

苗药肺筋草调控NF- κ B/JAK途径改善大鼠急性肺损伤的作用机制研究

张紫玉, 刘畅*, 杨小英, 周英, 权伟, 俸婷婷, 刘雄伟*

贵州中医药大学药学院/药食两用资源应用与开发研究中心, 贵州 贵阳 550025

摘要: 目的 通过网络药理学及实验验证探讨肺筋草对脂多糖(LPS)诱导大鼠急性肺损伤(ALI)的防治作用及机制。方法 查阅肺筋草相关文献结合SwissADME数据库对肺筋草的活性成分进行筛选,通过Swiss Target Prediction平台预测肺筋草活性成分作用的潜在靶点,通过GeneCards数据库、DrugBank数据库、OMIM数据库检索与ALI相关的基因,与化合物的作用靶点进行比对,绘制韦恩图得到交集靶点。STRING数据库中输入交集靶点信息,选择综合得分在0.9以上的靶点,利用Cytoscape 3.9.0软件获得蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,利用Metascape数据库对关键靶点进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,筛选得到有关ALI的通路,通过Cytoscape 3.9.0软件绘制“关键成分-靶点-通路”网络图。将SD大鼠随机分为对照组、模型组、地塞米松(阳性药, 5 mg·kg⁻¹)组和肺筋草水提取物(ASWE)高、中、低剂量(9.00、4.50、2.25 g·kg⁻¹)组,连续7 d对大鼠进行预防性ig给药,7 d后ip脂多糖(LPS, 5 mg·kg⁻¹)诱导ALI模型,对肺组织进行病理学观察分析,试剂盒法检测大鼠血清中的炎症因子以及肺组织中氧化应激指标的表达水平,实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测肺组织丝裂原活化蛋白激酶1(MAPK1)、Janus激酶2(JAK2)、核因子 κ B(NF- κ B)、神经细胞瘤鼠肉瘤癌基因(Nras)、信号传导及转录激活蛋白(STAT)、内质网 α (Ensa) mRNA水平, Western blotting实验检测肺组织NF- κ B、JAK2蛋白表达。结果 筛选出肺筋草的主要活性成分10个,包括阿魏酸甲酯、香豆酸、熊果酸等,得到肺筋草作用于ALI关键靶点189个,MAPK1、MAPK8、STAT3、AKT1、PIK3R1、TP53、ESR1、RELA等为核心靶点,KEGG富集分析结果显示肺筋草可能通过MAPK、NF- κ B、JAK-STAT等信号通路发挥药效作用。与模型组比较,ASWE各剂量组炎症细胞浸润等肺组织病理表现明显改善;中、高剂量组肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平显著降低($P < 0.05$),中剂量组白细胞介素(IL)-1 β 水平显著降低($P < 0.05$),各剂量组IL-6水平均有降低趋势;高、中剂量组超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平明显升高($P < 0.05$);低、中剂量组Nras、STAT3、MAPK1、JAK2、Ensa、NF- κ B mRNA水平显著降低($P < 0.05, 0.01$);中剂量组NF- κ B、JAK2蛋白的表达量显著下降($P < 0.05, 0.01$)。结论 肺筋草可以抑制炎症介质的过度分泌,调节氧化应激平衡而对ALI有防治作用,其作用机制可能与抑制MAPK1、NF- κ B、STAT3等基因表达,从而抑制NF- κ B/JAK等炎症信号通路相关。

关键词: 肺筋草; 脂多糖; 急性肺损伤; 网络药理学; NF- κ B/JAK; 阿魏酸甲酯; 香豆酸; 熊果酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)11-2548-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.11.010

Study on mechanism of Miao medicine *Aletris spicata* regulating NF- κ B/JAK pathway to improve acute lung injury in rats

ZHANG Ziyu, LIU Chang, YANG Xiaoying, ZHOU Ying, QUAN Wei, FENG Tingting, LIU Xiongwei

Research Center for Application and Development of Medicinal and Food Resources, College of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of the preventive and therapeutic effects of *Aletris spicata* on acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharide (LPS) in rats through network pharmacology and experimental verification. **Methods** Review the relevant literature on *A. spicata* and use the SwissADME database to screen the active components of *A. spicata*. Predict the potential targets of the active components of *A. spicata* using the Swiss Target Prediction platform. Use the GeneCards database,

收稿日期: 2024-06-17

基金项目: 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(QZYY-2022-015);贵州省科学技术基金(黔科合基础-ZK[2021]一般515);贵州省教育厅2023年度自然科学研究项目(黔教技[2023]069号);贵州省特色食药材高效综合利用科技创新人才团队建设(黔科合平台人才-CXTD[2023]020)

第一作者: 张紫玉(2001—),女,研究生,研究方向为中药学。E-mail:869599383@qq.com

***共同通信作者:** 刘畅(1988—),女,副教授,研究方向为中药药效物质基础及质量控制研究。E-mail:19liuchang@163.com

刘雄伟(1991—),女,副教授,研究方向为中药药效物质基础及质量控制研究。E-mail:453184149@qq.com

DrugBank database, and OMIM database to search for genes related to ALI, compare them with the targets of the active compounds, and draw a Venn diagram to obtain the intersection targets. Input the intersection target information into the String database, select targets with a comprehensive score of 0.9 or above, and use Cytoscape 3.9.0 software to obtain a protein-protein interaction (PPI) network. Use the Metascape database to perform Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis on key targets, and select pathways related to ALI. Draw a "key component-target-pathway" network diagram using Cytoscape 3.9.0 software. Randomly divide SD rats into a control group, a model group, a dexamethasone (positive drug, 5 mg·kg⁻¹) group, and *A. spicata* water extract (ASWE) high, medium, and low dose (9.00, 4.50, 2.25 g·kg⁻¹) groups. Continuously administer the rats with the drugs by ig for 7 days, ip LPS (5 mg·kg⁻¹) to induce the ALI model 7 days later, and observe and analyze the pathological changes in the lung tissue. Detect the expression levels of inflammatory factors in the serum and oxidative stress indicators in the lung tissue using kit assays, and detect the mRNA levels of β -activated protein kinase 2 (*TAK2*), Janus kinase 2 (*JAK2*), nuclear factor kappa B (*NF- κ B*), *Nras*, signal transducer and activator of transcription (*STAT*), and *Ensa* in the lung tissue using real-time quantitative PCR (qRT-PCR), and detect the expression levels of NF- κ B and JAK2 proteins in the lung tissue using Western blotting experiments. **Results** Ten main active compounds of *A. spicata* were screened out, including methyl salicylate, coumarin, ursolic acid, etc. A total of 189 key targets were identified for *A. spicata* acting on ALI, with MAPK1, MAPK8, STAT3, AKT1, PIK3R1, TP53, ESR1, and RELA as core targets. The KEGG enrichment analysis showed that *A. spicata* may exert its therapeutic effects through MAPK, NF- κ B, and JAK-STAT signaling pathways. Compared with the model group, the pulmonary tissue pathological manifestations of inflammatory cell infiltration in the ASWE treatment groups were significantly improved. The TNF- α level was significantly lower in the middle and high-dose groups ($P < 0.05$), and the IL-1 β level was significantly lower in the middle-dose group ($P < 0.05$). The IL-6 level showed a downward trend in all dosage groups; the SOD and GSH-Px levels were significantly higher in the high and middle-dose groups ($P < 0.05$); The *Nras*, *STAT3*, *MAPK1*, *JAK2*, *Ensa*, and *NF- κ B* mRNA levels were significantly lower in the high and middle-dose groups ($P < 0.05$, 0.01). The expression levels of NF- κ B and JAK2 proteins were significantly lower in the middle-dose group ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusions** *A. spicata* can inhibit the excessive secretion of inflammatory mediators, regulate the balance of oxidative stress and have a preventive and therapeutic effect on ALI. The mechanism may be related to inhibiting the expression of *MAPK1*, *NF- κ B*, *STAT3* and other genes, thereby inhibiting the expression of NF- κ B/JAK and other inflammatory signaling pathways.

