

基于网络药理学和多中心临床数据的清肺承气汤治疗腹腔感染所致急性呼吸窘迫综合征的作用机制研究

王馨培¹, 王子玉², 傅强^{1,3*}, 杜超⁴, 巩传勇⁵, 王兵⁶

1. 天津医科大学研究生院, 天津 300070
2. 湖北省中西医结合医院 重症医学科, 湖北 武汉 430015
3. 天津市第四中心医院 重症医学科, 天津 300140
4. 天津中医药大学第一附属医院 急诊部, 天津 300193
5. 天津市南开医院 重症医学科, 天津 300102
6. 天津市第一中心医院 重症医学科, 天津 300190

摘要:目的 采用网络药理学和多中心临床数据探讨清肺承气汤治疗腹腔感染所致急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 的作用机制。方法 通过中药系统药理学分析平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP) 数据库检索清肺承气汤的化学成分和靶点。采用 Cytoscape 3.7.1 软件建立“化合物-靶点”网络、靶点间的蛋白相互作用 (protein protein interaction, PPI) 网络, 并对预测靶点进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析。从 3 所医院选取 27 例腹腔感染所致 ARDS 患者, 随机分为 13 例对照组和 14 例清肺承气汤组, 分别于治疗前后 3 d 取肺泡灌洗液, 微球检测法检测患者肺泡灌洗液中白细胞介素-4 (interleukin 4, IL-4)、白细胞介素-6 (interleukin 6, IL-6)、白细胞介素-10 (interleukin 10, IL-10) 水平; 流式细胞术检测患者肺泡巨噬细胞的凋亡情况。结果 筛选得到清肺承气汤中 78 种活性成分, 对应 63 个潜在靶点; “化合物-靶点”网络和 PPI 网络度值靠前的靶点为过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptor γ , PPAR γ)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、IL-6、IL-10、 γ 干扰素 (interferon-gamma, INFG), 化合物为槲皮素和木犀草素; 潜在靶点的 KEGG 通路排序靠前的炎症相关通路为核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 信号通路、白细胞介素-17 (interleukin 17, IL-17) 通路、T 细胞受体通路等信号通路。与对照组比较, 清肺承气汤组患者肺泡灌洗液中 IL-6 水平显著升高 ($P < 0.05$), IL-10 水平显著降低 ($P < 0.05$), 肺泡巨噬细胞的凋亡面积显著降低 ($P < 0.001$)。结论 清肺承气汤中的有效成分可以通过 IL-6、Bcl-2、IL-10、趋化因子配体 2 (CXC chemokine ligand 2, CXCL2) 等靶点参与调控多条信号通路来影响 IL-4、IL-6、IL-10 分泌和细胞凋亡, 从而治疗 ARDS。

关键词: 清肺承气汤; 腹腔感染; 急性呼吸窘迫综合征; 网络药理学; 槲皮素; 木犀草素; 白细胞介素; 凋亡

中图分类号: R285.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)02-0437-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.02.017

Mechanism of Qingfei Chengqi Decoction on acute respiratory distress syndrome caused by abdominal infection based on network pharmacology and multi-center clinical data

WANG Xin-pei¹, WANG Zi-yu², FU Qiang^{1,3}, DU Chao⁴, GONG Chuan-yong⁵, WANG Bing⁶

1. Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China
2. Department of Critical Medicine, Hubei Provincial Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Wuhan 430015, China
3. Department of Critical Medicine, Tianjin Fourth Central Hospital, Tianjin 300140, China
4. Emergency Department, The First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China
5. Department of Critical Medicine, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300102, China
6. Department of Critical Medicine, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300190, China

收稿日期: 2020-06-06

基金项目: 天津市卫生行业重点攻关项目 (15KG121)

作者简介: 王馨培, 硕士研究生, 研究方向为外科危重症的中西医结合治疗。E-mail: qq563531789@163.com

*通信作者: 傅强 E-mail: 13920864938@163.com

Abstract: Objective To elucidate the underlying molecular mechanism of Qingfei Chengqi Decoction (清肺承气汤) in treatment of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS) caused by abdominal infection using network pharmacology and multi-center clinical data. **Methods** Through the database of Chinese Medicine System Pharmacology Analysis Platform (TCMSP), the chemical constituents and targets of Qingfei Chengqi Decoction was retrieved. Cytoscape 3.7.1 software was used to establish a “compound-target” network, a predicted protein-protein interaction (PPI) network between predicted targets, and a KEGG enrichment analysis of predicted targets. A total of 27 patients with ARDS due to celiac infection were selected from three hospitals and were randomly divided into Qingfei Chengqi Decoction group (14 cases) and control group (13 cases). Alveolar lavage fluid was taken 3 d before and after treatment; Levels of IL-4, IL-6, IL-10 were detected by microsphere detection; Alveolar macrophage apoptosis was analyzed by flow cytometry. **Results** A total of 78 active compounds and 63 potential targets of Qingfei Chengqi Decoction were screened. From “compound-target” network and PPI network, targets ranked the top were PPAR γ , Bcl-2, IL-6, IL-10 and INFG; Compounds were quercetin and luteolin. Inflammatory pathways ranked higher in KEGG pathway analysis were NF- κ B, TNF signaling pathway, IL-17 pathway and T cell receptor pathway. Compared with control group, level of IL-6 was significantly increased ($P < 0.05$), level of IL-10 was significantly decreased ($P < 0.05$), and apoptotic area of alveolar macrophages was significantly decreased ($P < 0.001$) in Qingfei Chengqi Decoction group. **Conclusion** Compounds in Qingfei Chengqi Decoction could regulate multiple signal pathways through targets such as IL-6, Bcl-2, IL-10, and CXCL2 to regulate the secretion of IL-4, IL-6, IL-10 and cell apoptosis to treat ARDS. **Key words:** Qingfei Chengqi Decoction; abdominal infection; acute respiratory distress syndrome; network pharmacology; quercetin; luteolin; interleukin; apoptosis

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 为重症监护室的常见病种, 死亡率达到 20%~50%^[1]。创伤、感染、药物等均可诱发 ARDS, 而对于外科重症监护病房中的 ARDS 患者, 严重腹腔感染是最常见的诱因^[2-3]。研究表明, ARDS 的发病机制为肺部促炎反应与抗炎反应失衡, 造成肺部炎症紊乱。目前 ARDS 以基础治疗和支持治疗为主, 对肺部炎症进展治疗欠佳, 因此寻找有效的药物对治疗 ARDS 有重要意义。

