

参附黄方通过抑制 GSDMD 介导的细胞焦亡减轻脓毒症诱导的小鼠肠损伤

吕媛媛^{1,2,3}, 赵春霞^{1,2,3}, 何莎莎^{1,2,3*}

1. 首都医科大学附属北京中医医院, 北京 100010

2. 北京市中医药研究所, 北京 100010

3. 中医感染性疾病基础研究北京市重点实验室, 北京 100010

摘要: **目的** 研究参附黄方对脓毒症肠损伤的治疗作用及其潜在机制。**方法** 采用超高效液相色谱-串联质谱 (ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 法检测参附黄方的主要入血成分。通过网络药理学分析参附黄方的物质基础和潜在作用机制。为验证网络药理学预测结果的可靠性, 采用分子对接技术分析参附黄方核心成分与目标靶点的相互作用。通过盲肠结扎穿孔 (cecal ligation and puncture, CLP) 手术构建小鼠脓毒症模型, 给予参附黄方干预后, 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色评估参附黄方对脓毒症小鼠肠损伤的治疗效果; 采用 ELISA 检测血清中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和 IL-6 的水平; 采用免疫荧光法检测肠道屏障蛋白紧密连接蛋白-1 (zonula occludens-1, ZO-1) 和闭合蛋白 (Occludin) 的表达; 采用 TUNEL 染色和免疫组化法评估细胞凋亡及消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) 蛋白表达; 采用 qRT-PCR 检测回肠组织 IL-1 β 、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cystein-aspartate protease-1, Caspase-1)、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)、GSDMD 的 mRNA 表达; 采用 Western blotting 检测回肠组织 NLRP3、Caspase-11、GSDMD-NT、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck, ASC)、Caspase-1 p20、IL-1 β 的蛋白表达。**结果** UPLC-MS/MS 检测到参附黄方 18 种主要的入血成分, 主要有人参皂苷 Rf、(+)-儿茶素-5-*O*-葡萄糖苷、人参皂苷 Rg₁、大黄酸和表儿茶素。网络药理学结果显示, IL-1 β 和 Caspase-1 为关键靶点; KEGG 富集分析显示靶点显著富集于细胞焦亡、NLRP3 炎症小体等通路。分子对接结果证实核心活性成分与关键靶点蛋白 (IL-1 β 、Caspase-1、NLRP3、GSDMD) 具有良好的结合活性。动物实验结果显示, 与模型组比较, 参附黄方治疗显著减轻脓毒症小鼠的肠损伤, 显著降低小鼠血清中促炎因子水平 ($P < 0.05$ 、 0.001), 增加肠道屏障蛋白的表达, 显著减少回肠组织细胞凋亡 ($P < 0.001$), 显著下调回肠组织中焦亡关键蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。**结论** 参附黄方可通过抑制 GSDMD 介导的细胞焦亡信号通路改善脓毒症小鼠肠损伤。

关键词: 脓毒症; 参附黄方; 细胞焦亡; 肠损伤; GSDMD; 人参皂苷 Rf; (+)-儿茶素-5-*O*-葡萄糖苷; 人参皂苷 Rg₁; 大黄酸; 表儿茶素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)16-5856-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.16.015

Shenfuhuang Formula alleviates sepsis-induced intestinal injury in mice by inhibiting GSDMD-mediated pyroptosis

LYU Yuanyuan^{1,2,3}, ZHAO Chunxia^{1,2,3}, HE Shasha^{1,2,3}

1. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100010, China

2. Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100010, China

3. Beijing Key Laboratory of Basic Research with Traditional Chinese Medicine on Infectious Diseases, Beijing 100010, China

Abstract: Objective To study the therapeutic effect and potential mechanism of Shenfuhuang Formula (参附黄方) on sepsis-induced intestinal injury. **Methods** Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was used to detect the main blood components of Shenfuhuang Formula. The material basis and potential mechanism of Shenfuhuang Formula were

收稿日期: 2025-03-29

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82174157); 国家自然科学基金面上项目 (82474315); 北京市自然科学基金资助项目 (7242219); 北京市医院管理中心“青苗”计划专项经费资助 (QML20231002)

作者简介: 吕媛媛, 硕士研究生, 研究方向为中医药防治感染性疾病机制。E-mail: lv_yyuan@163.com

*通信作者: 何莎莎, 副教授, 硕士生导师, 从事中医药防治感染性疾病机制研究。E-mail: hss_sara@126.com

analyzed through network pharmacology. To verify the reliability of network pharmacology prediction results, molecular docking technology was used to analyze the interaction between the core components of Shenfuhuang Formula and the target. A mouse sepsis model was constructed by cecal ligation and puncture (CLP) surgery, and after intervention with Shenfuhuang Formula, the therapeutic effect of Shenfuhuang Formula on intestinal injury in septic mice was evaluated using hematoxylin-eosin (HE) staining; ELISA was used to detect the levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 in serum; Immunofluorescence method was used to detect the expressions of intestinal barrier proteins zonula occludin-1 (ZO-1) and occludin; Cell apoptosis and gasdermin D (GSDMD) protein expression were evaluated using TUNEL staining and immunohistochemistry; qRT-PCR was used to detect the mRNA expressions of *IL-1 β* , cysteine aspartate protease-1 (*Caspase-1*), NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (*NLRP3*) and *GSDMD* in ileum; Western blotting was used to detect the protein expressions of NLRP3, Caspase-11, GSDMD-NT, apoptosis-associated speck (ASC), Caspase-1 p20 and IL-1 β in ileum. **Results** A total of 18 main blood components in Shenfuhuang Formula were detected by UPLC-MS/MS, including ginsenoside Rf, (+)-catechin-5-*O*-glucoside, ginsenoside Rg₁, rhein and epicatechin. The results of network pharmacology showed that IL-1 β and Caspase-1 were key targets; KEGG enrichment analysis showed that the target was significantly enriched in pathways such as cell apoptosis and NLRP3 inflammasome. The molecular docking results confirmed that the core active ingredient had good binding activity with key target proteins (IL-1 β , Caspase-1, NLRP3, GSDMD). The animal experiment results showed that compared with model group, Shenfuhuang Formula treatment significantly reduced intestinal injury in sepsis mice, significantly reduced the levels of pro-inflammatory factors in serum of mice ($P < 0.05, 0.001$), increased the expressions of intestinal barrier proteins, significantly reduced cell apoptosis in ileum ($P < 0.001$), and significantly down-regulated the expressions of key proteins of pyroptosis in ileum ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** Shenfuhuang Formula could improve intestinal injury in sepsis mice by inhibiting GSDMD-mediated pyroptosis signaling pathway.

Key words: sepsis; Shenfuhuang Formula; pyroptosis; intestinal injury; GSDMD; ginsenoside Rf; (+)-catechin-5-*O*-glucoside; ginsenoside Rg₁; rhein; epicatechin

脓毒症是机体对感染的失控性反应,进而导致危及生命的器官功能障碍^[1]。根据流行病学统计,全球每年发生超过 4 800 万例脓毒症病例,其中 1 100 万患者死亡,占全球死亡人数的 19.7%^[2]。肠道作为多器官功能衰竭的“驱动器”,在脓毒症中常遭受破坏,其屏障功能受损,成为多器官功能衰竭的关键始动因素^[3]。细胞焦亡是一种非凋亡和非坏死的细胞死亡形式,表现为细胞肿胀和膜破裂,并伴有炎症因子释放。研究发现,细胞焦亡通过加剧炎症反应和破坏上皮屏障,导致脓毒症诱导的肠道损伤^[4-6]。因此,靶向抑制细胞焦亡可能是治疗脓毒症诱导的肠道损伤的一个有效策略。

网络药理学整合了药理学和系统生物学,为探索中医的分子机制提供了一种整体分析方法。该方法能在分子水平阐明活性药物成分、蛋白质、基因及疾病之间的相互关系^[7-8]。其完整性和系统性等优点与多组分、多靶点中药化合物的特性相匹配,是中药研究的有力方法^[9-10]。分子对接是验证网络药理学预测可靠性以及计算机辅助新药设计^[11]。参附黄方由人参、附子和大黄组成,在过去 20 年的临床实践中被证实对脓毒症患者有效。近年来,参附黄方在治疗合并脓毒症的新型冠状病毒感染患者中也显示出良好的疗效^[12]。然而,参附黄方对

