

参附汤治疗脓毒症的动物实验及网络药理学研究*

刘福生¹ 郭楠² 黄坡¹ 方晓磊¹ 刘锦^{2△}

(1.北京中医药大学东方医院,北京 100078;2.北京中医药大学东直门医院,北京 100700)

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1004-745X(2023)05-0771-06

doi:10.3969/j.issn.1004-745X.2023.05.004

【摘要】目的 基于网络药理学研究参附汤治疗脓毒症的物质基础及其可能的作用机制。**方法** 通过中药系统药理学分析平台(TCMSP)数据库查找参附汤组成药物人参、附子的活性成分和药物靶点;通过 GeneCards、OMIM、DrugBank、PharmGkb 及 TTD 数据库中获得脓毒症相关靶点,利用韦恩图得到药物靶点和疾病靶点的交集,得到参附汤治疗脓毒症的关键靶点;使用软件 Cytoscape 构建参附汤治疗脓毒症的“药物-活性成分-疾病-靶点”网络,并联合 STRING 平台构建关键靶点 PPI 网络;通过 Bioconductor 平台对关键靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。建立盲肠结扎穿孔诱导的脓毒症大鼠模型,进一步验证参附汤治疗脓毒症的作用机制。**结果** 参附汤共有 45 个活性化合物,作用于 99 个活性成分靶点,与 1 564 个脓毒症靶点取交集共得到 46 个作用靶点,包括 Akt1、IL-1 β 、PPARG、PTGS2、JUN、CASP3 等;GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析主要涉及炎症、细胞凋亡、营养、能量代谢、缺氧等,通过肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、白细胞介素-17(IL-17)信号通路、细胞凋亡、NF- κ B 信号通路等发挥治疗脓毒症的作用。动物实验结果表明,参附汤有助于降低脓毒症大鼠血清的 TNF- α 和白细胞介素-6(IL-6)的表达水平,上调肠道组织中 Akt 磷酸化的表达水平($P < 0.05$)。**结论** 参附汤通过多成分-多靶点-多通路的作用方式治疗脓毒症,为其治疗脓毒症提供了一定的依据。

【关键词】 脓毒症 参附汤 网络药理学 动物实验

Mechanism of Shenfu Decoction in the Treatment of Sepsis Based on Network Pharmacology and Experimental Verification Liu Fusheng, Guo Nan, Huang Po, Fang Xiaolei, Liu Jin. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China.

【Abstract】Objective: To study the material basis and possible mechanism of Shenfu Decoction (SFD) in the treatment of sepsis by network pharmacology. **Methods:** The active components and drug targets of ginseng root (*Panax ginseng* C. A. Mey, Renshen) and aconite root (*Aconitum carmichaelii* Debeaux, Fuzi) were searched through the database of Traditional Chinese Medicine System Pharmacology Analysis Platform (TCMSP). Screening of sepsis related targets was performed using GeneCards, OMIM, DrugBank, PharmGkb and TTD databases. Venn diagram was used to obtain the intersection of SFD targets and sepsis targets, and the key targets of SFD in the treatment of sepsis were obtained. Cytoscape software was used to construct a drug-component-target-pathway network. String database and Cytoscape software were used to construct a protein-protein interaction (PPI) network. Bioconductor platform was used for gene ontology (GO) enrichment and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analyses. To further verify the mechanism of SFD in the treatment of sepsis, a sepsis rat model induced by cecal ligation and perforation was established. The therapeutic effect of SFD on sepsis was verified using ELISA and Western blotting. **Results:** The results revealed 45 potential active ingredients in SFD and 99 key targets involved in sepsis treatment. A total of 46 target sites were obtained among 1 564 sepsis targets, including Akt1, IL-1 β , PPARG, PTGS2, JUN, CASP3, etc. GO enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis mainly involved inflammation, apoptosis, nutrition, energy metabolism, hypoxia, etc., which played a role in the treatment of sepsis through TNF signaling pathway, IL-17 signaling pathway, apoptosis, NF- κ B signaling pathway, etc. The results of sepsis rats showed that SFD could reduce the expression levels of TNF- α and IL-6 in serum and

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82205070);中央高校基本科研业务费专项(2018-JYBZZ-JS075);

北京中医药大学教育科学研究课题(XJZX2002, XJY22088)

△通信作者(电子邮箱:ljhly05@163.com)

up-regulate the phosphorylation level of Akt in intestinal tissue of septic rats ($P < 0.05$). **Conclusion:** SFD plays a role in the treatment of sepsis through a multi-component, multi-target and multi-pathway mode of action, which has provided some basis for its treatment of sepsis.