Key words: *Aletris spicata* (Thunb.) Franch.; lipopolysaccharide; acute lung injury; network pharmacology; NF- κ B/JAK; methyl salicylate; coumarin; ursolic acid

急性肺损伤(ALI)是一种急性呼吸系统疾病,是临床上高发病且高死亡率的危重综合征^[1]。ALI以弥漫性急性肺部炎症为主要病理特征,伴有先天性和适应性免疫细胞的浸润、促炎和抗炎细胞因子平衡的转换^[2-3],主要表现为顽固性低氧血症和呼吸窘迫,严重的肺水肿,肺部炎症细胞聚集和炎症细胞大量产生,从而产生剧烈炎症反应^[4]。目前临床上常采用血管扩张剂药物、糖皮质激素药物、机械通气等治疗ALI,但存在不同程度的不良反应且费用较高^[5-6],因此,需要寻找更安全、经济的药物。中医学方面虽然没有关于“急性肺损伤”病名的记载,但对其症状如呼吸窘迫、咳嗽咳痰、烦躁的描述却早有记载。近年来随着传统中医药的迅速发展,中医药治疗ALI的基础和临床研究不断深入,在改善症状的同时,也降低了病死率^[7],充分体现出中药独特的优势。

肺筋草 *Aletris spicata* (Thunb.) Franch. 来源于百合科 Liliaceae 粉条儿菜属 *Aletris* L. 植物粉条儿菜

的全草^[8],又称作粉条儿菜、肺心草、小肺筋草、金线吊白米等,归肺、肝经,具有润肺、止咳、清热、安神、消痞积、驱蛔虫之功效。以根或全草入药,在贵州、湖北、四川、江西等地都有分布^[9]。肺筋草中含有糖、生物碱、萜类、木脂素类、挥发油、黄酮及甾体类成分^[10],其总黄酮具有抗炎、抗氧化等药理活性^[11]。肺筋草自古就有“草中黄金”的美誉,尤以润肺止咳见长,临床用以治疗肺系疾病等^[12]。肺筋草的药效及用药范畴与ALI的临床表现相符,其对ALI的防治作用机制研究具有重要意义。

本研究基于网络药理学,预测肺筋草活性成分和ALI之间的关键靶点及肺筋草防治ALI关键通路。建立体内ALI大鼠模型,对肺组织进行病理学观察分析,检测大鼠血清中的炎症因子以及肺组织中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)表达水平,利用实时荧光定量qRT-PCR、Western blotting实验确定肺筋草防治ALI发挥作用的靶点,探讨肺筋草对ALI的作用和

机制,以期为肺筋草的临床应用提供参考。

1 材料

1.1 动物

SPF级70只SD大鼠,雌雄各半,体质量为180~220 g,购自西南医科大学,实验动物生产许可证号SCXK(川)2018-17,生存饲养条件为(22±2)℃,相对湿度40%~70%,喂标准颗粒饲料,自由饮水和摄食。动物实验符合贵州中医药大学实验动物伦理委员会审查批准要求(伦理审批号20210078)。

1.2 药材

肺筋草购于贵州省贵阳市云岩区万东桥,经贵州中医药大学药学院孙庆文教授鉴定为百合科粉条儿菜属植物粉条儿菜 *Aletris spicata* (Thunb.) Franch. 的全草。

1.3 药品与试剂

地塞米松(批号530D055)、脂多糖(LPS,批号813Q0312)购自上海索莱宝生物科技有限公司;乌拉坦(批号N11IS232062)购自上海源叶生物科技有限公司;白细胞介素(IL)-1β、IL-6、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、MDA、GSH-Px、SOD ELISA试剂盒均购自上海茁彩生物科技有限公司;总RNA提取试剂盒、cDNA反转录试剂盒、荧光定量试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司;核因子κB(NF-κB)抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司;GAPDH抗体购自圣克鲁斯生物技术公司;Janus激酶2(JAK2)抗体购自南京巴傲得生物科技有限公司。

1.4 仪器与相关数据库

高速冷冻离心机购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;CFX96 Touch 型 qRT-PCR 仪、Sub-Cell GT 电泳槽、摇床、摇匀仪、BIO-RAD 电泳槽电泳仪、ChemDoc 型凝胶成像仪、N60 系列超微量分光光度计、Multiskan Mk3 型酶标仪均购自美国 Bio-rad 公司。PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); Swiss ADME 数据库(<http://www.swissadme.ch/>); Swiss Target Prediction 平台(<http://www.swisstargetprediction.ch/>); GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>); DrugBank 数据库(<https://go.drugbank.com/>); OMIM 数据库(<https://omim.org/>); Uniprot 数据库(<http://beta.uniprot.org/>); STRING 数据库(<https://www.string-db.org/>); Metascape 数据库(<https://metascape.org/>)。

2 方法

2.1 肺筋草防治大鼠 ALI 的网络药理学研究

2.1.1 肺筋草潜在活性成分的获得和筛选 查阅

肺筋草相关文献^[12-16],搜集肺筋草化学成分。通过 Pubchem 数据库下载肺筋草活性成分 SDF 格式文件,将文件导入 SwissADME 数据库,以胃肠道吸收度(GI absorption)为“High”和5项中有2项及以上为“yes”对肺筋草的活性成分进行筛选。

2.1.2 肺筋草潜在活性成分作用靶点的预测和 ALI 靶点的筛选 将筛选得到的肺筋草潜在活性成分以 Canonical SMILES 格式文件导入 Swiss Target Prediction 平台,将其属性设为“homo sapiens”,对活性成分作用的潜在靶点进行预测。通过 GeneCards 数据库、DrugBank 数据库、OMIM 数据库,以“acute lung injury”为关键词检索与 ALI 相关的基因,将其与 Uniprot 数据库进行比对,获得格式完全一致的 Gene symbol,剔除重复靶点基因,与化合物的作用靶点进行比对,绘制韦恩图,两者的交集靶点即为肺筋草作用于 ALI 的靶点。

2.1.3 “活性成分-靶点”网络的构建 采用 Cytoscape 3.9.0 软件,构建肺筋草“活性成分-靶点”网络。成分对应靶点的个数用度值来表示,度值越大,成分与靶点之间连线越密集,说明该成分作用的靶点越多,通过大小、明暗、密集程度筛选肺筋草干预 ALI 的关键成分。