脓毒症引起的肠损伤的关键活性成分及潜在作用机制目前尚不清楚。本研究通过超高效液相色谱-串联质谱 (ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)、网络药理学分析和分子对接验证等方法,探讨参附黄方改善脓毒症肠损伤的主要活性成分和潜在作用机制,并进一步构建脓毒症小鼠模型,明确参附黄方通过靶向消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) 介导的细胞焦亡,从而改善脓毒症肠损伤的机制。本研究为参附黄方治疗脓毒症的临床应用提供科学依据和潜在靶点。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,6~8 周龄,体重 (20 $\pm$ 2) g,购自北京华阜康生物科技有限公司,许可证号 SCXK (京) 2019-0008。动物于北京市中医研究所 SPF 级实验动物房适应性饲养 7 d,自由进食饮水,饲养环境温度 (22 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$,光照 12 h 和暗周期 12 h,相对湿度 40%~70%。动物实验经北京中医药研究所动物护理与使用专业委员会批准 (批准号 2021030201)。

1.2 药材

人参、附子、大黄均由首都医科大学附属北京

中医医院中药房提供, 经北京中医医院刘清泉教授鉴定为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎、毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的子根的加工品、蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根和根茎。

1.3 药品与试剂

苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染液套装 (批号 G1003)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA 试剂盒 (批号 G4421)、IL-6 ELISA 试剂盒 (批号 G4433)、组化试剂盒 DAB 显色剂 (批号 G1212)、TUNEL 试剂盒 (批号 G1504)、RNA 提取液 (批号 G3013)、逆转录试剂盒 (批号 G3337)、2 $\times$ Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix (批号 G3326) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 A8275) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 抗体 (批号 15101S)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-11 (cystein-aspartate protease-11, Caspase-11) 抗体 (批号 14340T)、GSDMD-NT 抗体 (批号 10137S)、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck, ASC) 抗体 (批号 67824T)、Caspase-1 p20 抗体 (批号 89332T)、紧密连接蛋白-1 (zonula occludens-1, ZO-1) 抗体 (批号 13663S)、闭合蛋白 (Occludin) 抗体 (批号 91131S) 购自美国 CST 公司; GSDMD 抗体 (批号 ab209845)、IL-1 β 抗体 (批号 ab283818) 购自英国 Abcam 公司。 β -actin 抗体 (批号 20536-1-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.4 仪器

Donatello 型脱水机 (意大利 DIPATH 公司); JB-P5 型包埋机 (武汉俊杰电子有限公司); RM2016 型病理切片机 (上海徕卡仪器有限公司); KZ-5F-3D 型三维冷冻研磨仪、SMC-5000F 型掌上离心机 (武汉赛维尔生物科技有限公司); BioTek Synergy H1 型酶标仪 (美国 BioTek 公司); NIKON ECLIPSE C1 型正置荧光显微镜、NIKON DS-U3 型成像系统 (日本 NIKON 公司); Panoramic MIDI 型扫描仪 (匈牙利 3DHISTECH 公司); D3024R 型台式高速冷冻型微量离心机 (大龙兴创实验仪器股份公司); ETC811 型 PCR 仪 (北京东胜创新生物科技有限公司); CFX Connect 型荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 参附黄方的制备和成分分析

参附黄方由人参 30 g、附子 60 g、大黄 30 g 组成。煎煮前 30 min 将附子用 350 mL 纯水浸泡, 先煎附子, 同时其余 2 味中药用 250 mL 纯水浸泡, 30 min 后混合一并煎煮, 大火煮开后双层纱布滤过, 滤渣加入 500 mL 纯水继续煎煮 30 min, 滤过。混合 2 次滤液, 加热浓缩至 120 mL, 得到 1 g/mL 原药液。原药液于实验前 1 d 制备, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。参考前期研究结果^[13-14], 实验前将原药液以水稀释 2 倍, 制成质量浓度为 0.5 g/mL 的溶液, 用于小鼠 ig 给药。

参考前期 UPLC-MS 分析方法^[13]对参附黄方进行成分分析。通过 UPLC-MS/MS 在正、负离子模式下检测, 共鉴定出参附黄方中 12 个主要活性成分, 分别为来源于人参的皂苷类成分 (人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁), 来源于附子的生物碱类成分 (苯甲酰乌头原碱、乌头碱、新乌头碱), 来源于大黄的蒽醌/酚酸类成分 (大黄酸、儿茶素、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、没食子酸)。

2.2 分组、造模与给药

小鼠适应性饲养 7 d, 随机分为假手术组 ($n=10$)、模型组 ($n=36$) 和参附黄方 (12.5 g/kg)^[13-14]组 ($n=20$)。采用盲肠结扎穿孔 (cecal ligation and puncture, CLP) 复制脓毒症模型^[15]。小鼠 ip 1%戊巴比妥钠麻醉后, 在腹腔中线做 1~2 cm 纵向切口, 暴露盲肠并在中点结扎, 用 21 号针刺穿; 从穿刺孔中挤出少量粪便, 将盲肠转移到腹腔, 缝合腹膜和皮肤。假手术组盲肠未进行结扎和穿刺, 其余操作相同。术后于颈后 sc 2 mL 无菌生理盐水进行液体复苏。术后 24 h, 给药组 ig 0.5 g/mL 参附黄方溶液 0.5 mL, 假手术组和模型组 ig 0.5 mL 生理盐水, 1 次/d, 连续给药 3 d^[13-14]。

2.3 样本采集

给药结束后, 深度麻醉小鼠, 打开胸腔, 从右心室采集血液, 静置 2 h 后, 4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 15 min, 分离血清, 于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。采血后, 用生理盐水灌洗回肠组织以去除肠道内容物和黏液, 于 4% 组织固定剂或 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

2.4 UPLC-MS/MS 分析参附黄方的入血成分

使用配备 HESI-II 探针的 UPLC-MS/MS 系统鉴定参附黄方的入血成分。

2.4.1 参附黄方样品溶液的制备 取参附黄方 100

μL ，置于 1.5 mL 离心管中，加入 300 μL 甲醇，涡旋混匀 1 min；4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min，取 100 μL 溶液，加入 100 μL 超纯水，混匀后，置于进样瓶中，待测。

2.4.2 参附黄方血清样品溶液的制备 取 100 μL 血清样品，置于 1.5 mL 离心管中，加入 300 μL 甲醇，涡旋振摇 10 min。将离心管置于低温离心机中，4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min，取上清液 270 μL ，真空离心浓缩 4 h。加入 90 μL 50% 甲醇水溶液，涡旋振摇 1 min。将离心管置于低温离心机中，4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min。取上清液 80 μL ，置于进样瓶中，待测。

2.4.3 色谱条件 安捷伦 SB-C₁₈ 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm)，流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B)，梯度洗脱：0~5 min, 98% A；5~13 min, 98%~85% A；13~25 min, 85%~35% A；25~27 min, 35%~10% A；27~30 min, 10% A。柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量 4 μL ；体积流量 0.35 mL/min。

2.4.4 质谱条件 HESI-II 的正、负电压分别为 3.5 kV 和 -3.0 kV；汽化器温度为 400 $^{\circ}\text{C}$ ；鞘气压力为 30 psi (1 psi=6.895 kPa)，辅助气压力为 10 psi；鞘气和辅助气均为氮气；碰撞气为氮气，压力为 0.199 5 Pa。数据由 Xcalibur 4.2 软件收集和处理。

2.5 网络药理学分析

2.5.1 参附黄方入血活性成分的靶标筛选 在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载参附黄方入血成分对应的 SMILES 序列，输入 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swiss-targetprediction.ch/>) 预测成分所对应的靶标，用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“药材-化合物-靶标”网络。

2.5.2 脓毒症诱导的肠损伤和细胞焦亡的靶标筛选 以“sepsis-induced intestinal injury”为关键词，通过 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>) 收集脓毒症诱导的肠损伤相关基因。以“pyroptosis”为关键词，通过 GeneCards 数据库收集细胞焦亡基因。

2.5.3 参附黄方治疗脓毒症诱导的肠损伤中细胞焦亡的网络药理学分析 采用 R 软件包 Venny 取交集，筛选出参附黄方治疗脓毒症诱导的肠损伤中细胞焦亡的潜在靶标。在 STRING 数据库中以 TSV 格式导出目标蛋白的蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 数据，采用 Cytoscape 3.7.2 软件可视化，并使用 MCODE 算法