【Key words】 Sepsis; Shenfu Decoction; Network pharmacology; Animal experiment

脓毒症是指由感染引起的宿主反应失调导致的器官功能障碍,其发病机制涉及炎症反应失衡、免疫功能异常及多器官功能障碍等多方面^[1]。尽管脓毒症的治疗手段在过去几年发展迅速,但发病率和死亡率仍居高不下^[2]。近年来,中医药治疗脓毒症有助于提高疗效、降低不良反应及改善预后,作用机制体现在抑制炎症风暴、抑制细菌耐药、平衡免疫系统对感染的反应、调节胃肠功能障碍等多方面^[3]。中医学并无“脓毒症”病名,但根据其临床表现将其归于“热病”“温毒”“厥证”“脱证”等范畴^[4]。中医学认为正虚是脓毒症发病的基础,急性虚证是脓毒症的重要病机之一,扶正固本是中医药治疗脓毒症的治法之一^[5]。参附汤由人参和附子组成,具有回阳救逆和益气固脱的功效,主治厥脱及阳虚诸证。参附汤及参附注射液被广泛用于脓毒症治疗^[6-7],然而其作用机制尚不完全清楚。鉴于中药多成分、多靶点的特点,本文基于网络药理学的方法,以参附汤的活性成分为研究对象,通过靶点、通路筛选以及实验验证,探索参附汤治疗脓毒症的分子机制。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级SD大鼠,雄性,12周龄,体质量200~230 g,购自北京维通利华实验动物科技有限公司,许可证号:SCXK(京)2016-0006,饲养于北京中医药大学东方医院实验动物中心屏障动物饲养室,相对湿度(60±5)%,温度(20±2)℃,12 h光照/12 h黑暗循环。实验动物伦理批号:201912。

1.2 试药及仪器 参附汤组成:人参30 g,附子15 g。颗粒剂购自北京康仁堂药业有限公司并提供质量控制检测,使用前采用沸水溶开至浓度1 g/mL灌胃使用。低温离心机(Sigma),酶标仪(Thermo Scientific),显微镜(OLYMPUS-CMAD-2),图像采集系统(Nikon DS-Fi2),电泳系统(Bio-Rad, USA),肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA试剂盒(Abcam, ab46070),白细胞介素-6(IL-6) ELISA试剂盒(Abcam, ab234570),Akt抗体(Abcam, ab8805),p-Akt(Cell Signaling, 4060T)。BCA蛋白测定试剂盒(北京百奥思科生物医学技术有限公司,MD913053)。

1.3 造模与分组 采用盲肠结扎穿孔法(CLP)诱导大鼠脓毒症模型,造模方法及模型判定方法同前^[9]。CLP成功诱导脓毒症后,随机分为脓毒症模型组($n = 21$)和参附汤组($n = 21$),并设假手术大鼠15只作为对照组。参附汤组大鼠给予参附汤3 mg/kg灌胃,每日

2次;模型组和对照组大鼠灌胃等量无菌水,治疗72 h。给药结束后,腹主动脉取血,室温静置30 min,3 500 r/min离心15 min分离血清;剪取盲肠上10 cm肠道,沿一侧剪开肠壁,用生理盐水将肠内容物冲洗干净,血清及小肠组织-80℃保存备用。

1.4 参附汤活性成分和靶点获取 通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)^[8]获取参附汤中人参和附子2种中药的所有成分,按口服生物利用度(OB)≥30%,类药性(DL)≥0.18来筛选化合物。下载PubChem中活性成分的SDF结构文件,在Swiss Target prediction中检索靶点,按Probability>0筛选后获得活性成分作用靶点。通过UniProt数据库转换得到靶点的Gene Symbol。

1.5 参附汤治疗脓毒症的潜在靶点获取 从GeneCards、OMIM、DrugBank、PharmGkb、TTD数据库中检索关键词“sepsis”,整合后得到脓毒症相关靶点,与参附汤活性成分靶点取交集,获得参附汤治疗脓毒症的潜在靶点。

1.6 构建蛋白质-蛋白质相互作用网络 在STRING平台中上传参附汤治疗脓毒症的潜在靶点,物种选项为“智人”,下载结果文件导入Cytoscape软件构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,通过内置分析功能分析参数,获得核心网络。

1.7 构建参附汤活性成分-脓毒症靶点作用通路网络 创建参附汤活性成分和脓毒症靶点Network和Type文件,导入Cytoscape软件中,构建参附汤活性成分-脓毒症靶点作用通路网络。