2.1.4 核心靶点之间相互作用网络的构建和通路富集分析 STRING 数据库中输入交集靶点信息,选择综合得分在 0.9 以上的靶点,利用 Cytoscape 3.9.0 软件绘制肺筋草防治 ALI 的关键靶点互作网络图,并通过计算度值获得蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,利用 Metascape 数据库对关键靶点进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,筛选得到有关 ALI 的通路,通过 Cytoscape 3.9.0 软件绘制“关键成分-靶点-通路”网络图。

2.2 肺筋草预防大鼠 ALI 的作用机制研究

2.2.1 肺筋草水提物(ASWE)的制备 根据《全国中草药汇编》中记载的成人每日用粉条儿菜为 0.3~1.0 两以及人与大鼠体表面积的计算规律得出 ASWE 高、中、低给药剂量。肺筋草剪碎过三号筛后称取 350 g,分 2 次提取:第 1 次用 18 倍量超纯水回流提取 1.5 h,滤过,滤渣加入 16 倍量超纯水提取 1 h,滤过。合并 2 次滤液,分别用旋转蒸发仪减压浓缩至生药质量浓度 0.225、0.450、0.900 g·mL⁻¹ 作为实验用药。通过紫外-可见分光光度法,在 510 nm 波长处测定吸光度(A)值,计算得 3 批肺筋草中总黄酮质量分数分别为 119.93、127.44、131.01 mg·g⁻¹,故肺筋草不同批次间主要成分总黄酮含量相近,质量稳

定,可用于后续研究。

2.2.2 动物分组、给药及模型建立 将70只SD大鼠随机分为6组,分别为对照组10只、模型组12只、地塞米松(阳性药, $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组12只和ASWE高、中、低剂量(9.00 、 4.50 、 $2.25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组各12只。连续7 d对大鼠进行预防性ig给药,参照刘畅等^[17]、夏金婵等^[18]、刘雄伟等^[19]的研究方法,ip LPS($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)构建ALI模型。

2.2.3 标本采集 大鼠出现呼吸急促、心率加快、抱团取暖、毛色暗淡、进食量减少等症状,说明造模成功。造模成功6 h后,根据大鼠的体质量,取20%乌拉坦($5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)进行ip麻醉。取腹主动脉血后,处死大鼠并取出肺组织,肺组织经0.9%的氯化钠溶液漂洗后,一部分保存于10%多聚甲醛中,用于后续制作病理切片;而另一部分分成小块放置于密封袋后,保存于液氮中。腹主动脉血静置2 h后, $3\ 500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,用移液枪将上层血清转移。取材完成后将上述所有样品分类置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保藏。

2.2.4 肺组织病理组织学变化及血清、肺组织指标检测 使用10%多聚甲醛固定肺组织,石蜡包埋,切片,HE染色,在光学显微镜下观察肺组织病理形态的变化。将获得的各组大鼠血清,按照试剂盒说明书要求严格检测各组血清中炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量。取大鼠肺组织约0.5 g,用灭菌后的剪刀将其剪成小碎片,随后制成组织匀浆液体,取出上清液,严格按照试剂盒说明书步骤检测肺组织中MDA、SOD和GSH-Px的含量。

2.2.5 qRT-PCR检测 根据天根试剂盒说明书提取大鼠肺组织总RNA,进一步逆转录为cDNA。通过primer3在线软件平台([https://bioinfo. ut. ee/primer3-0.4.0/](https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/))设计JAK2、NF- κ B、神经细胞瘤鼠肉瘤癌基因(*Nras*)、信号传导及转录激活蛋白(*STAT*)、内磺肽 α (*Ensa*)、丝裂原活化蛋白激酶1(*MAPK1*)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*GAPDH*)引物,见表1。通过PrimerSelect软件验证其可行性,将筛选完毕的引物合成备用;在荧光定量PCR仪上进行扩增反应,重复3次,利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对含量。

2.2.6 Western blotting检测 分别取各组的肺部组织于研钵中,加入液氮碾碎,将组织碎末转入离心管中。依次加入PIPA 200 μL 、PMSF 2 μL 、蛋白酶抑制剂2 μL ,静置裂解30 min(可超声10~20 s),再于冷冻离心机中 $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min。随后取上清120 μL ,使用酶标仪测定蛋白浓度后,加入蛋

表1 引物序列

Table 1 Primers sequence

基因	引物序列(5'→3')	引物长度/bp
<i>NF-κB</i>	F:CAGAAGCTCATGCCCAACTT	20
	R:ACTTCCGGTACTCCCTCCAC	20
<i>Nras</i>	F:TTCCCCTAGAAACAAACACACC	22
	R:CAAAGGGGGAAATCACCAG	19
<i>JAK2</i>	F:TTTCTGATGTTTCAGCTCTCACCAA	24
	R:CGTGCAGCTGACCATAATCTCC	22
<i>STAT3</i>	F:GGAAAAATGAGGCTGACAATC	21
	R:AATCCAGGTGGGCTTCTTCT	20
<i>Ensa</i>	F:CAGAGAAAGTCCTCGCTCGT	20
	R:GCCAATCCCTGCCTACAAT	20
<i>MAPK1</i>	F:CACCCGTACCTGGAGCAGTATT	22
	R:GCTGGAATCGAGCAGTCTCTTC	22
<i>GAPDH</i>	F:GGGCTCTCTGCTCCTCCCTGT	21
	R:ACGGCCAAATCCGTTCCACC	19

白酶缓冲液30 μL ,于 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中水浴10 min得到蛋白提取液。取蛋白提取液6 μL ,按照组别依次将蛋白提取液加入胶孔,电泳后转移到PVDF膜上。转膜结束后,加入5%脱脂奶粉室温封闭1 h,使用TBST溶液洗去膜上多余牛奶,加入相应一抗, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。第2天取出PVDF膜,TBST洗膜3次后加入二抗液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床1 h,TBST溶液洗膜3次后用ECL发光液显影。使用Image J软件分析各条带灰度值。

2.2.7 统计学分析 采用SPSS 22.0软件进行数据分析,数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 肺筋草主要活性成分的获得

通过文献获取“肺筋草”相关化学成分28种,以胃肠道吸收度为High和5项中有2项及以上为yes作为筛选条件,共筛选出肺筋草的主要活性成分10个,见表2。

3.2 肺筋草潜在活性成分作用靶点的预测及疾病靶点的获得

将阿魏酸甲酯、香豆酸等10个肺筋草潜在活性成分输入SwissTarget Prediction数据库中,得到有效靶点。选择“acute lung injury”等作为检索条件输入,在GeneCards数据库平台搜寻与其相关的基因,利用在线工具Venny 2.1.0绘制疾病靶点与肺筋草活性成分靶点韦恩图,得到二者的交集

