DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20241029.002
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20241029.1338.004

基于网络药理学及实验验证探讨吴茱萸汤减轻脓毒症大鼠肺损伤的作用机制

金颂峰[1],邸静鑫[2],关玉娟[1],丁晓欢[1],甘 雨[1],崔英海[1],张继伟[1],陈美娟[2],林宇康[2],于雪峰[1]✉,尹江涛[1]✉

(1.辽宁中医药大学附属第二医院,辽宁 沈阳 110034;2.辽宁中医药大学,辽宁 沈阳 110847)

[摘要] **目的**:结合网络药理学与实验验证,探究吴茱萸汤减轻脓毒症大鼠肺损伤的可能机制。**方法**:采用TCMSP和ETCM数据库筛选并确定吴茱萸汤中活性成分,利用Uniport数据库挑选出有效靶标,借助GeneCards和OMIM数据库获取脓毒症肺损伤的疾病靶点,使用在线Venny平台选出二者的交集靶点,利用String平台构建PPI网络,运用Cytoscape 3.7.1软件筛选核心靶点,运用DAVID数据库进行GO及KEGG通路富集分析,构建"药物-疾病-通路"网络图。实验验证部分采用CLP法建立脓毒症肺损伤大鼠模型,药物干预后观察各组大鼠生存率及肺组织病理变化,比较肺组织湿/干重比,检测BALF中白细胞计数、相关炎症因子水平及肺组织中NF-κB蛋白表达情况。**结果**:本研究共筛选得到TNF-α、IL-1β、IL-6等159个吴茱萸汤治疗脓毒症-肺损伤的作用靶点,涉及包括NF-κB signaling pathway在内的20条关键通路。实验验证结果显示:各给药组较模型组大鼠生存率提高($P<0.05$),其中吴茱萸汤中剂量组较其余给药组提高最显著($P<0.05$);模型组较假手术组大鼠肺组织湿/干比升高($P<0.05$),而各给药组较模型组下降($P<0.05$),其中吴茱萸汤中剂量组较其余给药组下降最显著($P<0.05$);模型组较假手术组BALF中白细胞计数及TNF-α、IL-1β、IL-6水平均升高($P<0.05$),而各给药组较模型组均降低($P<0.05$),其中吴茱萸汤中剂量组较其余给药组降低最显著($P<0.05$);模型组较假手术组大鼠肺组织中NF-κB p65蛋白表达上调($P<0.05$),而各给药组较模型组下调($P<0.05$),其中吴茱萸汤中剂量组较其余给药组下调最显著($P<0.05$)。**结论**:吴茱萸汤可降低TNF-α、IL-1β、IL-6水平,下调NF-κB蛋白表达,通过抑制脓毒症大鼠炎症以减轻肺损伤,该作用机制可能与NF-κB信号通路有关。

[关键词] 吴茱萸汤;脓毒症;肺损伤;抗炎;网络药理学
[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 2097-5953(2025)06-0433-10

Exploring the mechanism of Wuzhuyu decoction in reducing lung injury in sepsis rats based on network pharmacology and experimental validation

JIN Songfeng[1], DI Jingxin[2], GUAN Yujuan[1], DING Xiaohuan[1], GAN Yu[1], CUI Yinghai[1], ZHANG Jiwei[1], CHEN Meijuan[2], LIN Yukang[2], YU Xuefeng[1]✉, YIN Jiangtao[1]✉

(1. *The Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang* 110034, *China*; 2. *Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang* 110847, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by the National Key Research and Development Program* (2018*YFC*1707410); *Regional Traditional Chinese Medicine Diagnosis and Treatment Center Project of the State Administration of Traditional Chinese Medicine* (*Traditional Chinese Medicine Lung Disease Specialty*); *Collaborative Innovation and Transformation Project for High Quality Development of Traditional Chinese Medicine by the State Administration of Traditional Chinese Medicine* (*CXZH*04); *Natural Science Foundation of Liaoning Province* [*Liaokefa* (2022) *No.* 32]; *Construction Project of Yu Xuefeng Liaoning Provincial Famous Traditional*

[基金项目]国家重点研发计划(2018YFC1707410);国家中医药管理局区域中医诊疗中心项目(中医肺病专业);国家中医药管理局中医药高质量发展协同创新转化工程项目(CXZH04);辽宁省自然科学基金计划项目[辽科发(2022)32号];于雪峰辽宁省名中医传承工作室建设项目[辽中医药发(2022)1号];辽宁省科技厅博士启动基金(2022-BS-068);沈阳市科学技术计划项目公共卫生研发专项(241002、240997);辽宁中医药大学附属第二医院"育苗工程"项目[辽中研发(2023)5号]

[作者简介]金颂峰,E-mail:847555754@qq.com;邸静鑫,E-mail:lnzydjx@foxmail.com。
[通讯作者]于雪峰,主任中医师,教授,硕士生导师,E-mail:yu8282@163.com;尹江涛,副主任中医师,硕士生导师,E-mail:yjtiia@163.com。
[收稿日期]2024-07-09 [修回日期]2024-10-12 网络出版时间:2024-10-29 15:12:58

Chinese Medicine Inheritance Studio [*Liaoning Traditional Chinese Medicine Development* (2022) *No.* 1]; *Doctoral Initiation Fund of Liaoning Provincial Department of Science and Technology* (2022-*BS*-068); *Shenyang Science and Technology Plan Project Public Health Research and Development Special Project* (241002, 240997); *The "Nursery Project" of the Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine* [*Liaozhong R&D* (2023) *No.* 5]

[*Author*]: *JIN Songfeng*, *E-mail*: 847555754@*qq.com*; *DI Jingxin*, *E-mail*: *lnzydjx@foxmail.com*.

[*Correspondence to*]: *YU Xuefeng*, *Chief Traditional Chinese Medicine Practitioner*, *Professor*, *Master's Supervisor*, *E-mail*: *yu*8282@163.*com*; *YIN Jiangtao*, *Deputy Director of Traditional Chinese Medicine*, *Master's Supervisor*, *E-mail*: *yjtiia*@163.*com*.