1.8 GO分析及KEGG通路分析 提交潜在靶点到Metascape数据库,Input as species和Analysis as species都设置为“homo sapiens”,进行仅以本体(GO)分析和基于京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析($P < 0.05$),探究参附汤治疗脓毒症的可能机制。

1.9 指标检测 1)血清TNF- α 、IL-6表达水平:采用ELISA方法测定血清TNF- α 、IL-6的表达水平。2)小肠组织Akt及p-Akt的表达水平:采用Western blotting方法,将小肠组织加入RIPA裂解、低温超声破碎后离心(12 000 r/min, 15 min),吸取上清液提取蛋白,BCA法测定上清液中总蛋白浓度。每组30 μ g蛋白样品在10% SDS-PAGE进行电泳分离蛋白并转PVDF膜,5%脱脂奶粉在室温下封闭4 h,一抗4℃孵育过夜(Akt 1:800, P-Akt 1:1 000, β -actin 1:500)。TBST洗膜,二抗室温孵育1 h后, TBST洗膜,超敏ECL化学发光显影。

1.10 统计学处理 应用SPSS20.0统计软件。实验数据以($\bar{x}\pm s$)表示,组间差异采用单因素方差分析检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 参附汤活性成分和靶点获取 通过TCMSP网站检索到参附汤255个活性化合物(人参190个化合物、附子65个化合物),根据药物有效成分筛选的通用标准以 $OB\geq 30\%$ 且 $DL\geq 0.18$,筛选出人参22个活性化合物、附子21个活性化合物,共45个活性化合物。其中附子16个活性成分靶点,人参95个活性成分靶点,去除重复,共得到99个活性成分靶点,参附汤中主要活性化合物基本信息见表1。

2.2 脓毒症相关靶点获取 从GeneCards数据库获得脓毒症靶点2790个,根据经验设定 $Score>0.5$ 的靶点为脓毒症的潜在靶点。结合OMIM、TTD、DrugBank、PharmGkb数据库补充相关靶点,合并后删除重复值,最终得到1564个靶点。

2.3 参附汤有效成分靶点与脓毒症靶点交集 利用R语言将筛选的参附汤有效成分靶点与脓毒症靶点取交集,得到共同靶点46个,并绘制参附汤有效成分靶点与脓毒症靶点交集韦恩图(见图1)。

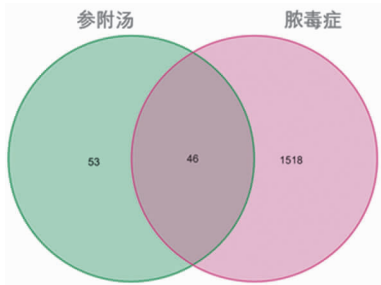


图1 参附汤有效成分-脓毒症靶点维恩图

2.4 PPI网络构建与分析 我们构建了参附汤与脓毒症相关靶点之间潜在的蛋白间相互作用,如图2所示:网络中有44个节点,291条边;平均节点度(Degree)为13.2,平均特征向量系数(Eigenvector coefficient)为0.549;高于平均节点度的20个靶标为Akt1(33),IL-1 β (29),PPARG(28),PTGS2(27),JUN(26),CASP3(25),ICAM1(24),HMOX1(23),NFKBIA(22),VCAM1(20),IFNG(19),STAT1(19),MAPK8(19),RELA(18),CASP8(17),IKBKB(17),CASP1(17),MMP1(15),SELE(15),NR3C1(14)。参附汤治疗脓毒症关键靶点蛋白PPI网络拓扑分析数据详见表2。二次筛选的网络13个节点,72条边;三次筛选的网络6个节点,15条边。

2.5 构建参附汤活性成分-脓毒症靶点网络图 应用Perl语言将交集靶点对应的药物有效成分逐个对应,各成分按简称命名(表3)。应用Cytoscape3.7.2软件

表1 参附汤主要活性成分($OB\geq 30\%$, $DL\geq 0.18$)

