

基于代谢组学和网络药理学探讨紫雪散防治重度创伤性脑损伤继发肺感染的药效及机制

吕诗倩^{1,3}, 刁凤胤¹, 葛士宁^{1,3}, 张欢⁴, 庄朋伟², 张艳军², 牛琳^{1,2,3*}, 郭虹^{1,5*}

1. 天津中医药大学, 天津 301617

2. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193

3. 天津中医药大学 现代中医药海河实验室, 天津 301617

4. 天津宏仁堂药业有限公司, 天津 300380

5. 天津中医药大学 中医药研究院, 天津 301617

摘要: 目的 探究紫雪散防治重度创伤性脑损伤 (STBI) 继发肺感染的药效及其潜在机制。方法 将 SD 雄性大鼠随机分为假手术组、STBI 造模后第 1 天 (M1D) 组、造模后第 7 天 (M7D) 组及紫雪散低、高剂量 [(0.54 (临床等效剂量)、2.16 g·kg⁻¹)] 组。采用控制性皮质撞击法 (CCI) 建立 STBI 实验模型; 通过苏木素-伊红 (HE) 染色观察肺组织病理变化, 肺功能检测系统测定呼吸频率 (F)、吸气时间 (Ti)、潮气量 (Tv), 细菌培养法计数肺组织细菌菌落数; 结合代谢组学与网络药理学分析紫雪散的作用机制; 血糖仪检测血糖水平; 酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测血清胰高血糖素水平, 肺组织晚期糖基化终末产物 (AGEs)、晚期糖基化终产物受体 (RAGE) 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 等炎症因子水平; Western blotting 检测肺组织磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶 (p-JNK)、磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p-p38) 的表达; 免疫荧光技术观察核因子 (NF)- κ B p65 的核转位情况。结果 与 M7D 组相比, 紫雪散高剂量组大鼠肺泡壁增厚、肺组织水肿等病理损伤显著改善; Ti、Tv 显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01), F 显著降低 ($P<0.001$), 肺组织细菌菌落数显著减少 ($P<0.001$), 且上述效应呈剂量相关性。血清代谢组学分析提示, 胰高血糖素代谢紊乱是 STBI 继发肺感染的关键病理环节, 实验证显示: 与假手术组相比, M1D 组、M7D 组大鼠血糖及血清胰高血糖素水平均显著升高 ($P<0.001$)。网络药理学筛选出 128 个紫雪散治疗 STBI 继发肺感染的潜在药效靶点, 提示其可能通过调控 AGE-RAGE 信号通路发挥作用。机制验证显示: 与 M7D 组相比, 紫雪散高剂量组大鼠肺组织 AGE、RAGE 相对含量显著下调 ($P<0.01$ 、 0.001), p-JNK、p-p38 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$), NF- κ B p65 核转位减少, IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及 MCP-1 等炎症因子水平显著降低 ($P<0.05$), 且效应呈剂量相关性。结论 紫雪散可通过调控 AGE-RAGE 信号通路, 抑制下游炎症通路激活及炎症因子释放, 显著减轻 STBI 大鼠肺部炎症损伤。

关键词: 紫雪散; 重度创伤性脑损伤 (STBI); 肺感染; AGE-RAGE 信号通路; 炎症因子; 胰高血糖素代谢通路

中图分类号: R285.5; R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2026)01-0132-12

DOI:10.7501/j.issn.1674-6376.2026.01.012

Exploration of efficacy and mechanism of Zixue Powder in preventing and treating secondary pulmonary infection after severe traumatic brain injury based on metabolomics and network pharmacology

LÜ Shiqian^{1,3}, DIAO Fengyin¹, GE Shining^{1,3}, ZHANG Huan⁴, ZHAUNG Pengwei², ZHANG Yanjun², NIU Lin^{1,2,3}, GUO Hong^{1,5}

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

3. Haihe Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

收稿日期: 2025-06-11

基金项目: 国家资助博士后研究人员计划资助项目 (GZC20231925); 中国博士后科学基金第 75 批面上资助项目 (2024M752398); 现代中医药海河实验室科技项目 (25HHZYSS00012); 青年科学基金项目 (C 类) (82505296)

作者简介: 吕诗倩, 硕士研究生, 主要从事中药神经药理研究。E-mail: lvshiqian2023@163.com

*通信作者: 郭虹, 副研究员, 主要从事中药脑血管及神经药理研究。E-mail: cacti1983@163.com

牛琳, 博士后, 助理研究员, 主要从事重症感染并发症中医药防治作用及机制研究。E-mail: niulinnl@163.com

4. Tianjin Hongrentang Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300380, China

5. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To explore the efficacy and potential mechanism of Zixue Powder in preventing and treating secondary pulmonary infection in severe traumatic brain injury (STBI). **Methods** SD male rats were randomly divided into sham operation group, STBI model day 1 (M1D) group, STBI model day 7 (M7D) group, and low-dose ($0.54 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and high-dose ($2.16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Zixue Powder groups. The STBI model was established by controlled cortical impact (CCI). The pathological changes of lung tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The respiratory rate (F), inspiratory time (T_i), and tidal volume (T_v) were measured by a pulmonary function detection system. The bacterial colony count in lung tissue was determined by bacterial culture. The mechanism of Zixue Powder was analyzed by combining metabolomics and network pharmacology. Blood glucose levels were monitored with a glucometer. The levels of glucagon, advanced glycation end products (AGEs), receptor for advanced glycation end products (RAGE), and inflammatory factors such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in lung tissue were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of phosphorylated c-Jun N-terminal kinase (p-JNK) and phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase (p-p38) in lung tissue was detected by Western blotting. The nuclear translocation of nuclear factor (NF)- κ B p65 was observed by immunofluorescence. **Results** Compared with the M7D group, the pathological damage of thickened alveolar walls and pulmonary edema in the high-dose Zixue Powder group was significantly improved. T_i and T_v were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), F was significantly decreased ($P < 0.001$), and the bacterial colony count in lung tissue was significantly reduced ($P < 0.001$), and the above effects were dose-dependent. Serum metabolomics analysis suggested that glucagon metabolism disorder was a key pathological link in secondary pulmonary infection after STBI. Experimental verification showed that the blood glucose and serum glucagon levels in the M1D group and M7D group were significantly increased compared with the sham operation group ($P < 0.001$). Network pharmacology screened out 128 potential therapeutic targets of Zixue Powder for secondary pulmonary infection after STBI, suggesting that it may act through regulating the AGE-RAGE signaling pathway. Mechanism verification showed that compared with the M7D group, the relative contents of AGE and RAGE in lung tissue in the high-dose Zixue Powder group were significantly downregulated ($P < 0.01, 0.001$), the protein expression levels of p-JNK and p-p38 were significantly decreased ($P < 0.05$), the nuclear translocation of NF- κ B p65 was reduced, and the levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , and MCP-1 were significantly decreased ($P < 0.05$), and the effects were dose-dependent.

Conclusion Zixue Powder can significantly alleviate pulmonary inflammatory damage in STBI rats by regulating the AGE-RAGE signaling pathway and inhibiting the activation of downstream inflammatory pathways and the release of inflammatory factors.