Received: 2024-07-09 *Revised*: 2024-10-12 *JHMU*, 2025;31(6):433-442

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective**: To pharmacology and experimental verification explore the possible mechanism of Wuzhuyu decoction in reducing lung injury in septic rats based on network. **Methods**: TCMSP and ETCM databases were used to screen and determine the active ingredients in Wuzhuyu decoction. Effective targets were selected using the Uniport database, and disease targets for sepsis-induced lung injury were obtained using GeneCards and OMIM databases. The intersection targets of the two were selected using the online Venny platform. A PPI network was constructed using the String platform, and core targets were screened using Cytoscape 3.7.1 software.The DAVID database was utilized to analyze GO and KEGG pathway and a "Drug-Disease-Pathway" network diagram was constructed. The experimental validation section used the CLP method to establish a rat model of sepsis-induced lung injury. After drug intervention, the survival rate and pathological changes in lung tissue of each group of rats were observed, and the wet/dry weight ratio of lung tissue was compared. The white blood cell count, levels of related inflammatory factors in BALF and expression of NF-κB protein in lung tissue were detected. **Results**: This research screened 159 targets of Wuzhuyu decoction for the cure of sepsis lung injury, including TNF-α, IL-1β, IL-6, *etc*, involving 20 key pathways including NF-κB signaling pathway. The experimental verification results showed that the survival rates of rats in each treatment group were improved compared to the model group ($P<0.05$), while the medium dose group of Wuzhuyu decoction showed the most significant improvement compared to the other treatment groups ($P<0.05$). The wet/dry ratio of lung tissue in the model group was higher than the sham surgery group ($P<0.05$), while each treatment group showed a decrease compared to the model group ($P<0.05$). Among them, the medium dose group of Wuzhuyu decoction showed the most significant decrease compared to the other treatment groups ($P<0.05$). The model group showed an increase in white blood cell count, TNF-α, IL-1β and IL-6 levels in BALF compared to the sham surgery group (all $P<0.05$), while each treatment group showed a decrease compared to the model group (all $P<0.05$). Among them, the medium dose group of Wuzhuyu decoction showed the most significant decrease compared to the other treatment groups ($P<0.05$). The expression of NF-κB p65 protein in the lung tissue of rats in the model group was upregulated compared to the sham surgery group ($P<0.05$), while each treatment group was downregulated compared to the model group ($P<0.05$). Among them, the medium dose group of Wuzhuyu decoction had the most significant downregulation compared to the other treatment groups ($P<0.05$). **Conclusion**: Wuzhuyu decoction can reduce the levels of TNF-α, IL-1β and IL-6, downregulate the expression of NF-κB protein, and alleviate lung injury by inhibiting inflammation in septic rats. This mechanism may be related to the NF-κB signaling pathway.

[Key words] Wuzhuyu decoction; Sepsis; Lung injury; Inhibit inflammation; Network pharmacology

脓毒症(Sepsis)是机体对感染反应失调所导致的严重器官功能障碍,而肺脏往往是其受累的第一个器官[1]。据相关流行病学调查发现Sepsis患者中肺损伤的发生率为68.2%,其90 d内的病死率高达35.5%,严重威胁患者的生命健康[2]。目前临床上针对Sepsis所致肺损伤的治疗手段有限,而中医药具有多成分、多靶点、多通路的独特优势,故对Sepsis肺损伤中医药治疗的研究极为重要。

吴茱萸汤的组成包括吴茱萸、生姜、人参、大枣4种中药,目前针对吴茱萸汤成分的研究主要集中在其单味药成分上,如吴茱萸碱、姜黄素、人参皂苷、大枣多糖等已有研究证实具有抗炎、抗菌、抗氧化、调节免疫功能等作用,可有效改善脓毒症肺损伤[3-6]。但作为中药复方的吴茱萸汤对Sepsis肺损伤的研究鲜有报道,为明确吴茱萸汤对Sepsis肺损伤的作用靶点、机制及可能有关的信号通路。因此,本研究基于网络药理学及实验验证,探讨吴茱萸汤减轻脓毒症大鼠肺损伤的作用机制。

1 网络药理学

1.1 吴茱萸汤活性成分及靶点筛选

以“吴茱萸”、“人参”、“生姜”和“大枣”为关键词利用TCMSP数据库[7]检索四位中药的所有化学成分。以生物口服利用度(OB)≥30%、类药性(DL)≥0.18为标准筛选“吴茱萸汤”主要活性成分。对于在TCMSP数据库中未能检索到的药物,借助ETCM数据库进行查询,并结合查阅已发表的文献来补充药物成分,再通过UniProt数据库[8]对靶点信息进行标准化处理。

1.2 脓毒症肺损伤有效疾病靶点筛选

以“Sepsis induced lung injury”为关键词分别使用GeneCards数据库[9]和OMIM数据库[10]查找“脓毒症肺损伤”疾病靶点，考虑获得的全部疾病靶点较多，为筛选出有效疾病靶点，故计算全部疾病靶点Relevance score的中位数为8.82，遂筛选出所有Relevance score＞8.82的靶点作为“脓毒症肺损伤”的有效疾病靶点。

1.3 获取交集靶点、构建PPI网络、筛选核心靶点

使用在线Venny平台对吴茱萸汤靶点与脓毒症肺损伤有效靶点进行交集分析，通过绘制韦恩图获取交集靶点，并将交集靶点上传至String平台[11]，建立蛋白质相互作用(PPI)网络，并将PPI结果导入Cytoscape3.7.1软件中，根据连接度值(Degree)筛选核心靶点，并构建“吴茱萸汤减轻脓毒症肺损伤”的核心靶点网络图。

1.4 交集靶点的GO功能与KEGG通路富集分析

将交集靶点导入DAVID数据库[12]，对其进行GO生物学过程富集分析和KEGG代谢通路富集分析，使用Bioinformatics平台分别对其绘制气泡图。

2 实验验证

2.1 实验动物

90只8周龄雄性(体重300～400 g)SPF级SD大鼠，生产许可证号SCXK(辽)2020-0001，使用许可证号SYXK(辽)2019-0004，购自辽宁长生生物技术股份有限公司，饲养于辽宁中医药大学附属第二医院动物实验中心，温度20 ℃，相对湿度50%，12 h光照、12 h黑暗循环。本研究通过辽宁中医药大学附属第二医院/辽宁省中医药研究院实验动物伦理委员会审查(实验动物伦理审查编号：D001-RS01)。

