

基于“药物-靶点-通路”网络的血必净注射液 治疗脓毒症分子调控机制

冯燕燕^{1,2}, 谢媛媛^{2*}, 汪艳平², 连琦², 王义明², 罗国安^{1,2}, 王淑美^{1*}

(1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006; 2. 清华大学化学系, 北京 100084)

摘要: 构建血必净注射液治疗脓毒症的“药物-靶点-通路”分子调控网络, 基于“系统-系统”的模式探索其治疗脓毒症“多成分-多靶点-多通路”的作用机制。针对血必净注射液整体化学物质组中的活性成分, 采用网络药理学研究方法, 利用基于反向药效团匹配的靶标识别服务平台分析预测潜在作用靶点, 获取的靶点信息利用 DAVID 和 KEGG 数据库进行通路注释, 采用 Cytoscape 软件构建血必净注射液治疗脓毒症的“成分-靶点-通路”网络模型。结果显示, 血必净注射液中 21 个主要活性成分通过调控 HRAS、GSK3B、BTK 和 AK 等 550 个靶点, 干预 B 细胞受体信号转导途径、血管内皮生长因子信号通路、自然杀伤细胞介导的细胞毒作用和 Toll 样受体信号转导途径等 10 条通路发挥抗炎、调节免疫等作用。血必净注射液对脓毒症的治疗作用体现了中药多成分、多靶点和多途径的作用特点。本研究明确了血必净注射液抗炎和调节免疫作用的物质基础, 为深入阐释血必净注射液治疗脓毒症作用相关机制提供科学依据。

关键词: 网络药理学; 血必净注射液; 脓毒症; 抗炎; 免疫调节; 物质基础

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 04-0556-07

Molecular mechanism of Xuebijing injection in treatment of sepsis according to “drug-target-pathway” network

FENG Yan-yan^{1,2}, XIE Yuan-yuan^{2*}, WANG Yan-ping², LIAN Qi², WANG Yi-ming²,
LUO Guo-an^{1,2}, WANG Shu-mei^{1*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;
2. Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: This study was aimed to construct a “drug-target-pathway” network of Xuebijing injection for sepsis treatment in an effort to explore the “multi-components, multi-targets, multi-pathways” mechanism based on “system-system” research mode. Active ingredients of Xuebijing injection were used to predict the potential targets according to reversed pharmacophore matching method. The pathway information was acquired from DAVID and KEGG database. The Cytoscape software was used to construct the “ingredient-target-pathway” network of Xuebijing injection for sepsis treatment. The results showed that 21 major active ingredients of Xuebijing injection regulated 550 targets (HRAS, GSK3B, BTK, AK, et al) and affected 10 inflammation and immune-related pathways, such as B cell receptor signaling pathway, VEGF signaling pathway, natural killer cell mediated cytotoxicity, Toll-like receptor signaling pathway. The sepsis therapeutic effect of Xuebijing injection reflected the action features of traditional Chinese medicine as multi-ingredients, multi-targets, multi-pathways.

收稿日期: 2016-10-28; 修回日期: 2017-01-05.

基金项目: 国家科技重大新药创制专项资助项目 (2011ZX09201-201-23).

*通讯作者 Tel: 86-10-62772264, E-mail: yuanyuan_sy@tsinghua.edu.cn;

Tel: 86-20-39352177, E-mail: shmwang@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1048

This research clarifies the material basis of Xuebijing injection for anti-inflammation and immunoregulation, providing a scientific basis for elucidation the mechanism of Xuebijing injection in the treatment of sepsis.

