

## 王不留行黄酮苷对脓毒症小鼠急性肺损伤保护作用及机制研究

蔡维维, 张仕杰, 文媛媛, 朱雪雪, 侯豹, 孙海建, 邱丽颖\*

江南大学 医学院, 江苏 无锡 214122

**摘要:** 目的 基于网络药理学和动物实验探究王不留行黄酮苷(VAC)对脓毒症小鼠急性肺损伤的保护作用机制。方法 通过Swiss Target Prediction数据库收集VAC的潜在作用靶点; 利用GeneCards数据库检索脓毒症相关的疾病靶点; 运用Draw Venn Diagram软件构建VAC和疾病的共同靶点; 利用STRING 11.5数据库和Cytoscape 3.10.0软件构建共同靶点蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络; 利用Metascape数据库进行基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析。采用ip给予脂多糖(LPS)构建脓毒症模型, 造模同时给予VAC(1,5 mg·kg<sup>-1</sup>)或地塞米松干预, 取各组小鼠肺组织及血清, 苏木精-伊红(HE)、Masson及TUNEL染色观察肺组织形态变化、纤维化及细胞凋亡情况, ELISA法和实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法分别检测血清和肺组织中炎症因子水平, 免疫组织化学法和Western blotting法检测肺组织炎症通路相关蛋白表达。**结果** VAC和肺脓毒症共同靶点有44个; GO富集分析涉及生物过程(BP)823个条目、细胞组分(CC)52个条目和分子功能(MF)49个条目; KEGG分析筛选出癌症通路、PI3K-Akt、JAK-STAT信号通路等20条信号通路。验证实验结果显示, 与对照组相比, 模型组小鼠肺组织损伤且纤维化严重, 肺脏指数显著增加( $P < 0.05$ ), 血清及肺组织中相关炎症因子表达升高( $P < 0.01, 0.001$ )。与模型组相比, VAC及地塞米松组肺组织病理形态得到改善, 纤维化程度减轻, 肺脏指数显著降低( $P < 0.05$ ), 血清中肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素6(IL-6)水平、肺组织炎症蛋白表达量及细胞凋亡数量降低, PI3K、Akt蛋白表达升高( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ )。动物实验结果与网络药理学结果一致。**结论** VAC对脓毒症小鼠急性肺损伤具有一定的保护作用, 其机制可能与调控PI3K-Akt、NLRP3/TNF- $\alpha$ 等通路抑制炎症的发展有关, 为VAC抗炎作用机制的深入研究提供了依据。

**关键词:** 王不留行黄酮苷; 脂多糖; 脓毒症; 急性肺损伤; 网络药理学; 药理学设计性实验

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2024)07-1583-12

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.07.017

## Protective effect and mechanism of vaccarin on acute lung injury in sepsis mice

CAI Weiwei, ZHANG Shijie, WEN Yuanyuan, ZHU Xuexue, HOU Bao, SUN Haijian, QIU Liying

Wuxi Medical College, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

**Abstract: Objective** Based on network pharmacology and animal experiments to explore the protective mechanism of vaccarin (VAC) in acute lung injury of sepsis mice. **Methods** The potential targets of VAC and the disease targets related to pulmonary sepsis were collected through the Swiss Target Prediction database and the GeneCards database separately. Then, the common targets for VAC (1,5 mg·kg<sup>-1</sup>) and diseases were obtained using Draw Venn Diagram software. The STRING 11.5 database protein-protein interaction was used to construct PPI network and a drug target disease network was constructed using Cytoscape 3.10.0. Finally, Gene Ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis for key targets were conducted utilizing the Metascape database. A sepsis model was established by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS) and treated with VAC or dexamethasone (DEX). Then, lung tissue and serum were collected from each group, and HE, Masson, and TUNEL staining were used to observe changes in lung tissue morphology, fibrosis area, and cell apoptosis. The levels of inflammatory factors in serum and lung tissue were detected by ELISA and qRT-PCR, respectively. The expression of inflammatory pathway related proteins in lung tissue was detected by immunohistochemistry and Western blotting. **Results** There were 44 common targets for VAC and pulmonary sepsis. A total of 924 GO items were obtained by GO enrichment

收稿日期: 2024-03-25

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82170424); 国家自然科学基金青年项目(81700364); 江苏省大学生创新创业训练计划重点项目(202210295035Z); 江南大学实验室管理专项研究课题(JDSYS201924)

第一作者: 蔡维维, 女, 硕士, 实验师, 从事天然产物的抗感染与修复药理学研究。E-mail: caiweiwei@jiangnan.edu.cn

\*通信作者: 邱丽颖, 女, 教授, 博士, 从事天然产物的抗感染与修复药理学研究。E-mail: 535682185@qq.com

analysis, including 823 for biological processes, 52 for cellular composition, and 49 for molecular functions. KEGG analysis identified 20 signaling pathways, including cancer pathway, PI3K-Akt, and JAK-STAT signaling pathway. The animal experiment results showed that compared with the control group, the model group mice had severe lung tissue damage and fibrosis, lung index significantly increased ( $P < 0.05$ ), and the expression of inflammatory factor in serum and tissue was increased ( $P < 0.01, 0.001$ ). While, compared with model group, VAC and DEX improved pathological morphology of lung tissue, reduced fibrosis and the expression levels of serum TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ). The expression of inflammatory proteins in lung tissue, and the number of cell apoptosis decreased, while the expression of PI3K and AKT1 proteins increased ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ). The results of animal experiments were consistent with the results of network pharmacology. **Conclusion** VAC have a certain protective effect on acute lung injury in sepsis mice, and its mechanism may be related to the regulation of PI3K-Akt and NLRP3/TNF- $\alpha$  pathways related to its occurrence and development, which provides a basis for the in-depth study of the anti-inflammation mechanism of VAC.

**Key words:** vaccarin; lipopolysaccharide; sepsis; acute lung injury; network pharmacology; pharmacological design experiment

脓毒症是机体对感染反应失调所引起的一种涉及生理、病理和生化异常的危及生命的器官功能障碍<sup>[1]</sup>,其死亡率在ICU急症中高达20%~45%<sup>[2]</sup>。急性肺损伤(ALI)属于临床中非常多见的一类呼吸系统疾病,可由感染、创伤、烧伤、中毒、肺炎、输血、免疫反应等多种致病因素引发肺毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞结构功能损害,增加肺毛细血管的通透性,继而造成非心源性肺间质和肺泡弥漫性水肿<sup>[3]</sup>。ALI是脓毒症患者临床常见并发症,病情恶化可出现急性呼吸窘迫综合征,这也是脓毒症病人死亡的重要原因。研究发现,脓毒症ALI的发病机制主要是血管内皮损伤、炎症反应、细胞焦亡、氧化应激、细胞凋亡与自噬、肺泡上皮损伤等<sup>[4]</sup>,因此,对于脓毒症ALI的干预治疗可以从以上几个方面展开研究。

王不留行黄酮苷(VAC)是一种从石竹科麦蓝菜属植物麦蓝菜 *Vaccaria segetalis* (Neck.) Garcke 种子中提取的多酚类化合物,是含有12个酚羟基的黄酮单体。VAC具有广泛的生物学作用,包括预防和缓解内皮细胞损伤、促进血管生成和伤口愈合、肝脏保护、抗炎、抗氧化<sup>[5]</sup>。前期研究表明,VAC可参与成纤维细胞生长因子(FGF-2)介导的成纤维细胞生长因子受体1(FGFR-1)诱导的血管生成;可以通过抑制Notch信号减轻过氧化氢对人EA·hy926内皮细胞的损伤<sup>[6]</sup>;可以通过miR-570-3p/HDAC1信号通路抑制高糖诱导的血管内皮功能障碍<sup>[7]</sup>。最新研究发现,VAC可通过抑制慢性伤口释放炎症因子肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )发挥促进伤口愈合的作用<sup>[8]</sup>。