2.2 实验药物

吴茱萸汤：吴茱萸9 g，生姜18 g，人参9 g，大枣十二枚约20 g，由中医药大学附属第二医院中药局制备；地塞米松片：广东南国药业，国药准字H44024618，0.75 mg/片。

2.3 试剂与仪器

大鼠肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-6(IL-6)ELISA试剂盒(购自Servicebio公司，货号分别为：GB11063-1、GB14037、GB13021)；NF-κB p65抗体(购自Bioss公司，货号：bs-20355R)；BCA蛋白定量试剂盒(购自新赛美生物公司，货号：WB6501)；Western电泳仪、电泳槽(购自Tianneng公司，型号分别为：ZXCT-6600TY、HEFT-1200)；倒置荧光显微镜(购自Olympus Science公司，型号：IX71FL)等。

2.4 分组、造模与给药

适应性喂养大鼠7 d后，随机分为6组：假手术组、模型组、地塞米松组、吴茱萸汤低剂量组、吴茱萸汤中剂量组、吴茱萸汤高剂量组，15只/组，术前禁食12 h，不禁水。大鼠经丙泊酚(80～100 mg/kg)腹腔注射麻醉后采用盲肠结扎穿刺法(CLP)[13]，CLP法是当前较为公认的制备脓毒症肺损伤大鼠模型的造模方法，与活细菌法和脂多糖法(LPS)等模型制备方法相比，具有见效快、持续时间长、可近似真实的模拟临床脓毒症肺损伤患者等优势，其具体方法为：开腹暴露动物盲肠，除正常组外的大鼠于距盲肠末端1 cm处采用3号缝合线结扎并使用8号针头贯穿盲肠2次，轻挤压使含有多重菌的肠内容物由穿刺孔流入腹腔。正常组仅开腹取出盲肠再原位放回，不做结扎、穿孔处理。各组动物分别于造模第2天开始灌胃：吴茱萸汤低剂量组予2.5 g/kg吴茱萸汤、吴茱萸汤中剂量组予5 g/kg吴茱萸汤、吴茱萸汤高剂量组予10 g/kg吴茱萸汤、地塞米松组予1 mg/kg地塞米松溶液、假手术组、模型组予等剂量蒸馏水，连续灌胃7 d。

2.5 标本采集与检测

2.5.1 ELISA法检测BALF中白细胞计数和相关炎症因子水平 采集前夜大鼠需禁食。暴露气管并将留置静脉针插入气管，用2 mL磷酸盐缓冲液(PBS)进行肺泡灌洗约1 min，重复灌洗3次收集肺泡灌洗液(BALF)。取一部分BALF使用BCA蛋白试剂盒检测蛋白含量，采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测BALF中白细胞计数、TNF-α、IL-1β及IL-6水平。

2.5.2 Western blot法检测肺组织中NF-κB p65蛋白表达水平 严格无菌开胸取左肺组织放入1.5 L的EP管中，加裂解液匀浆，离心后吸取上清，进行蛋白质定量分析，将提取的蛋白电泳、转膜后，一抗与靶蛋白结合，辣根过氧化物酶标记的二抗与一抗结合；将PVDF膜平铺于保鲜膜上，加入ECL发光液避光反应2 min后进行灰度扫描及条带分析。

2.5.3 肺组织湿/干重比 取右肺中叶组织，滤纸擦干，称重即湿重(W)，放入烤箱中，直至质量不再变化，称重即干重(D)。计算大鼠W/D值。

2.5.4 肺组织病理改变及损伤评分 取右上叶肺组织，用生理盐水冲洗表面血液并吸取表面水分，4%多聚甲醛固定后石蜡包埋，切片4 μm进行H&E染色，封片后于观察肺组织病理变化，根据中性粒细胞浸润、肺泡腔内出血及渗出、泡水肿等肺组织病理变化评估肺组织损伤程度[14]。

2.6　统计学方法

应用SPSS 20.0软件。计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析。$P<0.05$为差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　药物活性成分及有效靶点筛选

筛选得到吴茱萸独有成分(WZY)12个、人参独有成分(RS)7个、生姜独有成分(SJ)1个、大枣独有成分(DZ)9个,此外吴茱萸＋人参＋生姜＋大枣共有成分(A1)1个、吴茱萸＋大枣共有成分(C1、E1)2个、人参＋生姜共有成分(B1)1个、人参＋大枣共有成分(D1)1个,共计34种吴茱萸汤活性成分,见表1。所对应靶点包括吴茱萸189个、人参106个、生姜48个、大枣195个,合并去重处理后,共计221个吴茱萸汤有效靶点。

表1　“吴茱萸汤”药物活性成分

Tab 1　The active ingredients of Wuzhuyu decoction

标记	MOL ID	活性成分	OB值	DL值	来源
WZY1	MOL002662	Rutaecarpine	40.30	0.60	吴茱萸
WZY2	MOL000354	Isorhamnetin	49.60	0.31	吴茱萸
WZY3	MOL000359	Sitosterol	36.91	0.75	吴茱萸
WZY4	MOL003947	1-Methyl-2-[(Z)-pentadec-10-enyl]-4-quinolone	48.45	0.46	吴茱萸
WZY5	MOL003956	Dihydrorutaecarpine	42.27	0.60	吴茱萸
WZY6	MOL003957	1-Methyl-2-pentadecyl-4-quinolone	44.52	0.46	吴茱萸
WZY7	MOL003958	Evodiamine	86.02	0.64	吴茱萸
WZY8	MOL003960	1-(5,7,8-Trimethoxy-2,2- dimethylchromen-6-yl)ethanone	30.39	0.18	吴茱萸
WZY9	MOL003963	Hydroxyevodiamine	72.11	0.71	吴茱萸
WZY10	MOL003972	1-Methyl-2-nonyl-4-quinolone	48.42	0.20	吴茱萸
WZY11	MOL004014	Evodiamide	73.77	0.28	吴茱萸
WZY12	MOL004020	Gossypetin	35.00	0.31	吴茱萸
RS1	MOL002879	Diop	43.59	0.39	人参
RS2	MOL003648	Inermin	65.83	0.31	人参
RS3	MOL000422	Kaempferol	41.88	0.24	人参
RS4	MOL005320	Arachidonate	45.57	0.20	人参
RS5	MOL005344	Ginsenoside rh2	36.32	0.56	人参
RS6	MOL005376	Panaxadiol	33.09	0.79	人参
RS7	MOL005384	Suchilactone	57.52	0.56	人参
SJ1	MOL006129	6-Methylgingediacetate2	48.73	0.32	生姜
DZ1	MOL012921	Stepharine	31.55	0.33	大枣
DZ2	MOL012946	Zizyphus saponin I_qt	32.69	0.62	大枣
DZ3	MOL012976	Coumestrol	32.49	0.34	大枣
DZ4	MOL001522	(S)-Coclaurine	42.35	0.24	大枣
DZ5	MOL000492	(＋)-catechin	54.83	0.24	大枣
DZ6	MOL000627	Stepholidine	33.11	0.54	大枣
DZ7	MOL007213	Nuciferin	34.43	0.40	大枣
DZ8	MOL002773	Beta-carotene	37.18	0.58	大枣
DZ9	MOL000096	(-)-Catechin	49.68	0.24	大枣
A1	MOL000358	Beta-sitosterol	36.91	0.75	吴茱萸＋人参＋生姜＋大枣
B1	MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76	人参＋生姜
D1	MOL000787	Fumarine	59.26	0.83	人参＋大枣
C1	MOL001454	Berberine	36.86	0.78	吴茱萸＋大枣
E1	MOL000098	Quercetin	46.43	0.28	吴茱萸＋大枣