Key words: network pharmacology; Xuebijing injection; sepsis; anti-inflammation; immune-regulation; material basis

血必净注射液由红花、赤芍、川芎、丹参和当归等 5 味中药提取精制而成, 具有活血化瘀、疏经通络和溃散毒邪的作用, 治疗因感染、创伤和烧伤等引起的多器官功能障碍综合征效果确切^[1], 是防治脓毒症及多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS) 的一线临床用药。姚咏明课题组^[2]对血必净注射液药理作用进行了大量系统研究, 血必净通过调节 T 细胞凋亡, 影响单核细胞组织因子及凝血功能^[3], 干预活化蛋白 C 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)^[4, 5]等改善脓毒症大鼠的症状, 其作用涉及调节性 T 细胞 (Treg)、高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1)、单核细胞蛋白酶激活受体-1 (PAR-1)、组织因子 (TF)、白细胞介素-6 (IL-6) 和 TNF- α 等炎症和免疫相关靶点, 一定程度上解释了血必净注射液治疗脓毒症的相关机制。然而, 由于脓毒症本身的病因、病机复杂, 经典药理学实验研究往往只针对疾病某一病理特征或环节构建动物或细胞模型, 通过药物对某一个或某些特定病理生化指标的改变来评价药物疗效, 对药物作用机制的阐明也多停留在某一特定的通路, 结果多具有片面性, 难以整体反映中药复方对机体多方面的影响, 违背了中医药的“整体观”。

Luo 等^[6]提出中医药研究从根本上不同于西医药模式, 是一种“系统-系统”的作用模式, 即多组分药物群 (药物系统) 与生物系统 (系统生物学) 的相互作用, 并在此基础上提出了中医药整体系统生物学, 即开展中药化学物质组学与系统生物学相结合研究, 采用化学物质组学表征中药复杂系统, 基因组学、蛋白质组学、代谢组学及药理学等表征生命系统, 建立研究两个复杂系统相互作用和网络调控机制的方法体系。

网络药理学是基于系统生物学和多向药理学提出的一种药物设计新方法^[7], 通过生物学网络中节点的连接和关系来分析药物对疾病网络的干预构建“分子 (药物)-靶点-通路-疾病”的多层次网络, 从整体效应角度预测药物靶点, 认识药物作用机制, 为提高药物发现效率提供理论依据和技术支撑。网络药理学“多成分-多靶点-多通路”的研究策略将药物-靶点网络与生物系统网络相结合, 是研究中药复杂

系统和人体生物系统两个系统之间的相互作用, 阐明中药复方作用机制的重要手段之一。目前, 网络药理学研究在中药研究中主要应用于中药药效物质基础研究、中药药效作用机制研究、中药药效评价研究和中药方剂配伍理论研究等^[8]。

反向分子对接技术基于 Fisher 的“锁-钥匙模型学说”^[9], 以天然产物、先导化合物及化学合成物这些小分子化合物为探针, 在已知结构的靶点数据库内搜寻可能与之结合的生物大分子, 通过空间和能量匹配相互识别形成分子复合物, 进而预测药物潜在的作用靶点, 为寻找药物作用靶点提供了新的方法。继 INVDOCK 软件之后, TarFisDock、PharmMapper 等免费在线服务器为人们所熟知并逐渐得到认可^[10]。PharmMapper 是基于配体特征的反向药效团匹配开发的以活性小分子为探针, 搜寻潜在药物靶点, 从而预测小分子生物活性的反向分子对接方法之一^[11]。该程序通过对 TargetBank、DrugBank、Binding DB 和 PDTD 四大数据库检索, 可快速获取药物靶点信息, 由于其具有运算速度快、靶点信息全面等优点, 在中药靶点研究中得到广泛应用^[12]。

本研究基于“系统-系统”的中药复方整体系统生物学研究模式, 基于血必净注射液的化学物质组学研究结果, 运用网络药理学方法通过构建“成分-靶点-通路”网络模型, 全面系统预测血必净注射液主要化学成分干预脓毒症的潜在作用靶点和通路, 为深入探讨血必净注射液治疗脓毒症的作用机制和基于血必净注射液的组分中药发现提供科学依据。