脂多糖又名内毒素(LPS),是临床医学微生物实验中常见革兰阴性菌细胞壁的主要成分,可导致包括ALI在内的各种炎症性疾病,ip给予LPS也是

脓毒症模型构建的常用方法之一<sup>[9]</sup>。因此本实验将网络药理学与脓毒症小鼠ALI模型相结合,探讨VAC对LPS诱导的脓毒症小鼠ALI的保护作用机制。

## 1 材料

### 1.1 主要试剂与仪器

LPS(批号:L2880,质量分数 $\geq 97\%$ ,美国Sigma公司);地塞米松磷酸钠注射液(规格:1 mL:5 mg,郑州卓峰制药有限公司);VAC(批号:B10888-1 g,质量分数 $\geq 98\%$ ,上海士锋科技有限公司);苏木精-伊红(HE)染液、SABC试剂盒、Masson染色试剂盒(批号:D006-1-4、I001-1-1、D026-1-3,南京建成生物科技有限公司);白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、蛋白激酶B(Akt)、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)抗体(批号:16806-1-AP、17590-1-AP、10176-2-AP、27921-1-AP、30109-1-AP, Proteintech公司); $\beta$ -actin及山羊抗兔二抗(批号:ab8226、ab6721, Abcam公司);TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10 ELISA检测试剂盒(批号:H052-1-2、H002-1-2、H007-1-2、H009-1-2,南京建成生物科技有限公司);TUNEL染色试剂盒(批号:KTA2010,亚科因生物技术有限公司);TRIzol试剂(批号:15596026CN,赛默飞世尔科技公司);4%多聚甲醛固定液(批号:P885233-250 mL,上海麦克林生化科技股份有限公司)。

生物组织包埋机(EG1150H+C,徠卡仪器有限公司);石蜡切片仪(RM2135,徠卡仪器有限公司);数字切片扫描系统(Pannoramic MIDI, 3DHISTECN公司);电子天平(AX2202ZH/E,奥豪斯仪器有限公司);光学显微镜(IX73, OLYMPUS公司);冷冻离心机(5424R,德国Eppendorf公司);全自动化学发光

分析仪(天能 5200Multi, 上海天能科技有限公司); 流式细胞仪(Accuri C6 Plus, 美国BD公司); 全自动荧光定量PCR系统(LightCycler 480 II, 美国罗氏公司)。

## 1.2 实验动物

雄性 C57 小鼠[许可证号: SCXK(沪)2022-0004], 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 6~8 周龄, 体质量(20±2)g, 饲养于江南大学医学院实验动物中心屏障环境, 所有动物实验在江南大学实验动物委员会的批准下进行, 动物伦理编号: JN.No20240315c0400731[104]。

## 2 方法

### 2.1 网络药理学分析

**2.1.1 VAC 的靶点基因预测** 通过 PubChem 数据库(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)搜索王不留行黄酮苷的英文关键词“vaccarin”, 得到正确结构的“Canonical SMILES”, 即“C1C(C(C(C(O1)OC2C(C(C(OC2C3=C(C4=C(C=C3O)OC(=CC4=O)C5=CC=C(C=C5)OC6C(C(C(C(O6)CO)O)O)O)O)O)O)O)O)O)”, 随后将此导入 Swiss TargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>), 得到相关的预测靶点蛋白和基因名称。

**2.1.2 肺脓毒症相关靶点筛选** 通过 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)搜索关键词“Pulmonary sepsis”, 得到其相关靶点基因。

**2.1.3 “VAC-脓毒症”靶点交集图绘制** 通过 Venny 在线绘图工具(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>), 输入 VAC 的预测靶点基因和肺脓毒症潜在靶点, 绘制肺脓毒症与 VAC 的靶点交集图并获得共同靶点基因信息。

**2.1.4 肺脓毒症-VAC 靶点的蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建** 将 Venny 图交集得到的靶点数据输入到 STRING 数据库(<https://string-db.org/>), 利用 Cytoscape 3.10.0 软件绘制 PPI 网络图。

**2.1.5 基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析** 运用 Metascape(<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>)进行交集靶点的 GO 功能分析和 KEGG 信号通路富集分析, GO 功能分析包括生物过程(BP)、分子功能(MF)、细胞组成(CC), 并借助微生信-在线生物信息分析、可视化云平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)进行可视化分析。

### 2.2 动物实验验证

**2.2.1 分组与给药** C57 小鼠适应性饲养 3 d 后, 将 30 只 C57 小鼠随机分为 5 组, 即对照组、模型组、地塞米松(5 mg·kg<sup>-1</sup>)组及 VAC 低、高剂量组(1、5 mg·kg<sup>-1</sup>), 实验周期为 2 d。LPS 造模前 1 d, 对照组 ip 给予 0.9% 氯化钠溶液, 地塞米松组按 5 mg·kg<sup>-1</sup> ip 给予地塞米松磷酸钠注射液<sup>[10]</sup>, VAC 组按以上分组 ip 给予溶解于 0.9% 氯化钠溶液的 VAC 溶液; 给药 24 h 后, 除对照组 ip 给予 0.9% 氯化钠溶液外, 其他组小鼠均 ip 给予 LPS 溶液 10 mg·kg<sup>-1</sup>, 同时各组 ip 给予相应的药物进行治疗。

**2.2.2 小鼠血液、肺组织的收集** ip 给予 LPS 造模 24 h 后, 将小鼠进行称重, 记录每只小鼠体质量。将小鼠麻醉后, 眼眶取血, 脱颈处死并迅速打开小鼠胸腔, 将肺组织连同心脏、气管一并取出, 称质量; 然后分离出心脏及气管, 称质量, 得到肺组织质量, 计算肺脏指数=(肺组织质量/小鼠体质量)。

**2.2.3 ELISA 法检测小鼠血清中 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-10 的水平** 将未抗凝的小鼠全血, 室温静置 30 min, 2 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min, 取上层血清, 备用。采用 ELISA 法检测血清中炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-10 水平, 按试剂盒说明进行操作。

**2.2.4 实时荧光定量 PCR 法(qRT-PCR)检测小鼠肺组织中炎症因子 TNF-α、IL-1β mRNA 的表达** 取各组小鼠的新鲜肺组织左下叶, 使用 TRIzol 试剂提取各组 RNA, 再取 1 μg 逆转录成 cDNA 后, 用 SYBR Green 进行 qRT-PCR 检测, 以 β-actin 作为内参, 采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算目的基因 IL-1β、TNF-α mRNA 的相对表达量。内参及目的基因引物序列见表 1。

表 1 内参及目的基因 qRT-PCR 引物序列

Table 1 qRT-PCR primer sequences of internal reference and target genes

基因	引物序列(5'-3')
<i>TNF-α</i>	F: 5'-CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA-3' R: 5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'
<i>IL-1β</i>	F: 5'-GCTGAAAGCTCTCCACCTCAATG-3' R: 5'-TGTCGTTGCTTGTTCTCCTTG-3'
<i>β-actin</i>	F: 5'-CATGGAGTCTCTGGGCATCC-3' R: 5'-CTCCTTCTGCATCCTGTCCGG-3'

**2.2.5 HE 染色法观察小鼠肺组织病理形态学变化** 切取小鼠右肺组织下叶, 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h, 蒸馏水冲洗至无多聚甲醛味, 常规梯度乙醇脱水, 包埋成蜡块, 制成 3 μm 的石蜡切片, 在 65 °C

下烘干2 h,梯度乙醇洗脱,二甲苯脱蜡,HE染色,封片,晾干,用数字切片扫描仪读取切片,观察肺泡壁厚度、肺组织破坏、炎症细胞浸润情况,按以下标准进行评分:肺组织正常,记为0分;肺组织受损程度少于25%,记为1分;肺组织受损程度25%~50%(含50%),记为2分;肺组织受损程度50%~75%(含75%),记为3分;肺组织受损程度超过75%,记为4分。