3.2　药物与疾病交集靶点的获取

共计获得11 039个脓毒症肺损伤疾病靶点,其中有2 692个Relevance Score大于中位数的有效疾病靶点。将收集的“脓毒症肺损伤”有效疾病靶点与“吴茱萸汤”有效药物靶点取交集,得到159个吴茱萸汤与脓毒症肺损伤交集靶点。见图1。

3.3　构建蛋白质相互作用(PPI)网络、筛选核心靶点

在String平台上传159个交集靶点构建PPI网络,下载其数据导入Cytoscape3.7.1筛选核心靶点,节点越大,颜色越深,连线越密集,则地位越重要,如TNF-α、IL-1β、IL-6等。见图2。

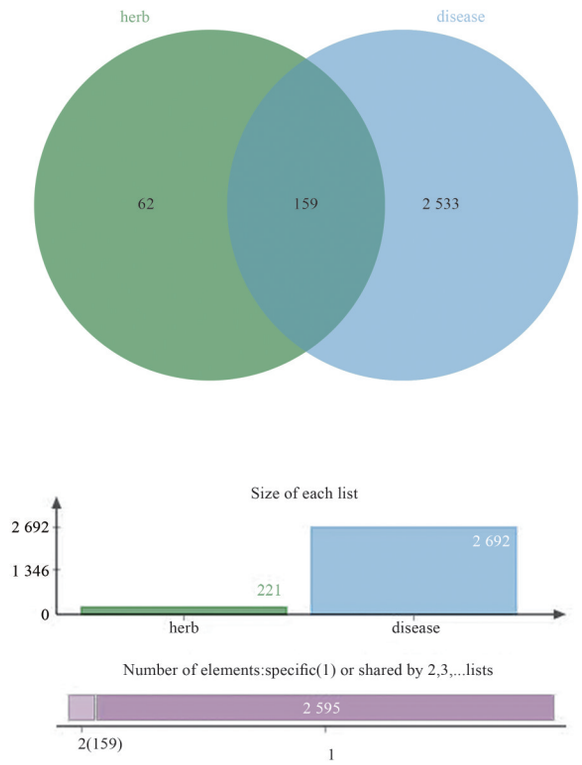


图1 吴茱萸汤与脓毒症肺损伤交集靶点韦恩图

Fig 1 Venn plot of intersection targets of Wuzhuyu decoction in the reducing sepsis lung injury

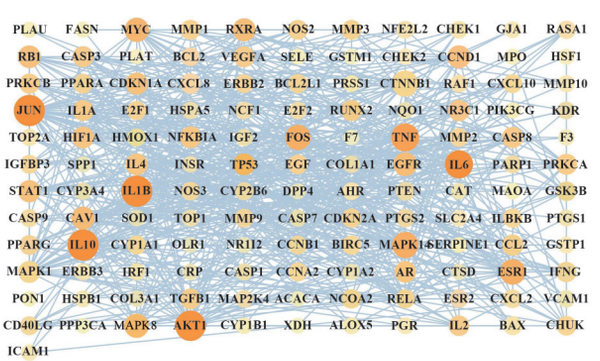


图2 吴茱萸汤减轻脓毒症肺损伤的PPI网络及核心靶点网络图

Fig 2 PPI network and core target network diagram of Wuzhuyu decoction in reducing sepsis lung injury

3.4 核心靶点的GO功能和KEGG通路富集分析

GO功能富集分析显示共有385个GO术语条目：细胞组成(CC)主要集中于膜筏(membrane raft)、等离子体膜筏(plasma membrane raft)、转录调节复合体(transcription regulator complex)等部位；分子功能(MF)主要集中于DNA结合转录因子结合(DNA-binding transcription factor binding)、激酶结合(kinase binding)、激酶结合蛋白结构域特异性结合(kinase bindingprotein domain specific binding)等方面；生物过程(BP)主要集中于细胞对氮化合物的反应(cellular response to nitrogen compound)、对无机物质的反应(response to inorganic substance)、细胞对脂质的反应(cellular response to lipid)等方面。KEGG通路富集分析显示有191条通路，主要与NF-kappa B signaling pathway、HIF-1 signaling pathway、PI3K-AKT signaling pathway等20条关键通路相关。见图3。

3.5 构建“药物-疾病-通路”网络关系图

绘制吴茱萸汤活性成分-吴茱萸汤减轻脓毒症肺损伤核心靶点-关键信号通路网络图，见图4。该网络图反映出吴茱萸汤减轻脓毒症肺损伤多成分、多靶点、多通路的调控特点。

3.6 各组大鼠药物干预后生存率、肺组织湿/干比(W/D)比较结果

药物干预后，模型组存活8只、西药组存活11只、吴茱萸汤低剂量组10只、吴茱萸汤中剂量组13只、吴茱萸汤高剂量组10只、假手术组大鼠15只。各给药组较模型组大鼠生存率提高($P<0.05$)，其中吴茱萸汤中剂量组较其余给药组提高最显著($P<0.05$)。模型组较假手术组大鼠肺组织W/D升高($P<0.05$)，而各给药组较模型组下降($P<0.05$)，其中吴茱萸汤中剂量组较其余给药组下降最显著($P<0.05$)。见表2。