材料与方法

化合物信息 前期建立了血必净注射液整体化学物质组多波长指纹图谱, 全息表征其化学物质基础。采用超高效液相-四级杆-飞行时间质谱 (UPLC-QTOF/MS) 液质联用技术对血必净注射液中的化学成分进行定性分析, 通过一级和二级质谱信息分析并结合文献报告, 共鉴定出 41 种化学成分^[13], 本研究选取其中 21 个主要活性成分 (血必净注射液指纹图谱特征峰, 含量稳定, 已有确切的生物活性报道, 配伍药材中指标性成分), 包括: 苯甲酰芍药苷

(C₃₀H₃₂O₁₂, CAS 号: 38642-49-8)、没食子酰芍药苷 (C₃₀H₃₂O₁₅, CAS 号: 122965-41-7)、芍药苷 (C₂₃H₂₈O₁₁, CAS 号: 23180-57-6)、芍药内酯苷 (C₂₃H₂₈O₁₁, CAS 号: 39011-90-0)、氧化芍药苷 (C₂₃H₂₈O₁₂, CAS 号: 39011-91-1)、鸟苷 (C₁₀H₁₃N₅O₅, CAS 号: 118-00-3)、尿苷 (C₉H₁₂N₂O₆, CAS 号: 58-96-8)、红花黄色素 A (C₂₇H₃₀O₁₅, CAS 号: 85532-77-0)、羟基红花黄色素 A (C₂₇H₃₂O₁₆, CAS 号: 78281-02-4)、脱水红花黄色素 B (C₄₈H₅₂O₂₆, CAS 号: 184840-84-4)、咖啡酸 (C₉H₈O₄, CAS 号: 331-39-5)、阿魏酸 (C₁₀H₁₀O₄, CAS 号: 1135-24-6)、丹参素 (C₉H₁₀O₅, CAS 号: 76822-21-4)、原儿茶醛 (C₇H₆O₅, CAS 号: 139-85-5)、丹酚酸 B (C₃₆H₃₀O₁₆, CAS 号: 121521-90-23)、没食子酸 (C₇H₆O₅, CAS 号: 149-91-7)、洋川芎内酯 H (C₁₂H₁₆O₄, CAS 号: 94596-27-7)、洋川芎内酯 I (C₁₂H₁₆O₄, CAS 号: 94596-28-8)、4',5-二羟基黄酮-6,7-*O*-吡喃葡萄糖苷 (C₂₇H₃₀O₁₆)、6-羟基山柰酚-3,6-*O*-β-*D*-葡萄糖苷 (C₂₇H₃₂O₁₇)、6-羟基山柰酚-3,6,7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷 (C₃₃H₄₂O₂₂)，以上化学信息来源于美国化学文摘数据库 (Chemical Abstract Service, CAS)。

***.mol2 格式文件建立** 从 CAS 数据库中确定 21 种活性成分的化学结构。应用 Chembiodraw Ultra 12.0 软件画出其各自的结构图，并以 MDL Molfile (*.mol) 格式存储；将建立的 MDL Molfile (*.mol) 格式文件导入 Chem Bio 3D Ultra12.0 软件，将该成分的二维结构式转换为三维立体结构式，通过“另存为”将 MDL Molfile (*.mol) 格式转换为*.mol2 格式文件。

潜在作用靶点反向预测 登录 PharmMapper 服务器 (<http://59.78.96.61/pharmmapper>)，上传血必净注射液主要活性成分的*.mol2 格式文件，采用“反向药效团匹配方法”得到虚拟筛选结果。由于检索到的药物靶点存在命名不规范等问题，本研究使用美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 数据库的 Gene 基因搜索功能 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)，将筛选出的分子-靶点匹配度 (Fit Score) 大于 4.5 的药物靶点 (若无 Fit > 4.5，选取 Fit 值最高的 10 个靶点) 名称输入到 NCBI 数据库中并限定物种为人类，将输入的所有药物靶点名称校正为该靶点的官方简写 (Official Gene Symbol)，由此获取与活性成分相关的靶点信息。