筛选 cytoHubba 中的关键基因。将目标蛋白基因列表导入 Metascape 数据库 (<https://metascape.org/>)，进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。

2.6 活性化合物的分子对接

从 RCSB 蛋白质数据库 (<http://www.pdb.org/>) 下载靶标蛋白的晶体结构，并使用 Discovery studio 2019 软件进行修改、去除配体、添加氢、去除水、优化和修复氨基酸等。采用 ChemBioDraw3D 软件生成活性化合物的三维化学结构。采用 Schrodinger 软件进行分子对接，对接结果由 Pymol 进行可视化。

2.7 HE 染色观察回肠组织病理学变化

取小鼠回肠组织，用 4% 多聚甲醛固定，梯度乙醇脱水，石蜡包埋，并切成 5 μm 厚的切片，然后进行 HE 染色。于显微镜下观察回肠组织形态变化。按照 Chiu 等^[16]的评分标准对回肠组织损伤程度进行评分：正常黏膜绒毛计为 0 分；上皮间隙增大计为 1 分；上皮间隙延伸，上皮层从固有层提升为 2 分；大量上皮提升至绒毛两侧，隐窝缺失为 3 分；绒毛裸露，固有层缺失，毛细血管扩张，隐窝和上皮细胞缺失为 4 分；固有层的消化和分离，出血和溃疡为 5 分。

2.8 免疫荧光检测回肠组织肠道屏障蛋白的表达

取小鼠回肠组织，4% 多聚甲醛固定 24 h，石蜡包埋，并切成 4 μm 厚的切片。切片经脱蜡、复水后，放入 Tris-EDTA 抗原修复液中煮沸 5 min 修复抗原，用 10% 正常驴血清室温封闭 1 h。滴加 ZO-1 和 Occludin 抗体，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜；次日，滴加二抗，室温孵育 1 h，然后用 DAPI 复染，于荧光显微镜下观察并拍照。

2.9 血清中炎症因子水平的检测

取各组小鼠血清，按照 ELISA 试剂盒说明书检测小鼠血清中 IL-1 β 和 IL-6 水平。

2.10 TUNEL 染色检测回肠组织细胞凋亡情况

取小鼠回肠组织，4% 多聚甲醛固定 24 h，包埋于石蜡中，切成 3 μm 厚的切片，按照 TUNEL 染色试剂盒检测细胞凋亡情况。

2.11 免疫组化法检测回肠组织 GSDMD 蛋白表达

取小鼠回肠组织切片，经脱蜡、水化处理后，将切片置于 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中，于 95 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸，并加入 3% 过氧化氢孵育 25 min 以阻断内源性过氧化物酶活性。滴加一抗，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵

育过夜；滴加二抗，室温孵育 1 h，洗涤 3 次后，使用 DAB 进行染色，再以苏木素复染，脱水后封片。随机选取 3 个不同视野，在显微镜下进行观察。

2.12 qRT-PCR 检测回肠组织 *IL-1β*、*Caspase-1*、*NLRP3*、*GSDMD* 的 mRNA 表达

取小鼠回肠组织，使用 RNA 提取液提取总 RNA 并合成 cDNA，进行 qRT-PCR 分析。以 *GAPDH* 为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各基因的相对表达量。引物委托武汉赛维尔生物科技有限公司合成，引物序列见表 1。

2.13 Western blotting 检测回肠组织 *NLRP3*、*Caspase-11*、*GSDMD-NT*、*ASC*、*Caspase-1 p20*、*IL-1β* 的蛋白表达

取小鼠回肠组织，加入裂解液提取蛋白，采用 BCA 法测定蛋白浓度。取 10 μg 蛋白样品经十二烷基

基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，封闭后分别加入相应抗体，4 ℃ 孵育过夜；TBST 洗涤后加入二抗，室温孵育 1 h，加入 ECL 化学发光试剂显影，采用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.14 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，并通过 GraphPad Prism 8 软件进行分析。通过单因素方差分析（ANOVA）符合正态分布和方差同质性的数据。

3 结果

3.1 参附黄方活性成分及潜在靶标

如表 2 所示，采用 UHPLC-MS/MS 对参附黄方含药血清样品在正、负离子模式下进行分析，鉴定出参附黄方入血的主要活性化合物 18 个，其中 12 个为原型成分（大黄酸、大黄素、次乌头碱、乌头碱、新铈酸 B、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rc、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rd），6 个为代谢产物[(+)-儿茶酚-5-*O*-葡萄糖苷、2-*O*-桂皮酰-没食子酰葡萄糖、苯基丁酮葡萄糖苷、大黄素甲醚、表儿茶素、人参皂苷 Rf]。其中皂苷类化合物 7 种，包括人参皂苷 Re、Rg₁、Rb₁、Rc、Rb₂、Rd 和 Rf；儿茶酚类化合物 2 种：(+)-儿茶酚-5-*O*-葡萄糖苷和表儿茶素；生物碱类化合物 3 种：次乌头碱、乌头碱和新铈酸 B；蒽醌类化合物 3 种：大黄素甲醚、大黄酸和大黄素；其他类化合物：2-*O*-桂皮酰-没食子酰葡萄糖、苯基丁酮葡萄糖苷和苯基丁酮葡萄糖苷等。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')	长度/bp
<i>IL-1β</i>	F: AGGCTCCGAGATGAACAACAAA	206
	R: GTGCCGTCTTTTCATTACACAGGA	
<i>Caspase-1</i>	F: TTGAAAGACAAGCCCCAAGGTG	280
	R: CCAAGTCACAAGACCAGGCATA	
<i>NLRP3</i>	F: TAAGAACTGTCATAGGGTCAAAACG	146
	R: GTCTGGAAGAACAGGCAACATG	
<i>GSDMD</i>	F: GAGCTTTATGCTTGAAGGGTGTA	235
	R: ATGGAACAAAGCGCAGCAA	
<i>GAPDH</i>	F: CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	133
	R: TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT	

表 2 参附黄方中入血成分的鉴定

Table 2 Identification of absorbed components from Shenfuhuang Formula

序号	<i>m/z</i>	<i>t_R</i> /min	加合物形式	转化	误差 (×10 ⁻⁶)	碎片离子 (<i>m/z</i>)	化合物	归属	转化类型
1	465.102 4	7.71	[M-H] ⁻	M+O-H ₂	3.12	91.958 7, 371.984 1, 420.085 4, 70.066 4, 249.978 2, 125.516 5, 201.608 0, 425.036 9	(+)-儿茶酚-5- <i>O</i> -葡萄糖苷	大黄	氧化+去饱和 (I相代谢)
2	479.118 2	10.26	[M-H] ⁻	M+H ₂ O	2.71	153.018 3, 131.049 3, 103.054 7, 445.112 5, 143.033 9, 79.018 6, 69.034 3	2- <i>O</i> -桂皮酰-没食子酰葡萄糖	大黄	水合反应 (I相代谢)
3	339.107 6	10.78	[M-H] ⁻	M+O-H ₂	2.76	107.049 6, 165.091 1, 85.029 1, 339.107 7	苯基丁酮葡萄糖苷	大黄	氧化+去饱和 (I相代谢)
4	991.551 9	23.50	[M-H] ⁻	M	1.24	991.548 7, 945.543 0, 637.431 5, 475.378 8, 161.043 6, 113.021 8, 101.021 8	人参皂苷Re	红参	原型
5	845.493 0	23.65	[M-H] ⁻	M	-1.53	845.490 5, 59.011 2, 71.011 1, 101.021 8, 89.021 7, 113.021 9	人参皂苷Rg ₁	红参	原型
6	297.039 6	26.44	[M-H] ⁻	M+O-H ₂	2.87	253.049 8, 225.054 7, 297.041 0	大黄素甲醚	大黄	氧化+去饱和 (I相代谢)
7	283.024 1	28.78	[M-H] ⁻	M	-2.57	257.045 4, 183.043 6, 239.034 5, 283.025 1, 211.039 2, 243.029 4	大黄酸	大黄	原型

表 2 (续)