Key words: Zixue Powder; severe traumatic brain injury (STBI); lung infection; AGE-RAGE signaling pathway; inflammatory factors; glucagon metabolic pathway

颅脑损伤(TBI)是临床常见的中枢神经系统疾病,以高致残率、高死亡率为显著特征。此类患者常并发感染性疾病,其中重症颅脑损伤(STBI)患者的感染风险尤为突出^[1]。研究表明,STBI可导致中枢神经系统、自主神经系统及先天免疫系统等多系统兴奋性异常^[2-3],使患者在重症监护病房(ICU)治疗期间常出现颅内高压、高血糖、低血压、低钠血症、高热及各类颅外并发症。

在STBI相关颅外并发症中,肺部并发症发生率居首:肺炎发生率高达72.2%,肺感染发生率约50%,急性呼吸窘迫综合征/急性肺损伤发生率为31.6%^[4-6]。尽管临床侵入性操作可能增加肺感染发生风险,但目前其核心发病机制仍不十分明确,临床亦缺乏特效治疗药物^[7-8]。

现有治疗手段中,抗生素应用无法有效降低

STBI继发肺感染的发生率^[9],肾上腺素能受体拮抗剂也难以有效控制交感神经兴奋介导的肺感染^[10]。中药因具备多靶点、多途径的作用优势,在重大疾病防治领域展现出独特价值。在新型冠状病毒肺炎(COVID-19)疫情期间,紫雪散被纳入多地临床专家共识及治疗指南,其临床价值得到广泛认可。

紫雪散主要由石膏、寒水石、滑石、磁石、玄参、木香、沉香、升麻、甘草、丁香、制芒硝、精制硝石、水牛角浓缩粉、羚羊角、麝香、朱砂等组成,具有清热开窍、解毒安神、行气化瘀之功效,临幊上常用于控制重度感染后休克、外科感染创面、高热惊厥、乙型脑炎病毒感染等疾病的的相关症状^[11-12]。本研究针对紫雪散治疗STBI继发肺感染开展药效学研究,并结合代谢组学与网络药理学技术解析其作用机制,旨在筛选出防治重症患者感染

并发症的切实有效中成药,为运用中医药解决此类临床难题提供新的思路与实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

SD 雄性大鼠,体质量 220~250 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号 SCXK(京)2016-0006。饲养于天津中医药大学医学实验动物中心,饲养温度为 22~25 °C,相对湿度 40%~70%,采用 12 h 照明/12 h 黑暗的昼夜节律周期,大鼠自由进食与饮水,每笼 5 只。经天津中医药大学动物伦理委员会批准,动物伦理审查编号 TCM-LAEC2023068。

1.2 主要试剂

紫雪散(每瓶装 1.5 g,批号 BB27001),天津宏仁堂药业有限公司;异氟烷气体麻醉试剂(货号 R510-22-10),深圳市瑞沃德生命科技有限公司;苏木素-伊红(HE)染色剂试剂盒(货号 G1120),北京索莱宝科技有限公司;血琼脂培养基(货号 024070),苏州川禾生物科技有限公司;EasyPure Genomic DNA 提取试剂盒(货号 EE101-02),北京全式金生物技术有限公司;胰高血糖素、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、晚期糖基化终末产物(AGEs)、晚期糖基化终末产物受体(RAGE)ELISA 试剂盒(货号分别为 JYM0751Ra、BY-EM220852、BY-EM220852、CSB-E04639m、CSB-E04655h、SP11600、EK1103),武汉基因美生物科技有限公司;总 RNA 提取试剂盒(货号 LS1040),上海普洛麦格生物产品有限公司;DNA 扩增试剂盒(货号 KG203-02)、反转录试剂盒(货号 KR116-01),天根生化科技(北京)有限公司;c-Jun 氨基末端激酶(JNK)(货号 9252T),磷酸化应激激活蛋白激酶(p-JNK,货号 4668T),细胞信号技术公司;p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38)(货号 bsm-55529R),北京博奥森生物技术有限公司;磷酸化 p38(p-p38)(货号 28796-1-AP),核因子κB p65 亚基(NF-κB p65)抗体(货号 10745-1-AP),武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 主要仪器

68099II 颅脑/脊髓大小鼠-精密打击器,深圳市瑞沃德生命科技有限公司;51600 脑立体定位仪,美国 Steoltting 公司;EMKA-WBP 清醒动物肺功能检测系统,北京艾慕卡生物技术有限公司;CFX69

实时定量 PCR 仪,美国 Bio-rad 公司;Stellaris 8 快速超高分辨激光共聚焦显微镜,德国 Leica 公司;Vanquish UPLC 超高压液相色谱仪、Q Exactive 系列质谱仪,美国 Thermo 公司。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

健康 SD 雄性大鼠,采用随机数字表法分为假手术组、造模后 1 d(M1D)组、造模后 7 d(M7D)组、紫雪散低、高剂量(0.54、2.16 g·kg⁻¹)组,每组 6 只。大鼠适应性饲养 3 d,术前 12 h 禁食不禁水。

本研究采用控制性皮质撞击法构建大鼠损伤模型^[13],造模操作流程如下:采用 5% 异氟烷气体吸入法对大鼠实施麻醉,沿头部正中线切开头皮,逐层分离组织以充分暴露颅骨。于前囟后方 2.5 mm、中线旁开 2.5 mm 定位点,制备直径 5 mm 的圆形骨窗。撞击参数设定为:撞击深度 5 mm、撞击速度 5 m·s⁻¹、停留时间 150 ms,撞击完成后立即行清创缝合术。假手术组仅进行骨窗制备、清创及缝合操作,不予以撞击处理,全程保持硬脑膜结构完整。

参照《中国药典》2025 年版相关标准,紫雪散成人临床推荐用量为每次 1.5~3.0 g,每日 2 次。本研究以成人每日最大用药剂量 6 g 为换算基准,结合体表面积等效剂量换算公式,分别配制紫雪散低剂量(0.54 g·kg⁻¹,临床等效剂量)及高剂量(2.16 g·kg⁻¹,4 倍临床等效剂量)给药体系。所有给药组大鼠均按 10 mL·kg⁻¹ 的给药体积 ig 给药,自造模成功后开始连续给药 6 d,每日 1 次。

2.2 组织病理学检测

取各组大鼠左肺大叶,在 4% 多聚甲醛固定液中固定 24 h,乙醇梯度脱水,二甲苯透明处理,石蜡包埋,制成石蜡切片,脱蜡处理。肺组织切片经 Masson 染色及 HE 染色处理后,梯度乙醇快速脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,在光学显微镜下观察病理变化。

2.3 肺功能检测

大鼠肺功能检测采用无创整体体积描记法进行。将大鼠置于检测腔室内适应平衡 30 min,随后使用 EMKA 清醒动物肺功能检测系统连续记录清醒状态下大鼠的呼吸波形,并通过 iox 软件实时采集数据,分析呼吸频率(F)、吸气时间(Ti)、潮气量(Tv)等参数。

2.4 细菌培养

使用高压灭菌后的手术器械在无菌环境下摘

取大鼠右肺最下叶，迅速置于冰上。称取 50 mg 肺组织于 2 mL 无菌 EP 管中加入 1 mL 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 进行匀浆。取 100 μ L 匀浆上清至血琼脂培养皿中顺时针涂布，封口膜封闭，倒置于 37 °C 生化培养箱中孵育 24 h，对细菌菌落计数。

每克肺组织菌落形成单位 (CFU) 数 = 菌落数 \times 稀释倍数 \times 100/肺组织质量 (mg)^[14]