靶点通路注释分析 利用 DAVID 数据库中功能注释工具 (Functional Annotation Tool)，上传搜索到的

潜在药物靶点的官方简写，之后选择 KEGG-Pathway，选取具有显著差异性 ($P < 0.05$) 的所有通路，即可输出所有靶点作用的体内通路，药物靶点富集的通路被认为是药物调控的主要通路。

“活性成分-靶点-通路”网络模型构建 根据血必净注射液主要活性成分靶点预测结果，采用 Cytoscape 软件的 Merge 功能构建血必净注射液“成分-靶点-通路”网络模型。节点 (node) 表示活性成分、潜在作用靶点及作用通路。边 (edge) 用来连接某一个化合物及其潜在作用靶点，同时用来连接活性成分作用靶点及其注释的相关通路，由此构建网络探讨血必净注射液多成分、多靶点和多通路的作用机制。

结果

1 血必净注射液药材-成分-靶点分析

血必净注射液的 21 个代表性成分，包含以苯甲酰芍药苷为代表的芍药苷类成分 5 个、4',5-二羟基黄酮-6,7-*O*-吡喃葡萄糖等糖苷类成分 5 个、红花黄色素 A 等红花黄色素类成分 3 个、丹参素等有机酸类成分 6 个和洋川芎内酯 H 等内酯类成分 2 个。从药材归属来看，其中有 6 个成分来自赤芍，3 个成分来自川芎，3 个成分来自丹参，6 个成分来自当归，7 个成分来自红花，其中川芎和当归有 3 个共有成分，红花和当归有 1 个共有成分。经上述数据库检索和转化操作后，共得到靶点 550 个。其中，赤芍潜在作用靶点 287 个，川芎潜在作用靶点 30 个，丹参潜在作用靶点 72 个，当归潜在作用靶点 65 个，红花潜在作用靶点 96 个。

2 血必净注射液靶点-通路分析

在线人类孟德尔遗传数据库 (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM) 具有及时性、准确性、全面性、实用性和便捷的检索功能等特点^[14, 15]。利用 OMIM 数据库检索与脓毒症相关的基因，共有 96 个，其中与血必净注射液的共同靶点有 8 个 (HARS、BTK、LCN2、ELANE、FROCR、CASP1、IL6、S100A9)。将 OMIM 得到的靶点与血必净注射液的靶点分别进行通路分析，得到共同通路 33 条，见表 1。其中涉及免疫应激及炎症的通路有 10 条，见表 2。

根据 KEGG 网站上的通路信息及相关文献，对表 2 中 10 条通路的生物学意义简单描述如下。

MAPK 信号通路：脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 炎症刺激可导致 MAPK 的活化。MAPK 的激活可促进多种促炎因子如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 等的表达和释放，被认为是调控炎症反应的中心环节^[16]。

Table 1 Information of common pathways

Pathway	ID	Count
MAPK signaling pathway	hsa04010	22
Insulin signaling pathway	hsa04914	19
Prostate cancer	hsa05215	15
ErbB signaling pathway	hsa04012	14
VEGF signaling pathway	hsa04370	12
Fc epsilon RI signaling pathway	hsa04664	12
T cell receptor signaling pathway	hsa04660	12
Chronic myeloid leukemia	hsa05220	11
Regulation of actin cytoskeleton	hsa04810	11
Endometrial cancer	hsa05213	10
Acute myeloid leukemia	hsa05221	10
Pancreatic cancer	hsa05212	10
Natural killer cell mediated cytotoxicity	hsa04650	10
Cytokine-cytokine receptor interaction	hsa04060	9
Epithelial cell signaling in <i>Helicobacter pylori</i> infection	hsa05120	8
B cell receptor signaling pathway	hsa04662	8
Long-term depression	hsa04730	7
Toll-like receptor signaling pathway	hsa04620	7
Alzheimer's disease	hsa05010	7
JAK-STAT signaling pathway	hsa04630	6
Amyotrophic lateral sclerosis	hsa05014	5
Complement and coagulation cascades	hsa04610	5
Hematopoietic cell lineage	hsa04640	5
Calcium signaling pathway	hsa04020	5
Neuroactive ligand-receptor interaction	hsa04080	5
Primary immunodeficiency	hsa05340	4
Adipocytokine signaling pathway	hsa04920	4
p53 signaling pathway	hsa04115	4
Renin-angiotensin system	hsa04614	3
Apoptosis	hsa04215	3
Graft-versus-host disease	hsa05332	2
Pathogenic <i>Escherichia coli</i> infection-EHEC	hsa05130	2
Small cell lung cancer	hsa05222	2