**2.2.6 Masson染色法观察小鼠肺组织病理形态学变化** 将肺组织蜡块切成3 μm厚的薄片,按Masson染色试剂盒操作说明行常规染色步骤,染好后用中性树脂封片,用数字切片扫描仪读取切片,ImageJ软件计算肺组织纤维化面积百分比。

**2.2.7 TUNEL染色检测小鼠肺组织细胞凋亡情况** 将肺组织蜡块切成3 μm厚的薄片,按TUNEL染色试剂盒操作说明:石蜡切片脱蜡至水,蛋白酶K修复。然后每张切片滴加50 μL TdT缓冲液(TdT缓冲液配方:TdT酶1 μL、Equilibration Buffer10 μL、Label Mix Green5 μL、去离子水34 μL),37 °C避光孵育1 h后,PBS冲洗2次,用含DAPI的封片剂封片,荧光显微镜下观察并拍照,采用IPP(6.0版本)图像软件计数阳性细胞数量。

**2.2.8 免疫组化法检测小鼠肺组织炎症因子TNF-α、IL-1β、NLRP3蛋白水平** 将肺组织蜡块切成3 μm厚的薄片,然后依次进行组织烤片、二甲苯脱蜡、梯度酒精水化、柠檬酸抗原修复、3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>灭活、BSA封闭,然后分别滴加不同的一抗溶液,于4 °C冰箱内孵育过夜,随后室温下复温1 h后,洗去一抗,37 °C下滴加二抗溶液孵育15 min、SABC孵育20 min、DAB显色,镜下观察染色进度,及时洗片终

止,苏木素染核3 min、流水冲洗返蓝后,中性树脂封片,用数字切片扫描仪读取切片,使用Image J分析软件计算各组TNF-α、IL-1β、NLRP3蛋白相对表达水平,以目的蛋白表达面积进行统计。

**2.2.9 Western blotting法检测小鼠肺组织Akt1、PI3K的蛋白表达水平** 取新鲜肺组织加入RIPA裂解液于冰上提取组织中总蛋白,采用BCA蛋白浓度测定试剂盒对蛋白进行定量。将蛋白样品与上样缓冲液混匀,沸水浴加热变性,取等量变性蛋白样品加入上样孔,SDS-PAGE凝胶电泳。待蛋白分离后转膜至PVDF膜上,在质量浓度为5%脱脂奶粉中封闭1 h,TBST洗膜后加入一抗(1:2 000稀释),4 °C过夜杂交,TBST洗膜后再加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:3 000稀释),室温杂交1 h,TBST洗膜后以ECL化学发光,于暗室成像拍照,以β-actin为内标蛋白,使用Image J分析软件计算各组PI3K、Akt1蛋白相对表达水平。

**2.2.10 统计学处理方法** 所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用GraphPad Prism 8.0统计软件进行t-test分析。

### 3 结果

#### 3.1 网络药理学分析结果

通过网络药理学分析VAC潜在作用靶点为111个(图1)。通过GeneCards数据库收集肺脓毒症潜在作用靶点3 452个,药物靶点与疾病靶点进行合集分析,二者共同靶点为44个(图2)。PPI网络的构建及分析发现其潜在靶点为蛋白激酶B1(AKT1)、肿瘤坏死因子(TNF)、内皮细胞生长因子受体(EGFR)、缺氧诱导因子-1A(HIF-1A)和前列腺素内过氧化物合酶2(PTGS2),见图3。

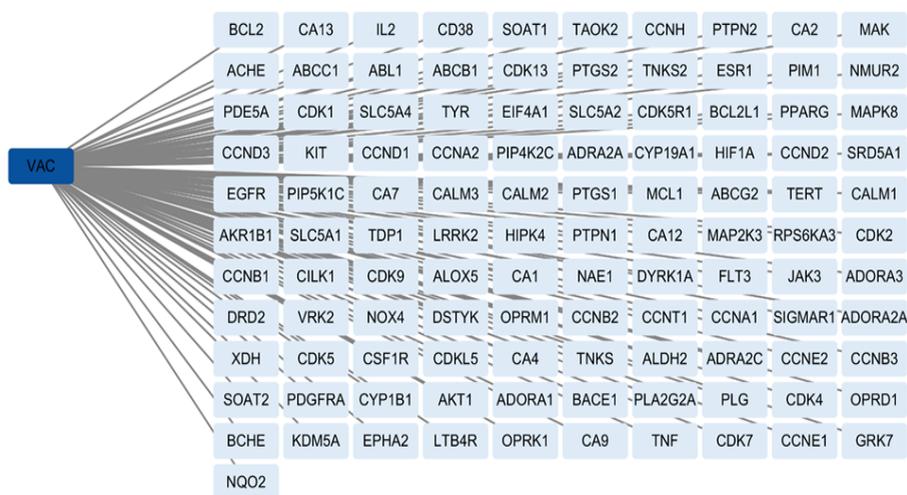


图1 VAC潜在作用靶点

Fig. 1 Potential targets of VAC

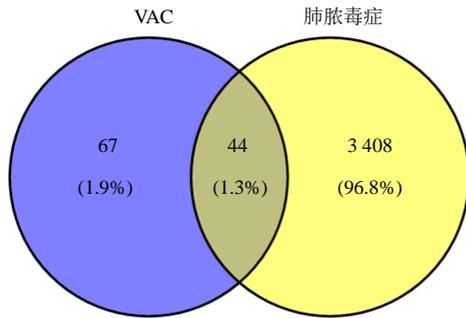


图2 肺炎毒症与VAC靶点维恩图

Fig. 2 Venn diagram of targets of pulmonary sepsis and VAC

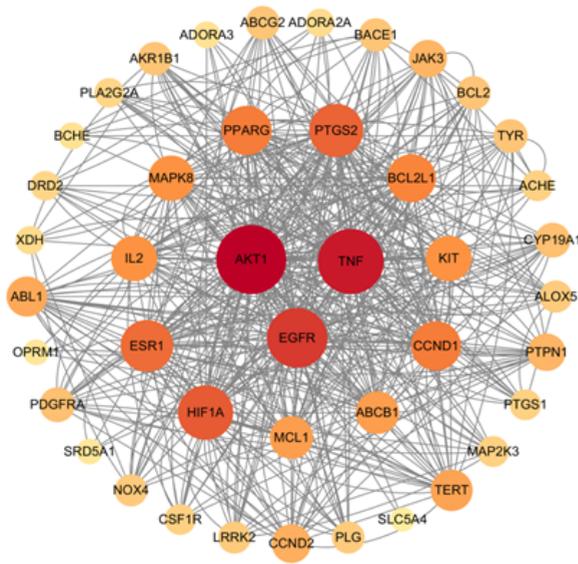


图3 PPI网络图

Fig. 3 PPI diagram

对VAC与“Pulmonary sepsis”的交集基因进行GO功能富集分析(图4)发现,作用靶点基因主要富集在823个BP,主要包括一氧化氮合酶活性的调节、淋巴细胞凋亡过程的负调控、氧化应激诱导的内源性凋亡信号通路的调控、氧化应激诱导细胞死亡的负调控、线粒体凋亡变化、氧化应激反应的调节、类固醇激素生物合成过程、miRNA转录的负调控等;52个CC,主要包括Bcl-2家族蛋白复合物、受体复合体、核膜、神经元细胞体、轴突等;49个MF,主要包括一氧化氮合酶调节活性、转录辅激活因子结合、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性、DNA结合转录因子结合、氧化还原酶活性、双加氧酶活性等。

对交集基因进行KEGG通路富集分析,筛选出前20条信号通路(图5),包括癌症通路(pathway in cancer)、JAK-STAT信号通路(JAK-STAT signaling pathway)、PI3K-Akt信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、人类T细胞白血病病毒1型感染(Human

T-cell leukemia virus 1 infection)、Ras信号通路(Ras signaling pathway)、内分泌抵抗(Endocrine resistance)、MAPK信号通路(MAPK signaling pathway)、脂质与动脉粥样硬化(Lipid and atherosclerosis)、细胞凋亡(Apoptosis)等。