2.5 代谢组学分析

2.5.1 血浆样本的制备 在大鼠造模后的第 1 天，异氟烷吸入麻醉后眼眶静脉丛采血。造模后第 7 天，同法麻醉后腹主动脉取血。采集的血液样本于 4 °C、3 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 15 min，取上层血清于 -80 °C 保存，用于质谱检测和代谢组学分析 (n=6)。血清样本前处理采用甲醇-乙腈沉淀法。步骤如下：取适量样本，加入预冷的提取溶剂 (甲醇：乙腈：水=2:2:1)，涡旋 30 s，低温超声处理 30 min，-20 °C 静置孵育 10 min，于 4 °C、14 000 $\times g$ 离心 20 min。分离出上清后，真空干燥，质谱分析时加入 100 μ L 乙腈水溶液 (乙腈：水=1:1) 复溶，涡旋混匀，于 4 °C、14 000 $\times g$ 离心 15 min，取上清液进样分析。

2.5.2 色谱条件 样品采用 ACQUITY UPLC BEH Amide (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m) 色谱柱，柱温 25 °C；体积流量 0.3 mL $\cdot min^{-1}$ ；进样量 2 μ L；流动相为水 + 25 mmol $\cdot L^{-1}$ 乙酸铵 + 25 mmol $\cdot L^{-1}$ 氨水 (A)-乙腈 (B) 梯度洗脱：0~1.5 min, 98% B；1.5~12.0 min, 98% \rightarrow 2% B；12.0~14.0 min, 2% B；14.0~14.1 min, 2% \rightarrow 98% B；14.1~17.0 min, 98% B；自动进样器温度 4 °C。为减少仪器信号波动的影响，所有样本按随机顺序连续进样，并在样本序列中插入质控样品，以考察系统稳定性及数据可靠性。

2.5.3 质谱条件 采用电喷雾电离 (ESI) 正离子和负离子模式进行检测。ESI 源及质谱设置参数如下：雾化气辅助加热气 1 (Gas1) 414 kPa，辅助加热气 2 (Gas2) 414 kPa，气帘气 (CUR) 207 kPa，离子源温度 600 °C，喷雾电压 (ISVF) \pm 5 500 V；一级 MS 的质量范围 m/z 80~1 200，分辨率 60 000，扫描累积时间 100 ms，二级采用分段式采集方法，扫描范围 m/z 70~1 200，分辨率 30 000，扫描累积时间 50 ms，动态排除时间 4 s。

2.5.4 数据分析 原始数据经 ProteoWizard 软件转换为 mzXML 格式后，采用 XCMS 程序进行峰识别、峰对齐、保留时间校正及峰面积提取。代谢物

的结构鉴定通过将二级质谱数据与 HMDB 和 METLIN 数据库进行比对完成。鉴定标准包括精确相对分子质量 (误差 $< 1 \times 10^{-5}$)、保留时间及二级质谱碎片图谱。

2.6 网络药理学分析

2.6.1 紫雪散主要成分作用靶点及对应基因的收集 将本课题组已明确的紫雪散主要成分^[15] (亮氨酸、L-苯丙氨酸、丁香酸、哈巴苷、酪氨酸、毛兰素、隐绿原酸等共 40 个成分) 的英文名导入中药系统药理学数据库与分析平台 TCMSP (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)，以口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 且类药性 (DL) ≥ 0.18 为筛选标准，得到活性成分，同时查阅高通量实验与参考指导的中药数据库 HERB (<http://herb.ac.cn/>)，以 Lipinski 五原则为筛选标准，补充 TCMSP 数据库未收录的相关成分，确保成分集合的完整性。将上述 2 个数据库筛选得到的活性成分联合输入 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)，设置预测物种为 “Homo sapiens”，获取各成分对应的预测作用靶点蛋白。随后通过 UniProt 知识库 (<https://www.uniprot.org/>) 对上述靶点蛋白进行信息标准化处理，将靶点名称 (target name) 转化为基因符号 (symbol name)，最终获得药物活性成分对应的唯一人类靶标基因集合。

2.6.2 核心靶点筛选与可视化网络构建 利用 SwissTargetPrediction 在线数据库，筛选并获取所有差异代谢物所对应的潜在作用靶点信息。以 “severe traumatic brain injury” 和 “pulmonary infection” 为检索关键词，在 Genecard 数据库与 OMIM 数据库中分别进行靶向检索，提取与上述 2 种疾病直接相关的疾病关联靶点。将差异代谢物潜在靶点与 STBI 及肺感染疾病关联靶点进行交集分析，最终确定 STBI 继发肺感染的核心疾病靶点。为明确药物与疾病的作用关联，将上述核心疾病靶点与前期筛选的药物成分作用靶点共同导入 Venny 2.1.0 在线分析工具，经交集运算获得药物-疾病共同作用靶点。将所得药物-疾病共同作用靶点数据集导入 Cytoscape 3.7.2 软件，构建药物-疾病-靶点可视化网络并完成拓扑分析。

2.6.3 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络的构建 将药物-疾病交集靶点在 STRING 网站上建立 PPI 网络，下载 TSV 文件，通过 Cytoscape 3.7.2 软件对其进行可视化处理。

2.6.4 京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富

集分析 将核心作用靶点上传至 Metascape 平台, 设置富集过程中 $P < 0.01$ 进 KEGG 通路富集分析。

2.7 胰高血糖素及血糖检测

造模后第 1 天剪尾采血法取血, 造模后第 7 天腹主动脉取血。用动物血糖仪检测血糖。采集的血液样本于 4 ℃、3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 吸取上清液, 分装后于 -80 ℃ 保存备用, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测胰高血糖素水平。

2.8 ELISA 检测肺组织 AGE、RAGE、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MCP-1 水平

取各组大鼠部分右肺上叶, 加入 PBS 制备肺组织匀浆, 将匀浆液于 4 ℃、3 000 $\times g$ 条件下离心 15 min, 吸取上清液, 分装后于 -80 ℃ 保存备用, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测相关指标。

2.9 免疫荧光观察 NF- κ B p65 核转位情况

取各组大鼠左肺大叶, 4% 多聚甲醛固定 24 h, 蔗糖溶液梯度脱水, OTC 包埋, 制成 12 μm 厚的冰冻切片。切片以 0.2% Triton X-100 室温通透 10 min, 再以 10% 山羊血清室温封闭 1 h, 在 4 ℃ 下与一抗 NF- κ B p65 孵育过夜, 然后以 PBS 洗涤 3 次, 与荧光二抗 37 ℃ 孵育 1 h, 滴加含 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂, 封片, 共聚焦显微镜下观察记录。

2.10 Western blotting 检测 p-JNK、p-p38 蛋白表达水平

取各组大鼠部分右肺上叶, 加入 RIPA 裂解液, 置于冰上研磨, 在 4 ℃ 条件下 10 000 $\times g$ 离心 15 min 收集上清, BCA 法测定肺组织蛋白浓度, 具体检测步骤依照 BCA 试剂盒说明书进行。加入上样缓冲液及 PBS 于 95 ℃ 水浴锅加热 5 min, 将样品分装至 EP 管中, -80 ℃ 保存备用。蛋白样品 (40 μg) 经 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转至硝化纤维素膜 (PVDF) 膜上, 5% BSA 封闭, 加入一抗抗体 4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗涤, PVDF 膜与二抗室温孵育 2 h, 化学发光成像显影, 使用 Image Quant LAS 4000 对条带进行定量。

2.11 统计学方法

所有数据均使用 GraphPad Prism 9 软件作图。实验数据采用 SPSS 23.0 软件统计分析, 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 紫雪散有效改善大鼠 STBI 继发肺感染