清肺承气汤由小承气汤与小陷胸汤组成, 首见于张仲景所著的《伤寒杂病论》。小承气汤由大黄、枳实、厚朴组成, 3 味同煎, 枳实、厚朴减少用量, 泻热攻下之力较轻, 适用于阳明热盛、燥屎初结、痞满而实、燥坚不甚之腑实证^[4]。小陷胸汤主治痰热互结之结胸证, 方中黄连清热泻火, 半夏化痰开结, 2 药合用, 辛开苦降、善治痰热内阻; 以栝楼实荡热涤痰、宽胸散结, 3 药共奏清热化痰、宽胸散结之功^[5]。两方合用可轻下热结、清热化痰, 在中医理论上吻合腹腔感染、阳明热结所致肺损伤痰多喘息之证。课题组前期研究发现, 清肺承气汤对于 ARDS 患者有明确的治疗效果, 但其具体药效物质基础和作用机制尚不明确^[6-7]。本研究基于网络药理学方法对清肺承气汤治疗 ARDS 的潜在靶点和作用机制进行预测, 并通过对临床患者的数据分析, 探讨清肺承气汤对细胞因子和肺巨噬细胞凋亡的影响。

1 材料

1.1 网络药理学材料

中药系统药理学分析平台 (TCMSP, [http://lsp.](http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php)

nwu.edu.cn/tcmsp.php), GeneCards 知识库 (<https://www.genecards.org/>), Cytoscape 3.7.1 软件 (<https://cytoscape.org/>), OMIM 数据库 (<https://omim.org/>), STRING 数据库 (<https://string-db.org/>), DAVID 6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>)。

1.2 临床研究的一般资料

选自 2016 年 6 月—2018 年 3 月于天津市南开医院、天津市第一中心医院、天津市第四中心医院重症加强治疗病房 (ICU) 收治的严重腹腔感染所致 ARDS 患者为研究对象, 所有患者均签署知情同意书, 并通过天津市第四中心医院伦理委员会审查 (伦理批件号 SZXLL-2015-030)。

纳入标准: 1 周内起病、新发或恶化的呼吸症状; 双肺模糊影不能完全由渗出、肺塌陷或结节来解释; 不能完全由心力衰竭或容量过负荷解释的呼吸衰竭; 没有发现危险因素时可行超声心动图等检查排除血流源性肺水肿, 呼气末正压通气 (positive end-expiratory pressure, PEEP) ≥ 5 cm H₂O 时, 100 mm Hg $< p(\text{O}_2)/\text{FiO}_2 \leq 200$ mm Hg 或 $p(\text{O}_2)/\text{FiO}_2 \leq 100$ mm Hg; 腹腔感染符合脓毒症诊断标准^[8]; 气管插管机械通气治疗; 年龄 > 18 岁且 < 80 岁; 患者及其家属知情同意。

排除标准: 发病 24 h 内死亡者, 或临终状态; 合并外伤、免疫缺陷性疾病、严重心血管疾病、终末期肝肾疾病、恶性肿瘤; 近期内使用免疫抑制剂 (如激素等); 艾滋病或慢性炎症性疾病 (如类风湿性关节炎); 各种原因中途退出者。

1.3 仪器

纤维支气管镜购自 Olympus 公司、液相芯片悬

浮系统购自 Flexmap 3D 公司; 免疫分析试剂盒、手持式磁力洗板机、涡流搅拌机、微量滴定板机、流式细胞仪均购自 Thermo Fisher Scientific 公司。

2 方法

2.1 清肺承气汤活性成分的筛选

在 TCMSP 数据库中输入关键词“大黄、枳实、厚朴、黄连、半夏、栝楼”得出化合物信息。计算机模拟吸收、分布、代谢和排泄系统评估模型用于评估清肺承气汤的潜在活性成分。口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) 用于评估体内药物的药动学和药物形成特性, 药物相似性 (drug-likeness, DL) 用于评估分子在生物利用度等方面的“药物样”程度, 根据 $DL \geq 0.18$ 、 $OB \geq 30\%$ 对化合物进行筛选。

2.2 药物活性成分对应靶点和 ARDS 相关靶点的搜集

利用 TCMSP 对 78 种活性成分的对应靶点进行统计, 在 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库中查找 ARDS 疾病的相关靶点。

2.3 “化合物-疾病-靶点”和蛋白相互作用 (protein protein interaction, PPI) 网络的构建

利用 R 语言得到化合物、疾病和靶点的共同作用靶点, 基于 STRING 构建 PPI 网络模型, 相互作用置信度 > 0.4 , 采用 Cytoscape 3.7.1 软件构建“化合物-疾病-靶点”网络。

2.4 京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析

通过 DAVID 数据库对疾病和化合物的关键靶点进行 KEGG 富集分析。

2.5 临床研究的分组与治疗方法

共纳入 ARDS 患者 27 例, 随机分为对照组 (13 例) 和治疗组 (14 例)。对照组参照 2012 年脓毒症指南^[8], 进行抗感染、改善循环、血液净化、机械通气支持等治疗; 治疗组在对照组基础上给予清肺承气汤治疗。清肺承气汤由大黄、枳实、厚朴、黄连、半夏、瓜蒌组成, 制成的中药颗粒规格: 3 g/袋; 2 袋中药颗粒溶于 200 mL 温水口服或胃管注入, 4 袋中药颗粒溶于 400 mL 温水, 保留灌肠, 2 次/d。

2.6 患者一般情况的统计

根据患者入院后的血常规、血气分析值和生命体征计算 24 h 内的 APACHE II 评分, 统计患者年龄、性别等基本信息和 ICU 住院时间、总住院费用以及治

疗 3 d 后死亡状况。

2.7 肺泡灌洗液的采集

操作前了解患者病情、主要病征和生理状态, 备好呼吸、血压、心电、氧饱和度检测和急救的器材及药物。术前 iv 5 mg 咪唑安定, 2%利多卡因经气道雾化, 行气道局部黏膜麻醉; 纤维支气管镜经气管插管插入气管, 嵌入右肺中叶或左肺舌叶段支气管管口, 注入 2~3 mL 2%利多卡因局麻后, 用 50 mL 注射器将 37 °C 生理盐水分次注入, 每次 25~50 mL, 总量 100~300 mL; 注入后立即通过负压吸引装置吸引、回收至硅质灌洗液收集瓶内; 回收液用双层无菌纱布滤过, 除去黏液, 记录总回收液量, 装入硅质容器中; 灌洗液 1500 r/min 离心 15 min, 弃去上清液, PBS 洗涤, 调整细胞密度为 1×10^6 /mL, 接种于 96 孔板, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