### 3.2 VAC对急性肺损伤小鼠肺组织大体形态及肺脏指数的影响

观察发现,采用LPS诱导小鼠脓毒症模型建立及药物(地塞米松或VAC)干预后,模型组小鼠精神不振,身体蜷缩,眼球充血明显,而地塞米松组和VAC组相比较于模型组小鼠活动能力及精神状态有所改善。各组典型肺组织病例观察结果如图6所示,模型组肺组织水肿,表面有明显的发红点,而地塞米松组和VAC组采用药物干预能改善LPS引起的部分损伤,减少肺部组织的出血情况,且模型组肺脏指数较对照组显著增加( $P < 0.05$ ),地塞米松组和高剂量VAC处理组的肺脏指数较模型组显著降低( $P < 0.05, 0.01$ ),见图7。

### 3.3 VAC对小鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10水平的影响

血清中炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10的水平是反映肺组织炎症程度的重要指标。如图8所示,与对照组相比,模型组血清中促炎因子IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6的含量显著增加( $P < 0.01, 0.001$ ),抑炎因子IL-10含量降低( $P < 0.001$ );给予药物预处理后,与模型相比,地塞米松组和VAC组小鼠血清中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6的含量明显降低( $P < 0.05, 0.01$ ),抑炎因子升高,说明VAC具有抑制脓毒症小鼠血清中促炎因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6表达以及增加抑炎因子IL-10表达的作用。

### 3.4 VAC降低小鼠肺组织中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ mRNA的水平

如图9所示,与对照组相比,模型组中的肺组织TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA表达显著增加( $P < 0.01, 0.001$ );与模型组比较,地塞米松组的TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$  mRNA表达显著降低( $P < 0.01$ ),VAC高剂量组小鼠肺组织中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA表达显著降低( $P < 0.05, 0.01$ )。

### 3.5 VAC对脓毒症小鼠肺组织病理学的影响

HE染色结果如图10显示,对照组小鼠肺组织结构正常、组织轮廓清晰未见明显异常,肺泡充气良好,而模型组小鼠肺泡腔和间质可见大量红细胞,肉眼可见片状血灶,肺组织肺泡壁明显增厚,肺组织损伤评分显著升高( $P < 0.001$ );VAC低、高剂

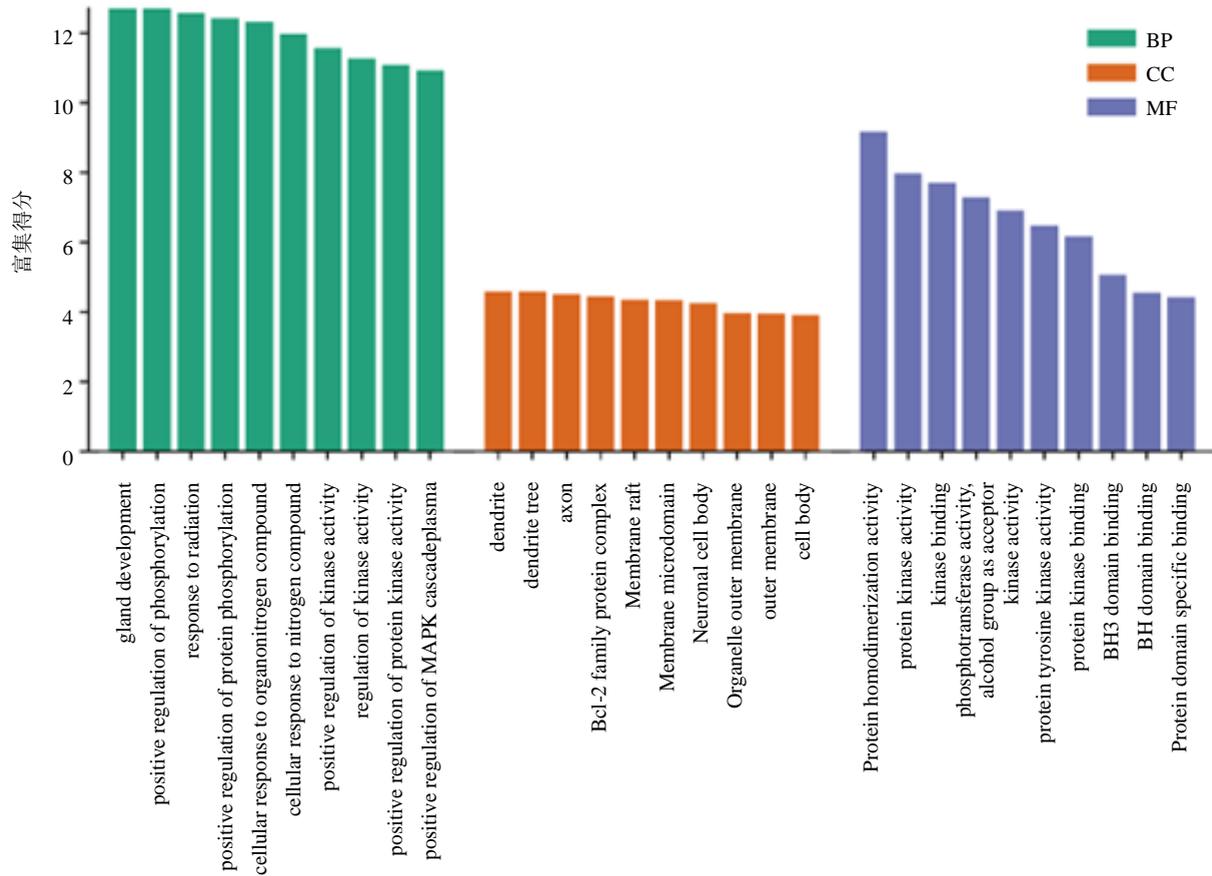


图 4 GO 功能富集分析

Fig. 4 GO function enrichment analysis

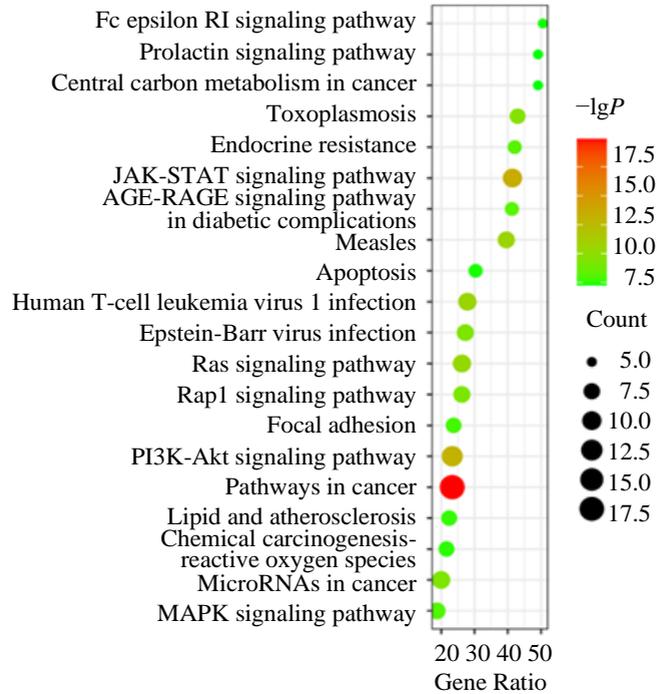


图 5 KEGG 通路富集分析

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis

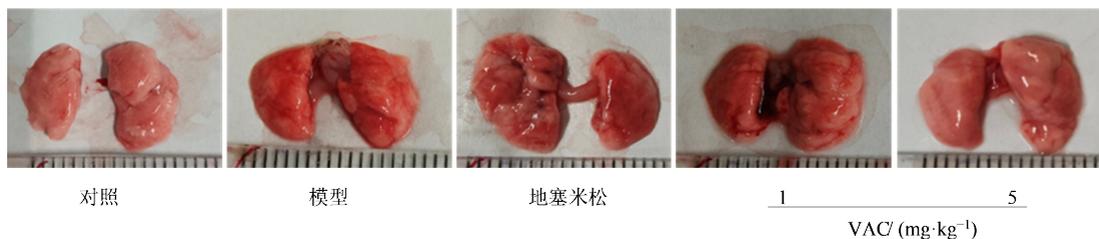
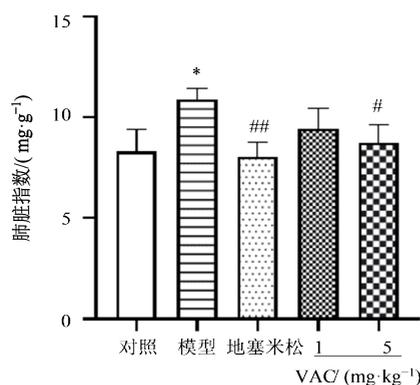


图6 VAC对脓毒症小鼠肺组织大体形态的影响  
Fig. 6 Effect of VAC on lung tissue morphology in sepsis mice



与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较, # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ .  
\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group.

