.853 736 820	0.490 566 038	17	0.218 877 465	11.176 470 590
11	CASP8	13.965 501 090	0.485 981 308	16	0.217 562 020	11.75
12	AR	18.587 148 730	0.477 064 220	15	0.196 620 807	9.866 666 667
13	CCNB1	9.691 622 604	0.440 677 966	15	0.199 406 847	10.933 333 330
14	CDK1	38.325 020 770	0.440 677 966	15	0.181 081 682	8.8
15	CASP9	12.653 127 350	0.481 481 481	15	0.205 910 072	11.2
16	ACHE	342.096 347 600	0.514 851 485	12	0.080 549 881	3.5
17	PGR	6.161 051 010	0.452 173 913	12	0.167 478 099	9
18	KDR	16.961 904 460	0.481 481 481	11	0.155 401 096	8.545 454 545
19	ADRB2	291.903 234 700	0.504 854 369	11	0.052 660 663	2.545 454 545
20	BAX	21.447 054 750	0.460 176 991	11	0.147 686 169	7.272 727 273

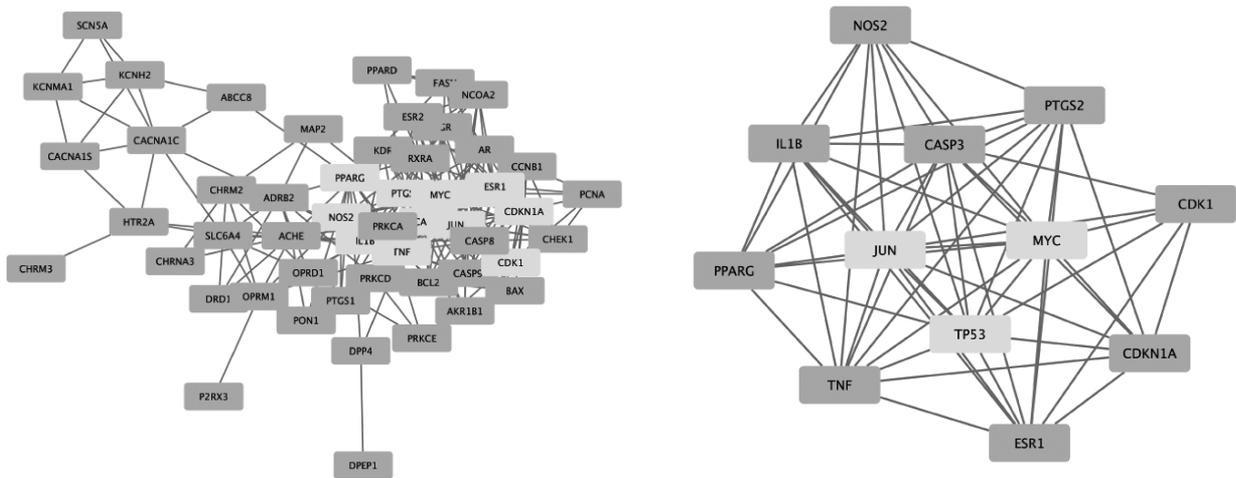


图 4 CytoNca 核心蛋白基因筛选流程图

Figure 4 Screening flowchart of CytoNca core protein genes

路($P < 0.05$)。选取排名前 20 位的富集通路, 根据每个通路的 P 值、 Q 值及富集在其上的基因数目绘制气泡图, 见图 6。横坐标表示富集到基因的数量, 左边表示通路名称, 颜色表示 P 值, P 值越小颜色越偏向红色, P 值越大则越偏向蓝色。主要涉及到 P53 信号通路。

2.8 木犀草素、芦荟大黄素、柚皮素能降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 TNF- α 、IL-6 细胞因子水平 MTT 的数据结果表明, 相较于正常对照组(Ctrl, 药物浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$), 浓度小于 100 $\mu\text{mol/L}$ 的柚皮素组和芦荟大黄素组以及浓度小于 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 的木犀草素组对 RAW264.7 细胞没有毒性, 具体结果见