2.8 观察指标

2.8.1 细胞因子分泌 将肺泡灌洗液以涡流法搅拌均匀, $10\,000 \times g$ 离心 5~10 min 去除颗粒。将珠瓶涡旋 30 s, 加入 5 mL 珠溶液, 涡流 30 s。使用多通道移液管将 50 μ L 珠状混合物加入 96 孔板中, 加入样品类型特异性缓冲液、样品各 25 μ L, 孵育后清洗磁珠并加入抗体混合物, 封闭磁珠, 摇床室温孵育 30 min; 加入 50 μ L Streptavidin-PE, 封闭磁珠, 摇床室温孵育 30 min; 重悬磁珠, 加入 120 μ L 读数缓冲液, 封闭磁珠, 摇床室温孵育 30 min。在 Luminex 100/200 上将标准的期望浓度与每个标准生成的 MFI 作图, 计算细胞因子质量浓度。

2.8.2 肺巨噬细胞凋亡 肺泡灌洗液采集后的细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化, 调整至细胞密度为 5×10^4 /mL, $1000 \times g$ 离心 5 min, 弃上清, 加入 195 μ L Annexin V-FITC 结合液重悬细胞, 加入 5 μ L Annexin V-FITC 混匀; 加入 10 μ L 碘化丙啶 (PI) 染色液, 混匀, 室温避光孵育 10~20 min, 采用流式细胞仪上机检测。

2.9 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件分析数据。计量资料符合正态分布且方差齐的用 $\bar{x} \pm s$ 表示并用 t 检验统计分析, 不符合条件者以四分位数间距 (P25, P75) 表示, 并以秩和检验统计分析; 计数数据以率或构成比表示, 采用确切概率法。

3 结果

3.1 清肺承气汤活性成分的筛选结果

通过检索 TCMSP, 得到 78 个活性成分, 其中

与 大 黄 相 关 的 化 学 成 分 16 个，与 枳 实 相 关 的 化 学 成 分 14 个，与 半 夏 相 关 的 化 学 成 分 13 个，与 厚 朴 相 关 的 化 学 成 分 2 个，与 黄 连 相 关 的 化 学 成 分 11 个，见 表 1。

表 1 清肺承气汤活性成分信息

Table 1 Information of active compounds of Qingfei Chengqi Decoction

编号	活性成分	OB/%	DL
MOL002235	eupatin	50.80	0.41
MOL002251	mutatochrome	48.64	0.61
MOL002259	physciondiglucoside	41.65	0.63
MOL002260	procyanidin B-5,3'-O-gallate	31.99	0.32
MOL002268	rhein	47.07	0.28
MOL002276	sennoside E_qt	50.69	0.61
MOL002280	torachrysone-8-O-β-D-(6'-oxayl)-glucoside	43.02	0.74
MOL002281	toralactone	46.46	0.24
MOL002288	emodin-1-O-β-D-glucopyranoside	44.81	0.80
MOL002293	sennoside D_qt	61.06	0.61
MOL002297	daucosterol_qt	35.89	0.70
MOL002303	palmidin A	32.45	0.65
MOL000358	β-sitosterol	36.91	0.75
MOL000471	aloe-emodin	83.38	0.24
MOL000554	gallic acid-3-O-(6'-O-galloyl)-glucoside	30.25	0.67
MOL000096	(-)-catechin	49.68	0.24
MOL013276	poncirin	36.55	0.74
MOL013277	isosinensetin	51.15	0.44
MOL013279	5,7,4'-trimethylapigenin	39.83	0.30
MOL013428	isosakuranetin-7-rutinoside	41.24	0.72
MOL013430	prangenin	43.60	0.29
MOL013433	prangenin hydrate	72.63	0.29
MOL013435	poncimarín	63.62	0.35
MOL013436	isoponcimarín	63.28	0.31
MOL013437	6-methoxyaurapten	31.24	0.30
MOL013440	citrusin B	40.80	0.71
MOL001798	neohesperidin_qt	71.17	0.27
MOL001803	sinensetin	50.56	0.45
MOL001941	ammidin	34.55	0.22
MOL013352	obacunone	43.29	0.77
MOL002914	eriodyctiol (flavanone)	41.35	0.24
MOL004328	naringenin	59.29	0.21
MOL005100	5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) chroman-4-one	47.74	0.27
MOL005828	nobiletin	61.67	0.52
MOL005849	didymin	38.55	0.24
MOL000006	luteolin	36.16	0.25
MOL007879	tetramethoxyluteolin	43.68	0.37
MOL009053	(2S,3R)-5-E-3-hydroxyprop-1-enyl-7-methoxy-3-methylol-2,3-dihydrobenzofuran-2-yl-2-methoxy-phenol	50.76	0.39
MOL005970	eucalyptol	60.62	0.32
MOL005980	neohesperidin	57.44	0.27
MOL001454	berberine	36.86	0.78
MOL013352	obacunone	43.29	0.77
MOL002894	berberrubine	35.74	0.73
MOL002897	epiberberine	43.09	0.78
MOL002903	R-canadine	55.37	0.77
MOL002904	berlambine	36.68	0.82
MOL002907	corchoroside A_qt	104.95	0.78
MOL000622	magnograndiolide	63.71	0.19
MOL000762	palmidin A	35.36	0.65
MOL000785	palmatine	64.60	0.65