ErbB 信号通路: ErbBs 受体包括 ErbB1、ErbB2、ErbB3 和 ErbB4 亚型。神经调节蛋白 (neuregulin, NRG) 通过激活 ErbB 酪氨酸激酶受体进行一系列的信号转导。Xu 等^[17]通过体内外实验研究证明 NRG 在中枢神经系统属于抗炎物质。

VEGF 信号通路: 组织器官在生理或病理状态下, 受到促血管生成因子的刺激, 引发血管新生。现有大量证据表明, VEGFR-2 主要介导 VEGF 驱动的内皮细胞反应, 它被认为是生理和病理血管生成的关键信号转导。VEGF 结合 VEGFR-2 引发一系列不同的信号通路, 导致上调的基因参与介导的内皮细胞增殖和迁移, 促进它们的生存和血管通透性。

Fc epsilon RI 信号通路: Fc 的 ϵ RI 信号通路与炎症有关, 影响炎症介质如白三烯 (LTC₄、LTD₄ 和

LTE₄) 和前列腺素 (尤其 PDG₂) 的释放和细胞因子 (TNF- α 、IL-4 和 IL-5) 分泌。

T 细胞受体信号通路: 与机体免疫调节直接相关, T 细胞是淋巴细胞的主要组分, 它具有多种生物学功能, 如直接杀伤靶细胞, 辅助或抑制 B 细胞产生抗体, 对特异性抗原和促有丝分裂原的应答反应以及产生细胞因子等。

自然杀伤细胞介导的细胞毒性: 自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞是先天性免疫系统的淋巴细胞, 涉及对非自身细胞以及受到各种形式刺激 (如感染病毒、细菌、寄生虫或恶性转化) 的自身细胞的早期防御。NK 细胞杀伤的机制与在适应性免疫应答中产生细胞毒性 T 细胞的机制相同; 细胞毒颗粒释放到结合的靶细胞表面, 并且它们所包含的效应蛋白穿透细胞膜并诱导细胞程序性死亡。

B 细胞受体信号通路: B 细胞是适应性免疫的重要组成部分, 其生产和分泌数以百万计的不同的抗体分子, 分别识别不同的抗原。磷脂酰肌醇 3-激酶和磷脂酶 C- γ 2 是 B 细胞受体信号重要的下游效应器。这一信号最终导致即早基因的表达, 进一步激活参与 B 细胞增殖、分化和免疫球蛋白生产等过程的其他基因表达。

Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 信号通路: 识别病原体, 引起先天免疫快速活化, 诱导促炎因子的产生和共刺激分子的上调, TLR 信号通路共分为两组: 一组是快速活化核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 和 MAPK 导致促炎因子产生的 MyD88 依赖通路; 另一组是与 INF- β 和 INF 可诱导基因的诱导、并与 NF- κ B 和 MAPK 缓慢活化、树突细胞成熟有关的 MyD88 非依赖通路。

JAK-STAT 信号通路: JAK-STAT 途径是体内普遍存在的信号通路之一, 参与机体细胞的增殖、分化、存活和凋亡, 介导机体免疫失调和肿瘤生成等过程。目前发现, STAT 家族存在 7 个成员, 其中, STAT1 可抑制 NF- κ B 的活化; STAT2 被 IFN- α/β 和 IFN- λ s 活化; STAT3 能够被多种细胞因子 (IL-6、IL-10、IFN- α/β) 激活; IL-12、IL-23 和 IFN- α 激活 STAT4^[18,19]。