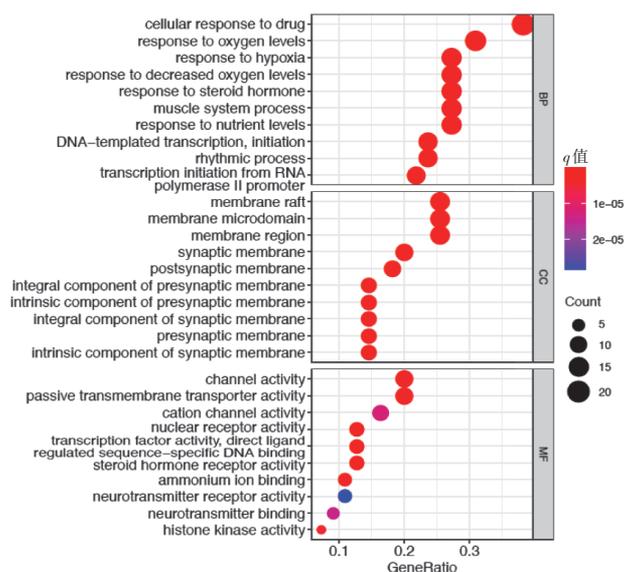


图5 大承气汤治疗急性肺损伤的GO功能富集分析
Figure 5 GO function enrichment of *Dachengqi* Decoction in treating acute lung injury

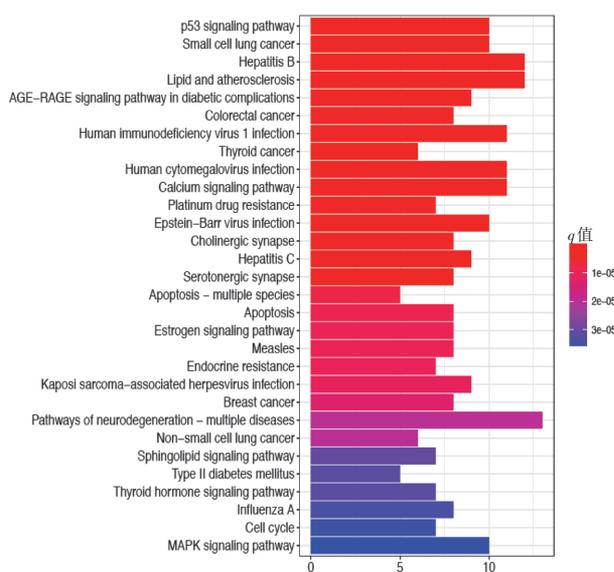


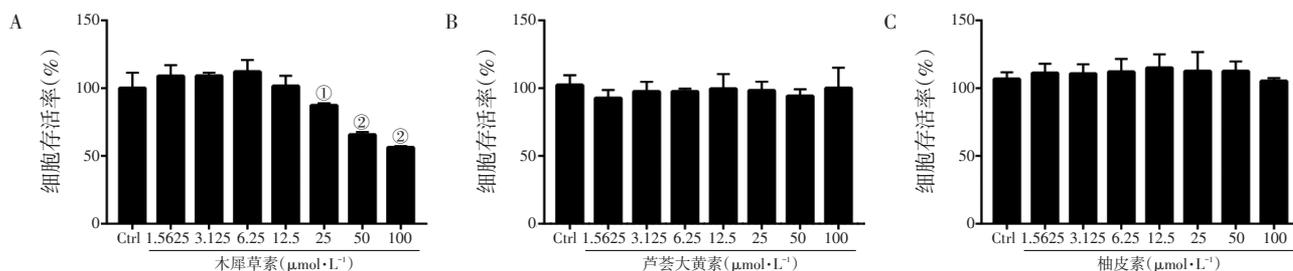
图6 大承气汤与急性肺损伤交集基因KEGG通路富集图
Figure 6 KEGG pathway enrichment of *Dachengqi* Decoction in treating acute lung injury

图7。药效实验的结果表明，柚皮素和芦荟大黄素从 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度，木犀草素从 2 $\mu\text{mol/L}$ 浓度开始，具有一定抑制 TNF- α 、IL-6 细胞因子分泌的能力，且细胞因子的分泌水平呈剂量依赖性地降低，具体结果见图 8。