续表 1

编号	活性成分	OB/%	DL
MOL000098	quercetin	46.43	0.28
MOL001458	coptisine	30.67	0.86
MOL002668	worenine	45.83	0.87
MOL008647	moupinamide	86.71	0.26
MOL001755	24-ethylcholest-4-en-3-one	36.08	0.76
MOL002670	cavidine	35.64	0.81
MOL002714	baicalein	33.52	0.21
MOL002776	baicalin	40.12	0.75
MOL000358	β -sitosterol	36.91	0.75
MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76
MOL005030	gondoic acid	30.70	0.20
MOL000519	coniferin	31.11	0.32
MOL006936	10,13-eicosadienoic	39.99	0.20
MOL006937	12,13-epoxy-9-hydroxynonadeca-7,10-dienoic acid	42.15	0.24
MOL006957	(3S,6S)-3-(benzyl)-6-(4-hydroxybenzyl) piperazine-2,5-quinone	46.89	0.27
MOL003578	cycloartenol	38.69	0.78
MOL006967	β -D-ribofuranosidexanthine-9	44.72	0.21
MOL001494	mandenol	42.00	0.19
MOL002881	diosmetin	31.14	0.27
MOL004355	spinasterol	42.98	0.76
MOL005530	hydroxygenkwanin	36.47	0.27
MOL006756	schottenol	37.42	0.75
MOL007165	10 α -cucurbita-5,24-diene-3 β -ol	44.02	0.74
MOL007171	5-dehydrokarounidiol	30.23	0.77
MOL007172	7-oxo-dihydrokaro-unidiol	36.85	0.75
MOL007175	karounidiol 3-O-benzoate	43.99	0.50
MOL007179	linolenic acid ethyl ester	46.10	0.20
MOL007180	vitamin E	32.29	0.70

3.2 清肺承气汤治疗 ARDS 的潜在靶点筛选

从 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库共获得 ARDS 相关靶点 476 个, 从 TCMSP 数据库筛选清肺承气汤活性成分对应靶点 225 个, 将疾病和活性成分靶点进行交叉筛选获得共同潜在靶点 63 个, 如图 1 和表 2 所示。

3.3 清肺承气汤“化合物-疾病-靶点”网络的构建

如图 2 所示, “化合物-疾病-靶点”网络由 110 个节点(44 个化合物、63 个靶点)和 324 个边缘组成。红色四边形代表 ARDS, 蓝色六边形代表清肺承气汤, 紫色四边形代表化合物, 绿色圆圈代表靶点, 每条边代表靶点和化合物之间的相互关系, 网络图表明清肺承气汤通过多种成分靶向发挥各种治疗作用, 体现了中药方剂的特性。网络图中每个节点的度值代表与节点连接的线路的数量, 度值越大代表节点越重要。度值越高的化合物和靶点在清肺承气汤治疗 ARDS 过程中起到的作用越高, 见表 3。槲皮素与 52 个靶点相连, 通过调节 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 参与细胞凋亡, 通过调控白细胞介素发挥抗炎作用。多个靶点

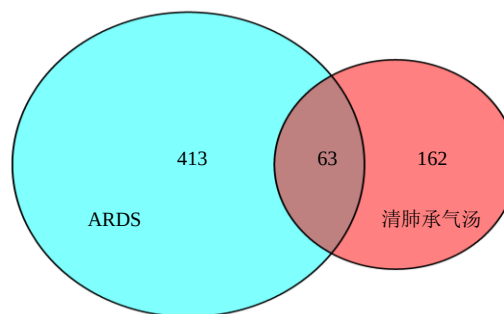


图 1 清肺承气汤治疗 ARDS 潜在靶点的韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of potential targets for Qingfei Chengqi Decoction in treatment of ARDS

与多个化合物相结合, 如 Bcl-2、雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1)、雄激素受体 (androgen receptor, AR) 分别与 7、16、19 个化合物结合, 在细胞增殖、炎症、细胞凋亡等方面起到关键作用。

3.4 清肺承气汤治疗 ARDS 潜在靶点的 PPI 网络构建

将 63 个潜在靶点通过 STRING 数据库构建 PPI 网络图, 见图 3, PPI 图有 68 个节点和 1078 条边,

表2 清肺承气汤治疗 ARDS 潜在靶点相关信息

Table 2 Information of potential targets of Qingfei Chengqi Decoction in treatment of ARDS

靶点	蛋白名称	靶点	蛋白名称
NOS2	nitric oxide synthase, inducible	IFNG	interferon gamma
AR	androgen receptor	CD40LG	CD40 ligand
ESR2	estrogen receptor β	MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14
KDR	vascular endothelial growth factor receptor 2	MMP3	stromelysin-1
PTGS1	prostaglandin G/H synthase 1	PLAU	urokinase-type plasminogen activator
ESR1	estrogen receptor	EGF	pro-epidermal growth factor
ADRB2	β -2 adrenergic receptor	HIF1A	hypoxia-inducible factor 1 α
BCL2	apoptosis regulator Bcl-2	CAV1	caveolin-1
IL-1 β	interleukin-1 β	F3	tissue factor
PPARG	peroxisome proliferator-activated receptor γ	CCL2	C-C motif chemokine 2
RELA	transcription factor p65	SELE	E-selectin
AKT1	RAC- α serine/threonine-protein kinase	VCAM1	vascular cell adhesion protein 1
MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1	CXCL8	interleukin-8
SOD1	superoxide dismutase [Cu-Zn]	NOS3	nitric oxide synthase, endothelial
CAT	catalase	CYP1B1	cytochrome P450 1B1
GSTP1	glutathione S-transferase P	PLAT	tissue-type plasminogen activator
UGT1A1	UDP-glucuronosyltransferase 1-1	THBD	thrombomodulin
ADIPOQ	adiponectin	SERPINE1	plasminogen activator inhibitor 1
GSK3B	glycogen synthase kinase-3 β	ALOX5	arachidonate 5-lipoxygenase
MMP9	matrix metalloproteinase 9	IL-1 α	interleukin-1 α
TIMP1	metalloproteinase inhibitor 1	MPO	myeloperoxidase
CREB1	cyclic AMP-responsive element-binding protein 1	NFE2L2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	AHR	aryl hydrocarbon receptor
BCL2L1	Bcl-2-like protein 1	CXCL2	C-X-C motif chemokine 2
MMP2	matrix metalloproteinase 2	CRP	C-reactive protein
IL-10	interleukin-10	CXCL10	C-X-C motif chemokine 10
IL-6	interleukin-6	IGFBP3	insulin-like growth factor-binding protein 3
NFKBIA	NF-kappa-B inhibitor α	IRF1	interferon regulatory factor 1
MMP1	interstitial collagenase	GSTM1	glutathione S-transferase Mu 1
HMOX1	heme oxygenase 1	EGLN1	Egl nine homolog 1
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	NR3C1	glucocorticoid receptor
IL-2	interleukin-2		