序号	<i>m/z</i>	<i>t_R</i> /min	加合物形式	转化	误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (<i>m/z</i>)	化合物	归属	转化类型
8	1 107.594 4	30.74	[M+FA-H] ⁻	M	-1.73	487.165 7, 425.377 3, 407.366 5, 325.112 8, 163.059 9, 145.049 6, 127.039 2	人参皂苷Rb ₁	红参	原型
9	1 123.586 7	31.02	[M+FA-H] ⁻	M	-2.40	457.155 3, 425.377 4, 407.366 9, 325.112 6, 295.102 1, 189.163 9, 163.059 9	人参皂苷Rc	红参	原型
10	1 123.586 4	31.71	[M+FA-H] ⁻	M	-2.67	85.029 0, 97.028 9, 145.049 5, 127.039 1, 457.151 4, 325.112 4, 95.086 1, 81.070 5, 163.060 0, 109.028 6	人参皂苷Rb ₂	红参	原型
11	269.041 2	32.06	[M-H] ⁻	M	-1.03	269.045 4, 225.054 8, 241.050 1, 181.063 9	大黄素	大黄	原型
12	991.544 6	33.13	[M+FA-H] ⁻	M	-2.62	991.549 8, 945.543 0, 783.491 5, 113.021 9, 101.021 8, 89.021 8, 71.011 1	人参皂苷Rd	红参	原型
13	307.083 2	3.07	[M+H] ⁺	M+O	6.25	139.039 0, 123.044 2, 147.044 1, 165.055 0, 291.085 8, 119.049 6, 161.059 8, 207.065 3	表儿茶素	大黄	氧化 (I相代谢)
14	365.099 2	10.61	[M+K] ⁺	M	-1.73	107.049 6, 165.091 1, 85.029 1, 344.174 5	苯基丁酮葡萄糖苷	大黄	原型
15	616.311 7	21.10	[M+H] ⁺	M	0.13	616.311 7, 105.034 0, 556.287 7, 524.261 5, 338.175 3, 515.438 9	次乌头碱	附子	原型
16	646.322 1	21.35	[M+H] ⁺	M	0.55	646.321 8, 105.033 9, 586.30 1	乌头碱	附子	原型
17	881.452 3	33.90	[M+H] ⁺	M+SO ₃	4.55	143.106 8, 71.050 0, 85.029 1, 107.086 0, 125.096 4, 457.367 3, 119.086 0, 439.357 7, 105.070 4, 145.101 2	人参皂苷Rf	红参	硫酸盐化 (II相代谢)
18	905.668 7	41.72	[2M+H] ⁺	M	3.67	654.616 5, 837.681 1, 905.668 0, 86.097 1, 778.611 8, 91.955 2, 146.981 9	新铈酸B	附子	原型

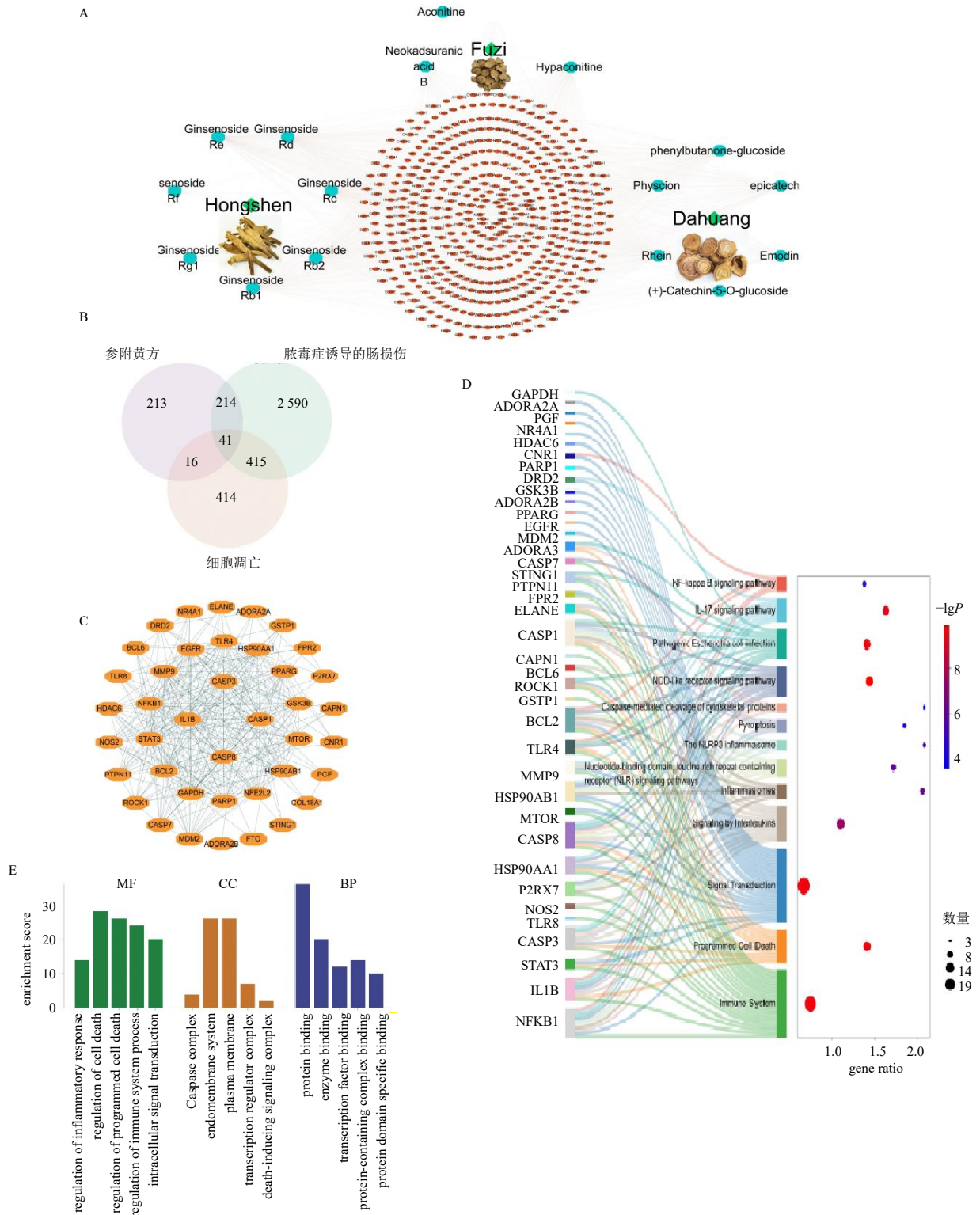
3.2 网络药理学分析

通过 SwissTargetPrediction 数据库对参附黄方入血活性成分进行靶标预测,得到 484 个作用靶标,其中 2-*O*-桂皮酰-没食子酰葡萄糖未发现靶标。采用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“中药-化合物-靶标”网络见图 1-A。通过数据库共收集了 3 260 个脓毒症诱导的肠损伤相关基因,886 个细胞焦亡基因。通过 Venn 图对参附黄方活性成分靶标、脓毒症诱导肠损伤相关靶标及细胞焦亡基因进行映射(图 1-B),获得 41 个参附黄方作用于脓毒症诱导的肠损伤中细胞焦亡的潜在靶标。在 STRING 数据库中删除不相关的基因,用 Cytoscape 软件构建 PPI 网络(图 1-C),其中 IL-1 β 和 Caspase-1 是参附黄方治疗脓毒症诱导的肠损伤中细胞焦亡的重要基因。根据生物过程(biological process, BP)、细胞组成(cell composition, CC)和分子功能(molecular function, MF)对核心靶点进行 GO 分析(图 1-E),BP 分析显示这些靶点可能参与了炎症反应的调节、细胞死亡的调节、程序性细胞死亡的调节、免疫系统过程的调节和细胞内信号转导等;CC 分析显示这些靶

点集中在质膜、死亡诱导信号复合体和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶复合物等;MF 分析显示这些靶点集中在蛋白结合、酶结合、转录因子结合等。KEGG 富集分析表明这些靶点可能参与了白细胞介素信号传导、细胞焦亡、NLRP3 炎症小体信号通路、核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路等(图 1-D)。上述结果表明,参附黄方可通过抑制细胞焦亡治疗脓毒症诱导的肠损伤。

3.3 分子对接结果

为了深入探索参附黄方通过抑制细胞焦亡改善脓毒症诱导的肠损伤的作用机制,选择参附黄方入血活性成分人参皂苷 Rf、(+)-儿茶素-5-*O*-葡萄糖苷、人参皂苷 Rg₁、大黄酸、表儿茶素与焦亡关键靶标 IL-1 β 、Caspase-1、NLRP3 和 GSDMD 进行分子对接模拟(图 2)。如表 3 所示,人参皂苷 Rf、(+)-儿茶素-5-*O*-葡萄糖苷、人参皂苷 Rg₁、大黄酸、表儿茶素与焦亡关键靶标 IL-1 β 、Caspase-1、NLRP3 和 GSDMD 结合良好,结合能小于-4.0 kcal/mol(1 kcal/mol=4.182 kJ/mol)。表明参附黄方可能通过抑制细胞焦亡改善脓毒症肠损伤。



A-“中药-化合物-靶标”网络；B-Venn图；C-PPI网络；D-KEGG通路富集分析；E-GO功能富集分析。

A-“traditional Chinese medicine-compound-target” network; B-Venn diagram; C-PPI network; D-KEGG pathway enrichment analysis; E-GO function enrichment analysis.