2.9 木犀草素、芦荟大黄素、柚皮素降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 P53 蛋白表达 根据网络药理学预测结果，TP53 基因在构建的成分-靶点-通路网络中，度值较大且控制着 P53 蛋白的表达。因此，本研究检测 P53 蛋白表达，对网络药理学预测靶点进行验证。Western Blot 实验结果显示，与模型组比较，木犀草素、芦荟大黄素、柚皮素的干预能显著降低 P53 蛋白的表达，且与给药剂量呈现一定的量-效关系，具体结果见图 9。

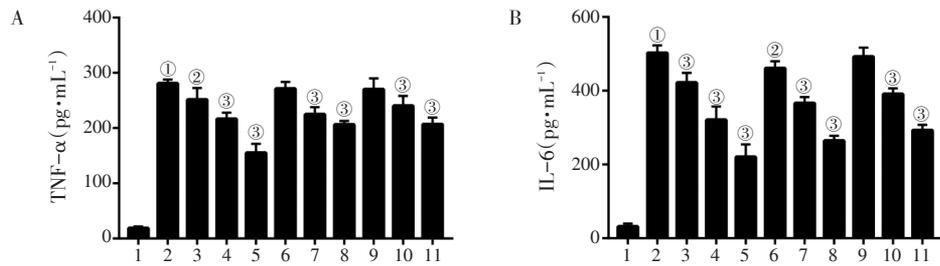
3 讨论

本研究基于网络药理学的方法探讨大承气汤治疗急性肺损伤的作用机制。根据 OB 和 DL 参数，共筛选出大承气汤化学成分 27 个，预测靶点经合并去重收集 82 个。构建有效成分-靶点网络图，结果表明，木犀草素 (MOL000006 luteolin)、芦荟大黄素 (MOL000471 aloe-emodin)、柚皮素 (MOL004328 naringenin) 等是其主要的化学成分。既往的药理学研究表明，木犀草素抗炎作用较强，能抑制 IL-6、TNF- α 等炎症细胞因子的表达，并且能够提高 IL-10 的表达水平来调控炎症反应^[11]。周晓玲^[12]研究发现，芦荟大黄素具有体外抗炎作用，能够以剂量依赖的方式降低 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞中 NO、TNF- α 、IL-1 β 的释放。柚



A. 木犀草素; B. 芦荟大黄素; C. 柚皮素
① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$, 与正常对照组 (Ctrl) 比较

图7 木犀草素、芦荟大黄素、柚皮素对 RAW264.7 细胞活性的影响
Figure 7 Effects of luteolin, aloe-emodin and naringenin on RAW264.7 cell activity