靶点 189 个,即肺筋草作用于 ALI 的潜在靶点,见图 1。

3.3 “活性成分-靶点”网络的构建与分析

将肺筋草 10 个潜在活性成分和肺筋草作用于

表 2 肺筋草的活性成分

Table 2 Active ingredients of *A. spicata*

编号	化合物
FJC1	阿魏酸甲酯
FJC2	4-羟基苯甲酸
FJC3	香豆酸
FJC4	熊果酸
FJC5	13-表柏油酸
FJC6	二十二烷酸 1-甘油酯
FJC7	美商陆酚 A
FJC8	异美商陆酚 A
FJC9	1-(4'-羟基苯基)-7-(3"-甲氧基-4"-羟基苯基)-4-烯-3-庚酮
FJC10	5-羟甲基-2-呋喃甲醛

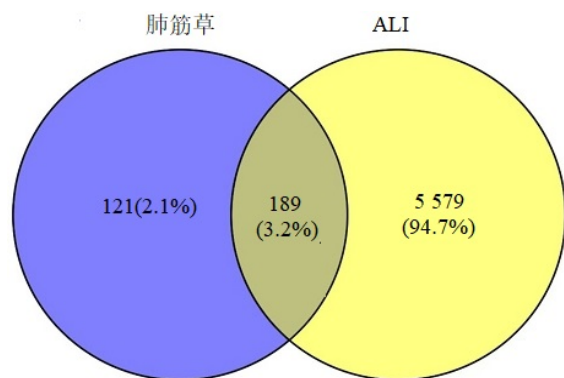
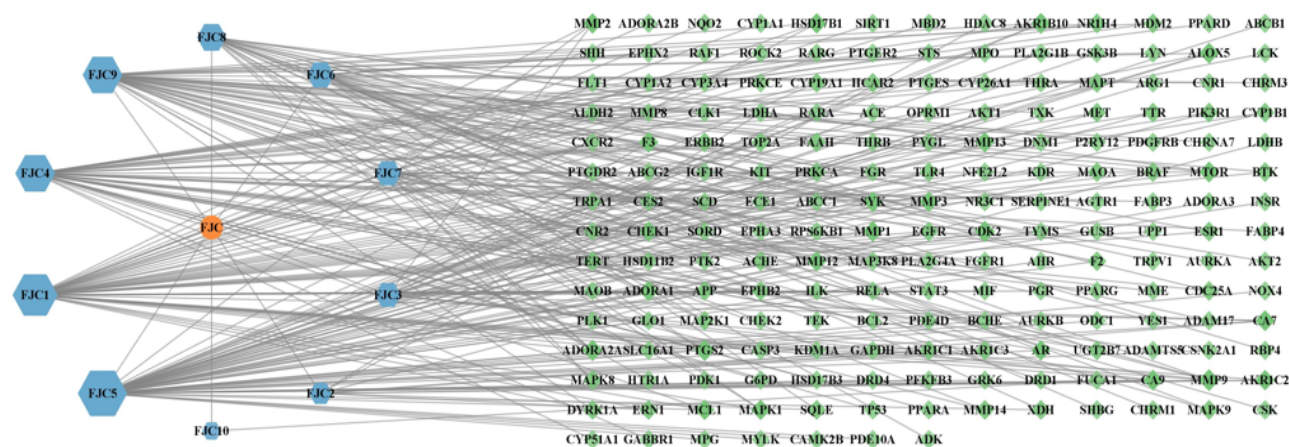


图 1 “肺筋草-ALI”交集基因 Venn 图

Fig. 1 Venn map of intersection gene of “*A. spicata*-ALI”



圆形节点-药物;六边形节点-活性成分;菱形节点-靶点。

Circular node-drug; hexagonal node-active ingredient; diamond node-target.

图 2 活性成分-靶点网络

Fig. 2 Active ingredient-target network

ALI 的 189 个候选靶点输入 Cytoscape 3.9.0 软件中,绘制得到活性成分-靶点网络,见图 2。图中六边形代表肺筋草 10 个潜在活性成分,菱形代表 189 个候选靶点,通过设置参数使六边形与菱形大小和亮度反映活性成分、靶点本身的重要程度以及活性成分与靶点间关系的密切程度,从而反映出中药多成分、多靶点间相互作用的特点。

3.4 PPI 网络的构建与分析

使用 STRING 数据库,对肺筋草与 ALI 相互作用的 189 个潜在靶点进行蛋白间相互作用分析,将最高置信度大于 0.900 的靶点导入到 Cytoscape 3.9.0 软件,绘制 PPI 网络,见图 3。网络中包含 189 个节点,2 047 条边,平均节点度 21.7,平均局部聚类系数 0.496,期望边数 778,借助软件分析可知 MAPK1、MAPK8、STAT3、AKT1、PIK3R1、TP53、ESR1、RELA 等度值排名靠前,为核心靶点,是连接大量其他节点蛋白的重要节点。节点分别代表潜在作用靶点,节点大小与明暗程度代表靶点的度值,节点越大、颜色越深,表明靶点在网络体系中的度值越大;节点间连线越多代表靶点与其他靶点潜在的相互作用关系越多。

3.5 KEGG 通路富集与重要信号通路基因筛选

在 Matescape 数据库中输入 189 个潜在靶点,进行 KEGG 通路富集,结果表明 189 个靶点主要通过 194 条 KEGG 通路发挥作用 ($P < 0.05$),包括 TNF 信号通路、IL-17 信号通路、PPAR 信号通路、TRP 通道的炎症介质调节、MAPK 信号通路、冠状病毒病-新冠肺炎、JAK-STAT 信号通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性、NF- κ B 信号通路、Rap1 信号通路等(图

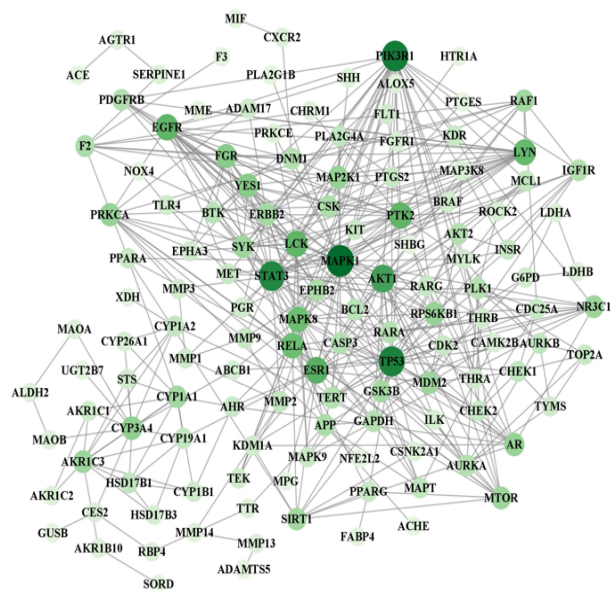


图3 PPI网络
Fig. 3 PPI network

4)。其中,阿魏酸甲酯(FJC1)、香豆酸(FJC3)、熊果酸(FJC4)、13-表柏油酸(FJC5)、二十二烷酸 1-甘油酯(FJC6)、美商陆酚 A(FJC7)、异美商陆酚 A(FJC8)、1-(4'-羟基苯基)-7-(3"-甲氧基-4"-羟基苯基)-4-烯-3-庚酮(FJC9)共 8 个肺筋草关键活性成分作用于 JAK-STAT 信号通路 13 个靶点,包括 MAPK1、MMP9、STAT3、MTOR 等。进一步构建“信号通路-靶点-活性成分”网络(图5)。