STBI 会显著增加大鼠肺感染易感性。HE 染色

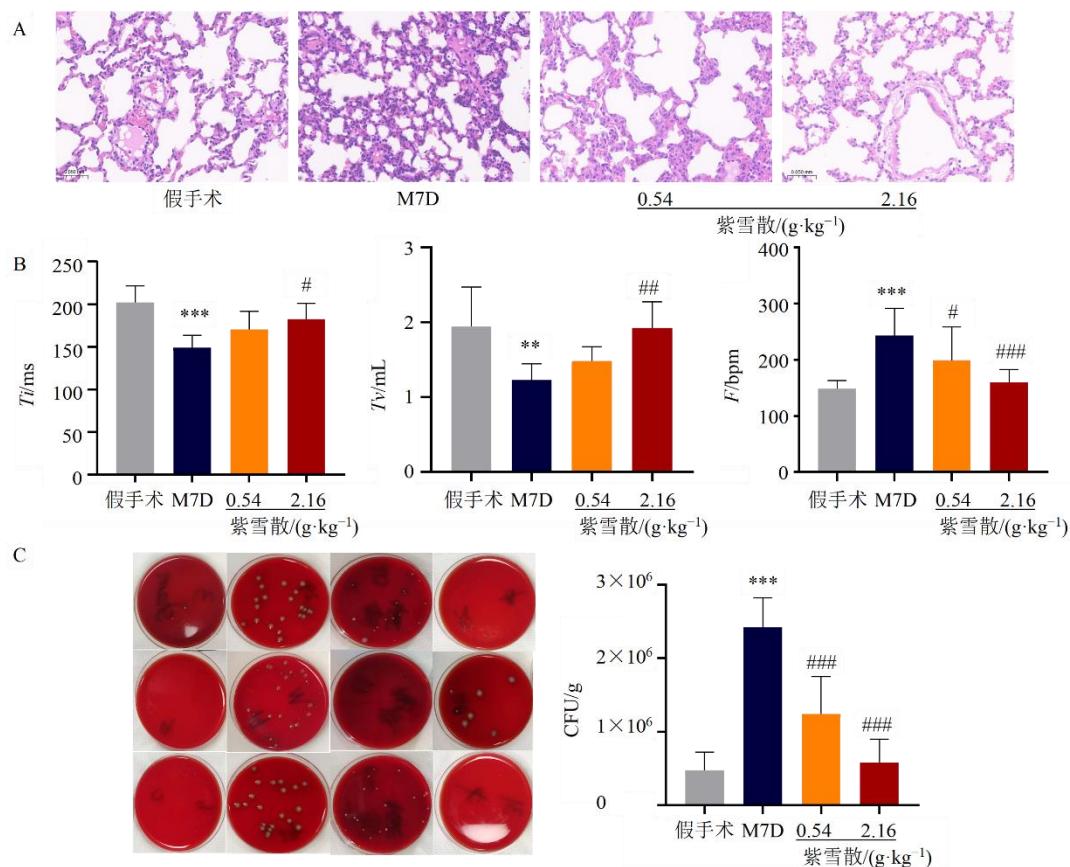
结果显示 (图 1-A), 与假手术组相比, M7D 组肺部渗入大量炎症细胞, 肺泡膜显著变厚, 并出现明显的组织水肿, 使用紫雪散治疗后, 大鼠肺部炎症显著减轻, 且呈剂量相关性。与 M7D 组相比, 紫雪散高剂量组大鼠肺部炎症细胞数量显著减少, 肺泡壁增厚、肺组织水肿等现象得以显著改善。紫雪散可有效改善 STBI 模型引起的大鼠呼吸功能下降。肺功能检测结果显示 (图 1-B), 与假手术组相比, M7D 组大鼠 T_i 、 T_v 显著下降 ($P < 0.01$ 、 0.001), F 显著升高 ($P < 0.001$)。与 M7D 组相比, 高剂量紫雪散能够显著改善 STBI 大鼠的 T_i 、 T_v 、 F ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。肺菌落计数和肺菌群负荷结果显示 (图 1-C), 与假手术组相比, M7D 组大鼠肺中微生物的数量、活性水平及肺感染程度均显著升高 ($P < 0.001$), 与 M7D 组相比, 紫雪散治疗后大鼠肺中微生物的数量、活性水平及肺感染程度均显著下降 ($P < 0.001$)。

3.2 基于代谢组学解析胰高血糖素代谢紊乱在 STBI 继发肺感染中的关键病理作用

课题组前期实验结果已证实, 肺感染通常发生于 STBI 造模后 3~7 d^[16], 而脑损伤初期则未出现感染迹象。为进一步明确损伤后肺感染期与损伤初期的病理特征差异, 本研究通过对比 M1D (损伤初期) 与 M7D (肺感染期) 的代谢组学特征, 旨在阐明 STBI 继发肺感染的关键病理环节。

正、负离子模式下的主成分分析 (PCA) 得分图均显示组间分离显著、组内聚集良好, 提示建模稳定可靠, 两组样本的代谢轮廓存在显著差异 (图 2)。为进一步聚焦差异代谢特征, 本研究开展正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA), 结果显示: 正离子模式下模型拟合度 $R^2 = 0.996$ 、预测能力 $Q^2 = 0.845$; 负离子模式下 $R^2 = 0.995$ 、 $Q^2 = 0.928$, 均体现出优异的模型性能。此外, OPLS-DA 模型的置换检验结果显示, 随着置换保留度的逐步降低, 随机模型的 R^2 和 Q^2 值均呈梯度下降趋势, 表明所建模型无过拟合问题, 稳健性良好 (图 3)。

本研究采用 OPLS-DA 模型中变量重要性投影 (VIP) > 1 且 $P < 0.05$ 作为显著性差异代谢物的筛选标准, 最终在正离子模式下筛选得到 122 个差异代谢物, 负离子模式下得到 92 个差异代谢物。对筛选出的差异代谢物进行 KEGG 通路富集分析, 结果显示, 胰高血糖素信号通路、组氨酸代谢通路、三羧酸循环等是 STBI 模型大鼠与假手术组大鼠间的



A-肺组织HE染色图($\times 40$); B-肺功能相关指标检测结果; C-肺组织菌落计数; 与假手术组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与M7D组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

A-HE staining of lung tissue ($\times 40$); B-results of lung function index detection; C-lung tissue colony count; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs sham operation group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs M7D group.

图1 紫雪散改善STBI大鼠肺部炎症水平、呼吸功能、肺感染情况 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 1 Zixue Powder improves lung inflammation level, respiratory function, and lung infection in STBI rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