图7 VAC对脓毒症小鼠肺脏指数的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )  
Fig. 7 Effect of VAC on lung indices in sepsis mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

量组及地塞米松组小鼠肺组织红细胞浸润减少,肺泡腔渗出减轻,肺泡壁与模型组相比变薄,VAC低、高剂量组及地塞米松组肺组织炎症浸润减少最为显著,肺泡结构改善明显,片状血灶明显减少及肺组织损伤评分明显降低( $P < 0.05, 0.01$ )。

### 3.6 VAC对脓毒症小鼠肺组织纤维化的影响

肺纤维化是指正常的肺泡组织被损坏后,以巨噬细胞、淋巴细胞和中性粒细胞等炎症细胞在肺泡的堆积为特点,同时伴随着成纤维细胞增殖,细胞外基质大量聚集,后经异常修复使组织结构破坏的间质性肺病<sup>[11]</sup>。实验结果见图11,对照组小鼠肺组织绝大部分区域呈红色或淡红色,仅在支气管、血管周围可见正常的少量丝状胶原纤维,且着色较浅,说明肺组织无明显异常;模型组小鼠肺间质可见大量胶原纤维增生,蓝染区域则明显增加,且着色加深,尤其在支气管、血管管壁及周边肺泡壁,与对照组相比,纤维化面积显著增加( $P < 0.001$ ),说明注射LPS后小鼠肺组织发生急性炎症反应,诱导成纤维细胞释放大量的胶原,使得纤维结缔组织过度沉积,继而发生严重纤维化;而地塞米松组和VAC干预组中的肺间胶原纤维增生明显减少,纤维化主要集中在支气管、血管壁周围可见,与模型组相比,

纤维化面积显著减少( $P < 0.01, 0.05, 0.001$ ),提示VAC可减轻LPS诱导的脓毒症小鼠肺组织纤维化。

### 3.7 VAC对小鼠肺组织炎症因子IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、NLRP3表达的影响

如图12、13所示,对照组小鼠肺组织绝大部分区域呈浅蓝色,仅显示细胞核的颜色,IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、NLRP3仅少量表达于支气管、血管周围,表现为肺组织自身的轻微炎症反应,说明肺组织正常;模型组小鼠肺组织可见大量阳性(棕色)表达区域,且着色加深,炎症因子表达在支气管、血管管壁及肺泡壁上,与对照组相比,炎症程度显著增加( $P < 0.01, 0.001$ ),说明模型组小鼠肺组织发生了严重的炎症反应;地塞米松和VAC干预组中的棕色区域主要集中在支气管、血管壁周围可见,与模型组相比,炎症程度显著减少( $P < 0.05, 0.01$ ),提示VAC可减轻LPS诱导的脓毒症小鼠肺组织炎症反应。

### 3.8 VAC抑制小鼠肺组织细胞凋亡

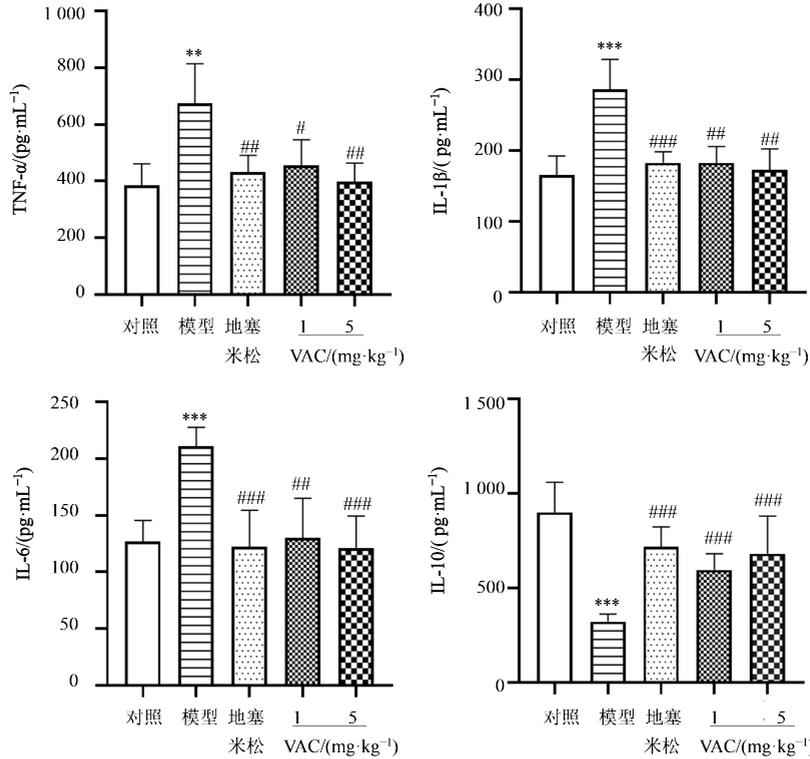
使用TUNEL染色观察小鼠肺组织细胞的凋亡水平,由图14中可以看出模型组中肺组织细胞凋亡率显著高于对照组( $P < 0.001$ )。与模型组相比,地塞米松组和VAC低、高剂量组中细胞凋亡率则显著降低( $P < 0.05, 0.01$ ),这表明VAC可以抑制脓毒症导致的肺组织细胞的凋亡。

### 3.9 VAC促进小鼠肺组织Akt、PI3K蛋白表达

如图15所示,与对照组相比,模型组中的肺组织PI3K和Akt蛋白表达显著减少( $P < 0.05, 0.01$ );与模型组比较,地塞米松组和VAC高剂量组小鼠肺组织中PI3K和Akt蛋白表达显著增加( $P < 0.05$ )。

## 4 讨论

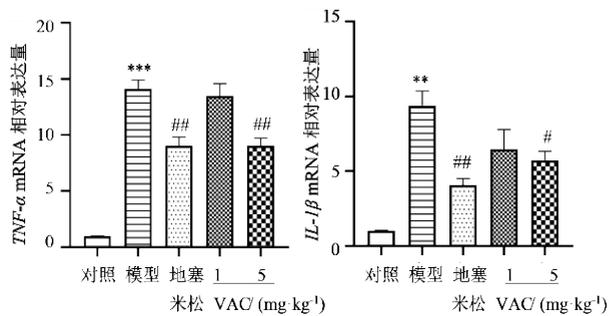
脓毒症ALI是一个多因素、多环节、多种机制共同参与的致病过程,炎症反应是其发病机制的关键环节<sup>[12]</sup>。TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6是机体重要的炎症介质,参与炎症级联反应及其他细胞因子的活化,可诱导细胞凋亡、损伤血管内皮,进而促进肺内微血栓形成,加重ALI<sup>[13]</sup>。本研究采用网络药理学分析技术结合动物实验探究VAC对ALI的保护作用及



与对照组相比, \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组相比, # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ 。  
\*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs model group.