3.6 肺组织的病理组织学观察

对照组的大鼠肺部组织没有明显的炎症,其形态结构表现正常,支气管纤毛上皮排列整齐,肺泡轮廓光滑且无水肿,未见炎症细胞浸润。模型组大鼠的病理学变化比较明显,其肺组织受到严重的损

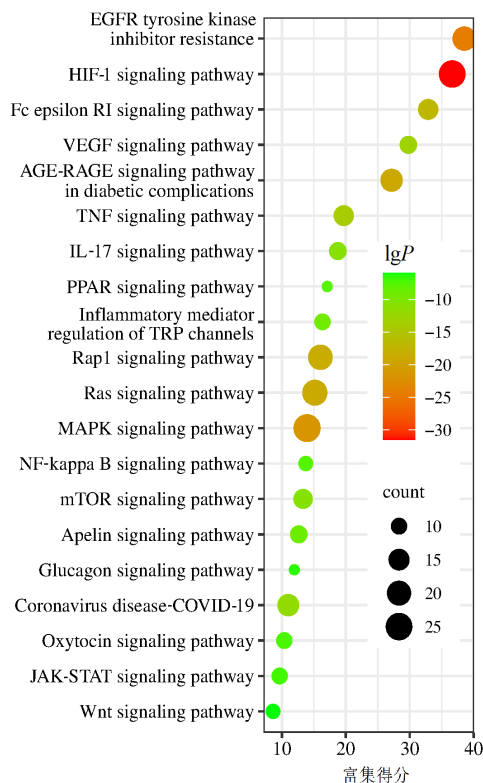


图4 KEGG通路富集分析
Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis

伤,支气管纤毛上皮的排列比较混乱,肺泡轮廓不光滑,且伴有水肿,同时被大量的炎症细胞浸润。地塞米松组炎症细胞浸润等病理现象都有非常明显的改善,ASWE 各剂量组的各项炎症反应也有所减轻(图6)。

3.7 血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达水平

由表 3 可知,与对照组相比,模型组大鼠血清中 IL-6 和 TNF- α 水平明显升高,差异显著($P < 0.05$ 、

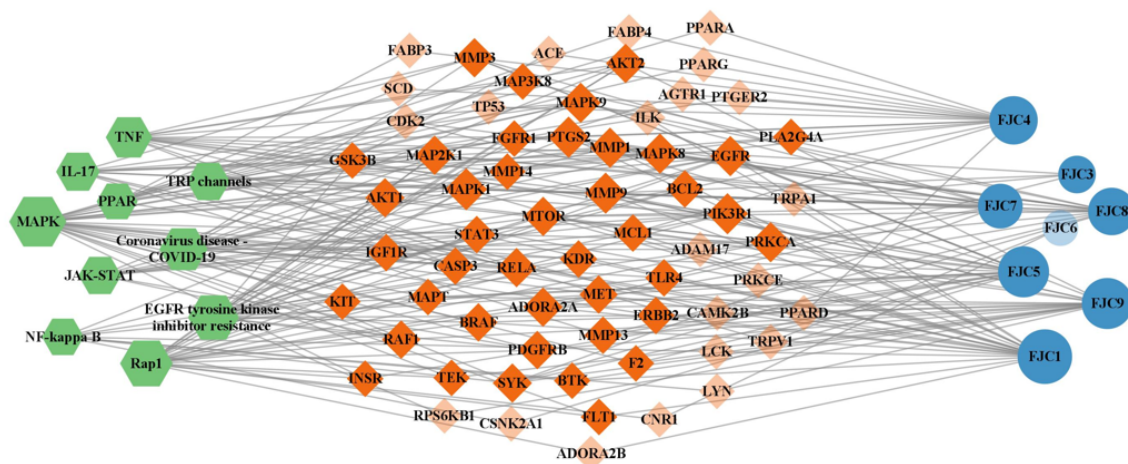


图5 “信号通路-靶点-活性成分”网络
hexagonal nodes-signal pathways; diamond nodes-targets; circular nodes are active ingredients.

图5 “Signal pathway-target-active ingredient” network

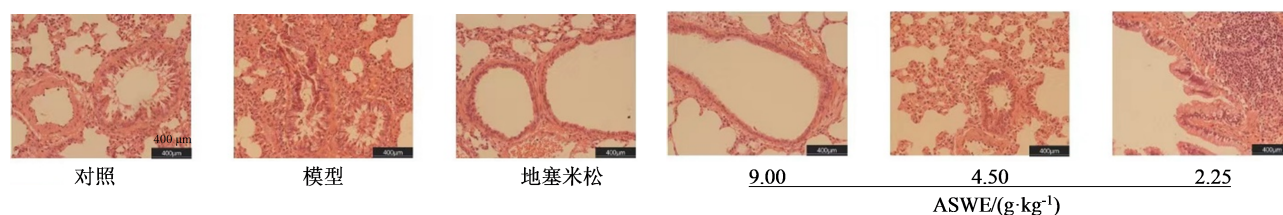


图 6 大鼠肺组织病理学观察(HE, ×400)
Fig. 6 Lung histopathology of rats (HE, ×400)

表 3 大鼠血清中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 3 Expression levels of IL-6, IL-1 β and TNF- α in serum of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-6/(ng·mL ⁻¹)	IL-1 β /(ng·mL ⁻¹)	TNF- α /(ng·mL ⁻¹)
对照	—	72.44 $\pm$ 18.38	683.50 $\pm$ 152.06	68.07 $\pm$ 16.54
模型	—	104.19 $\pm$ 48.38 [#]	812.60 $\pm$ 158.22	108.87 $\pm$ 38.73 ^{##}
地塞米松	0.005	79.08 $\pm$ 14.36 [*]	681.00 $\pm$ 178.57	84.33 $\pm$ 25.07 [*]
ASWE	9.00	93.79 $\pm$ 25.05	707.20 $\pm$ 154.68	91.86 $\pm$ 24.05 [*]
	4.50	88.26 $\pm$ 14.04	651.78 $\pm$ 134.60 [*]	84.77 $\pm$ 19.23 [*]
	2.25	86.31 $\pm$ 19.15	718.73 $\pm$ 172.19	82.00 $\pm$ 20.39

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ 。

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group.