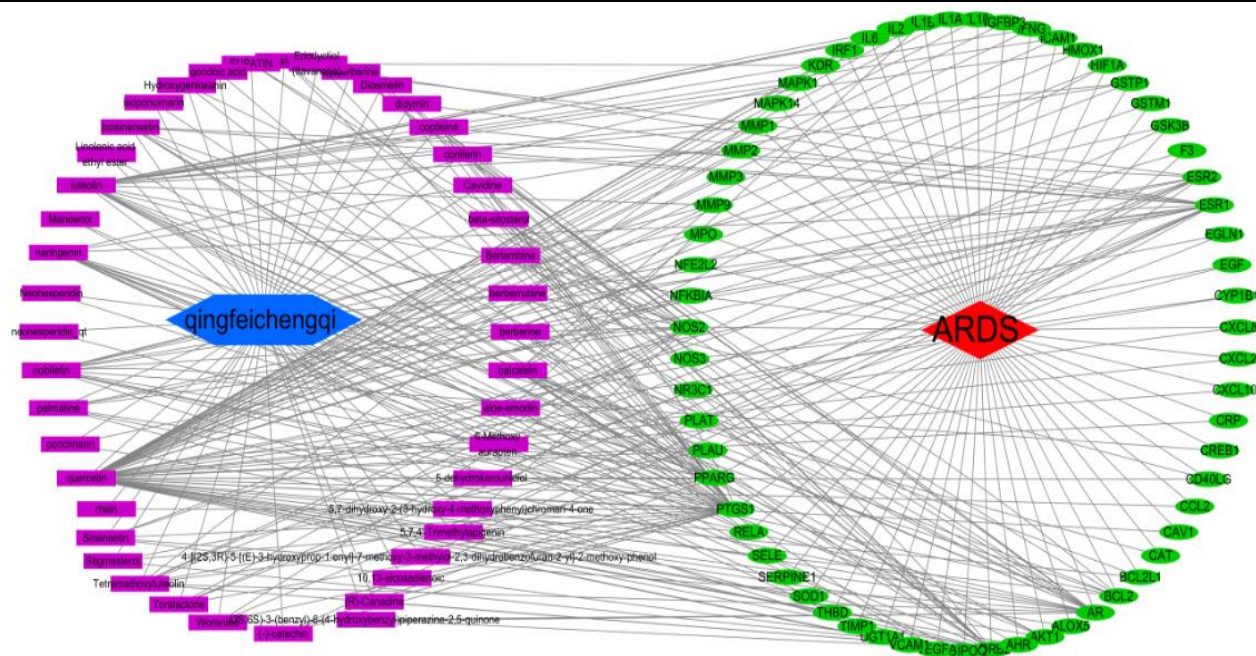


图2 清肺承气汤“化合物-疾病-靶点”网络

Fig. 2 “Compound-disease-target” network of Qingfei Chengqi Decoction

表 3 “化合物-疾病-靶点”网络关键点的拓扑学参数
Table 3 Topological parameters of key point in “compound-disease-target” network

ID 名称	类型	介数	度值
quercetin	化合物	2 919.547 000	52
PTGS1	靶点	2 064.282 700	37
luteolin	化合物	516.154 850	21
ADRB2	靶点	664.566 000	20
AR	靶点	566.801 640	19
NOS2	靶点	323.607 120	17
ESR1	靶点	350.658 140	16
naringenin	化合物	291.652 470	13
nobiletin	化合物	234.428 090	13
baicalein	化合物	228.717 160	12
PPARG	靶点	193.453 960	11
ESR2	靶点	111.593 155	9
tetramethoxyluteolin	化合物	119.399 025	9
isosinensetin	化合物	40.017 357	8
BCL2	靶点	67.614 740	7
β -sitosterol	化合物	37.497 640	7
palmitate	化合物	29.070 818	7
berberine	化合物	18.013 607	6
sinensetin	化合物	21.193 178	6

其中节点代表蛋白，连线代表蛋白与蛋白之间的相互作用。根据相关靶点间的数量即度值排序，度值越高，其起到的作用越关键，度值前 30 位的潜在靶点见图 4，存在较多与炎症密切相关的靶点，如排名第 1 位的白细胞介素-6 (interleukin 6, IL-6) 与巨噬细胞的分泌、肺组织细胞的修复密切相关，MacLaren 等^[9]发现 IL-6 可通过激活中性粒细胞，从而介导肝脏分泌大量急性期蛋白，最终促进炎症反应的爆发。

3.5 潜在靶点的 KEGG 通路分析

通过 DAVID 平台对 63 个靶点进行 KEGG 通路统计，63 个潜在靶点映射到 78 条 KEGG 通路，与炎症相关的通路 27 条，包括核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路、白细胞介素家族通路等；与细胞凋亡作用相关通路 11 条，包括 p53 通路、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 信号通路等。图 5 列出了 20 条最重要的通路。TNF 通路、NF- κ B 通路、T 细胞受体通路等与炎症的发生发展