图8 各组小鼠血清中IL-1β、TNF-α、IL-6、IL-10的表达水平( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ )

Fig. 8 Expression level of IL-1β, TNF-α, IL-6, and IL-10 in serum of each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ )



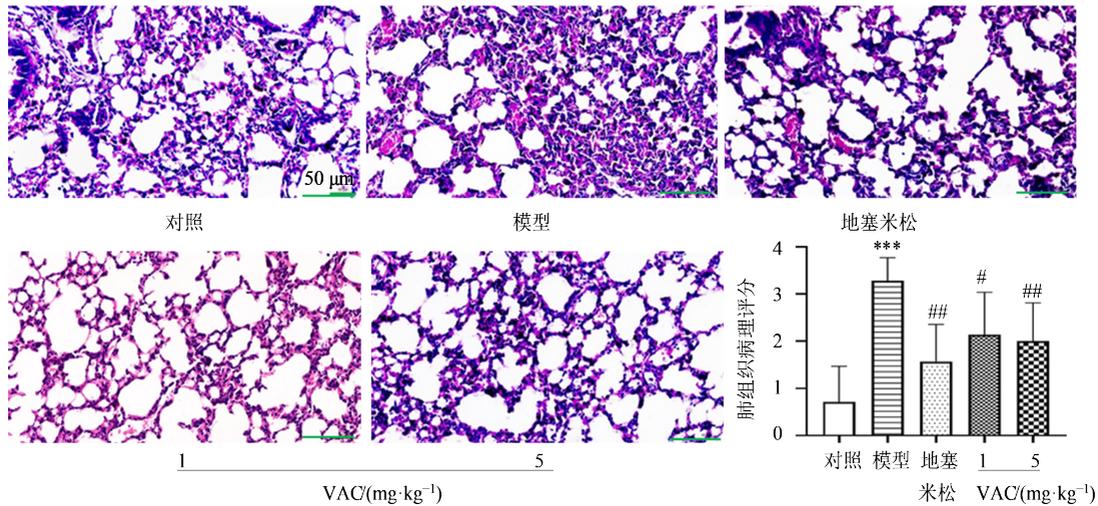
与对照组比较: \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ 。  
\*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group.

图9 VAC对小鼠肺组织中TNF-α、IL-1β mRNA表达水平的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ )

Fig. 9 Effects of VAC on mRNA expression of inflammation related factors IL-1β and TNF-α ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ )

机制。网络药理学挖掘出VAC和肺脓毒症共同靶点有44个,通过PPI网络构建筛选出AKT1、TNF、EGF、HIF-1α、PTGS2等关键靶点。其中,AKT1是AKT3种亚型之一,有研究表明,血管正常生理状态的维持需要一氧化氮(NO)分子的参与,NO主要是由内皮一氧化氮合酶(eNOS)合成,而AKT1是调控eNOS蛋白S1177位点磷酸化最重要的激酶,从而参

与调控血管新生<sup>[14-15]</sup>。TNF是炎症反应过程中的核心因子,近年来大量数据表明,TNF不仅通过诱导炎症基因表达直接驱动炎症反应,而且通过诱导细胞死亡、引发炎症免疫反应和疾病发展间接驱动炎症反应<sup>[16]</sup>。表皮生长因子(EGF)是一条由53个氨基酸组成的单链多肽链,研究发现其在体内外均可刺激表皮细胞增殖和角化<sup>[17]</sup>。缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)是HIF家族的亚基之一,被称为细胞对缺氧的适应性反应的主要调节剂。在缺氧情况下,由于缺氧诱导因子脯氨酰羟化酶被抑制,HIF-1α与HIF-1β形成二聚物,继而与缺氧作用元件结合,调节细胞的基因转录程序以增加细胞氧水平,并且影响代谢、血管生成、增殖、细胞凋亡和炎症等过程<sup>[18]</sup>。环氧合酶2(PTGS2)作为炎症反应的关键调节因子之一,在氧化应激损伤中起着重要的作用<sup>[19]</sup>。前期实验证明,VAC(5 μmol·L<sup>-1</sup>)可通过调节RAW264.7细胞中ROS水平和p38/MAPK信号通路活化程度,改善ox-LDL诱导的胞内脂质沉积现象<sup>[20]</sup>,且VAC(1 mg·kg<sup>-1</sup>)可通过降低ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血清中三酰甘油、血清总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇,升高高密度脂蛋白胆固醇的含量,抑制NF-κB p65蛋白

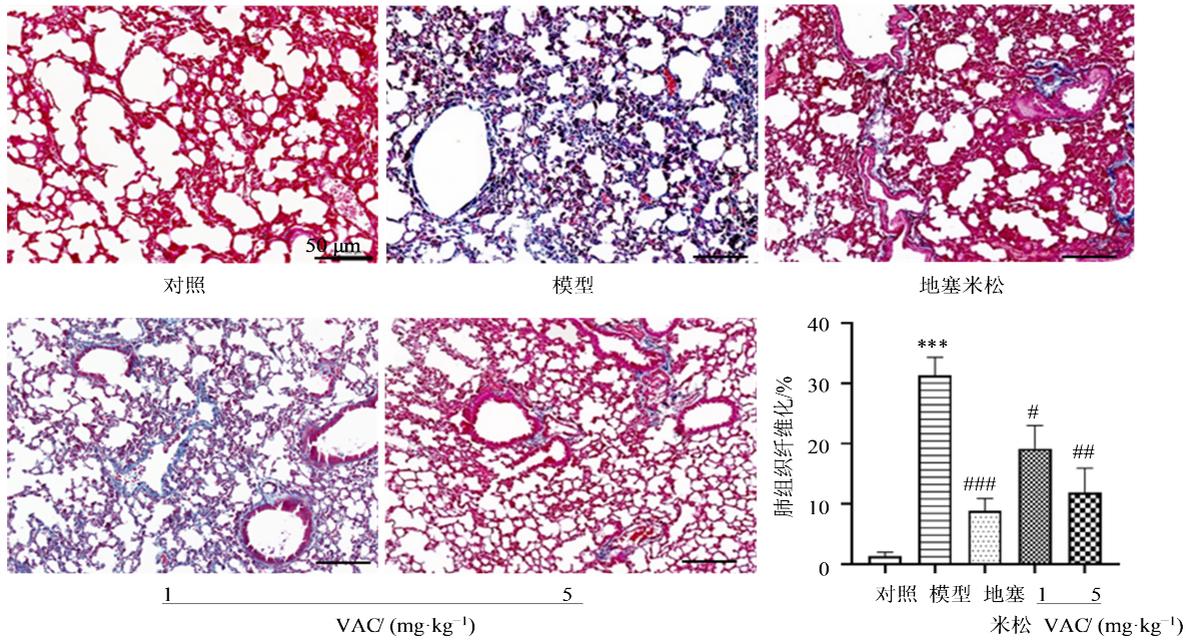


与对照组比较:\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组比较:# $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ 。

\*\*\* $P < 0.001$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group.

图 10 小鼠肺组织病理学变化( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Fig. 10 Lung histopathological changes( $\bar{x} \pm s, n=4$ )



与对照组比较:\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组比较:# $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ 。

\*\*\* $P < 0.001$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs model group.