0.01), IL-1 β 的表达水平虽然有所升高, 但差异不显著。与模型组相比, 地塞米松和 ASWE 中、高剂量组 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.05$); ASWE 中剂量组 IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.05$); 各剂量组 IL-6 水平均有降低趋势。结果表明, 肺筋草对大鼠 ALI 的炎症反应具有一定的抑制作用。

3.8 肺组织中 SOD、MDA 和 GSH-Px 表达水平

根据表 4 的数据显示, 模型组与对照组相比, 仅 MDA 的表达水平明显升高, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。与模型组比较, ASWE 高、中剂量组 SOD、GSH-Px 水平明显升高, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。结果表明肺筋草具有一定的抗氧化作用。

3.9 MAPK、NF- κ B、JAK-STAT 通路中相关基因 mRNA 的表达

如图 7 所示, 与对照组相比, 模型组 *Nras*、

STAT3、*MAPK1*、*JAK2* mRNA 的表达量均显著升高 ($P < 0.01$), *Ensa*、*NF- κ B* mRNA 的表达量升高; 与模型组相比, ASWE 低、中剂量组 *Nras*、*STAT3*、*MAPK1*、*JAK2*、*Ensa*、*NF- κ B* mRNA 表达量显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 且 ASWE 中剂量组 mRNA 表达量最接近对照组。结果表明, 肺筋草可以通过抑制 *MAPK*、*NF- κ B*、*JAK-STAT* 等炎症信号通路中的基因表达从而对 ALI 起到治疗作用。

3.10 NF- κ B、JAK2 蛋白表达

如图 8 所示, 与对照组相比, 模型组 NF- κ B、JAK2 蛋白的表达量显著上升 ($P < 0.05$); 与模型组相比, ASWE 中剂量组 NF- κ B、JAK2 蛋白的表达量显著下降 ($P < 0.05, 0.01$)。

4 讨论

ALI 是一种临床常见的复杂呼吸道疾病, 细菌、

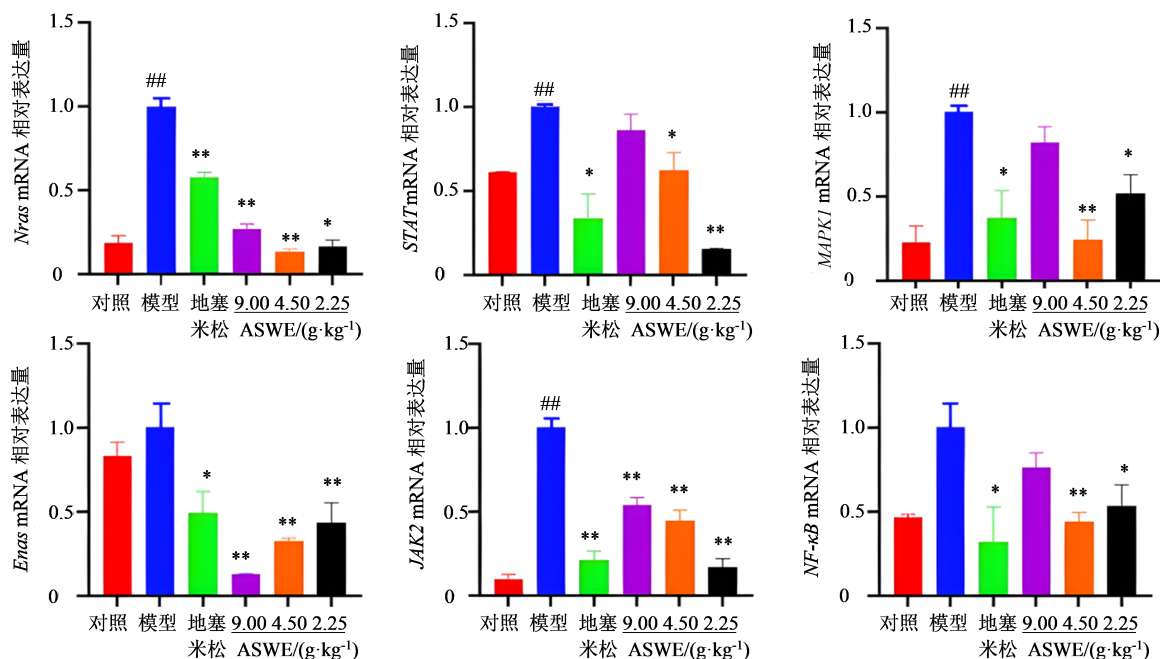
表 4 大鼠肺组织中 SOD、MDA、GSH-Px 的表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 4 Expression levels of SOD, MDA and GSH-Px in lung tissue of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	SOD/(ng·mL ⁻¹)	MDA/(ng·mL ⁻¹)	GSH-Px/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	4.29 $\pm$ 0.43	10.09 $\pm$ 1.05	80.79 $\pm$ 6.56
模型	—	4.27 $\pm$ 0.32	11.75 $\pm$ 1.87 [#]	84.38 $\pm$ 8.06
地塞米松	0.005	4.41 $\pm$ 0.68	10.84 $\pm$ 1.12	86.90 $\pm$ 8.33
ASWE	9.00	5.24 $\pm$ 0.66 [*]	11.22 $\pm$ 0.60	94.82 $\pm$ 9.04 [*]
	4.50	4.90 $\pm$ 0.44 [*]	11.13 $\pm$ 0.91	97.73 $\pm$ 6.07 [*]
	2.25	4.42 $\pm$ 0.51	11.53 $\pm$ 1.15	86.22 $\pm$ 9.86

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ 。

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group.

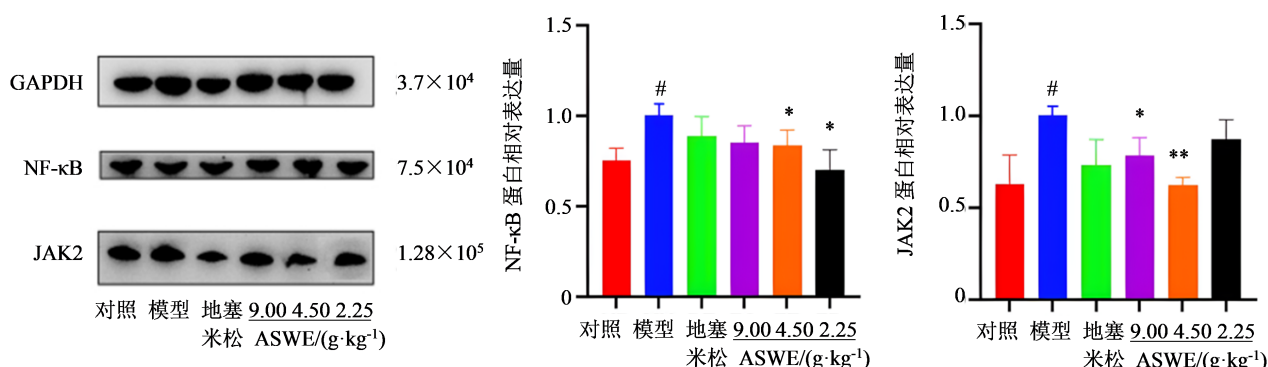


与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

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

图7 各组大鼠肺组织 *MAPK1*、*NF-κB*、*STAT3*、*JAK2*、*Nras*、*Ensa* mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 7 mRNA expression of *MAPK1*, *NF-κB*, *STAT3*, *JAK2*, *Nras* and *Ensa* in lung tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



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8 各组大鼠肺组织 *NF-κB*、*JAK2* 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 8 *NF-κB* and *JAK2* protein expression in lung tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

病毒感染、化学刺激等都会导致ALI, ip LPS可用于诱导大鼠ALI模型, 由于该方法操作简便且成功率较高, 本实验采用该方法来诱导大鼠ALI的发生。LPS进入机体后, 能与细胞表面的受体结合, 促使肺部炎症细胞特别是中性粒细胞、单核细胞以及巨噬细胞募集和活化, 释放出大量的炎症因子, 同时中性粒细胞在肺泡腔和肺间质中聚集并释放大量的自由基, 从而使得肺组织中具有自由基清除剂之称的GSH-Px和能够清除自由基及其衍生物的SOD含量降低以及具有细胞毒性的MDA含量升高。所以