表2 各组大鼠药物干预后生存率、肺组织W/D比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Comparison of survival rate after drug intervention and lung tissue W/D in each group of rats($\bar{x}\pm s$)

组 别	n	生存率	W/D
假手术组	15	1.00±0.07	5.17±0.12
模型组	8	0.53±0.03	5.68±0.18**
西药组	11	0.73±0.03$^{\#*}$	5.32±0.13$^{\#*}$
吴茱萸汤低剂量组	10	0.66±0.06$^{\#*}$	5.44±0.16$^{\#*}$
吴茱萸汤中剂量组	13	0.86±0.06$^{\#}$	5.24±0.12$^{\#}$
吴茱萸汤高剂量组	10	0.66±0.06$^{\#*}$	5.39±0.14$^{\#*}$
F		46.862	77.536
P		<0.001	<0.001

注：与假手术组比较，$^{**}P<0.05$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$；与吴茱萸汤中剂量组比较，$^{*}P<0.05$。

3.7 各组大鼠肺组织HE染色病理变化结果

模型组较假手术组大鼠肺组织结构遭到严重破坏，肺泡边缘不清晰，肺泡腔和间质内大量炎性细胞浸润、充血，可见红细胞渗出($P<0.05$)；各给药

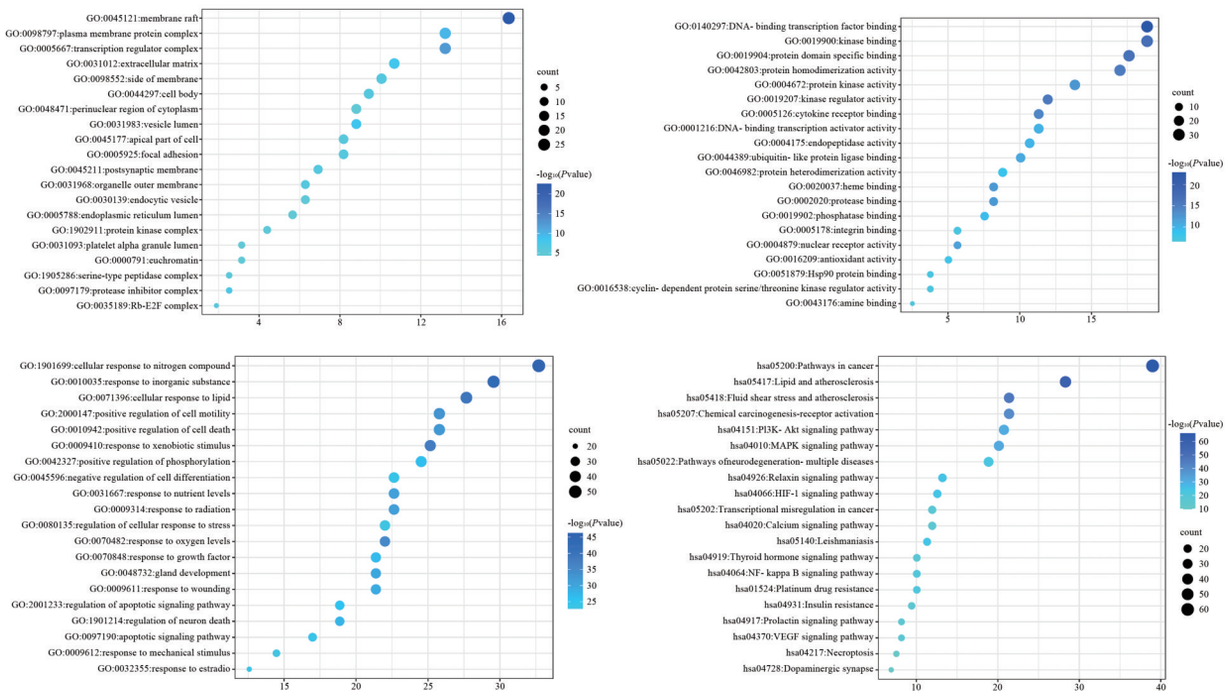


图3　核心靶点的GO功能和KEGG通路富集分析气泡图

Fig 3　Bubble diagram of GO function and KEGG pathway enrichment analysis for the core target

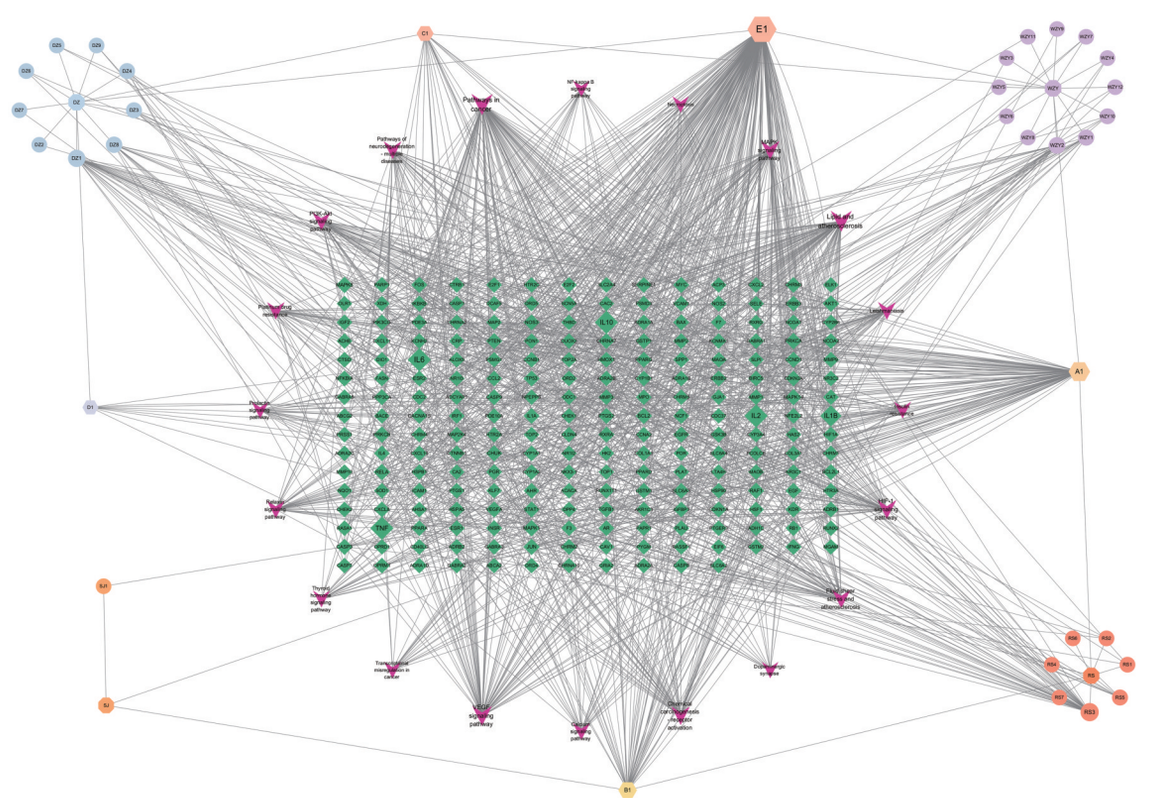
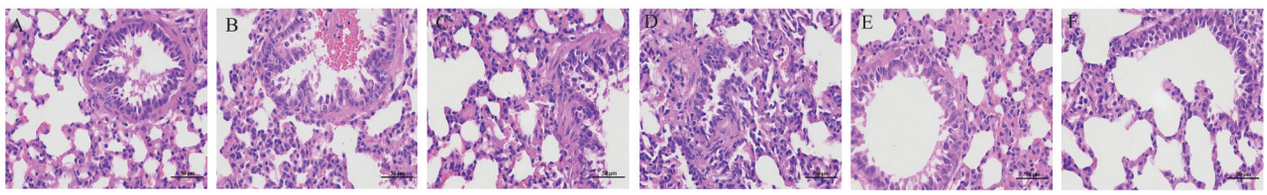