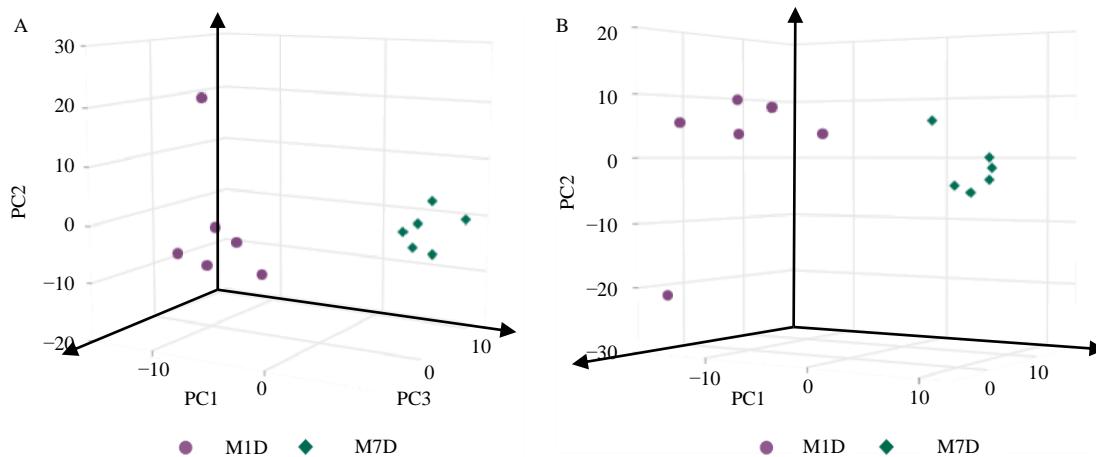
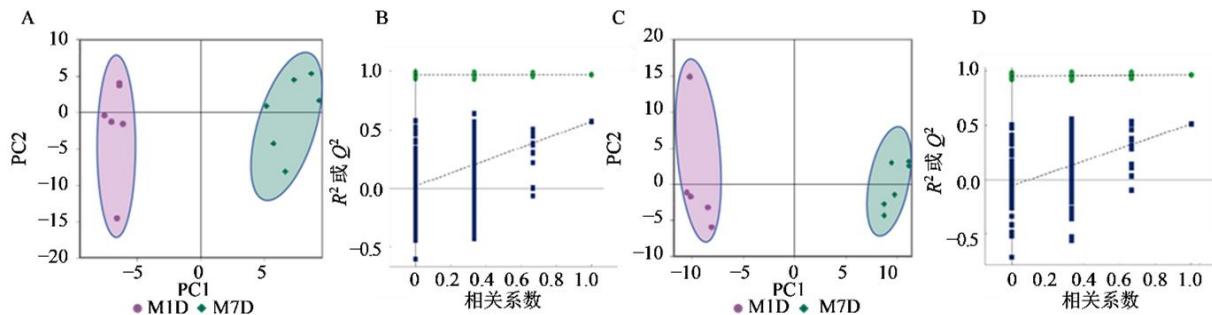


图2 正离子模式(A)和负离子模式(B)下PCA得分图

Fig. 2 PCA score plots in positive ion mode (A) and negative ion mode (B)

核心差异代谢通路(图4)。针对关键通路中的核心分子胰高血糖素,本研究进一步通过实验验证其表

达水平。结果表明(图4),与假手术组相比,M1D、M7D组大鼠血清中胰高血糖素水平均呈显著升高



A-正离子模式 OPLS-DA 得分图；B-正离子模式 OPLS-DA 置换检验；C-负离子模式 OPLS-DA 得分图；D-负离子模式 OPLS-DA 置换检验。
A-positive ion mode OPLS-DA score plot; B-positive ion mode OPLS-DA permutation test; C-negative ion mode OPLS-DA score plot; D-negative ion mode OPLS-DA permutation test.

图 3 正离子模式和负离子模式下 OPLS-DA 得分图和置换检验图

Fig. 3 OPLS-DA score plots and replacement test plots in positive ion mode and negative ion mode

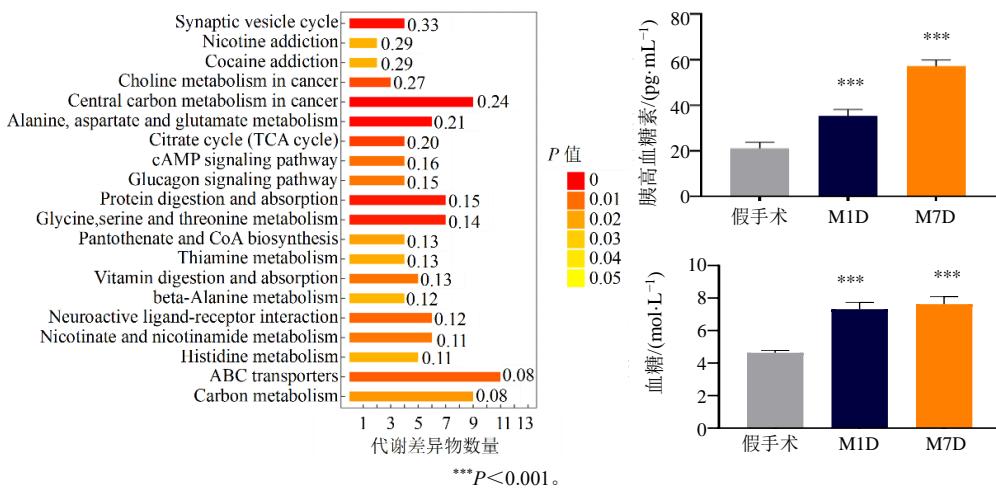


图 4 KEGG 富集通路图及胰高血糖素、血糖水平验证 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 4 KEGG enrichment pathway diagram and verification of glucagon and blood glucose levels ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

($P<0.001$)。后续血糖水平检测结果同样显示, M1D、M7D 组大鼠血糖水平较假手术组均显著上升 ($P<0.001$)。提示糖代谢紊乱可能是 STBI 继发肺感染过程中的潜在关键病理环节。

3.3 网络药理学结果

基于差异代谢物及 Swiss TargetPrediction 进行

靶点预测, 获得 1 749 个与代谢紊乱相关的潜在可调控靶标。在 Genecard、Drugbank、TTD 等多个疾病靶点数据库中以“severe traumatic brain injury”和“pulmonary infection”为关键词检索取交集, 获得 1 357 个与 STBI 继发肺感染相关的疾病靶点(图 5)。SwissTargetPrediction 数据库获取紫雪散有效

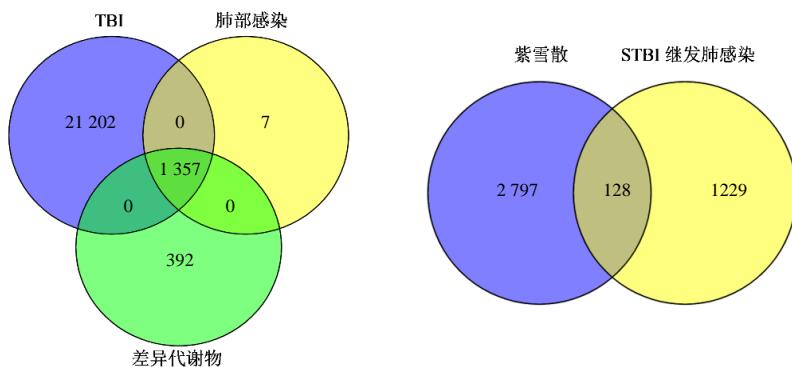


图 5 紫雪散治疗 STBI 继发肺感染韦恩图

Fig. 5 Venn diagram for treatment of secondary lung infection after STBI with Zixue Powder

活性成分作用靶点 2 925 个, 将 1 357 个疾病靶点和紫雪散有效成分作用靶点取交集, 得到 128 个紫雪散治疗 STBI 继发肺感染的药效靶点 (图 5)。

以紫雪散治疗 STBI 继发肺感染的主要药效成分为核心,结合筛选获得的 128 个相关药效靶点,构建药物-成分-靶点互作网络(图 6);将上述靶点导入 STRING 数据库在线构建 PPI 网络(图 6),将导出的 TSV 格式文件导入 Cytoscape 3.7.2 软件,通过 MCODE 插件进行核心靶点筛选(参数均采用默认设置 Degree Cutoff=2、Node Score Cutoff=0.2、K-Core=2、Max. Depth=100),选取得分最高的 PPI 子网络进行可视化分析,最终确定 NF- κ B、TNF、丝裂原活化蛋白激酶 14