补体和凝血级联通路: 与机体的免疫功能密切相关。一方面, 补体系统是血浆蛋白水解级联和先天免疫的中介, 介导对病原体的非特异性防御机制; 另一方面, 凝血级联反应是其他酶原转换为丝氨酸蛋白酶的过程, 最终形成凝血酶。由凝血酶激活的某些蛋白酶活化受体是先天免疫介质的成员。激肽释放酶-激肽系统是一种内源性的代谢级联, 引发导致血

Table 2 Information of inflammatory and immune related pathways-ingredients

Pathway	Count	Function	Main indigrent (target counts)
MAPK signaling pathway	22	Inflammation	6-Hydroxykaempferol-3,6- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoside (2); dehydrated safflower yellow B (2); 4',5-dihydroxyflavone-6,7- <i>O</i> -glucopyranoside (2); lithospermic acid B (4); guanosine (2); benzoyl-paeoniflorin (2); galloylpaeoniflorin (5); paeoniflorin (3); albiflorin (4); oxypaeoniflorin (2)
ErbB signaling pathway	14	Inflammation	6-Hydroxykaempferol-3,6- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoside (3); dehydrated safflower yellow B (2); 4',5-dihydroxyflavone-6,7- <i>O</i> -glucopyranoside (3); lithospermic acid B (4); guanosine (2); benzoyl-paeoniflorin (3); galloylpaeoniflorin (4); paeoniflorin (4); albiflorin (3); oxypaeoniflorin (2)
Fc epsilon RI signaling pathway	12	Inflammation	Hydroxy safflower yellow A (2); 6-hydroxykaempferol-3,6- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoside (2); dehydrated safflower yellow B (2); safflor yellow A (2); 4',5-dihydroxyflavone-6,7- <i>O</i> -glucopyranoside (3); lithospermic acid B (5); guanosine (2); benzoylpaeoniflorin (3); galloylpaeoniflorin (3); paeoniflorin (3); albiflorin (3)
Toll-like receptor signaling pathway	7	Inflammation	Dehydrated safflower yellow B (2); lithospermic acid B (3); benzoylpaeoniflorin (3); galloylpaeoniflorin (2); paeoniflorin (2); albiflorin (2); oxypaeoniflorin (1)
JAK-STAT signaling pathway	6	Inflammation & immunity	Lithospermic acid B (2); galloylpaeoniflorin (3); oxypaeoniflorin (3)
Complement and coagulation cascades	5	Inflammation & immunity	Benzoylpaeoniflorin (2); paeoniflorin (2); albiflorin (4)
T cell receptor signaling pathway	12	Immunity	Hydroxy safflower yellow A (2); 6-hydroxykaempferol-3,6- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoside (3); safflor yellow A (2); 4',5-dihydroxyflavone-6,7- <i>O</i> -glucopyranoside (3); lithospermic acid B (4); uridine (2); guanosine (2); benzoylpaeoniflorin (5); galloylpaeoniflorin (5); paeoniflorin (3); albiflorin (3); oxypaeoniflorin (2)
Natural killer cell mediated cytotoxicity	10	Immunity	Hydroxy safflower yellow A (2); 6-hydroxykaempferol-3,6- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoside (2); Safflor yellow A (2); 4',5-dihydroxyflavone-6,7- <i>O</i> -glucopyranoside (2); uridine (2); guanosine (2); benzoylpaeoniflorin (5); galloylpaeoniflorin (5); albiflorin (4)
B cell receptor signaling pathway	8	Immunity	Hydroxy safflower yellow A (2); 6-hydroxykaempferol-3,6- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoside (3); safflor yellow A (2); 4',5-dihydroxyflavone-6,7- <i>O</i> -glucopyranoside (3); lithospermic acid B (4); guanosine (2); benzoylpaeoniflorin (3); galloylpaeoniflorin (4); paeoniflorin (3); albiflorin (3); oxypaeoniflorin (2)
VEGF signaling pathway	12	Other	Lithospermic acid B (3); guanosine (2); benzoylpaeoniflorin (4); galloylpaeoniflorin (3); paeoniflorin (2); albiflorin (2); oxypaeoniflorin (2)