图 11 各组肺组织纤维化情况( $\bar{x} \pm s, n=4, \times 100$ )

Fig. 11 Fibrosis of lung tissue in each group ( $\bar{x} \pm s, n=4, \times 100$ )

的核转移,以及降低 ApoE<sup>-/-</sup>+HFD 小鼠主动脉血管内皮细胞的 ROS 水平,从而达到降低小鼠动脉粥样硬化斑块的纤维化程度、炎症及凋亡水平<sup>[21]</sup>。网络药理学分析结果以及前期实验结果说明 VAC 在抗炎和血管保护方面具有较好的药理作用。因此,本研究通过构建小鼠脓毒症急性肺损伤模型,探究 VAC 预防和治疗 ALI 的作用机制。地塞米松是一种糖皮质激素,具有抗炎、抗毒、抗过敏等药理作用,可

以从基因水平调控炎症基因的表达,抑制促炎症因子的释放。临床使用较广泛,也常作为阳性对照药物用于肺组织相关炎症研究中<sup>[22-23]</sup>。动物实验结果显示,与模型组相比,VAC 低、高剂量组和地塞米松组小鼠的肺系数降低,肺组织病理形态得到改善,纤维化程度减轻,血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平降低,肺组织炎症蛋白 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、NLRP3 的表达量及凋亡细胞数量降低;对比 VAC 低、高剂量组和地

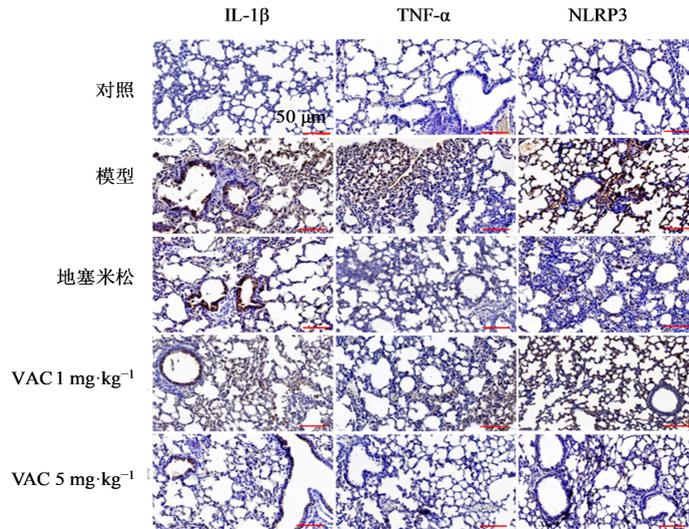
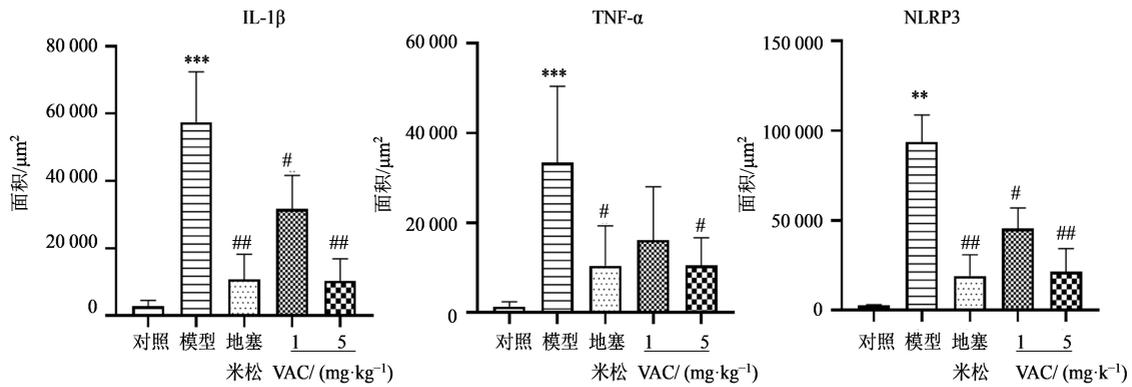
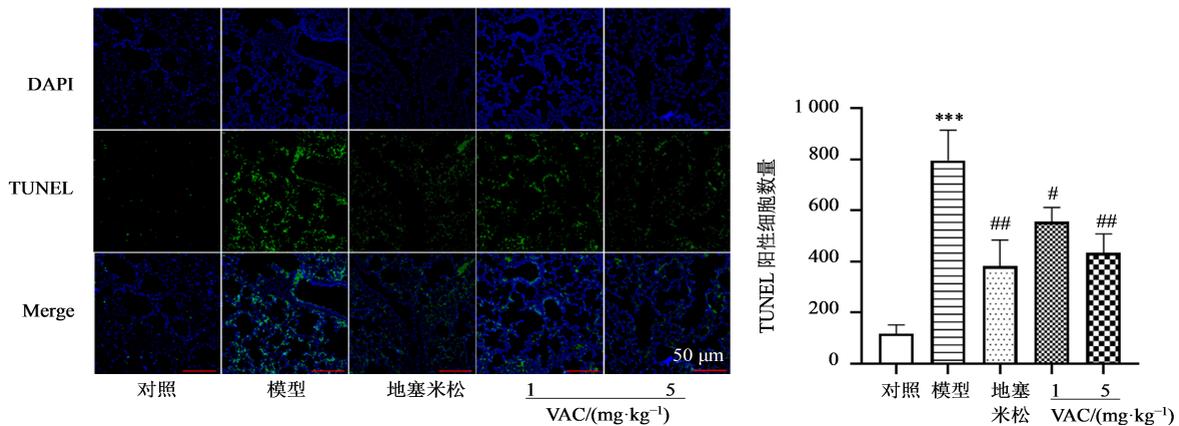


图 12 各组肺组织 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、NLRP3 蛋白表达情况( $\bar{x}\pm s, n=4$ )  
 Fig. 12 Expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , NLRP3 protein in lung tissues of each group( $\bar{x}\pm s, n=4$ )



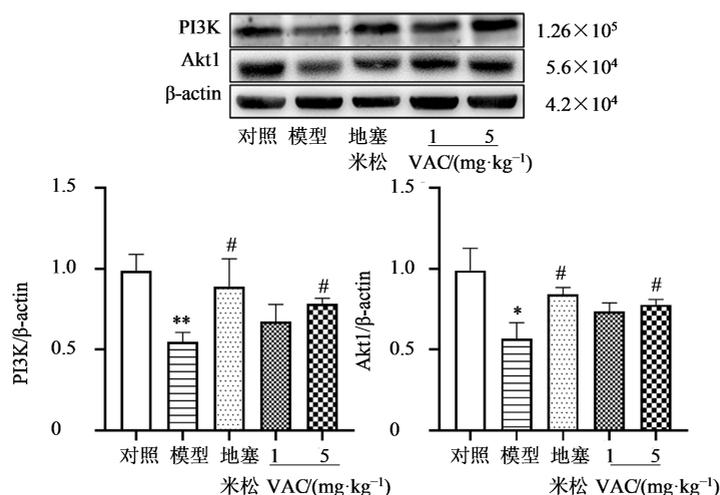
与对照组相比: \*\* $P<0.01$  \*\*\* $P<0.001$ ; 与模型组相比: # $P<0.05$  ## $P<0.01$ 。  
 \*\* $P<0.01$  \*\*\* $P<0.001$  vs control group; # $P<0.05$  ## $P<0.01$  vs model group.

图 13 各组肺组织 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、NLRP3 蛋白表达情况( $\bar{x}\pm s, n=4$ )  
 Fig. 13 Expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , NLRP3 protein in lung tissues of each group( $\bar{x}\pm s, n=4$ )



与对照组比较, \*\*\* $P<0.001$ ; 与模型组比较, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ 。  
 \*\*\* $P<0.001$  vs control group; # $P<0.05$  ## $P<0.01$  vs model group.

图 14 TUNEL 染色检测肺组织细胞凋亡情况( $\bar{x}\pm s, n=4, \times 100$ )  
 Fig. 14 TUNEL staining for detecting apoptosis in lung tissue cells ( $\bar{x}\pm s, n=4, \times 100$ )



与对照组相比: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组相比“# $P < 0.05$ 。

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  vs model group.