图4　活性成分-核心靶点-关键通路网络图

Fig 4　Network diagram of active ingredient-core target-key pathways

组较模型组肺组织结构破坏减轻，大部分肺泡尚完整，肺泡腔内及肺间隔充血渗出缓解（$P<0.05$）；其中吴茱萸汤中剂量组较其余给药组改善最显著（$P<0.05$）。见图5。



A:假手术组;B模型组;C:西药组;D:吴茱萸汤低剂量组;E:吴茱萸汤中剂量组;F:吴茱萸汤高剂量组

图5 各组大鼠肺组织病理组织观察(H&E染色,400倍)

Fig 5 Observation of lung tissue pathology in each group of rats (H&E staining, 400×)

3.8 ELISA法检测BALF中白细胞计数和相关炎症因子水平结果

模型组较假手术组BALF中白细胞计数及TNF-α、IL-1β、IL-6水平均升高($P<0.05$),而各给药组较模型组均降低($P<0.05$),其中吴茱萸汤中剂量组较其余给药组降低最显著($P<0.05$),见表3。

表3 各组大鼠BALF中白细胞计数、TNF-α、IL-1β及IL-6水平比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Comparison of white blood cell count, TNF-α, IL-1β, and IL-6 levels in BALF of rats in each group($\bar{x}\pm s$)

组 别	n	白细胞计数($\times10^9$/L)	TNF-α(pg/mL)	IL-1β(pg/mL)	IL-6(pg/mL)
假手术组	15	8.50±0.49	44.13±8.12	8.52±0.67	58.17±8.12
模型组	8	23.08±0.87**	335.68±22.47**	38.57±2.11**	411.65±22.68**
西药组	11	10.06±0.61$^{\#*}$	179.45±13.43$^{\#*}$	15.72±1.35$^{\#*}$	143.73±17.61$^{\#*}$
吴茱萸汤低剂量组	10	14.18±0.28$^{\#*}$	215.34±17.81$^{\#*}$	23.58±2.07$^{\#*}$	202.54±21.17$^{\#*}$
吴茱萸汤中剂量组	13	9.32±0.56$^{\#}$	147.48±11.35$^{\#}$	13.41±0.88$^{\#}$	135.96±13.18$^{\#}$
吴茱萸汤高剂量组	10	12.41±0.34$^{\#*}$	198.79±15.69$^{\#*}$	19.84±1.85$^{\#*}$	185.28±19.76$^{\#*}$
F		27.453	39.681	34.574	63.237
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与假手术组比较,$^{**}P<0.05$;与模型组比较,$^{\#}P<0.05$;与吴茱萸汤中剂量组比较,$^{*}P<0.05$。

3.9 Western blot法检测肺组织中NF-κB p65蛋白表达水平

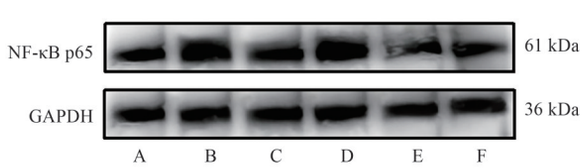
模型组较假手术组大鼠肺组织中NF-κB p65蛋白表达上调($P<0.05$),而各给药组较模型组下调($P<0.05$),其中吴茱萸汤中剂量组较其余给药组下调最显著($P<0.05$),见表4、图6。

表4 各组大鼠肺组织中NF-κB p65蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Comparison of NF-κB p65 protein expression levels in lung tissues of rats in different groups($\bar{x}\pm s$)

组 别	n	NF-κB p65/GAPDH
假手术组	15	1.05±0.03
模型组	8	1.61±0.05**
西药组	11	1.37±0.04$^{\#*}$
吴茱萸汤低剂量组	10	1.50±0.08$^{\#*}$
吴茱萸汤中剂量组	13	1.29±0.03$^{\#}$
吴茱萸汤高剂量组	10	1.41±0.04$^{\#*}$
F		157.337
P		<0.001

注:与假手术组比较,$^{**}P<0.05$;与模型组比较,$^{\#}P<0.05$;与吴茱萸汤中剂量组比较,$^{*}P<0.05$。



A:假手术组;B模型组;C:西药组;D:吴茱萸汤低剂量组;E:吴茱萸汤中剂量组;F:吴茱萸汤高剂量组

图6 各组大鼠肺组织中NF-κB p65蛋白表达电泳图

Fig 6 Electrophoretic maps of NF-κB p65 protein expression in lung tissue of rats in each group