Mol ID	Molecule Name	OB(%)	DL	MW	来源
MOL005318	Dianthramine	40.45	0.20	289.26	人参
MOL005320	arachidonate	45.57	0.20	304.52	人参
MOL005308	Aposiopolamine	66.65	0.22	271.34	人参
MOL000422	kaempferol	41.88	0.24	286.25	人参
MOL005356	Girinimb	61.22	0.31	263.36	人参
MOL005321	Frutinine A	65.90	0.34	264.24	人参
MOL002879	Diop	43.59	0.39	390.62	人参
MOL005314	Celabenzine	101.88	0.49	379.55	人参
MOL003648	Inermin	65.83	0.54	284.28	人参
MOL005384	suchilactone	57.52	0.56	368.41	人参
MOL005344	ginsenoside rh2	36.32	0.56	622.98	人参
MOL004492	Chrysanthemaxanthin	38.72	0.58	584.96	人参
MOL005360	malkangunin	57.71	0.63	432.56	人参
MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75	414.79	人参
MOL005399	alexandrin_qt	36.91	0.75	414.79	人参
MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76	412.77	人参
MOL005348	Ginsenoside-Rh4_qt	31.11	0.78	458.8	人参
MOL005401	ginsenoside Rg5_qt	39.56	0.79	442.8	人参
MOL005376	Panaxadiol	33.09	0.79	460.82	人参
MOL005317	Deoxyharringtonine	39.27	0.81	515.66	人参
MOL000787	Fumarine	59.26	0.83	353.40	人参
MOL005357	Gomisin B	31.99	0.83	514.62	人参
MOL002394	DemethyldeLavaine B	34.52	0.18	700.91	附子
MOL002393	DemethyldeLavaine A	34.52	0.18	700.91	附子
MOL002423	jesaconitine	33.41	0.19	675.85	附子
MOL002211	11,14-eicosadienoic acid	39.99	0.20	308.56	附子
MOL002419	(R)-Norcoclaurine	82.54	0.21	271.34	附子
MOL002433	(3R,8S,9R,10R,13R,14S,17R)-3-hydroxy-4,4,9,13,14-pentamethyl-17-[(E,2R)-6-methyl-7-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxyhept-5-en-2-yl]-1,2,3,7,8,10,12,15,16,17-decahydr	41.52	0.22	781.10	附子
MOL002416	deoxyaconitine	30.96	0.24	629.82	附子
MOL002421	ignavine	84.08	0.25	449.59	附子
MOL000538	hypaconitine	31.39	0.26	615.79	附子
MOL002388	Delphin_qt	57.76	0.28	303.26	附子
MOL002395	Deoxyandrographolide	56.30	0.31	334.50	附子
MOL002398	Karanjin	69.56	0.34	292.30	附子
MOL002392	Deltoin	46.69	0.37	328.39	附子
MOL002406	2,7-Dideacetyl-2,7-dibenzoyl-taxayunnanine F	39.43	0.38	776.90	附子
MOL002410	benzoylnapelline	34.06	0.53	463.67	附子
MOL002415	6-Demethyldeoline	51.87	0.66	453.64	附子
MOL002422	isotalatizidine	50.82	0.73	407.61	附子
MOL002397	karakoline	51.73	0.73	377.58	附子
MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	414.79	附子
MOL002434	Carnosifloside Lqt	38.16	0.80	456.78	附子
MOL002401	Neokadsuranic acid B	43.10	0.85	452.74	附子