图15 各组小鼠肺组织Akt、PI3K蛋白表达情况 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Fig. 15 Protein expression of Akt and PI3K in mouse lung ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

塞米松组小鼠各项指标变化情况可见,  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  VAC可以有效缓解脓毒症引起的肺部炎症,减轻细胞凋亡,进而保护脓毒症肺损伤。

KEGG信号通路富集分析显示, VAC可能通过JAK-STAT、PI3K-AKT、Ras、MAPK等信号通路干预治疗肺脓肿。PI3K-AKT信号通路具有调控细胞增殖、转化、凋亡等功能。有研究表明, PI3K-AKT信号通路与血清炎症因子表达水平具有密切关系,可以介导下游靶点减轻细胞凋亡、炎症反应、氧化应激反应<sup>[24]</sup>。实验结果也表明,模型组肺组织中PI3K、AKT1的表达量明显降低,而VAC组和地塞米松组中PI3K、AKT1的表达量明显升高,说明VAC可能是通过激活PI3K-AKT信号通路来发挥保护肺组织作用的。

综上所述,本研究采用网络药理学方法预测VAC保护脓毒症肺损伤的可能关键作用靶点和信号通路,并通过动物实验进行初步验证,结果表明VAC可能是通过PI3K-AKT信号通路保护脓毒症肺损伤,减轻细胞炎症、细胞凋亡等过程,继而达到保护脓毒症肺损伤的作用。此外,实验中采用地塞米松作为阳性药物,对比发现,  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  VAC具有相似的药理作用,虽然地塞米松具有强效的抗炎作用,但长期服用易产生不良反应,本研究中的VAC是从天然植物王不留行种子中提取分离得到的黄酮类物质,结合其抗炎作用,拓宽VAC的应用前景,可以将其开发应用于具有预防作用的保健饮品或食品中。但本研究仍存在以下局限性:(1)基于网

络药理学筛选出的潜在作用靶点和通路,本研究仅对其中部分靶点和通路进行了实验验证,后期仍需进一步的实验验证其作用机制。(2)本实验研究主要为动物整体验证,后期可结合体外实验以及测序手段等,从基因水平上阐释并验证VAC治疗ALI的作用机制。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Chiu C, Legrand M. Epidemiology of sepsis and septic shock [J]. Curr Opin Anaesthesiol, 2021, 34(2): 71-76.
- [2] Huang M, Cai S L, Su J Q. The pathogenesis of sepsis and potential therapeutic targets [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(21): 5376.
- [3] 周思江, 宁宗. 铁死亡在急性肺损伤中的研究进展 [J]. 中国全科医学, 2023, 26(3): 367-371, 379.  
Zhou S J, Ning Z. Research progress of ferroptosis in acute lung injury [J]. Chin Gen Pract, 2023, 26(3): 367-371, 379.
- [4] 范文京, 任娟宁, 战秀俊, 等. 桔梗汤及其活性成分治疗急性肺损伤的作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(4): 1230-1239.  
Zhan W J, Ren J N, Zhan X J, et al. Research progress on mechanism of Jiegeng Decoction and its active components in treatment of acute lung injury [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(4): 1230-1239.
- [5] Zhu X X, Lei Y Y, Tan F G, et al. Vaccarin protects human microvascular endothelial cells from apoptosis via attenuation of HDAC1 and oxidative stress [J]. Eur J

- Pharmacol, 2018, 818: 371-380.
- [6] Sun H J, Cai W W, Gong L L, et al. FGF-2-mediated FGFR1 signaling in human microvascular endothelial cells is activated by vaccarin to promote angiogenesis [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 95: 144-152.
- [7] Li T Y, Yu X Y, Zhu X R, et al. Vaccarin alleviates endothelial inflammatory injury in diabetes by mediating miR-570-3p/HDAC1 pathway [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 956247.
- [8] Hou B, Qi M T, Sun J N, et al. Preparation, characterization and wound healing effect of vaccarin-chitosan nanoparticles [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 165 (Pt B): 3169-3179.
- [9] 刘春慧, 梁群. 脓毒症急性肺损伤模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 113-120.
- Liu C H, Liang Q. Research progress in acute lung injury models of sepsis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 113-120.
- [10] Xiong C Q, Zhou H C, Wu J, et al. The protective effects and the involved mechanisms of tanshinone IIA on sepsis-induced brain damage in mice [J]. Inflammation, 2019, 42 (1): 354-364.
- [11] Henderson N C, Rieder F, Wynn T A. Fibrosis: From mechanisms to medicines [J]. Nature, 2020, 587(7835): 555-566.
- [12] 段亚楠, 秦妮. 基于 NLRP3/caspase-1 通路探讨芹菜素对脓毒症诱导急性呼吸窘迫综合征小鼠肺损伤的保护作用 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(7): 1745-1749.
- Duan Y N, Qin N. Based on NLRP3/caspase-1 pathway, the protective effect of apigenin on sepsis-induced acute respiratory distress syndrome in mice was discussed [J]. Chin J Gerontol, 2023, 43(7): 1745-1749.
- [13] Liu D, Huang S Y, Sun J H, et al. Sepsis-induced immunosuppression: Mechanisms, diagnosis and current treatment options [J]. Mil Med Res, 2022, 9(1): 56.
- [14] Iida M, Harari P M, Wheeler D L, et al. Targeting AKT/PKB to improve treatment outcomes for solid tumors [J]. Mutat Res, 2020, 819/820: 111690.
- [15] Iwakiri Y, Trebicka J. Portal hypertension in cirrhosis: Pathophysiological mechanisms and therapy [J]. JHEP Rep, 2021, 3(4): 100316.
- [16] van Loo G, Bertrand M J M. Death by TNF: A road to inflammation [J]. Nat Rev Immunol, 2023, 23(5): 289-303.
- [17] Lou Z C, Lou Z H, Jiang Y M, et al. FGF2 and EGF for the regeneration of tympanic membrane: A systematic review [J]. Stem Cells Int, 2021, 2021: 2366291.
- [18] Infantino V, Santarsiero A, Convertini P, et al. Cancer cell metabolism in hypoxia: Role of HIF-1 as key regulator and therapeutic target [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(11): 5703.
- [19] Wang L, Cheng C K, Yi M, et al. Targeting endothelial dysfunction and inflammation [J]. J Mol Cell Cardiol, 2022, 168: 58-67.
- [20] 徐非, 马欣雨, 龚蕾蕾, 等. 王不留行黄酮苷对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞活性氧及泡沫化的影响 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(9): 1253-1259.
- Xu F, Ma X Y, Gong L L, et al. Vaccarin prevents ox-LDL-induced Raw264.7 foaming by blocking ROS/p38 signaling pathways [J]. Chin Pharmacol Bull, 2020, 36 (9): 1253-1259.
- [21] 马欣雨, 徐非, 龚蕾蕾, 等. 王不留行黄酮苷对小鼠动脉粥样硬化的作用及机制 [J]. 中国药理学通报, 2021, 37 (11): 1518-1523.
- Ma X Y, Xu F, Gong L L, et al. Effect of vaccarin on atherosclerosis in mouse model and its mechanism [J]. Chin Pharmacol Bull, 2021, 37(11): 1518-1523.
- [22] 徐玲文, 王华兵, 王倩, 等. 黄芩苷对脓毒症急性肺损伤小鼠 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路及 Treg/Th17 平衡的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(15): 1813-1818, 1823.
- Xu L W, Wang H B, Wang Q, et al. Effects of baicalin on TLR4/NF- $\kappa$ B pathway and Treg/Th17 balance in mice with sepsis-induced acute lung injury [J]. Chin J Immunol, 2022, 38(15): 1813-1818, 1823.
- [23] 王旭红, 王瑞哲, 寇育乐, 等. 地塞米松联合谷氨酰胺减轻急性肺损伤大鼠肺组织炎症和肺水肿的机制 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2023, 39(11): 996-1002.
- Wang X H, Wang R Z, Kou Y L, et al. Mechanism of dexamethasone combined with glutamine in reducing lung inflammation and pulmonary edema in rats with acute lung injury [J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2023, 39 (11): 996-1002.
- [24] Iba T, Levi M, Levy J H. Sepsis-induced coagulopathy and disseminated intravascular coagulation [J]. Semin Thromb Hemost, 2020, 46(1): 89-95.

[责任编辑 齐静雯]