图1 参附黄方治疗脓毒症诱导的肠损伤中细胞焦亡的网络药理学分析

Fig. 1 Network pharmacology analysis of cell pyroptosis in sepsis induced-intestinal injury treated with Shenfufu Huang Formula

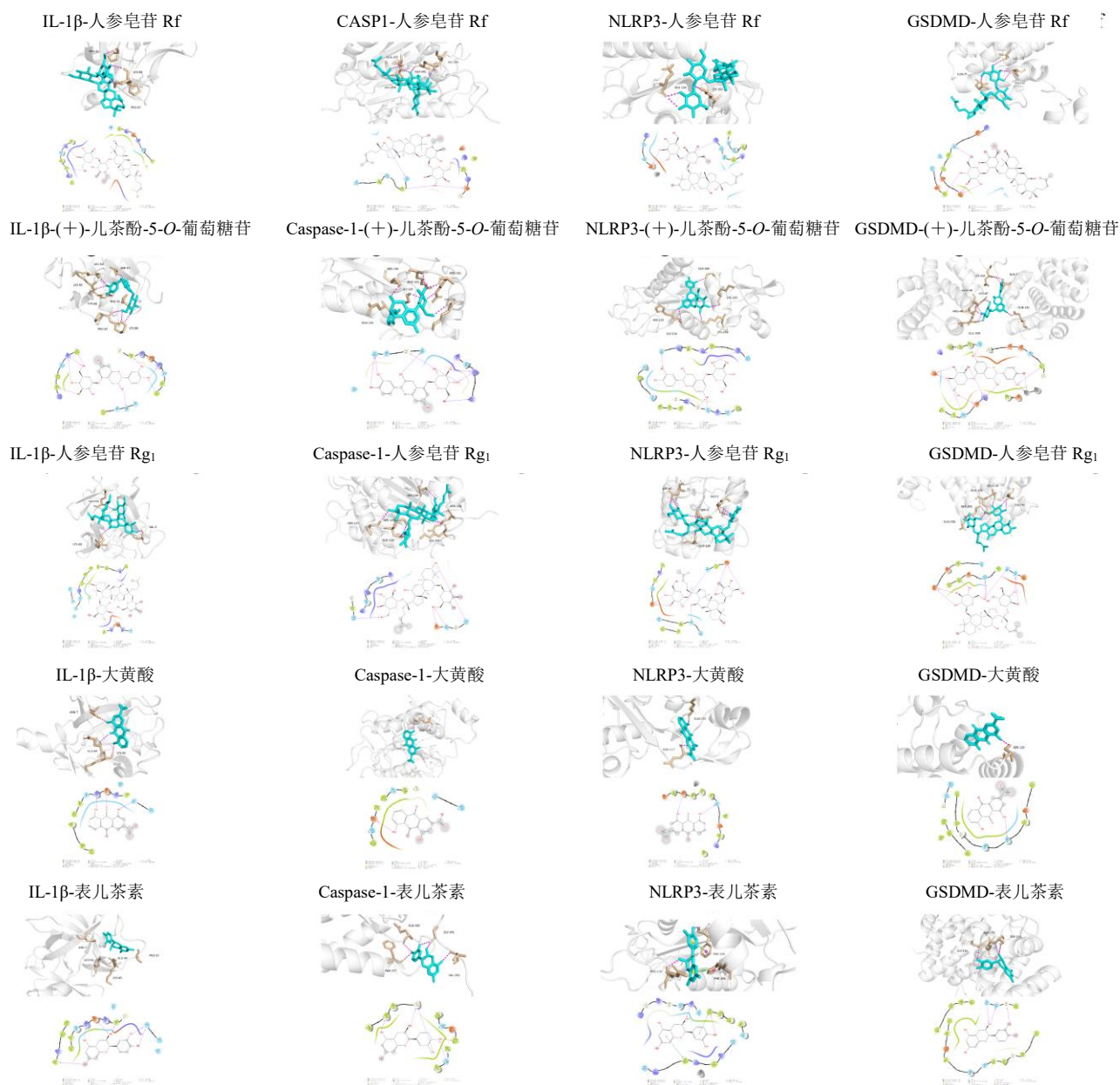


图 2 参附黄方主要活性成分与细胞焦亡关键蛋白的分子对接结果

Fig. 2 Molecular docking results of main active ingredients in Shenfuhuang Formula and key proteins involved in pyroptosis

3.4 参附黄方减轻脓毒症小鼠肠损伤

如图 3 所示,假手术组小鼠的肠组织各级结构清晰,肠绒毛结构完整,肠上皮细胞呈单层、柱状,排列整齐,无明显变性、水肿、炎症等病理变化;与假手术组比较,模型组小鼠的各层解剖结构欠清晰,肠绒毛结构排列紊乱,肠上皮细胞坏死、脱落,黏膜充血肿胀,组织可见炎细胞浸润明显;与模型组比较,参附黄方组小鼠肠组织的病理学变化明显改善,肠组织各级结构较清晰,肠绒毛结构排列较整齐,肠上皮细胞脱落及坏死较少,黏膜水肿和炎

症细胞浸润减少。病理组织学评分显示,与假手术组比较,模型组小鼠肠组织病理评分显著升高($P < 0.001$);与模型组比较,参附黄方组肠组织病理评分明显降低($P < 0.01$)。

3.5 参附黄方抑制脓毒症小鼠炎症反应

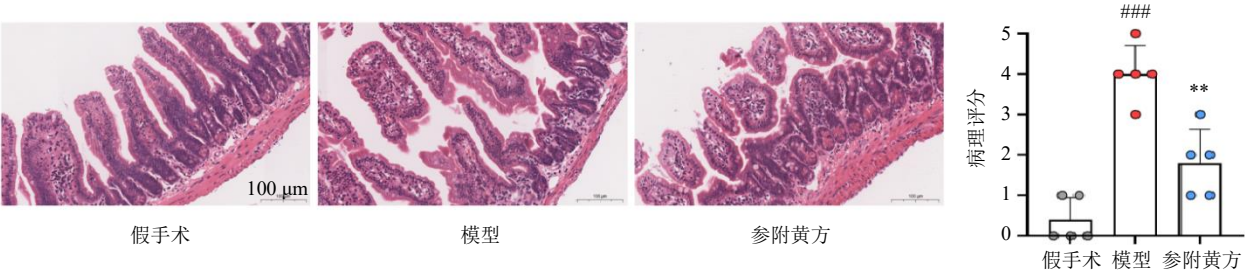
如图 4 所示,与假手术组比较,模型组小鼠血清中 IL-1 β 和 IL-6 水平显著升高($P < 0.05$ 、 0.001);与模型组比较,参附黄方组小鼠血清中 IL-1 β 和 IL-6 水平显著降低($P < 0.05$ 、 0.001),表明参附黄方可以减轻脓毒症小鼠的全身炎症反应。

表 3 参附黄方主要活性成分与细胞焦亡关键蛋白的分子对接结合能

Table 3 Molecular docking binding energy of main active ingredients in Shenfuhuang Formula and key proteins involved in pyroptosis

化合物	结合能/(kcal·mol ⁻¹)			
	IL-1β (1t4q)	Caspase-1 (2h48)	NLRP3 (3vwd)	GSDMD (5wqt)
次乌头碱	-5.173	-4.869	-4.298	-6.352
乌头碱	-5.386	-4.015	-5.883	-7.446
人参皂苷Rf	-8.238	-7.614	-6.032	-7.809
新木脂酸B	-3.018	-2.734	-4.175	-3.208
(+)-儿茶酚-5-O-葡萄糖苷	-9.110	-8.446	-9.566	-7.519
苯基丁酮葡萄糖苷	-8.878	-7.772	-9.096	-6.676
人参皂苷Re	—	-8.617	-7.505	-7.402
人参皂苷Rg ₁	-7.512	-7.909	-6.506	-8.078
大黄素甲醚	-4.392	-4.018	-5.402	-3.274
大黄酸	-6.707	-4.210	-4.548	-4.968
人参皂苷Rb ₁	-2.383	-2.559	-5.626	-2.971
人参皂苷Rc	—	—	-7.649	-8.291
大黄素	-4.812	-4.447	-5.149	-5.038
人参皂苷Rb ₂	—	—	-8.734	-8.800
人参皂苷Rd	—	—	-6.603	-7.802
表儿茶素	-6.885	-8.141	-8.218	-6.352

“—”表示无法对接; 1 kcal·mol⁻¹=4.182 kJ·mol⁻¹。
“—” means unable to connect; 1 kcal·mol⁻¹ = 4.182 kJ·mol⁻¹.