(MAPK14)、IL-6、IL-1 β 、胰岛素 (INS)、肿瘤蛋白 p53 (TP53)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (CASP3)、IL-10、基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、成纤维细胞生长因子 2 (FGF2) 及 C-C 基序趋化因子配体 2 (CCL2) 为作用靶点。将核心靶点上传至 Metascape 生物信息学分析平台, 以 $P < 0.01$ 为筛选阈值进行 KEGG 通路富集分析, 按 P 值由小到大排序选取前 20 条显著富集通路, 主要包括 AGE-RAGE 信号通路、脂质和动脉粥样硬化通路、癌症通路、MAPK 信号通路及细胞凋亡通路等(图 7), 其中排序首位的 AGE-RAGE 信号通路推测为紫雪散改善 STBI 继发肺感染的核心调控通路。

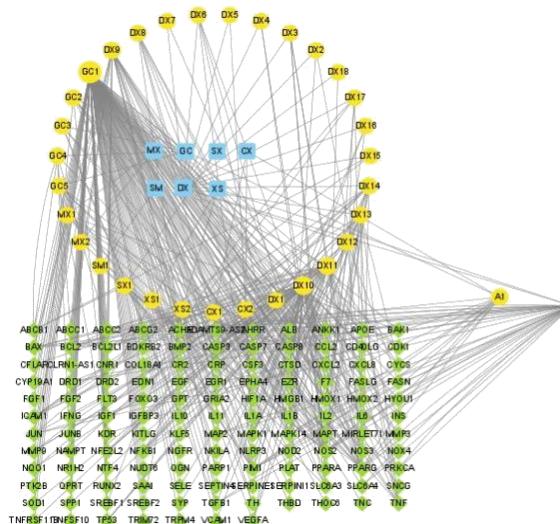


图 6 紫雪散治疗 STBI 继发肺感染的“药物-成分-潜在靶点”网络与交集靶点 PPI 网络

Fig. 6 “drug-component-potential target” network and PPI network of intersection targets of Zixue Powder in treatment of secondary pulmonary infection in STBI

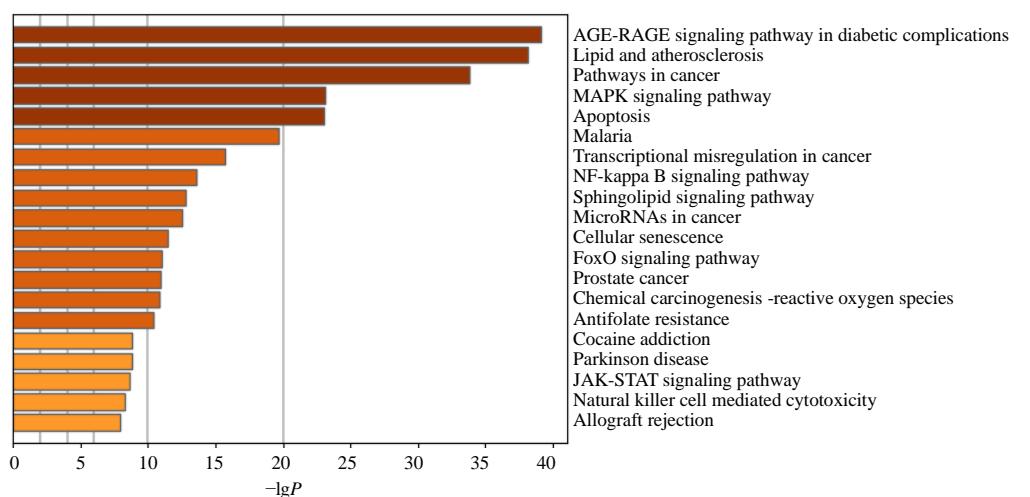


图 7 核心靶点 KEGG 通路富集分析

Fig. 7 KEGG pathway enrichment analysis of core targets

3.4 紫雪散对 STBI 大鼠肺组织 AGE-RAGE 信号通路的调控作用

“3.2”项结果表明, STBI 诱导的强烈应激反应引发了病理性高血糖状态。这种持续的代谢紊乱是驱动 AGEs 累积的关键上游因素^[17], 生成的 AGEs 作为重要的损伤相关分子模式, 会与其在肺组织中

高表达的特异性受体 RAGE 结合^[18-19]。为明确紫雪散对 AGE-RAGE 信号的干预作用, 本研究采用 ELISA 法检测大鼠肺组织 AGE、RAGE 含量, 结果如图 8 所示, 与 M7D 组相比, 紫雪散高剂量组大鼠肺组织中 AGE 与 RAGE 相对含量显著下调($P < 0.01$ 、 0.001)。

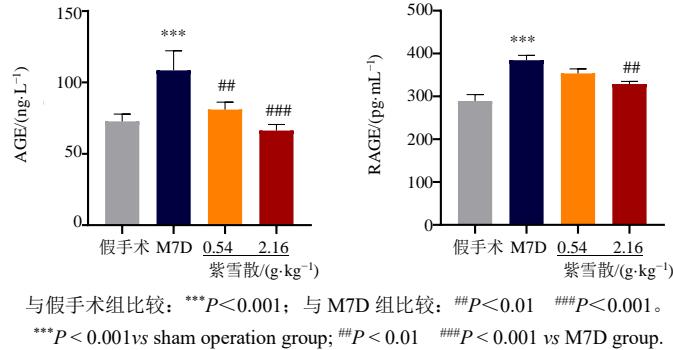


图 8 紫雪散对 STBI 大鼠 AGE 及 RAGE 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 8 Effect of Zixue Powder on AGE and RAGE levels in STBI rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3.5 紫雪散下调 MAPK-NF-κB 通路改善 STBI 大鼠肺部炎症损伤

AGE-RAGE 信号通路激活后, 可通过 MAPK-NF-κB 级联反应放大炎症效应。为明确紫雪散对 MAPK-NF-κB 通路的调控作用, 本研究检测大鼠肺组织中磷酸化 JNK (p-JNK)、p-p38 的蛋白表达水平, 观察 NF-κB p65 的核移位情况, 并检测 IL-1β、

IL-6、TNF-α 及 MCP-1 等关键炎症因子的表达水平。

研究结果显示, 与假手术组相比, M7D 组大鼠肺组织中 p-JNK 和 p-p38 的蛋白表达水平显著上调($P < 0.05$), 与 M7D 组相比, 高剂量紫雪散干预可显著下调上述 2 种蛋白的表达水平($P < 0.05$), 结果见图 9-A、B。与此同时, 假手术组大鼠肺组织中 NF-κB p65 核移位现象不明显, M7D 组则出现显著