本实验对大鼠ALI模型的血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 以及肺组织中GSH-Px、SOD、MDA的含量进行检测。

建立大鼠ALI模型, 与对照组相比, 模型组大鼠血清IL-6和TNF- α 水平显著升高, 肺组织MDA含量升高, 肺组织受到严重的损伤, 支气管纤毛上皮排列混乱, 肺泡轮廓不光滑, 且伴有水肿, 同时被大量的炎症细胞浸润, 表明大鼠ALI模型建立成功。与模型组相比, 地塞米松组和肺筋草各剂量组的症状包括纤毛的排列、肺泡的轮廓、炎症细胞的浸润

等病理学症状均有不同程度的改善;地塞米松、ASWE组中的TNF- α 、IL-6、IL-1 β 明显降低,SOD、GSH-Px的表达水平明显升高。因此肺筋草能够抑制炎症因子的表达以及上调抗氧化作用的酶的含量,从而减轻肺组织的损伤程度,最终达到防治大鼠ALI的作用。

利用网络药理学方法研究肺筋草防治ALI的作用机制,构建“成分-靶点-通路”网络,筛选得到了10种肺筋草潜在活性成分,其中,阿魏酸甲酯、4-羟基苯甲酸、香豆酸、熊果酸、5-羟甲基-2-呋喃甲醛等物质有较好的抗菌、抗炎等药理活性,可能在ALI的防治中起到关键作用。KEGG富集分析结果显示肺筋草活性成分主要富集于MAPK信号通路、NF- κ B信号通路、JAK-STAT信号通路、IL-17信号通路、RAP1信号通路等,MAPK1、MAPK8、STAT3、AKT1、PIK3R1、TP53、ESR1、RELA等核心靶点均位于上述通路中。其中,NF- κ B为调节核转录的转录因子,上游TLRs受到刺激后,会激活NF- κ B信号通路,导致肺部炎症因子大量表达^[20]。研究表明^[21],LPS可以刺激TLR4因子,并将信号传递至下游,最终导致NF- κ B信号通路激活表达。JAK-STAT信号通路是甲型H1N1流感病毒性肺炎疾病的主要作用通路^[22],其通路中的STAT3、AKT1、JAK2等蛋白在肺中表达量增多,在受到外界刺激时可直接促进TNF- α 炎症因子加剧,导致炎症反应的发生^[23]。qRT-PCR结果表明,肺筋草抑制MAPK1、NF- κ B、STAT3、JAK2、Nras、Ensa基因的表达;Western blotting结果表明,肺筋草抑制NF- κ B、JAK2蛋白的表达,二者趋势一致。MAPK1是MAPK信号通路中重要基因之一,外界病原体进攻时,其负责将信号传递至细胞核内。研究证明^[24]MAPK1表达被抑制会导致肺损伤、肺纤维化、促炎因子表达下降,加速ALI进程,阻碍MAPK/NF- κ B等信号通路发挥生物学作用。NF- κ B是MAPK信号通路的重要下游核转录因子,其可以接收MAPK传递的信号,做出免疫应答并被激活,刺激细胞凋亡、分化过程及促炎因子、炎症因子表达^[25]。JAK2、STAT3为JAK-STAT信号通路中重要家族成员,该通路是一条细胞因子刺激信号转导通路,在细胞增殖、分化、凋亡、炎症发生发展过程中扮演重要的角色,尤其在肺炎中起到至关重要的作用^[26-27]。STAT3可以磷酸化刺激NF- κ B信号通路表达,并加速Th17细胞增殖,进一步加强炎症反应的发展。Nras、Ensa基因是Rap1信号通路中重要调控分子,

其中Nras表达量增加会导致其发生突变,对MAPK信号通路产生持续激活效果^[28]。因此,肺筋草中上述基因表达量均下降说明基因表达被抑制,从而直接或间接性抑制了MAPK、NF- κ B、JAK-STAT等炎症信号通路表达。

本研究基于网络药理学及建立ALI大鼠模型,以肺筋草为研究对象,探讨其防治ALI的作用机制。肺筋草能够降低炎症因子的含量,增加SOD活性和GSH含量,增强机体清除自由基能力,抑制氧化应激和脂质过氧化损伤。分子机制结果表明肺筋草可抑制MAPK、NF- κ B、JAK-STAT等炎症信号通路关键基因的表达,减轻ALI造成的炎性细胞浸润。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Huang X, Zhang R Y, Fan G H, et al. Incidence and outcomes of acute respiratory distress syndrome in intensive care units of mainland China: A multicentre prospective longitudinal study [J]. Crit Care, 2020, 24 (1): 515.
- [2] Zhang Y, Xie Y F, Zhang L F, et al. MicroRNA-155 participates in smoke-inhalation-induced acute lung injury through inhibition of SOCS-1 [J]. Molecules, 2020, 25(5): 1022.
- [3] Zhao J J, Chen C, Guo M M, et al. MicroRNA-7 deficiency ameliorates the pathologies of acute lung injury through elevating KLF4 [J]. Front Immunol, 2016, 7: 389.
- [4] 郝玉花,唐潇潇,张晓青.感染引发急性肺损伤患者临床预后的影响因素分析[J].中国医学创新,2022,19 (23): 85-88.
Hao Y H, Tang X X, Zhang X Q. Analysis of influencing factors of clinical prognosis in patients with acute lung injury induced by infection [J]. Med Innov China, 2022, 19(23): 85-88.
- [5] 黄玉燕,郑齐,陈子杰,等.对清瘟败毒饮组方的思考[J].辽宁中医杂志,2019,46(7): 1486-1488.
Huang Y Y, Zheng Q, Chen Z J, et al. Thoughts on the prescription of Qingwen Baidu drink [J]. China Ind Econ, 2019, 46(7): 1486-1488.
- [6] 罗峰,杨曼.清瘟败毒饮合大承气汤联合西药治疗肺炎合并脓毒症39例[J].中医研究,2019,32(7): 16-18.
Luo F, Yang M. 39 cases of pneumonia complicated with sepsis treated by Qingwen Baidu Decoction combined with Dachengqi Decoction and western medicine [J]. Tradit Chin Med Res, 2019, 32(7): 16-18.
- [7] 李玉娟,贾元萍,张誉腾,等.基于文献的中医药治疗急