与假手术组比较: * $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同。
* $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs sham group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 3 参附黄方对脓毒症小鼠肠组织病理变化的影响 (HE, ×20; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 3 Effect of Shenfuhuang Formula on pathological changes of intestinal tissue in sepsis mice (HE, ×20; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

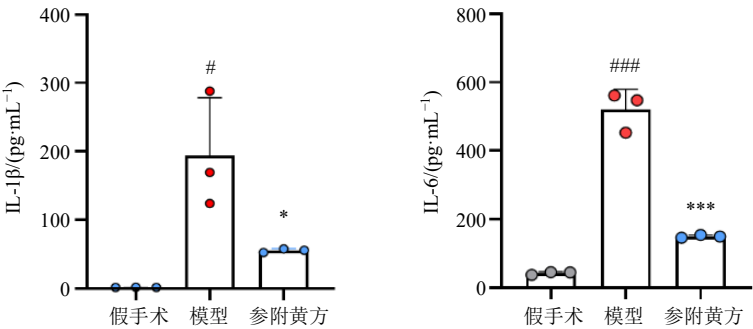


图 4 参附黄方对脓毒症小鼠血清中炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 4 Effect of Shenfuhuang Formula on levels of inflammatory factors in serum of sepsis mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.6 参附黄方对脓毒症小鼠肠道屏障功能的影响

如图 5 所示,与模型组比较,参附黄方组小鼠回肠组织 ZO-1 和 Occludin 的荧光强度显著增强,表明参附黄方对脓毒症小鼠肠道屏障功能具有保护作用。

3.7 参附黄方对脓毒症小鼠回肠组织细胞焦亡的影响

如图 6 所示, TUNEL 染色结果显示,与假手术组比较,模型组小鼠回肠组织细胞凋亡率显著升高 ($P<0.001$);与模型组比较,参附黄方组小鼠回肠组织细胞凋亡率显著降低 ($P<0.001$)。为了进一步确定 GSDMD 介导的细胞焦亡是否发生在脓毒症诱导的肠损伤中,采用免疫组化法对小鼠回肠组织中 GSDMD 蛋白表达进行分析。结果显示,与假手术组比较,模型组小鼠回肠组织 GSDMD 蛋白表达显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,参附黄方组小鼠回肠组织 GSDMD 蛋白表达显著降低 ($P<$

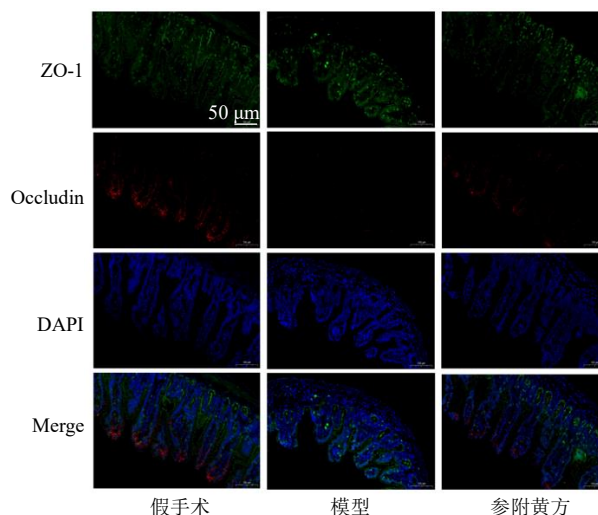


图 5 参附黄方对脓毒症小鼠回肠组织 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达的影响 (免疫荧光, $\times 40$)

Fig. 5 Effect of Shenfuhuang Formula on expressions of ZO-1 and Occludin proteins in ileum of septic mice (immunofluorescence, $\times 40$)

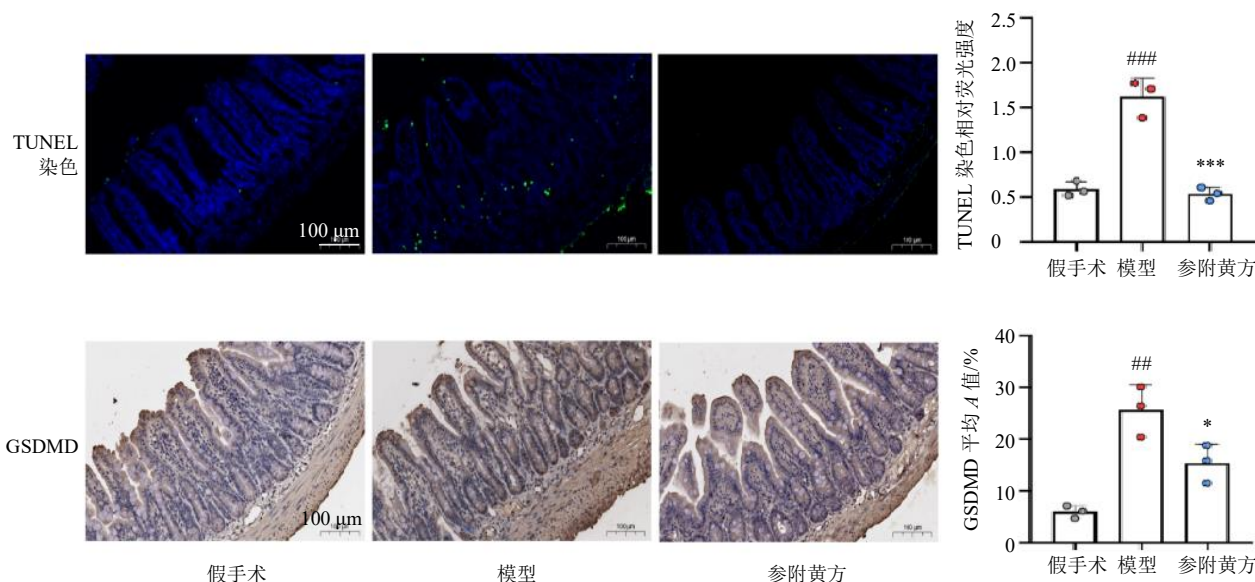


图 6 参附黄方对脓毒症小鼠回肠组织细胞焦亡的影响 ($\times 20$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Effect of Shenfuhuang Formula on cell pyroptosis in ileum of septic mice ($\times 20$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

0.05)。表明 CLP 诱导了脓毒症后细胞焦亡,参附黄方能够抑制脓毒症小鼠回肠组织中的细胞焦亡。

3.8 参附黄方对脓毒症小鼠回肠组织 *IL-1 β* 、*Caspase-1*、*NLRP3*、*GSDMD* mRNA 表达的影响

如图 7 所示,与假手术组比较,模型组小鼠回肠组织 *IL-1 β* 、*Caspase-1*、*NLRP3*、*GSDMD* mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001);与模型组比较,参附黄方组 *IL-1 β* 、*Caspase-1*、*NLRP3*、

GSDMD mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

3.9 参附黄方对脓毒症小鼠回肠组织 *NLRP3*、*Caspase-11*、*GSDMD-NT*、*ASC*、*Caspase-1 p20*、*IL-1 β* 蛋白表达的影响

如图 8 所示,与假手术组比较,模型组小鼠回肠组织中焦亡标志性蛋白 *NLRP3*、*Caspase-11*、*GSDMD-NT*、*Caspase-1 p20* 表达水平均显著升高