4 讨论

脓毒症(Sepsis)出现后大量炎症因子和细菌产物等有害物质可迅速通过血液循环先后影响各个脏器功能,而肺则是最早受损的靶器官,直接导致肺损伤的发生[15]。《伤寒论》:“凡少阴病阳虚寒盛而至亡阳,阳气涣散,神明无主,烦躁亦甚,吐利交作之际,多属不治之死证,有顷刻消亡之危。”从中医“六经辨证”角度分析,所谓上受即是太阳伤寒,太阳之底面即是少阴,少阴病多从太阳伤寒不治而

来。Sepsis肺损伤是由多种原因造成感染进而引发全身炎症反应的急危重症，其症状可见寒战、意识障碍（如焦虑不安）、四肢湿冷、脉搏细数等，故其发病过程与中医伤寒中“太阳”至“少阴”的传变过程相似，其症状与“少阴病”相符。根据患者的呼吸频速、喘息动作等主要临床表现，故可将Sepsis肺损伤归为中医“喘证”“暴喘”“喘脱”的范畴[16]。《黄帝内经·素问》中提出的“温邪上受，首先犯肺”理论认为肺叶娇嫩，百病易伤，为五脏六腑之华盖，最容易遭受温邪温毒的侵犯，而肺气一伤，则百病蜂起，这就与脓毒症相关肺损伤的产生原因、发病特点十分契合[17]。因此，在Sepsis的治疗过程中应贯彻以“肺保护”为核心的全身多器官功能保护，强化“肺保护”的前哨作用。

吴茱萸汤是汉代张仲景所著《伤寒论》中的经典名方，全方由吴茱萸、生姜、人参以及大枣组成，其中吴茱萸为君药，生姜为臣药，人参为佐药，大枣为使药[18]。《伤寒论》第309条：“少阴病，吐，利，手足逆冷，烦躁欲死者，吴茱萸汤主之。”吴茱萸汤具有抗炎、止痛、降压、止呕等多种作用，临床疗效显著，应用十分广泛[19]。Sepsis肺损伤的西医治疗对抗生素的使用具依赖性，而抗生素的大量应用促使细菌产生耐药性，提高了药物不良反应，增加了治疗的难度[20]。当前吴茱萸汤对Sepsis肺损伤的整方研究较少，多集中于单味药的化学成分研究，也缺乏对组方机制的深入研究，而中医理论强调整体观念和辨证论治，故本研究应用吴茱萸汤“温中补虚、温肺补肺、复脉固脱”之功效，发挥调控炎症因子作用，为中医药减轻Sepsis肺损伤提供新思路和新方法[21]。

脓毒症（Sepsis）肺损伤患者可分泌大量促炎因子造成全身性过度炎症反应，导致清除病原菌的能力下降[22]。全身性过度炎症反应的发生是由于侵入肺内的大量炎性因子迅速聚集并进一步浸润，使促炎和抗炎反应失调，继而产生弥漫性肺间质和肺泡水肿，影响了肺的气体交换，最终发展为Sepsis肺损伤[23]。可以说全身性过度炎症反应是导致Sepsis肺损伤发生的一个关键因素，而抗炎则是减轻Sepsis肺损伤的重要途径之一。大量研究发现吴茱萸汤中多种有效成分，如吴茱萸碱、姜黄素、人参皂苷及大枣多糖等都具有抗炎作用，但是作为整体成方的吴茱萸汤是否能够仍然对Sepsis肺损伤发挥抗炎作用的研究还尚缺乏，故挖掘吴茱萸汤对Sepsis肺损伤的抗炎作用及其具体作用机制尤为重要。

因此，本项研究首先采用网络药理学方法揭示了吴茱萸汤减轻Sepsis肺损伤的潜在核心靶点，主要包括肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、白细胞介素-1β（IL-1β）和白细胞介素-6（IL-6）等。TNF-α、IL-1β及IL-6作为经典的炎症因子能够引发白细胞聚集并导致严重的肺损伤发生[1]。其次，通过对吴茱萸汤减轻Sepsis肺损伤的潜在作用靶点进行GO功能富集分析和KEGG通路富集分析，其结果表明上述潜在核心靶点可能参与了炎症反应，而核因子κB（NF-κB）信号通路则可能是吴茱萸汤减轻Sepsis肺损伤的关键通路之一。NF-κB作为细胞内重要的核转录因子，已被证实在Sepsis肺损伤大鼠中发挥重要作用[24]。结合多项研究[25]，证实NF-κB信号通路可协同诱导TNF-α、IL-1β和IL-6等促炎细胞因子的表达，对炎症的发生、发展起着重要调控作用，进一步证实了吴茱萸汤减轻Sepsis肺损伤的可能性。最后，本研究在网络药理学分析的基础上，采用当前较为公认的Sepsis肺损伤大鼠造模方法——CLP法，建立动物模型，通过对大鼠的生存率、生化指标、肺组织病理、及对相关炎症反应和NF-κB信号通路的影响进行实验研究，证实吴茱萸汤可以提高Sepsis肺损伤大鼠的生存率，改善大鼠肺组织结构破坏，从而减轻Sepsis大鼠肺损伤，显著下调Sepsis肺损伤大鼠肺组织中NF-κB p65蛋白表达，降低BALF中白细胞计数、TNF-α、IL-1β及IL-6水平，说明吴茱萸汤具有抑制Sepsis肺损伤大鼠炎症反应的作用，其抗炎机制可能与抑制NF-κB信号通路有关。

综上所述，吴茱萸汤可以有效降低促炎因子水平，减轻Sepsis大鼠肺损伤，其作用机制通过网络药理学及实验验证可能与调控NF-κB信号通路有关。

作者贡献度说明：

金颂峰、邸静鑫：负责网络药理学、实验设计与实施、文稿撰写；于雪峰、尹江涛：负责论文及实验指导；甘雨、张继伟：负责动物饲养及造模；陈美娟、林宇康：负责指标检测、数据分析；关玉娟、丁晓欢：负责论文审校。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Evans T. Diagnosis and management of sepsis[J]. Clin Med, 2018,18(2): 146-149.

2 Xie J, Wang H, Kang Y, et al. The epidemiology of sepsis in Chinese ICUs: A national cross-sectional survey[J]. Crit Care Med, 2020, 48(3):e209-e218.