管活性肽(缓激肽相关肽)的释放。激肽牵连许多生理和病理过程,包括血压调节和钠平衡、炎症过程,以及心脏的保护作用。

3 血必净注射液“成分-靶点-通路”网络模型构建

采用 Cytoscape 软件构建血必净注射液“活性成分-靶点-通路”网络模型,见图 1。血必净注射液 21 个活性成分的作用靶点分布于不同的代谢通路,相互协调,从多种途径体现药物治疗脓毒症的作用机制。

讨论

脓毒症发病机制涉及感染、炎症、免疫、凝血、组织损害及基因多态性等一系列基本问题,并与机体多系统、多器官病理生理改变密切相关^[20]。本研究综合血必净注射液的作用靶点和 OMIM 数据库中与脓毒症相关的疾病基因分析,结果表明,血必净注射液主要作用于丝裂原活化蛋白激酶信号通路、ErbB 信号通路、血管内皮生长因子信号通路、Fc epsilon 受体 I 信号通路、T 细胞受体信号通路、自然杀伤细胞介导的细胞毒性、B 细胞受体信号通路、Toll 样受体信号通路、JAK-STAT 信号通路、补体和凝血级联等通路,通过调节 T 细胞、B 细胞和多种细胞因子 (TNF- α 、IL-6、血管内皮生长因子等) 发挥抗炎、

免疫的作用,与文献^[1-5]报道的血必净治疗脓毒症的药理研究结果一致。

脱水红花黄色素 B、苯甲酰芍药苷、芍药苷和氧化芍药苷等作用于与 NF- κ B 活化有关的 Toll 样受体信号通路。NF- κ B 普遍存在于生物体内各种类型的细胞中,涉及炎症反应、免疫应答及细胞增生、转化和凋亡等生物过程。Jiang 等^[21]建立了生物活性集成超高效液相色谱/四极时间飞行质谱 (UPLC-Q/TOF) 系统,筛选出血必净注射液中脱水红花黄色素 B、苯甲酰芍药苷、芍药苷和氧化芍药苷等成分具有一定的 NF- κ B 抑制活性,证实血必净注射液中这 4 种有效成分通过抑制 NF- κ B 活性发挥抗炎作用。

赤芍中的芍药苷既作用于 MAPK、Fc epsilon 受体 I 和 ErbB 等炎症相关的通路,也作用于 B 细胞受体和 T 细胞受体等免疫相关的通路。芍药苷可抑制促炎性介质如 TNF- α 、IL-1 β 、iNOS、环氧合酶-2 和 5-脂氧酶的上调,发挥抗炎作用^[22]。另外,Lü 等^[23]研究发现赤芍水提取物五没食子酰葡萄糖通过与脂质 A 直接结合,使内毒素失活以及降低血清内毒素和 TNF- α 的释放,达到治疗脓毒症的目的。

丹参中的丹酚酸 B 同时作用于 MAPK、Fc epsilon 受体 I 和 Toll 样受体等炎症相关通路以及免疫相关通路。Wang 等^[24]研究发现,丹酚酸 B 可降低由 LPS 诱