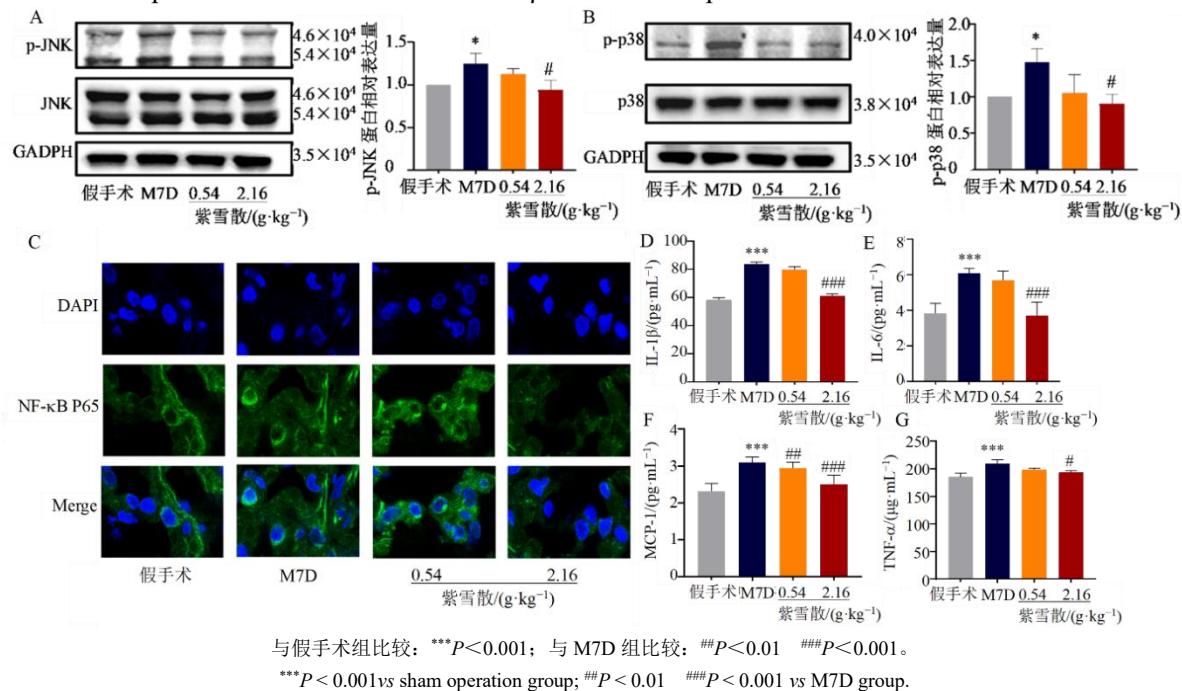


图 9 紫雪散对 STBI 大鼠肺组织中 p-JNK (A)、p-p38 (B) 蛋白, NF-κB p65 核移位 ($\times 100$, C) 及关键炎症因子水平(D~G) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 9 Effect of Zixue Powder on relative expression levels of p-JNK (A), p-p38 (B) protein, nuclear translocation of NF-κB p65 ($\times 100$, C), and levels of key inflammatory factors (D~G) in lung tissue of STBI rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

的 NF-κB p65 核移位, 高剂量紫雪散干预可有效抑制该核移位过程(图 9-C)。进一步研究发现, 与假手术组相比, M7D 组大鼠肺组织中 IL-1β、IL-6、TNF-α 及 MCP-1 的表达水平均显著升高($P<0.001$), 经高剂量紫雪散干预后, 上述炎症因子的水平均显著降低($P<0.05$ 、 0.001), 结果见图 9-D~G。

4 讨论

创伤后远端器官损伤是无菌性组织损伤的主要继发性并发症, 而创伤后患者的感染问题已成为困扰患者康复与临床护理的重大挑战。伴有感染性并发症的创伤患者, 其循环系统中的细胞免疫功能成分存在明显受损, 这提示重型 STBI 可诱发外周免疫抑制状态。STBI 相关免疫抑制主要表现为淋巴细胞转化功能下降、外周血及脾脏淋巴细胞计数减少、自然杀伤(NK) 细胞数量降低, 同时中性粒细胞的防御功能也存在缺陷^[20]。下丘脑-垂体-肾上腺轴释放的儿茶酚胺与糖皮质激素, 在调控 TBI 后全身免疫细胞功能中发挥关键作用; 脑损伤可激活肾上腺素能神经支配, 导致淋巴细胞功能衰退并进一步引发淋巴细胞减少^[21-22]。此外, 免疫细胞向中枢神经系统的定向募集, 也可能是造成外周血淋巴细胞减少的重要原因^[23]。这种免疫功能紊乱会导致远端组织(如肺组织)受累, 表现为局部炎症反应加剧, 进而增加细菌感染的易感性^[24]。其他中枢神经系统损伤(如缺血性脑卒中、颅内出血及蛛网膜下腔出血)的相关研究也证实, 免疫抑制状态会显著提高损伤后感染的发生率^[23]。

在创伤早期, 神经元损伤与神经胶质细胞激活会促使趋化因子、细胞因子及活性氧(ROS) 大量产生, 并释放损伤相关分子模式(DAMP), 从而引发机体无菌性炎症反应, 而这种炎症状态又可能进一步诱发感染。STBI 后释放的 DAMP 分子主要包括高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)、S100 蛋白家族及热休克蛋白等。先天免疫细胞可通过模式识别受体识别这些 DAMP 分子, 经抗原呈递等信号传递过程诱发肺部水肿及炎症反应。同时, TBI 可激活下丘脑-垂体-肾上腺轴与交感神经系统, 导致儿茶酚胺、胰高血糖素等激素水平升高, 促进糖原分解并引发代谢亢进, 最终使机体呈现高血糖状态^[25], 而高血糖会显著增加患者呼吸道感染的易感性^[26]。结合本研究结果推测, STBI 后肺部炎症的高发可能与血糖水平及 AGEs、RAGE 的表达水平密切相关。其中, AGE-RAGE 信号通路的激活是启动下游炎症

级联反应的关键环节。已有研究证实, AGEs 与 RAGE 结合后可直接激活丝 MAPK 通路(如 p38 MAPK), 并驱动 NF-κB 信号通路的转导^[27-28]; 被激活的 MAPK 还可进一步促进 NF-κB 向细胞核内转移, 进而启动 TNF-α、IL-6 等促炎因子的转录, 形成炎症放大效应^[28]。这一发现为包括肺感染在内的创伤后远端器官损伤, 提供了新的防治靶点。

本研究在网络药理学技术的预测提示下, 明确紫雪散治疗 STBI 继发肺感染的核心靶点可能为 NF-κB、TNF、MAPK14、IL6、IL-1β、INS、TP53、CASP3、IL-10、MMP9、FGF2、CCL2 等, 这些核心靶点多集中于炎症调控与免疫应答相关通路, 直接参与 STBI 继发肺感染的病理进程。通过进一步的 KEGG 富集分析, 不仅证实紫雪散主要参与炎症反应相关的生理过程, 还进一步锁定 AGE-RAGE 信号通路为紫雪散发挥药效的核心调控通路。研究结果显示, 紫雪散可通过调控 AGE-RAGE 信号通路, 抑制下游炎症通路的激活及促炎因子的产生, 从而减轻 STBI 模型大鼠的肺部炎症损伤, 提示紫雪散有望成为预防 STBI 继发肺感染的潜在临床用药。

本研究将非靶向代谢组学与网络药理学技术^[29]相结合, 不仅明确了“胰高血糖素代谢紊乱”是 STBI 继发肺感染过程中的关键病理环节, 还通过反向预测与实验验证, 证实 AGE-RAGE 信号通路为紫雪散干预该疾病的核心作用通路, 形成了“现象发现-靶点预测-实验验证”的完整研究闭环。在机制研究方面, 本研究首次提出并证实“紫雪散通过调控 AGE-RAGE/MAPK/NF-κB 信号轴发挥抗炎作用”的核心机制, 不过相关机制的挖掘深度仍有待进一步加强。尽管 AGE-RAGE 通路已被验证为核心调控通路, 但紫雪散中特定活性成分与该通路关键节点的直接相互作用仍不明确, 后续研究可结合靶点垂钓技术深入解析, 并利用条件性基因敲除动物模型开展更精准的机制验证。此外, 本研究采用的动物模型虽能较好地模拟 STBI 继发肺感染的关键病理过程, 但与人体复杂的临床环境仍存在差异——人体创伤常伴随多器官损伤、基础疾病等复杂因素, 动物模型难以完全复刻。因此, 未来需进一步收集临床样本, 开展更具针对性的疾病机制研究与防治方案优化。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Miao Y L, Fan X J, Wei L G, et al. L zhong decoction