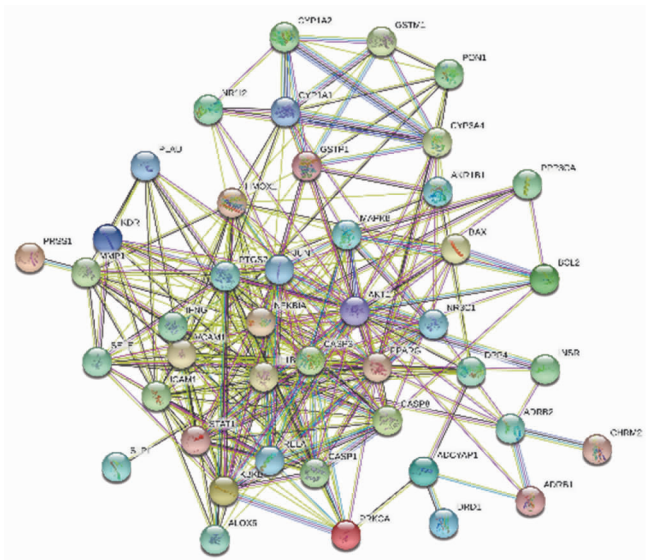


图2 参附汤治疗脓毒症关键靶点蛋白PPI网络

表2 参附汤治疗脓毒症关键靶点蛋白PPI网络拓扑分析数据

Name	Degree	Betweenness centrality	Closeness centrality	Eigenvector coefficient
Akt1	33	309.816 482	0.796 296 296	0.259 460 837
IL-1B	29	196.222 635 4	0.741 379 31	0.250 760 108
PPARG	28	152.157 952 9	0.716 666 667	0.240 280 077
PTGS2	27	64.790 347 54	0.704 918 033	0.249 206 573
JUN	26	68.878 842 59	0.693 548 387	0.241 825 163
CASP3	25	51.266 814 52	0.671 875	0.239 674 523
ICAM1	24	36.232 032 63	0.661 538 462	0.233 244 389
HMOX1	23	75.956 041 02	0.641 791 045	0.216 612 13
NFKBIA	22	31.881 756 97	0.651 515 152	0.223 164 201
VCAM1	20	39.473 930 15	0.632 352 941	0.199 820 355
IFNG	19	10.393 074 08	0.614 285 714	0.205 438 927
STAT1	19	7.844 187 795	0.605 633 803	0.206 095 71
MAPK8	19	29.551 719 36	0.605 633 803	0.186 760 53
RELA	18	5.300 669 265	0.589 041 096	0.197 584 659
CASP8	17	9.041 23 9316	0.573 333 333	0.184 904 814
IKBKB	17	3.275 017 956	0.589 041 096	0.191 961 482
CASP1	17	2.853 998 779	0.573 333 333	0.192 204 341
MMP1	15	87.411 634 56	0.565 789 474	0.153 190 821
SELE	15	2.558 157 486	0.565 789 474	0.170 478 94
NR3C1	14	21.870 801 2	0.565 789 474	0.141 436 473

构建参附汤成分-脓毒症靶点可视化网络图(图3)。
2.6 GO分析和KEGG通路分析 将参附汤治疗脓毒症的46个潜在靶点通过GO富集分析,根据 $P < 0.05$ 选择生物过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF)富集高的前10个进行可视化并生成柱状图(图4上)。如图所示,生物过程主要涉及对脂多糖、对细菌起源的分子的反应、对营养水平的反应、对外来刺激的反应、对

表3 交集靶点对应参附汤主要活性成分列表

药名	MOL ID	化学名	靶点
Renshen	MOL005344	ginsenoside rh2	BAX,CASP3,PTGS2,NFKBIA,IL1B,CASP1,IFNG,ADCYAP1
Renshen	MOL002879	Diop	ADRB2
Renshen	MOL005321	Frutnone A	PPARG,PTGS2,ADRB2,DPP4,Renshen
Renshen	MOL000422	kaempferol	PPARG,PTGS2,DPP4,PRSS1,CHRM2,F7,CAMSAP2,RELA,IKBKB,AKT1,BCL2,BAX,JUN,CASP3,MAPK8,MMP1,STAT1,HMOX1,CYP3A4,CYP1A2,CYP1A1,ICAM1,SELE,VCAM1,NR1I2,ALOX5,GSTP1,INSR,PPP3CA,GSTM1,SLP1
Renshen	MOL000358	beta-sitosterol	PTGS2,DRD1,CHRM2,ADRB2,BCL2,BAX,JUN,CASP3,CASP8,PRKCA,PON1
Renshen	MOL005308	Aposiopamine	ADRB2,DPP4
Renshen	MOL005320	arachidonate	PTGS2
Renshen	MOL000449	Stigmasterol	PTGS2,ADRB2,AKR1B1,PLAU,ADRB1,CHRM2
Renshen	MOL005318	Dianthramine	PTGS2
Renshen	MOL003648	Inermin	PTGS2,ADRB2,PRSS1,CAMSAP2
Renshen	MOL005384	suchilactone	PTGS2,F7,ADRB2,CAMSAP2
Renshen	MOL005356	Girinimbini	PTGS2,ADRB2
Renshen	MOL000787	Fumarine	PTGS2,F7,ADRB2,CAMSAP2,DRD1,KDR
Renshen	MOL005376	Panaxadiol	NR3C1
Fuzi	MOL002395	Deoxyandrographolide	PTGS2
Fuzi	MOL002388	Delphin_qt	PTGS2
Fuzi	MOL002392	Deltoin	PTGS2,ADRB2,DPP4,PRSS1,CAMSAP2
Fuzi	MOL002398	Karanjin	PTGS2