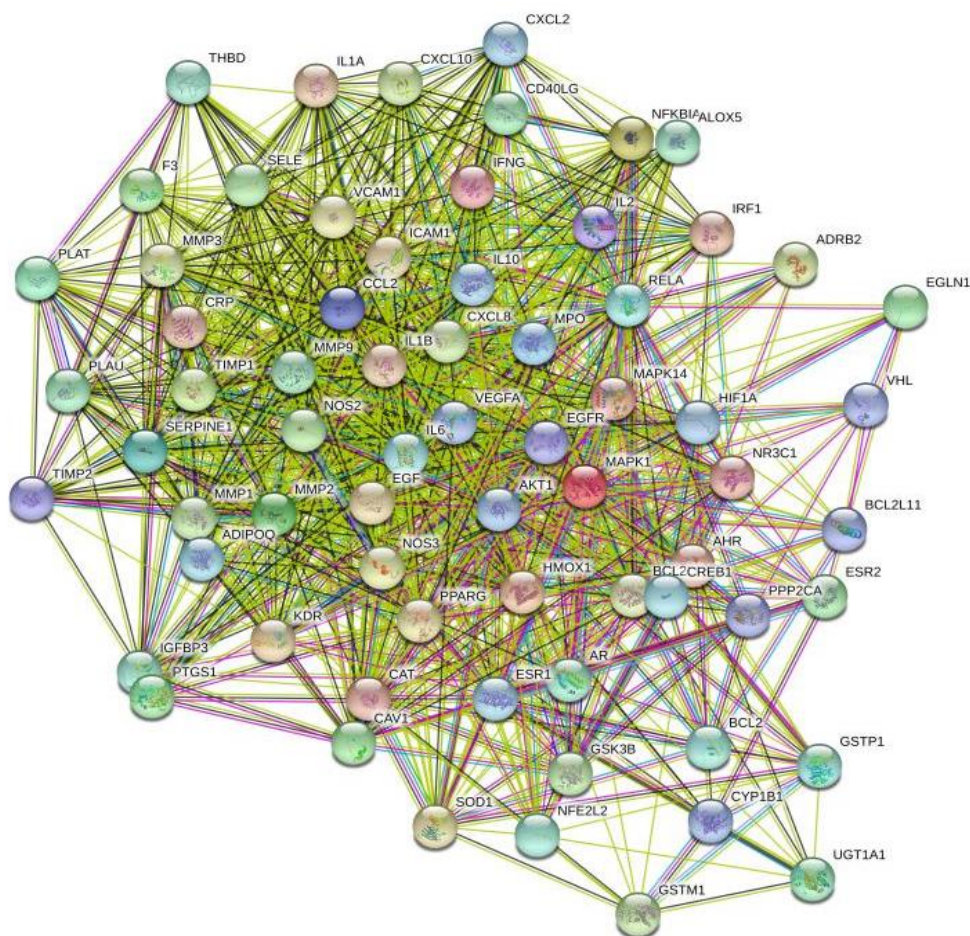


图 3 潜在靶点的 PPI 网络图

Fig. 3 PPI network of potential targets

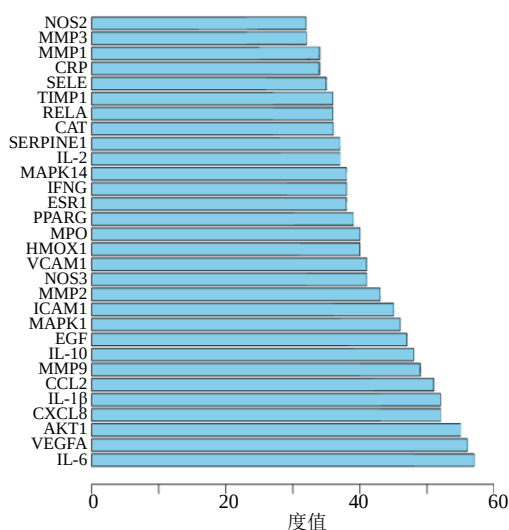


图 4 潜在靶点相关性排序

Fig. 4 Correlation ranking of potential targets

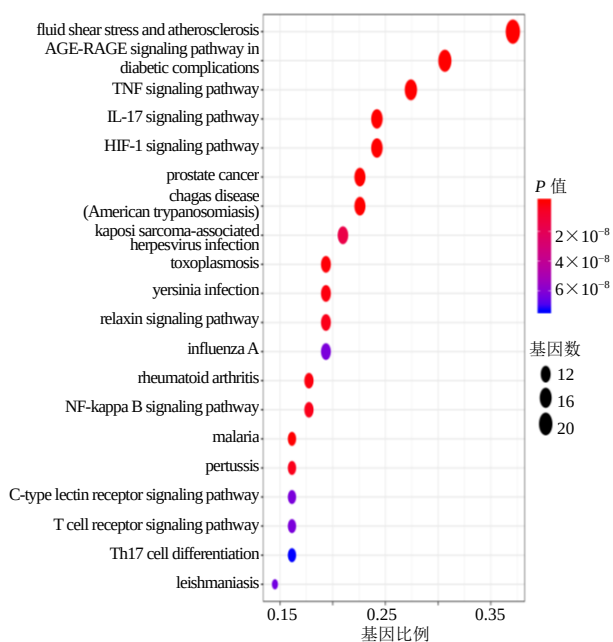


图 5 潜在治疗靶点的 KEGG 通路分析

Fig. 5 KEGG enrichment analysis of potential therapeutic targets

和细胞凋亡密切相关。TNF 通路属于细胞炎症和细胞凋亡的交互通路^[10]，既能通过活化 NF-κB 通路调节白细胞介素家族的分泌，又可通过 TNF-α 来调控细胞凋亡信号的活化。

3.6 清肺承气汤治疗腹腔感染所致 ARDS 的临床结果

3.6.1 患者一般资料比较 纳入严重腹腔感染所致 ARDS 患者 27 例，其中男性 19 例，女性 8 例；年龄 32~73 岁，平均 (54.19 ± 14.30) 岁；原发病：重症急性胰腺炎 20 例 (74.07%)，急性梗阻性化脓性胆管炎 5 例 (18.52%)，肠梗阻 2 例 (7.41%)；APACHE II 12~26 分，平均 (19.52 ± 7.07) 分；3 d 后死亡 11 例，存活 16 例，存活率 59.26%。治疗组患者年龄 (55.14 ± 12.89) 岁，对照组 (53.15 ± 16.15) 岁，差异无统计学意义；治疗组男性 9 例、女性 5 例，对照组男性 10 例、女性 3 例，性别比例无统计学意义；治疗组 APACHE II (17.36 ± 5.58) 分，对照组 APACHE II (21.84 ± 7.96) 分，差异无统计学意义。

3.6.2 2 组患者肺泡巨噬细胞凋亡比较 如图 6、表 4 所示，治疗前对照组和治疗组患者肺泡巨噬细胞凋亡无显著差异。与对照组治疗后比较，治疗组患者肺泡巨噬细胞凋亡显著降低 ($P < 0.001$)。

3.6.3 2 组患者肺泡细胞因子水平比较 如表 5 所示，治疗前 2 组患者肺泡白细胞介素-4(interleukin 4, IL-4)、IL-6、白细胞介素-10(interleukin 10, IL-10) 水平无明显差异，与对照组治疗后比较，治疗组患者肺泡 IL-6 水平显著升高 ($P < 0.05$)，IL-10 水平显著降低 ($P < 0.05$)。