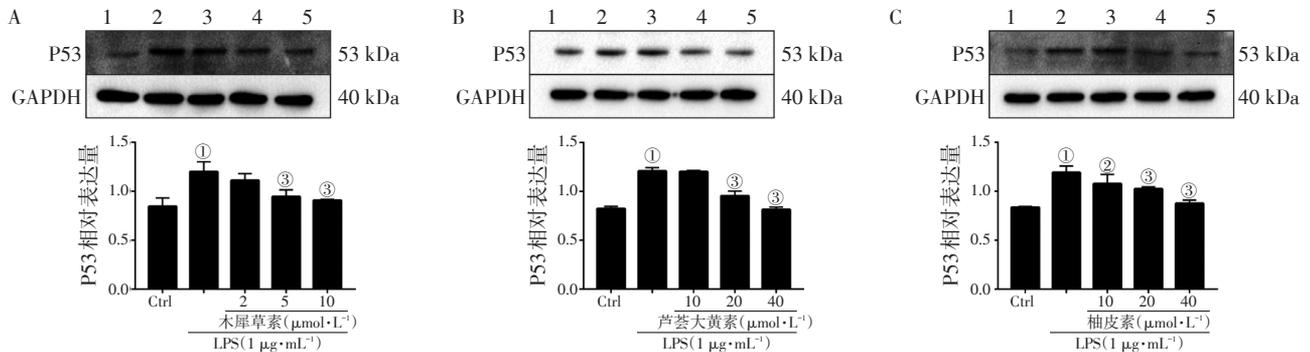
A. TNF-α 含量; B. IL-6 含量

1: 正常对照组 (药物浓度为 0 μmol/L); 2: 脂多糖 (LPS) 组; 3: 木犀草素 2 μmol/L 组; 4: 木犀草素 5 μmol/L 组; 5: 木犀草素 10 μmol/L 组; 6: 芦荟大黄素 10 μmol/L 组; 7: 芦荟大黄素 20 μmol/L 组; 8: 芦荟大黄素 40 μmol/L 组; 9: 柚皮素 10 μmol/L 组; 10: 柚皮素 20 μmol/L 组; 11: 柚皮素 40 μmol/L 组

①P < 0.01, 与正常对照组比较; ②P < 0.05, ③P < 0.01, 与 LPS 组比较

图 8 木犀草素、芦荟大黄素、柚皮素对 RAW264.7 细胞 TNF-α 和 IL-6 分泌的影响

Figure 8 Effects of luteolin, aloee-emodin and naringin on secretion of TNF-α and IL-6 in RAW264.7 cells



A. 木犀草素; B. 芦荟大黄素; C. 柚皮素

①P < 0.01, 与正常对照组 (Ctrl) 比较; ②P < 0.05, ③P < 0.01, 与脂多糖 (LPS) 组比较

图 9 木犀草素、芦荟大黄素、柚皮素对 RAW264.7 细胞 P53 蛋白表达水平的影响

Figure 9 Effects of luteolin, aloee-emodin and naringin on the protein expression level of P53 in RAW264.7 cells

皮素具有较强的抗炎及抗氧化作用, 薛传优等^[13]研究发现, 柚皮素可以降低 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 基因的表达水平, 改善脂多糖诱导的 H9c2 心肌细胞的炎症反应和细胞凋亡。

经过对 55 个交集基因蛋白进行核心蛋白筛选, 结果显示 TP53、JUN、MYC 等是大承气汤治疗急性肺损伤起到重要作用的核心蛋白。Laurent 等^[14]发现 TP53 表达细胞的比例与炎症强度相关。SONG 等^[15]研究发现, c-Jun 能够激活 NLRP3 炎症小体, 促进其磷酸化, 介导炎症反应。黄杰中等^[16]研究发现, c-Myc 与凋亡抑制因子呈正相关, 表明其可以显著地抑制细胞凋亡。急性肺损伤的发病往往继发于肺部疾患的炎症反应, 伴随着肺部毛细血管的损伤, 引起细胞凋亡。可以看出 TP53、JUN、MYC 均与急性肺损伤的发生发展具有一定的相关性。

交集基因 KEGG 通路富集分析显示, 其通路主要为 P53 信号通路。Wu 等^[17]的研究表明, 通过抑制 P53 相关信号通路可以减轻类风湿关节炎炎症反应。炎症信号通路 NF-κB 蛋白表达水平亦可以影响凋亡因子 P53 的表达^[18]。P53 被认为是 NF-κB 调控的细胞凋亡因子, 可以直接或间接影响参与细胞呼吸的多种酶的表达, 并通过增加氧化磷酸化促进活性氧的产生^[19]。也有研究认为, P53 是调控细胞应答多种胞外信号的重要转录因子, 可以增加促炎因子的产生^[20]。

本研究通过细胞实验证实, 木犀草素、芦荟大黄素、柚皮素均具有减少巨噬细胞炎症细胞因子 TNF-α、IL-6 释放的作用。Western Blot 结果显示, 3 种活性成分均可剂量依赖性地降低 P53 蛋白的表达, 对机体的炎症反应具有一定的抑制作用。

综上所述, 本研究将网络药理学和生物信息

学相结合,从网络层面系统地分析预测了大承气汤治疗急性肺损伤的化合物-靶点-通路作用机制,使用细胞实验和分子生物学方法验证了其药效与分子机制,这与中医的整体观念和辨证论治的理念相符合,为今后的相关研究和实验设计提供了参考和新思路。