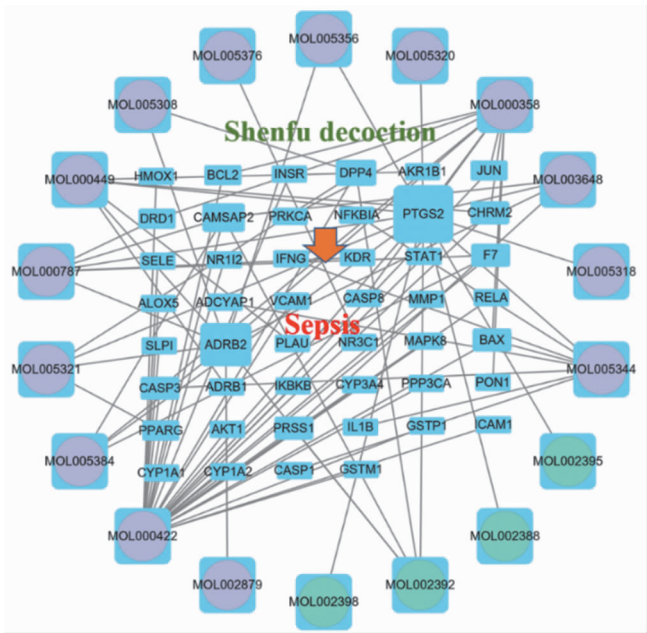


图3 参附汤活性成分-脓毒症靶点作用网络图

肿瘤坏死因子的反应、对金属离子的响应、应对缺氧、细胞对外界刺激的反应、对缺氧的反应等;细胞组分主要涉及膜筏、膜微区、细胞器外膜、线粒体外膜及核被膜等;分子功能主要涉及半胱氨酸型内肽酶活性参与凋亡信号通路、氧化还原酶活性、半胱氨酸型内肽酶

活性参与凋亡过程、肽链内切酶活性等。对参附汤治疗脓毒症的潜在靶点进行 KEGG 通路富集分析($P < 0.05$),选取前 30 条通路进行可视化并生成气泡图(图 4 下)。如图所示,这些潜在靶点涉及 TNF 信号通路、IL-17 信号通路、细胞凋亡、NF- κ B 信号通路等。综合 GO 分析和 KEGG 通路分析,结果表明参附汤对脓毒症的抑制作用与 TNF 信号通路和 NF- κ B 信号通路密切相关。

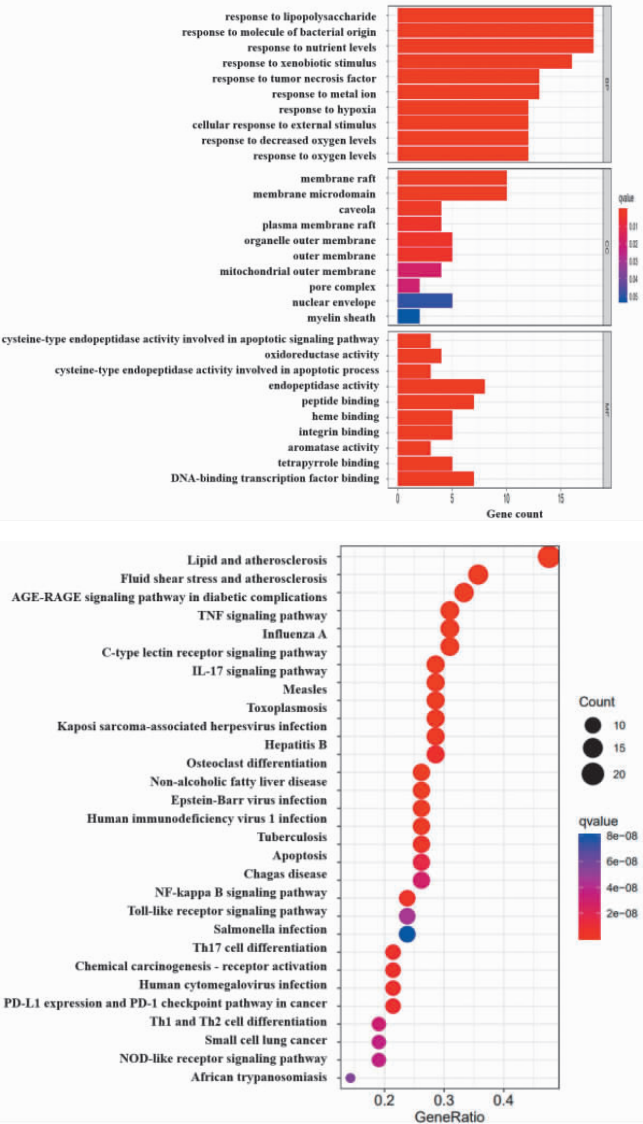


图4 参附汤治疗脓毒症的GO富集分析(上)及 KEGG通路分析(下)

2.7 参附汤对 CLP 诱导的脓毒症大鼠炎症因子表达的影响 与对照组(53.43 ± 26.04) ng/L 相比,模型组大鼠血清中 TNF- α 表达水平(392.21 ± 18.24) ng/L 显著升高($P < 0.01$);与模型组对比,参附汤组大鼠血清中 TNF- α 表达水平(137.04 ± 19.70) ng/L 显著降低($P < 0.01$)。与对照组(85.92 ± 7.05) ng/L 相比,模型组大鼠血清中 IL-6(160.98 ± 7.93) ng/L 表达水平显著升高($P < 0.01$);与模型组对比,参附汤组中大鼠血清 IL-6