4 讨论

中药复方具有多成分、多靶点、多功能的特点，如清肺承气汤有 6 味中药、78 个活性成分。网络药

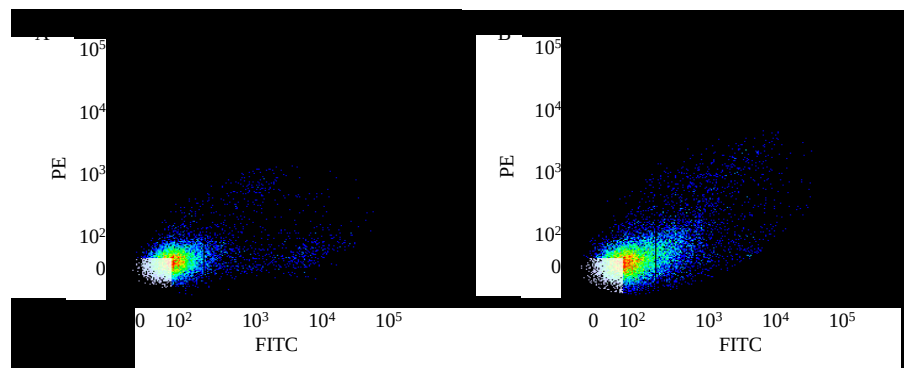


图 6 对照组 (A) 和治疗组 (B) 患者肺泡巨噬细胞的凋亡

Fig. 6 Apoptosis of alveolar macrophages of patients in control group (A) and treatment group (B)

表 4 对照组和治疗组患者肺泡巨噬细胞凋亡的比较

Table 4 Comparison of apoptosis of alveolar macrophages between control group and treatment group

组别	n	细胞凋亡 (P25, P75)	
		治疗前	治疗后
对照	13	17.59 (16.13, 19.61)	17.45 (17.18, 18.66)
治疗	14	18.90 (17.42, 19.66)	10.23 (7.74, 11.00) ####

与同组治疗前比较: ** $P < 0.01$; 与对照组治疗后比较: #### $P < 0.001$

** $P < 0.01$ vs the same group before treatment; #### $P < 0.001$ vs control group after treatment

表 5 对照组和治疗组患者肺泡细胞因子水平的比较

Table 5 Comparison of cytokine secretion between control group and treatment group

细胞因子	组别	n	肺泡细胞因子 (P25, P75) / (pg·mL ⁻¹)	
			治疗前	治疗后
IL-4	对照	13	0.32 (0.02, 5.28)	0.73 (0.55, 0.93)
	治疗	14	2.33 (1.42, 9.25)	4.16 (2.55, 6.68)
IL-6	对照	13	1.61 (0.06, 5.89)	2.01 (1.23, 2.17)
	治疗	14	1.17 (0.64, 3.72)	4.55 (3.03, 8.50) ***
IL-10	对照	13	0.85 (0.42, 1.21)	1.09 (0.42, 1.21)
	治疗	14	0.66 (0.37, 1.29)	0.29 (-0.37, 0.37) **

与同组治疗前比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与对照组治疗后比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs the same group before treatment; # $P < 0.05$ vs control group after treatment

理学将多向药理学和生物学结合,对大数据统计分析,在整体上考虑药物与疾病的相关性、系统性和整体性,从活性成分与疾病相互作用靶点出发,反映中药多成分-多靶点的作用关系,为阐明中药的复杂性提供了新的研究思路。本研究采用网络药理学建立“化合物-靶点”网络,分析清肺承气汤中活性成分治疗 ARDS 的作用机制。

肺泡上皮细胞和毛细血管内皮细胞损伤后,引起过度炎症反应和大量炎症细胞因子分泌,从而引发 ARDS。炎症细胞因子是在炎症过程中细胞分泌的小分子蛋白,参与炎症的发生、发展。IL-6 主要由 T 淋巴细胞分泌,部分由单核巨噬细胞合成释放。研究发现,地塞米松可以通过抑制内毒素介导的 ARDS 小鼠模型 IL-6 的分泌,从而减轻肺部炎症反应,缓解 ARDS 的病情发展^[11]。TNF 超家族由 19 个家族成员组成。研究发现,ARDS 发生过程中,TNF- α 表达明显增加。TNF- α 与肿瘤坏死因子受体 1 结合,进而活化 NF- κ B,上调细胞因子 IL-1、IL-8、IL-6 的表达,从而导致肺水肿的发生^[12-13];转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF β) 属于致病性细胞因子,参与急性肺损伤早期发展,可

以通过减少肺上皮细胞钠离子的转运,导致肺泡水肿,影响 ARDS^[14-15];炎症早期,M1 巨噬细胞产生 IL-1 β 、IL-6、IL-12 等促炎因子,M2 巨噬细胞产生抗炎细胞因子 IL-10^[16];急性肺损伤患者肺泡灌洗液中 IL-1 β 有较高生物活性,可以通过 p38 MAPK 通路,抑制上皮钠通道,促进炎症发展^[17];过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ (proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) 是核激素受体超家族的成员,其特定的 PPAR γ 受体激动剂罗格列酮可以抑制 ARDS 的炎症反应,防止细胞损伤^[18];趋化因子配体 2 (CXC chemokine ligand 2, CXCL2) 与趋化因子受体 4 (CXC chemokine receptor 4, CXCR4) 结合,加重炎症反应,与肺纤维化后急性炎症的病理发展相关^[19-20];鲁斯可皂苷元可通过抑制 Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4) /髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MYD88) /NF- κ B 信号通路保护肺泡上皮细胞,减少 ARDS 发病过程中的细胞凋亡^[10]。

IL-10 是肺内重要的内源性调节剂,在 ARDS 早期属于促炎性细胞因子,可诱导炎症级联反应和一氧化氮合酶的产生,一氧化氮的积累进一步加重 ARDS 的病情^[21-22]。IL-10 可通过抑制骨髓干细胞向 II 型肺泡表皮细胞的转化来促进 ARDS 发展^[23]。在 ARDS 后期,IL-10 可通过促进 M2 型巨噬细胞并抑制 M1 型巨噬细胞的转化起到炎症修复作用。D'Alessio 等^[24]发现 IL-4 可增强 ARDS 小鼠 M2 型巨噬细胞分化,促进肺组织修复。本研究临床数据显示清肺承气汤通过调节 IL-4、IL-6、IL-10 的分泌并抑制肺泡巨噬细胞的凋亡,影响 ARDS 不同阶段 M1 和 M2 型巨噬细胞的分化,促进肺组织修复,从而影响 ARDS 病情进展。