3 潘之得, 沙媛媛, 郭健, 等. 吴茱萸碱调节HMGB1-RAGE信号通路对脓毒症大鼠急性肺损伤的影响[J]. 解剖学研究, 2023, 45(6): 541-546.
Pan ZD, Sha YY, Guo J, et al. The effect of Wu Zhu Yu alkaloid on regulating the HMGB1-RAGE signaling pathway in acute lung injury of septic rats[J]. Anatom Study, 2023, 45(6): 541-546.

4 Xiao Z, Xu F, Zhu X, et al. Erratum: Inhibition of JNK phosphorylation by curcumin analog C66 protects LPS-induced acute lung injury[J]. Drug Des Devel Ther, 2022,16: 249-250.

5 Wang QL, Yang L, Peng Y, , et al. Ginsenoside Rg1 regulates SIRT1 to ameliorate sepsis-induced lung inflammation and injury *via* inhibiting endoplasmic reticulum stress and inflammation[J]. Mediators Inflamm, 2019: 6453296.

6 代琪, 白苑丁, 叶俏波, 等. 不同产地大枣化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中国药物评价, 2023, 40(6): 506-511.
Dai Q, Bai YD, Ye QB, et al. Research progress on chemical components and pharmacological effects of jujube from different regions[J]. Chin Drug Evaluat, 2023, 40(6): 506-511.

7 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(1):13.

8 Consortium TU. UniProt: The universal protein knowledgebase in 2023[J]. Nucleic Acids Res, 2022, 51(D1): D523-D531.

9 Safran M, Rosen N, Twik M, et al. The genecards suite[J]. Pract Guide Life Sci Databases, 2021: 27-56.

10 Hamosh A, Amberger JS, Bocchini C, et al. Online mendelian inheritance in man(OMIM®): Victor McKusick's magnum opus[J]. Am J Med Genet A, 2021, 185(11): 3259-3265.

11 Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage , supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. Nucleic Acids Res, 2019 ,47(D1): D607-D613.

12 Sherman BT, Hao M, Qiu J, et al. DAVID: A web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists(2021 update)[J]. Nucleic Acids Res, 2022, 50(W1): W216-W221.

13 Anter A, Ahmed AF, Hammad ASA, et al. Corrigendum: The severity of acute kidney and lung injuries induced by cecal ligation and puncture is attenuated by menthol: Role of proliferating cell nuclear antigen and apoptotic markers[J]. Front Med,2022,9:1024554.

14 邵沙沙, 殷惠美, 杨家乐, 等. 丹参酮ⅡA对脓毒症肺微血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国中医急症, 2024, 33(4): 591-594,624.
Shao SS, Yin HM, Yang JL, et al. Protective effect of tanshinone IIA on pulmonary microvascular endothelial cell injury in sepsis[J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2024, 33(4): 591-594,624.

15 丁鑫, 钱占红, 任存霞, 等. 中医药防治脓毒症肺损伤现状及其相关指标的研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2022, 41(7): 145-147.
Ding X, Qian ZH, Ren CX, et al. Research progress on the current status and related indicators of traditional Chinese medicine in the prevention and treatment of sepsis induced lung injury[J]. Nei Mongol J Tradit Chin Med, 2022, 41(7): 145-147.

16 马小龙, 陈跃如, 沈菲妍, 等. 传统中医药在急性肺损伤中的治疗作用和机制的研/进展[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(2): 269-276.
Ma XL, Chen YR, Shen FY, et al. Research progress on the therapeutic effect and mechanism of traditional Chinese medicine in acute lung injury[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2022, 39(2): 269-276.

17 任清竹,苏和,张瑞芬,等. 脓毒症的病因病机及中药治疗研究进展[J]. 内蒙古中医药,2022, 41(4): 167-168.
Ren QZ, Su H, Zhang RF, et al. Research progress on the etiology, pathogenesis, and traditional Chinese medicine treatment of sepsis[J]. Nei Mongol J Tradit Chin Med,2022, 41(4): 167-168.

18 蔡梦如,董晓旭,朱荣玥,等.经典名方吴茱萸汤研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(1): 155-159.
Cai MR, Dong XX, Zhu RY, et al. Research progress on the classic decoction Wuzhuyu[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2023, 41(1): 155-159.

19 徐程, 李崇超. 吴茱萸汤的研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2022,37(10): 5853-5856.
Xu C, Li CC. Research progress of Wuzhuyu decoction[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(10): 5853-5856.

20 王亚鹏, 袁倩倩, 谢冠群. 脓毒症中医多体系辨治探讨[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(8): 4269-4272.
Wang YP, Yuan QQ, Xie GQ. Exploration of traditional Chinese medicine multi system diagnosis and

treatment for sepsis[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(8): 4269-4272.

21 胡斌, 刘冰, 赵浩延, 等.中医药治疗脓毒症的研究进展[J].中国医药指南, 2020, 18(22): 32-33.
Hu B, Liu B, Zhao HT, et al. Research progress in the treatment of sepsis with traditional Chinese medicine[J]. Guide Chin Med, 2020, 18(22): 32-33.

22 Su J, Chen K, Sang X, et al. Huperzine a ameliorates sepsis-induced acute lung injury by suppressing inflammation and oxidative stress *via* α7 nicotinic acetylcholine receptor[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 141: 112907.

23 Liu Y, Chen L. Impact of interleukin 6 levels on acute lung injury risk and disease severity in critically ill sepsis patients[J]. World J Clin Cases, 2024, 12(23): 5374-5381.

24 王西墨, 余剑波, 金胜威.脓毒症肺损伤中西医结合诊治专家共识[J].中国中西医结合外科杂志, 2020, 26(3): 400-408.
Wang XM, Yu JB, Jin SW. Expert consensus on the integrated diagnosis and treatment of traditional Chinese and Western medicine for sepsis induced lung injury[J]. Chin J Int Tradit Chin Western Med Surgery, 2020, 26(3): 400-408.

25 Huang SY, Liu D, Sun JH, et al. Tim-3 regulates sepsis-induced immunosuppression by inhibiting the NF-κB signaling pathway in CD4 T cells[J]. Mol Ther, 2022, 30(3): 1227-1238.

[**本文编辑**] 雷 燕 宋睿璞 朱 昊