- 性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征用药规律研究[J]. 世界中医药, 2020, 15(12): 1756-1761.
- Li Y J, Jia Y P, Zhang Y T, et al. Study on the medication rules of traditional Chinese medicine in the treatment of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome based on literature [J]. World Chin Med, 2020, 15(12): 1756-1761.
- [8] 刘亚华, 邹娟, 何康, 等. 侗族治疗疾病常用的百合科植物药[J]. 中国民族医药杂志, 2013, 19(2): 39-40.
- Liu Y H, Zou J, He K, et al. Liliaceae plant drugs commonly used by Dong people to treat diseases [J]. J Med Pharm Chin Minor, 2013, 19(2): 39-40.
- [9] 汤宗孝, 刘洪先. 川西北草地野生中药材植物资源名录[J]. 草业与畜牧, 2014(6): 26-28.
- Tang Z X, Liu H X. List of wild Chinese medicinal plant resources in grasslands of northwest Sichuan [J]. Grassl Anim Husb, 2014(6): 26-28.
- [10] 何维维, 吕享, 谢军丽, 等. 黔产民族药肺筋草的化学成分预试验研究[J]. 广东化工, 2021, 48(13): 63-64, 54.
- He W W, Lv X, Xie J L, et al. Preliminary study on chemical components of the *Aletris spicata* (Thunb.) Franch [J]. Guangdong Chem Ind, 2021, 48(13): 63-64, 54.
- [11] 杨菁, 刘顶鼎, 陈滕, 等. 粉条儿菜总黄酮提取工艺优化及抗氧化、抗炎活性分析[J]. 食品工业科技, 2024, 45(2): 192-200.
- Yang J, Liu D D, Chen T, et al. Extraction process optimization and antioxidant, anti-inflammatory activity of total flavonoids from *Aletris spicata* (Thunb.) Franch [J]. Sci Technol Food Ind, 2024, 45(2): 192-200.
- [12] 蔡凌云, 李培武, 何琴, 等. 川黔民间常用药肺经草(肺筋草)考证[J]. 中国医药导报, 2020, 17(19): 132-135.
- Cai L Y, Li P W, He Q, et al. Textual research on common folk medicines of lung meridian grass (false *Aloe*) in Sichuan and Guizhou [J]. China Med Her, 2020, 17(19): 132-135.
- [13] 潘杰, 潘卫东. 肺筋草脂溶性化学成分研究[J]. 山地农业生物学报, 2011, 30(5): 458-460.
- Pan J, Pan W D. Chemical constituents of liposoluble components isolated from *Aletris spicata* [J]. J Mt Agric Biol, 2011, 30(5): 458-460.
- [14] 李焱, 张尧, 黄筑艳, 等. HPLC法测定肺筋草中薯蓣皂苷的含量[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(12): 163-165.
- Li Y, Zhang Y, Huang Z Y, et al. HPLC determination of dioscin in *Aletris spicata* (Thunb.) Franch [J]. Food Res Dev, 2010, 31(12): 163-165.
- [15] 黄兰, 潘杰, 曹佩雪, 等. 肺筋草化学成分研究[J]. 中草药, 2013, 44(7): 812-815.
- Huang L, Pan J, Cao P X, et al. Study on chemical constituents of *Aletris spicata* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2013, 44(7): 812-815.
- [16] 李林珍, 王孟华, 孙建博, 等. 粉条儿菜化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报, 2014, 45(2): 175-177.
- Li L Z, Wang M H, Sun J B, et al. Chemical constituents from *Aletris spicata* [J]. J China Pharm Univ, 2014, 45(2): 175-177.
- [17] 周枝, 刘畅, 俸婷婷, 等. 黄褐毛忍冬对大鼠急性肺损伤模型的抗炎机制研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(20): 4978-4983.
- Zhou Z, Liu C, Feng T T, et al. Study on anti-inflammatory mechanism of *Lonicera fulvotomentosa* on acute lung injury model in rats [J]. China J Chin Mater Med, 2020, 45(20): 4978-4983.
- [18] 夏金婵, 从人愿, 袁静, 等. 黄芩苷通过 p38 MAPK/NLRP3 通路对脂多糖诱导大鼠急性肺损伤的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(2): 79-86.
- Xia J C, Cong R Y, Yuan J, et al. Baicalin alleviates LPS-induced acute lung injury in rats through p38 MAPK/NLRP3 pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2022, 28(2): 79-86.
- [19] 刘畅, 刘雄伟, 李嘉欣, 等. 基于 16S rRNA 基因测序研究金银花和山银花对急性肺损伤大鼠肠道菌群的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2021, 33(2): 130-137.
- Liu C, Liu X W, Li J X, et al. Effect of *Lonicera japonica* Thunb and *Lonicera hypoglauca* on gut microbiota in rats with acute lung injury based on 16S rRNA gene sequencing [J]. Chin J Microecol, 2021, 33(2): 130-137.
- [20] Fan Y Y, Wang J, Feng Z H, et al. Pinitol attenuates LPS-induced pneumonia in experimental animals: Possible role via inhibition of the TLR-4 and NF- κ B/I κ B α signaling cascade pathway [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2021, 35(1): e22622.
- [21] 陈红英, 李新, 许浚, 等. 基于 TLR4/NF- κ B 信号通路研究清开灵口服液防治肺炎的作用机制[J]. 中草药, 2022, 53(19): 6101-6107.
- Chen H Y, Li X, Xu J, et al. Mechanism of Qingkailing Oral Liquid in preventing and treatment of pneumonia based on TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(19): 6101-6107.
- [22] Wang X, Huang X J, Ihsan A, et al. Metabolites and JAK/STAT pathway were involved in the liver and spleen damage in male Wistar rats fed with mequindox [J]. Toxicology, 2011, 280(3): 126-134.
- [23] Peters J. An increased alveolar CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T-regulatory cell ratio in acute respiratory distress syndrome is associated with increased 30-day mortality: Response to comment by singer and D'Alessio [J]. Intensive Care Med, 2014, 40(10): 1605-1606.

- [24] 沈晓莉, 庄雪明, 钱梦书, 等. 微小RNA-182-5p 通过靶向 MAPK1 调控 MAPK/NF- κ B 通路治疗急性肺损伤的研究 [J]. 实用临床医药杂志, 2022, 26(5): 79-85.
Shen X L, Zhuang X M, Qian M S, et al. MicroRNA-182-5p regulates the MAPK/NF- κ B pathway by targeting MAPK1 to treat acute lung injury [J]. J Clin Med Pract, 2022, 26(5): 79-85.
- [25] Li T, Wu Y N, Wang H, et al. Dapkl improves inflammation, oxidative stress and autophagy in LPS-induced acute lung injury via p38MAPK/NF- κ B signaling pathway [J]. Mol Immunol, 2020, 120: 13-22.
- [26] Li N, Dou Z F, Liu J C, et al. Therapeutic effect of HGF on NASH mice through HGF/c-met and JAK2-STAT3 signalling pathway [J]. Ann Hepatol, 2018, 17(3): 501-510.
- [27] Villarino A V, Kanno Y, Ferdinand J R, et al. Mechanisms of Jak/STAT signaling in immunity and disease [J]. J Immunol, 2015, 194(1): 21-27.
- [28] 苟海梅, 方莉, 钟晓武. KRAS、NRAS及 BRAF 基因突变与结直肠癌肝转移的关系 [J]. 昆明医科大学学报, 2023, 44(1): 19-24.
Gou H M, Fang L, Zhong X W. Relationship between mutations of KRAS NRAS and BRAF genes and colorectal liver metastases [J]. J Kunming Med Univ, 2023, 44(1): 19-24.

【责任编辑 兰新新】