基于网络药理学分析得出,Bcl-2 为“化合物-靶点”网络中度值排前 10 位的靶点,可以通过其映射的 p53 通路和凋亡通路下调半胱氨酸蛋白酶 3,从而抑制细胞凋亡;TNF 信号通路作为 KEGG 通路排序靠前的通路,为凋亡作用的核心通路。IL-6、IL-10、AR、CXCL8、PPAR γ 等靶点属于 PPI 网络及“化合物-靶点”网络度值靠前的靶点,NF- κ B、T 细胞受体通路、白细胞介素信号通路在 KEGG 分析中为排序靠前的通路,表明清肺承气汤中的化合物可能调控 IL-6、IL-10、AR、CXCL8、PPAR γ 等多个靶点,以及上述多条炎症通路,调节患者白细胞介素的分泌。

本研究采用了网络药理学,对清肺承气汤治疗腹腔感染所致 ARDS 患者的临床数据进行了初步的潜在分子机制分析,结果显示,清肺承气汤通过多成分、多靶点、多通路作用于细胞因子和细胞凋亡,从而延缓疾病进展。本研究为 ARDS 的中西医结合治疗提供了新的思路和治疗靶点,课题组后续将通过动物实验和分子生物学实验对清肺承气汤的具体作用进行深入探究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yadav H, Thompson B T, Gajic O. Fifty years of research in ARDS: Is acute respiratory distress syndrome a preventable disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 195(6): 725-736.
- [2] 闫丽娜,傅强,杜超,等. 阳明腑实证合并急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征患者预后因素分析: 附 206 例多中心报告 [J]. *中华危重病急救医学*, 2015, 27(7): 548.
- [3] 杜超,傅强,巩传勇,等. 肺泡巨噬细胞吞噬功能对腹腔感染致 ARDS 患者预后的影响: 一项多中心研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2019, 31(4): 444-448.
- [4] 刘淼,庞立健,吕晓东,等. 急下存阴救阳明,结者散之疗腑实—白长川教授运用大承气汤治疗热结旁流证经验 [J]. *中国中医急症*, 2019, 28(8): 1485-1487.
- [5] 徐振东,付英凯,张成博,等. 《中医方剂大辞典》含小陷胸汤类方组方特点与配伍规律分析 [J]. *世界中医药*, 2019, 14(7): 1898-1902.
- [6] 李静,傅强,余杨梓. 清肺承气颗粒对重症急性胰腺炎患者感染期免疫反应的影响 [J]. *山东医药*, 2014, 54(8): 9-11.
- [7] 张艳敏,崔乃强,张淑坤. 清肺承气汤对重症腹腔感染大鼠急性肺损伤的影响 [J]. *中医杂志*, 2014, 55(21): 1856-1859.
- [8] 高戈,冯喆,常志刚,等. 2012 国际严重脓毒症及脓毒性休克诊疗指南 [J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25(8): 26-27.
- [9] MacLaren R, Stringer K A. Emerging role of anticoagulants and fibrinolytics in the treatment of acute respiratory distress syndrome [J]. *Pharmacotherapy*, 2007, 27(6): 860-73.
- [10] Wu Y, Wang Y, Gong S, et al. Ruscogenin alleviates LPS-induced pulmonary endothelial cell apoptosis by suppressing TLR4 signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125: 109868.
- [11] Qin M, Qiu Z. Changes in TNF- α , IL-6, IL-10 and VEGF in rats with ARDS and the effects of dexamethasone [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(1): 383-387.
- [12] Yamagata T, Yamagata Y, Nishimoto T, et al. The regulation of amiloride-sensitive epithelial sodium channels by tumor necrosis factor- α in injured lungs and alveolar type II cells [J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2009, 166(1): 16-23.
- [13] Hamacher J, Lucas R, Lijnen H R, et al. Tumor necrosis factor- α and angiostatin are mediators of endothelial cytotoxicity in bronchoalveolar lavages of patients with acute respiratory distress syndrome [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 166(5): 651-656.
- [14] Lucas R, Yue Q, Alli A, et al. The lectin-like domain of TNF increases ENaC open probability through a novel site at the interface between the second transmembrane and C-terminal domains of the α -subunit [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(45): 23440-23451.
- [15] Peters Dorothea M, István V, Lukasz W, et al. TGF- β directs trafficking of the epithelial sodium channel ENaC which has implications for ion and fluid transport in acute lung injury [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 111(3): 374-383.
- [16] Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 614.
- [17] Galam L, Soundararajan R, Breitziq M, et al. SOCS-1 rescues IL-1 β -mediated suppression of epithelial sodium channel in mouse lung epithelial cells via ASK-1 [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(20): 29081-29091.
- [18] Lee S, Kim W, Kang KP, et al. Agonist of peroxisome proliferator-activated receptor- γ , rosiglitazone, reduces renal injury and dysfunction in a murine sepsis model [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2005, 20(6): 1057-1065.
- [19] Dotan I, Werner L, Vigodman S, et al. CXCL12 is a constitutive and inflammatory chemokine in the intestinal immune system [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2010, 16(4): 583-92.
- [20] Shu H K, Yoon Y, Hong S, et al. Inhibition of the CXCL12/CXCR4-axis as preventive therapy for radiation-induced pulmonary fibrosis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79768.
- [21] Aisiku I P, Yamal J M, Doshi P, et al. Plasma cytokines IL-6, IL-8, and IL-10 are associated with the development of acute respiratory distress syndrome in patients with severe traumatic brain injury [J]. *Crit Care*, 2016, 20(1): 288.
- [22] Liu C H, Kuo S W, Ko W J, et al. Early measurement of IL-10 predicts the outcomes of patients with acute respiratory distress syndrome receiving extracorporeal membrane oxygenation [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1021.
- [23] Chen Z, Hu Y, Xiong T, et al. IL-10 promotes development of acute respiratory distress syndrome via inhibiting differentiation of bone marrow stem cells to alveolar type 2 epithelial cells [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(18): 6085-6092.
- [24] D'Alessio F R, Craig J M, Singer B D, et al. Enhanced resolution of experimental ARDS through IL-4-mediated lung macrophage reprogramming [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 310(8): 733-746.

[责任编辑 李亚楠]