- ameliorates pulmonary infection secondary to severe traumatic brain injury in rats by regulating the intestinal physical barrier and immune response [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 311: 116346.
- [2] Lim S H, Jung H, Youn D H, et al. Mild traumatic brain injury and subsequent acute pulmonary inflammatory response [J]. *J Korean Neurosurg Soc*, 2022, 65(5): 680-687.
- [3] Hanscom M, Loane D J, Shea-Donohue T. Brain-gut axis dysfunction in the pathogenesis of traumatic brain injury [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(12): e143777.
- [4] Chou Y F, Weng W C, Huang W Y. Association between gastrointestinal bleeding and 3-year mortality in patients with acute, first-ever ischemic stroke [J]. *J Clin Neurosci*, 2017, 44: 289-293.
- [5] Sharma R, Shultz S R, Robinson M J, et al. Infections after a traumatic brain injury: The complex interplay between the immune and neurological systems [J]. *Brain Behav Immun*, 2019, 79: 63-74.
- [6] Schirmer-Mikalsen K, Moen K G, Skandsen T, et al. Intensive care and traumatic brain injury after the introduction of a treatment protocol: A prospective study [J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2013, 57(1): 46-55.
- [7] Burns K E A, Rizvi L, Cook D J, et al. Ventilator weaning and discontinuation practices for critically ill patients [J]. *JAMA*, 2021, 325(12): 1173-1184.
- [8] Maramattom B V, Weigand S, Reinalda M, et al. Pulmonary complications after intracerebral hemorrhage [J]. *Neurocrit Care*, 2006, 5(2): 115-119.
- [9] 李晓捷, 王宏勤. 颅脑损伤病人术后继发多重耐药菌肺部感染风险 Nomogram 模型构建与验证 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2024, 22(8): 1521-1526.
- Li X J, Wang H Q. Construction and verification of Nomogram model for the risk of pulmonary infection secondary to multidrug-resistant bacteria in patients with craniocerebral injury after operation [J]. *Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis*, 2024, 22(8): 1521-1526.
- [10] Henriquez A R, Snow S J, Schladweiler M C, et al. Adrenergic and glucocorticoid receptor antagonists reduce ozone-induced lung injury and inflammation [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 339: 161-171.
- [11] 任金国, 杨启发. 紫雪散治疗外科感染伤口的临床观察 [A] // 2008 年中医外科学术年会论文集 [C]. 济南: 枣庄市中医医院, 2008: 96-97.
- Ren J G, Yang Q F. Clinical Observation of Zixue Powder in the treatment of surgical infected wounds [A] // Chinese Association of Traditional Chinese Medicine Surgery Branch, Shandong Association of Traditional Chinese Medicine Surgery Professional Committee. Proceedings of the 2008 Annual Conference on Traditional Chinese Medicine Surgery [C]. Jinan: Zaozhuang City Hospital of Traditional Chinese Medicine, 2008.
- [12] 张玉佩, 路岩莉, 孙丹, 等. 短期服用紫雪防治小儿反复热性惊厥复发的临床观察 [J]. 内蒙古中医药, 2022, 41(5): 1-3.
- Zhang Y P, Lu Y L, Sun D, et al. Clinical observation on prevention of recurrent febrile seizure in children by short-term administration of Zixue [J]. *Inn Mong J Tradit Chin Med*, 2022, 41(5): 1-3.
- [13] Zhang Y L, Zhang Z G, Chopp M, et al. Treatment of traumatic brain injury in rats with *N*-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline [J]. *J Neurosurg*, 2017, 126(3): 782-795.
- [14] de Magalhães R F, Samary C S, Santos R S, et al. Variable ventilation improves pulmonary function and reduces lung damage without increasing bacterial translocation in a rat model of experimental pneumonia [J]. *Respir Res*, 2016, 17(1): 158.
- [15] Zhang H Y, Song X J, Ge S N, et al. Zixue Powder attenuates septic thrombosis via reducing neutrophil extracellular trap through blocking platelet STING activation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 331: 118337.
- [16] Miao Y, Fan X, Wei L, et al. Lizhong decoction ameliorates pulmonary infection secondary to severe traumatic brain injury in rats by regulating the intestinal physical barrier and immune response [J]. *J of Ethnopharmacol*, 2023, 311: 116346.
- [17] Jandeleit-Dahm K, Watson A, Soro-Paavonen A. The AGE/RAGE axis in diabetes-accelerated atherosclerosis [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2008, 35(3): 329-334.
- [18] Oczypok E A, Perkins T N, Oury T D. All the “RAGE” in lung disease: The receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is a major mediator of pulmonary inflammatory responses [J]. *Paediatr Respir Rev*, 2017, 23: 40-49.
- [19] Salehi M, Amiri S, Ilghari D, et al. The remarkable roles of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and its soluble isoforms in COVID-19: The importance of RAGE pathway in the lung injuries [J]. *Indian J Clin Biochem*, 2023, 38(2): 159-171.
- [20] Hazeldine J, Naumann D N, Toman E, et al. Prehospital immune responses and development of multiple organ dysfunction syndrome following traumatic injury: A prospective cohort study [J]. *PLoS Med*, 2017, 14(7): e1002338.
- [21] Cabrera-Maqueda J M, Fuentes Rumí L, Valero López G, et al. Antibiotic diffusion to central nervous system [J].

- Rev Esp Quimioter, 2018, 31(1): 1-12.
- [22] Zhang J, Shi K B, Li Z G, et al. Organ- and cell-specific immune responses are associated with the outcomes of intracerebral hemorrhage [J]. FASEB J, 2018, 32(1): 220-229.
- [23] Shi S X, Shi K B, Liu Q. Brain injury instructs bone marrow cellular lineage destination to reduce neuroinflammation [J]. Sci Transl Med, 2021, 13(589): eabc7029.
- [24] Hoyer F F, Naxerova K, Schloss M J, et al. Tissue-specific macrophage responses to remote injury impact the outcome of subsequent local immune challenge [J]. Immunity, 2019, 51(5): 899-914.e7.
- [25] Kerby J D, Griffin R L, MacLennan P, et al. Stress-induced hyperglycemia, not diabetic hyperglycemia, is associated with higher mortality in trauma [J]. Ann Surg, 2012, 256(3): 446-452.
- [26] Ballegeer M, Saelens X. Cell-mediated responses to human metapneumovirus infection [J]. Viruses, 2020, 12(5): 542.
- [27] Reynaert N L, Vanfleteren L E G W, Perkins T N. The AGE-RAGE axis and the pathophysiology of multimorbidity in COPD [J]. J Clin Med, 2023, 12(10): 3366.
- [28] Zhong H H, Ji J J, Zhuang J L, et al. Tissue-resident macrophages exacerbate lung injury after remote sterile damage [J]. Cell Mol Immunol, 2024, 21(4): 332-348.
- [29] 张文静, 尚子慧, 孙孝亚, 等. 基于代谢组学和网络药理学探究山茱萸多糖改善2型糖尿病合并非酒精性脂肪性肝病的作用机制 [J]. 中草药, 2025, 56(15): 5463-5475
Zhang W J, Shang Z H, Sun X Y, et al. Mechanism of *Corni Fructus* polysaccharides in improving type 2 diabetes combined with non-alcoholic fatty liver disease based on metabolomics and network pharmacology. [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(15): 5463-5475

[责任编辑 孙英杰]