表达水平(93.36 ± 17.44) ng/L 显著降低($P < 0.01$)。这初步验证了网络药理学部分参附汤对脓毒症 TNF 信号通路表达的调节。

2.8 参附汤对 CLP 诱导的脓毒症大鼠肠组织中 Akt 及 p-Akt 蛋白表达的影响 Akt 是 PI3K/Akt 信号通路的重要组成部分,其磷酸化涉及代谢、增殖、细胞存活、生长和血管生成。在构建的参附汤药物成分-脓毒症靶点的通路网络中 Akt 度值较大且与活性成分结合能力较好。因此本实验通过检测参附汤对 CLP 诱导的脓毒症大鼠小肠 Akt 及 p-Akt 蛋白表达的影响,对预测靶点进行初步的验证(图 5)。结果显示, Akt 在对照组、模型组和参附组大鼠肠道组织中表达无明显差异($P > 0.05$);与对照组相比, p-Akt 在模型组和参附组大鼠肠道组织中表达降低;与模型组相比,参附汤治疗能显著提高 p-Akt 蛋白表达($P < 0.01$)。见表 3。

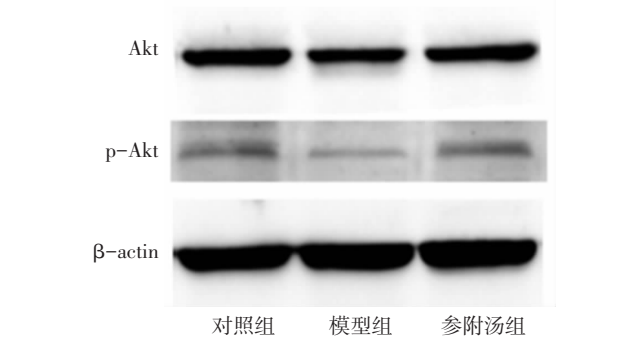


图5 参附汤对脓毒症大鼠肠道 Akt 及 p-Akt 表达的影响

表3 各组大鼠 Akt/ β -actin、p-Akt/Akt 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Akt/ β -actin	p-Akt/Akt
对照组	3	0.674 2 $\pm$ 0.009 70	0.406 9 $\pm$ 0.016 61
模型组	3	0.615 6 $\pm$ 0.005 65	0.288 0 $\pm$ 0.013 15 ^A
参附汤组	3	0.637 0 $\pm$ 0.003 97	0.422 0 $\pm$ 0.026 04 [*]

3 讨论 中医药治疗脓毒症优势在于纠正炎症反应失衡、改善凝血功能障碍、减轻脏器损伤等^[10]。作为参附汤来源的静脉制剂,参附注射液广泛应用于脓毒症及脓毒症休克的治疗^[7]。参附注射液与参附汤在给药途径、主要组成成分及作用靶点上存在一定的差别^[11]。作为经典的治疗危重症方剂,参附汤经常用于治疗脓毒症的基础方剂加减或联合使用^[12]。深入研究参附汤的主要组成成分及其治疗脓毒症的机制有助于加深对参附汤治疗脓毒症的认识。本研究通过检索 TCMSP 网站,以 OB $\geq 30\%$ 且 DL ≥ 0.18 ,筛选出人参 22 个活性化合物、附子 21 个活性化合物,共 45 个活性化合物,共得到 99 个活性成分靶点,与脓毒症靶点取交集得到共同靶点 46 个。构建 PPI 网络并分析参数筛选排名前 20 的关键靶点(表 2)。GO 富集分析参附汤治疗脓毒