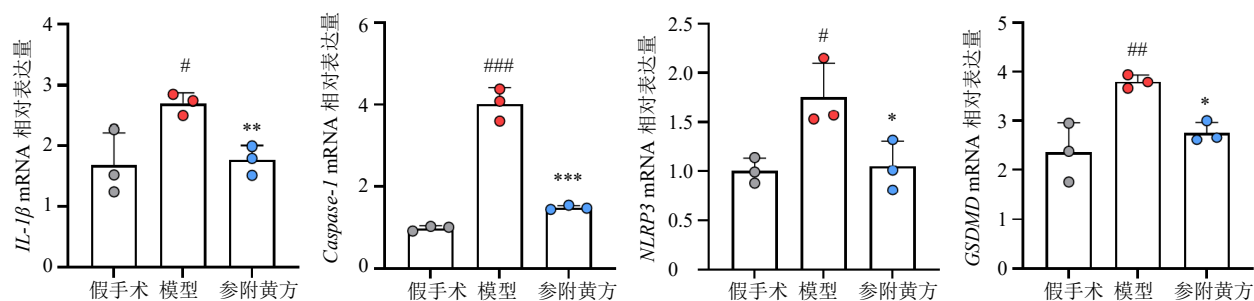


图 7 参附黄方对脓毒症小鼠回肠组织 *IL-1β*、*Caspase-1*、*NLRP3*、*GSDMD* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of Shenfuhuang Formula on mRNA expressions of *IL-1β*, *Caspase-1*, *NLRP3* and *GSDMD* in ileum of septic mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

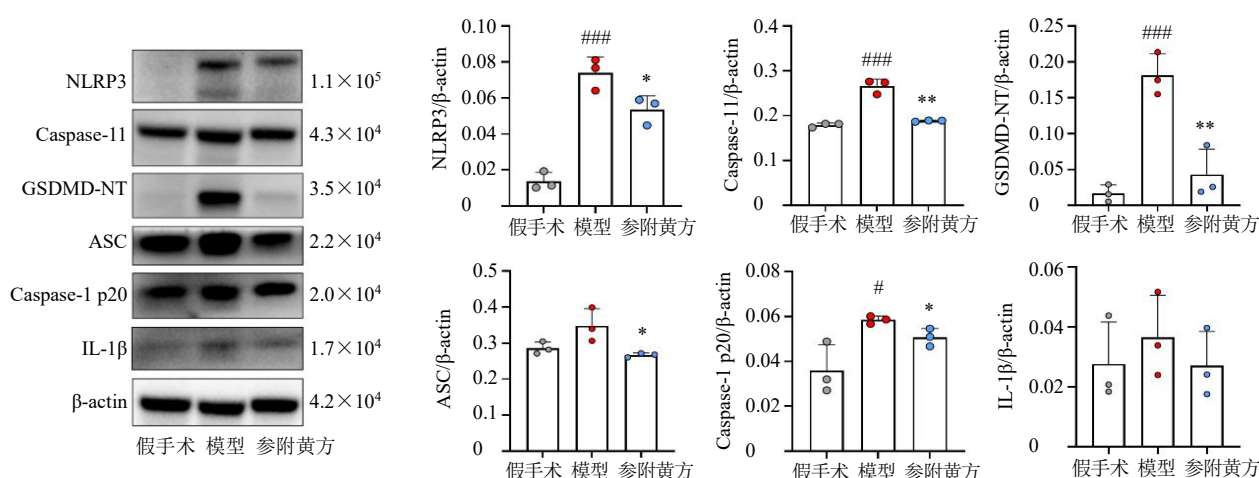


图 8 参附黄方对脓毒症小鼠回肠组织 *NLRP3*、*Caspase-11*、*GSDMD-NT*、*ASC*、*Caspase-1 p20*、*IL-1β* 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of Shenfuhuang Formula on protein expressions of *NLRP3*, *Caspase-11*, *GSDMD-NT*, *ASC*, *Caspase-1 p20* and *IL-1β* in ileum of septic mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

($P < 0.05$ 、 0.001)，*ASC*、*IL-1β* 蛋白表达水平呈升高趋势；与模型组比较，参附黄方组 *NLRP3*、*Caspase-11*、*GSDMD-NT*、*ASC*、*Caspase-1 p20* 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，*IL-1β* 蛋白表达水平呈降低趋势，表明参附黄方能够抑制 *GSDMD* 介导的细胞焦亡信号通路。

4 讨论

脓毒症可导致多器官功能障碍综合征，全球死亡率较高^[1]。然而，脓毒症的发病机制尚不清楚。目前西医常规治疗通常侧重于缓解症状，缺乏特效药物。中医药在脓毒症的治疗中具有独特的临床优势，包括改善炎症反应、减轻脏器损伤和提高免疫功能等^[17]。在中医理论中，参附黄方被认为具有扶正解毒通络的功效。本研究利用 UPLC-MS/MS、网络药理学和分子对接技术，对参附黄方治疗脓毒症

的主要成分及细胞焦亡的机制进行了综合分析。首先通过 UPLC-MS/MS 鉴定了参附黄方的 18 种入血成分，其中主要成分为人参皂苷 Rf、(+)-儿茶素-5-*O*-葡萄糖苷、人参皂苷 Rg₁、大黄酸和表儿茶素，均被证实具有抗炎作用。人参皂苷 Rf 通过抑制 *TNF-α*/脂多糖诱导的 *NF-κB* 转录活性，从而抑制肠道炎症^[18]；人参皂苷 Rg₁ 通过阻断 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, *TLR4*)/*NF-κB*/*NLRP3* 通路，抑制细胞炎症反应，从而提高脓毒症小鼠的存活率^[19]；大黄酸可以抑制促炎细胞因子的产生^[20]；表儿茶素可以抑制脂多糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症反应^[21]；表儿茶素还可通过调控 *miR-124-3p*/*IL-6* 信号通路，抑制炎症相关性结肠癌模型小鼠的炎症反应^[22]。因此，将这 5 种成分作为参附黄方治疗脓毒症的主要活性成分。

其次,通过网络药理学预测靶标通路,发现参附黄方可能通过细胞焦亡途径对脓毒症发挥治疗作用。通过对参附黄方入血活性成分人参皂苷 Rf、(+)-儿茶素-5-O-葡萄糖苷、人参皂苷 Rg₁、大黄酸、表儿茶素与焦亡关键靶标 IL-1 β 、Caspase-1、NLRP3 和 GSDMD 进行分子对接,结果表明所有活性成分均稳定结合于靶位点,揭示了参附黄方治疗脓毒症的初步机制,其关键靶标均与细胞焦亡密切相关。细胞焦亡是一种与炎症相关的程序性细胞死亡,由靶向膜、形成孔的 gasdermin 蛋白家族介导。焦亡最初被描述为 Caspase-1 和炎性小体依赖性细胞死亡途径,其典型表现为膜完整性丧失和细胞因子的分泌^[23]。炎症反应是 NLRP3 的重要环节^[24]。NLRP3 炎性小体的激活导致 pro-Caspase-1 自切割和 cleaved Caspase-1 的产生,进而介导 IL-1 β 和 IL-18 的成熟和分泌。此外,cleaved Caspase-1 裂解 GSDMD 以产生具有成孔活性的 GSDMD-NT,导致细胞裂解和炎性细胞因子释放^[25-27]。大量研究表明,细胞焦亡是一种依赖于 GSDMD 激活的程序性细胞死亡,与脓毒症引起的全身炎症反应和肠道损伤密切相关^[25,28]。已有数项研究将 GSDMD 确定为减少脓毒症炎症反应和器官功能障碍的重要治疗靶点^[25,29]。GSDMD 在肠上皮细胞中高度表达,而 Caspase-1 和 Caspase-11 在控制肠道病原体中起重要作用^[30]。此外,GSDMD 导致轮状病毒感染小鼠肠上皮细胞发生 NLRP9 依赖性焦亡^[31]。研究报道,焦亡途径导致细菌性脓毒症诱导的炎症性肠道损伤^[28]。在肠道缺血再灌注损伤模型中,二甲双胍抑制硫氧还蛋白互作蛋白(thioredoxin-interacting protein, TXNIP)表达和 TXNIP 与 NLRP3 的相互作用,保护肠道损伤和细胞焦亡^[32]。