参考文献:

- [1] 夏明珠,王琦,黄志,等.右美托咪定通过 α_2 AR介导的ERK1/2减轻急性肺损伤大鼠肺水肿[J].中国病理生理杂志,2021,37(3):487-494.
- [2] MA K, PATEL K, NADDOUR M, et al. Acute respiratory distress syndrome novel therapies [J]. Crit Care Nurs Q, 2019, 42(4): 411-416.
- [3] 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.
- [4] 苏景深,刘恩顺,赵鑫民.急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征中医药治疗研究进展[J].吉林中医药,2019,39(5):696-700.
- [5] 刘汉伟,唐纪文,饶李亮.大承气汤在急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征患者机械通气治疗中的应用价值[J].现代中西医结合杂志,2016,25(34):3792-3794,3876.
- [6] 王芳,李明心.宣白承气汤合大陷胸丸加减治疗脓毒症致急性肺损伤的临床观察[J].中国中医急症,2021,30(4):707-710.
- [7] 蒋朱秀,蔡宛如,李敏静,等.加味大承气汤对脓毒症急性肺损伤大鼠血清中Gc球蛋白和内毒素的影响[J].浙江中医杂志,2017,52(10):767-768.
- [8] 胡星星,刘绛云,朱瑾,等.大承气汤对脓毒症肺损伤患者肺保护作用的研究[J].现代中西医结合杂志,2020,29(5):463-467,488.
- [9] FISHILEVICH S, NUDEL R, RAPPAPORT N, et al. GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in Gene Cards [J]. Database (Oxford), 2017, 2017: 1-17.
- [10] LUO P, TIAN L P, RUAN J, et al. Disease gene prediction by integrating PPI networks, clinical RNA-Seq data and OMIM data [J]. IEEE/ACM Trans Comput Bio Bioinform, 2019, 16(1): 222-232.
- [11] 于倩,巫冠中.木犀草素抗炎机制的研究进展[J].药学研究,2019,38(2):108-111,119.
- [12] 周晓玲.芦荟大黄素体外抗炎作用及其机制研究[D].成都:成都中医药大学,2012.
- [13] 薛传优,徐璐,秦庆庆,等.柚皮素对脂多糖诱导的H9c2心肌细胞炎症和凋亡的作用机制研究[J].中国临床药理学杂志,2020,36(22):3635-3638.
- [14] LAURENT C, SVRCEK M, FLEJOU J F, et al. Immunohistochemical expression of CDX2, β -Catenin, and TP53 in inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer [J]. Inflamm Bowel Dis, 2011, 17(1): 232-240.
- [15] SONG N, LIU Z S, XUE W, et al. NLRP3 phosphorylation is an essential priming event for inflammasome activation [J]. Mol Cell, 2017, 68(1): 185-197.
- [16] 黄杰中,陈敬恒.c-myc蛋白及凋亡抑制、促进因子在骨肉瘤中的检测价值探究[J].中国医学创新,2021,18(9):138-142.
- [17] WU H, ZHOU X, WANG X, et al. miR-34a in extracellular vesicles from bone marrow mesenchymal stem cells reduces rheumatoid arthritis inflammation via the cyclin I/ATM/ATR/P53 axis [J]. J Cell Mol Med NLM, 2021, 25(4): 1896-1910.
- [18] 武冬,郭筱王,贾佳,等.艾司洛尔对脓毒症大鼠心肌损伤的改善及对氧化还原酶及核因子- κ B-P53的调控分析[J].山西医药杂志,2019,48(15):1811-1815.
- [19] FSCHER M, QUAAS M, STEINER L, et al. The P53-p21-DREAMCDE/CHR pathway regulates G2/M cell cycle genes [J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(1): 164-174.
- [20] 白贵斌,王媛,燕超,等.MTB感染对小鼠肺脏上皮细胞NF- κ B和P53信号通路的调控[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2020,48(4):33-40.

【责任编辑:侯丽颖】