症的生物过程主要涉及对脂多糖、对细菌起源的分子的反应、对营养水平的反应、对外来刺激的反应、对肿瘤坏死因子的反应、应对缺氧、细胞对外界刺激的反应、对缺氧的反应、对氧气水平的反应趋性等,反映了益气温阳中药对机体生物过程的调节作用。KEGG通路富集分析提示参附汤治疗脓毒症涉及TNF信号通路、IL-17信号通路、细胞凋亡、NF- κ B信号通路、Toll样受体信号通路等。盲肠结扎穿孔诱导的脓毒症模型是经典的脓毒症动物模型,被广泛使用。本研究建立盲肠结扎穿孔诱导的脓毒症大鼠模型,采用参附汤治疗72 h,结果表明,参附汤有助于降低脓毒症大鼠血清TNF- α 和IL-6的表达水平,调节机体的炎症水平。人参皂苷是人参中的有效成分之一,其可以调节机体的炎症水平^[13]。在构建的参附汤药物成分-脓毒症靶点的通路网络中,Akt度值较大且与活性成分结合能力较好。所以,本实验通过检测参附汤对CLP诱导的脓毒症大鼠肠道中Akt及p-Akt蛋白表达的影响,对预测靶点进行初步的验证。既往研究^[14]表明,脓毒症大鼠肠道p-Akt的表达量存在先高后低的变化。本实验结果表明CLP诱导的脓毒症大鼠72 h肠道中p-Akt表达较对照组显著降低,参附汤治疗72 h后脓毒症大鼠肠道p-Akt表达较模型组显著升高。实验结果表明参附汤对Akt具有调节作用,这初步验证了网络药理学部分参附汤对脓毒症Akt表达的调节。参附汤中人参的有效成分之一是人参皂苷Rd,该研究与既往研究^[15]提示人参皂苷Rd可以提高p-Akt的表达水平一致。参附汤治疗脓毒症实验结果对基于网络药理学得到的参附汤治疗脓毒症的结果进行了初步的验证,可见参附汤通过多成分、多靶点、多通路治疗脓毒症,为进一步研究奠定了基础。但参附汤治疗脓毒症的量、效、时关系,因临床不同证型的复杂性还有待进一步研究。

综上所述,本研究基于网络药理学方法及动物实验表明参附汤通过多成分-多靶点-多通路的作用方式发挥治疗脓毒症的作用,为参附汤治疗脓毒症的进一步研究奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] HUANG M, CAI S, SU J. The pathogenesis of sepsis and potential therapeutic targets[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(21): 5376.
- [2] TILLMANN B, WUNSCH H. Epidemiology and Outcomes[J]. *Crit Care Clin*, 2018, 34(1): 15-27.
- [3] FAN TT, CHENG BL, FANG XM, et al. Application of Chinese medicine in the management of critical conditions: a review on sepsis[J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(6): 1315-1330.
- [4] 中华医学会重症医学分会. 中国严重脓毒症/脓毒性休克治疗指南(2014)[J]. *中华危重病急救医学*, 2015, 27(6): 401-426.
- [5] 智屹惠, 王坤根, 王灵聪. 《中国严重脓毒症/脓毒性休克治疗指南(2014)》中医药部分解读[J]. *中华危重病急救医学*, 2015, 27(6): 429-434.
- [6] LIU J, LIU F, LIANG T, et al. Efficacy of Shenfu decoction on sepsis in rats with condition induced by cecal ligation and puncture[J]. *J Tradit Chin Med*, 2020, 40(4): 621-628.
- [7] 胡曼, 刘福生, 黄坡, 等. 参附注射液治疗脓毒症心肌损伤临床疗效的Meta分析[J]. *中国中医急症*, 2022, 31(7): 1129-1133.
- [8] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. *J Cheminform*, 2014(6): 13.
- [9] LIU F, LIU J, LIU Y, et al. Shen-Fu Decoction could ameliorate intestinal permeability by regulating the intestinal expression of tight junction proteins and p-VASP in septic rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021(268): 113562.
- [10] 孔令博, 晏军, 张迪, 等. 中医药治疗脓毒症领域临床优势的探讨[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(5): 211-218.
- [11] 应天昊, 余涛, 赵佳宁, 等. 基于网络药理学研究参附注射液治疗脓毒症的作用机制[J]. *山东科学*, 2022, 35(1): 18-27.
- [12] 陈华琼, 郭应军, 刘八一, 等. 参附汤合生脉散对脓毒性休克急性虚证患者血流动力学及其预后的影响[J]. *中国实用医药*, 2022, 17(10): 148-150.
- [13] JEONG SY, KIM JE, SONG GY, et al. Rgx365, a rare protopanaxatriol-type ginsenoside fraction from black ginseng, suppresses inflammatory gene iNOS via the inhibition of p-STAT-1 and NF- κ B[J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(5): 1091-1102.
- [14] 陈浩, 李慧利, 杜亮, 等. 右美托咪定通过Akt/mTOR自噬通路介导NLRP3炎症小体失活而减轻脓毒症大鼠肠损伤[J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(9): 1582-1588.
- [15] LIU XY, ZHOU XY, HOU JC, et al. Ginsenoside Rd promotes neurogenesis in rat brain after transient focal cerebral ischemia via activation of PI3K/Akt pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015(36): 421-428.

(收稿日期2022-10-22)