为探究参附黄方治疗脓毒症的作用,本研究采用 C57BL/6J 小鼠构建脓毒症模型,观察小鼠的肠损伤情况。HE 染色结果显示,与模型组比较,参附黄方减轻了脓毒症小鼠的肠损伤。进一步发现,参附黄方显著降低了脓毒症小鼠血清中 IL-1 β 和 IL-6 的水平,提示其可通过抑制全身炎症反应改善脓毒症病理进程。此外,ZO-1 和 Occludin 蛋白表达的升高表明参附黄方对肠道屏障功能具有保护作用。为进一步验证参附黄方是否通过 GSDMD 介导的细胞焦亡保护脓毒症小鼠肠损伤,对小鼠回肠组织进行 TUNEL 染色和 GSDMD 表达检测。TUNEL 染色结果显示,CLP 诱导了 C57BL/6J 小鼠肠组织细

胞凋亡,而给予参附黄方治疗可减轻此现象。进一步通过免疫组化检测肠组织 GSDMD 的表达情况,以确定是否发生细胞焦亡。结果显示,CLP 诱导了 C57BL/6J 小鼠肠组织 GSDMD 表达增加,而给予参附黄方干预显著抑制 GSDMD 的表达。采用 qRT-PCR 检测 GSDMD 介导的细胞焦亡信号通路相关基因的表达,结果显示,CLP 诱导的脓毒症小鼠回肠组织中细胞焦亡相关基因表达上调,而给予参附黄方干预显著下调细胞焦亡相关基因表达。Western blotting 结果与 qRT-PCR 结果一致,参附黄方能够通过抑制 GSDMD 介导的细胞焦亡信号通路,抑制炎症反应,从而减轻 CLP 诱导的脓毒症小鼠肠损伤。

综上,本研究发现参附黄方潜在活性成分为人参皂苷 Rf、(+)-儿茶素-5-O-葡萄糖苷、人参皂苷 Rg₁、大黄酸和表儿茶素,可通过抑制 GSDMD 介导的细胞焦亡,对 CLP 诱导的脓毒症小鼠肠损伤发挥治疗作用。本研究为参附黄方治疗脓毒症提供了新的思路,并为基于中药的脓毒症补充替代疗法临床应用提供实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Singer M, Deutschman C S, Seymour C W, *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3) [J]. *JAMA*, 2016, 315(8): 801-810.
- [2] Rudd K E, Johnson S C, Agesa K M, *et al.* Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990—2017: Analysis for the Global Burden of Disease Study [J]. *Lancet*, 2020, 395(10219): 200-211.
- [3] Meng M, Klingensmith N J, Coopersmith C M. New insights into the gut as the driver of critical illness and organ failure [J]. *Curr Opin Crit Care*, 2017, 23(2): 143-148.
- [4] Ning W, Gao G, Zhou Y, *et al.* Calcitonin gene-related peptide ameliorates sepsis-induced intestinal injury by suppressing NLRP3 inflammasome activation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 116: 109747.
- [5] Wang H, Shan C L, Gao B, *et al.* Yersiniabactin-producing *E. coli* induces the pyroptosis of intestinal epithelial cells via the NLRP3 pathway and promotes gut inflammation [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(14): 11451.
- [6] Zhang Y S, Liu Y K, Xie Z X, *et al.* Inhibition of PFKFB preserves intestinal barrier function in sepsis by inhibiting NLRP3/GSDMD [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 8704016.
- [7] Wang C L, Li S L, Shen Y Z, *et al.* Mechanisms of Panax

- ginseng* on treating sepsis by RNA-seq technology [J]. *Infect Drug Resist*, 2022, 15: 7667-7678.
- [8] Wang C Z, Wang P R, Chen W B, *et al.* Mechanisms of *Gynostemma pentaphyllum* against non-alcoholic fibre liver disease based on network pharmacology and molecular docking [J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(13): 3760-3771.
- [9] Wang X, Wang Z Y, Zheng J H, *et al.* TCM network pharmacology: A new trend towards combining computational, experimental and clinical approaches [J]. *Chin J Nat Med*, 2021, 19(1): 1-11.
- [10] Zhang R Z, Zhu X, Bai H, *et al.* Network pharmacology databases for traditional Chinese medicine: Review and assessment [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 123.
- [11] Saikia S, Bordoloi M. Molecular docking: Challenges, advances and its use in drug discovery perspective [J]. *Curr Drug Targets*, 2019, 20(5): 501-521.
- [12] Liu T W, Guo Y H, Zhao J X, *et al.* Systems pharmacology and verification of ShenFuHuang Formula in zebrafish model reveal multi-scale treatment strategy for septic syndrome in COVID-19 [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 584057.
- [13] He S S, Zhao C X, Guo Y H, *et al.* Alterations in the gut microbiome and metabolome profiles of septic mice treated with Shen FuHuang Formula [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1111962.
- [14] 赵春霞, 何莎莎, 郭玉红, 等. 参附黄方对脓毒症小鼠生存率、组织损伤及炎症反应的影响 [J]. 北京中医药, 2022, 41(5): 501-505.
- [15] Rittirsch D, Huber-Lang M S, Flierl M A, *et al.* Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 31-36.
- [16] Chiu C J, McArdle A H, Brown R, *et al.* Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal [J]. *Arch Surg*, 1970, 101(4): 478-483.
- [17] 曾仪晨, 马雨雯, 曾榆淞, 等. 四妙勇安汤加减化裁治疗脓毒症的研究进展及其应用开发思路与方法 [J]. 中草药, 2025, 56(1): 330-339.
- [18] Ahn S, Siddiqi M H, Aceituno V C, *et al.* Suppression of MAPKs/NF- κ B activation induces intestinal anti-inflammatory action of ginsenoside Rf in HT-29 and RAW264.7 cells [J]. *Immunol Invest*, 2016, 45(5): 439-449.
- [19] Luo M, Yan D S, Sun Q S, *et al.* Ginsenoside Rg₁ attenuates cardiomyocyte apoptosis and inflammation via the TLR4/NF- κ B/NLRP3 pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(4): 2994-3004.
- [20] Wu J W, Wei Z H, Cheng P, *et al.* Rhein modulates host purine metabolism in intestine through gut microbiota and ameliorates experimental colitis [J]. *Theranostics*, 2020, 10(23): 10665-10679.
- [21] 阮洪生, 牟晋珠. 表儿茶素对脂多糖诱导RAW264.7细胞分泌炎症因子的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(4): 159-163.
- [22] 张磊, 罗霄, 刘明靓, 等. 基于 miR-124-3p/IL-6 信号通路的槲皮素和表儿茶素协同调节炎症相关性结肠癌研究 [J]. 中草药, 2023, 54(5): 1471-1477.
- [23] Elias E E, Lyons B, Muruve D A. Gasdermins and pyroptosis in the kidney [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2023, 19(5): 337-350.
- [24] Huang G W, Bao J W, Shao X H, *et al.* Inhibiting pannexin-1 alleviates sepsis-induced acute kidney injury via decreasing NLRP3 inflammasome activation and cell apoptosis [J]. *Life Sci*, 2020, 254: 117791.
- [25] Wang Y C, Liu Y K, Liu Q X, *et al.* Caspase-1-dependent pyroptosis of peripheral blood mononuclear cells is associated with the severity and mortality of septic patients [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 9152140.
- [26] Li Z F, Wang Y C, Feng Q R, *et al.* Inhibition of the C3a receptor attenuates sepsis-induced acute lung injury by suppressing pyroptosis of the pulmonary vascular endothelial cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 184: 208-217.
- [27] Liu Y K, Wang D F, Li T Y, *et al.* The role of NLRP3 inflammasome in inflammation-related skeletal muscle atrophy [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1035709.
- [28] Chen H, Li Y S, Wu J F, *et al.* RIPK3 collaborates with GSDMD to drive tissue injury in lethal polymicrobial sepsis [J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(9): 2568-2585.
- [29] Kang R, Zeng L, Zhu S, *et al.* Lipid peroxidation drives gasdermin D-mediated pyroptosis in lethal polymicrobial sepsis [J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 24(1): 97-108.
- [30] Pallett M A, Crepin V F, Serafini N, *et al.* Bacterial virulence factor inhibits Caspase-4/11 activation in intestinal epithelial cells [J]. *Mucosal Immunol*, 2017, 10(3): 602-612.
- [31] Zhu S, Ding S Y, Wang P H, *et al.* Nlrp9b inflammasome restricts rotavirus infection in intestinal epithelial cells [J]. *Nature*, 2017, 546(7660): 667-670.
- [32] Jia Y F, Cui R X, Wang C, *et al.* Metformin protects against intestinal ischemia-reperfusion injury and cell pyroptosis via TXNIP-NLRP3-GSDMD pathway [J]. *Redox Biol*, 2020, 32: 101534.