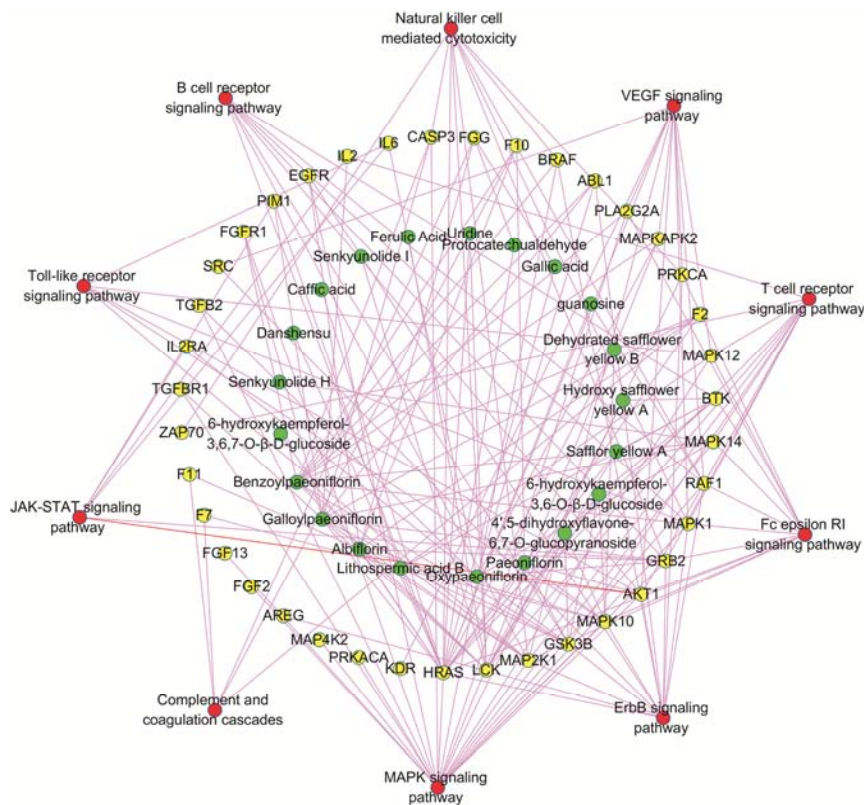


Figure 1 Ingredients-targets-pathways network of active ingredients of Xuebijing injection (●) active ingredients, (●) targets, (●) pathways

导的心肌细胞炎症损伤大鼠的 LDH 和 TNF- α 浓度, 以及降低 TLR4 和 NF- κ B 的表达, 说明丹酚酸 B 可能是通过抑制 TLR-4-NF- κ B-TNF- α 通路实现对心肌细胞的保护作用。另外, 丹酚酸 B 还有保护内皮细胞, 抑制 VEGF 诱导的血管通透性增加, 抑制血小板活化、聚集与释放等作用^[25-27]。

红花中的羟基红花黄色素 A 主要作用于与免疫相关的 T 细胞、B 细胞受体信号通路。Lu 等^[28]研究了含 75%羟基红花黄色素 A 的红花总黄素对免疫功能的影响, 提示红花总黄素可能是治疗多种免疫性疾病的主要有效成分。

当归和川芎中的洋川芎内酯 I、红花中的脱水红花黄色素 B 作用于肾素-血管紧张素系统和造血细胞系, 对心脑血管和血压的调节有着重要的影响。丹参中的丹酚酸 B 和赤芍的主要成分芍药苷、苯甲酰芍药苷等除发挥抗炎、免疫的作用外, 还作用于补体和凝血级联通路, 调控血压、钠平衡及心脏的保护作用。血必净注射液各药材活性成分共同发挥抗炎、免疫调节、控制血压和心脑血管保护等作用。

血必净注射液中来源于 5 个配伍药材 21 个主要活性成分通过调控不同的基因, 作用于不同的通路, 协同配伍产生抗炎、免疫调节、控制血压和心脑血管

保护等作用, 充分显示了不同成分之间的多靶点多通路协同作用, 体现了中药方剂的整体观念。本文运用网络药理学技术手段, 基于“系统-系统”的模式, 探索血必净治疗脓毒症“多成分-多靶点-多通路”的作用机制, 其研究结果与现有的血必净治疗脓毒症的药理机制研究相互验证, 更好地解释了血必净临床治疗脓毒症的作用机制, 为中药方剂治疗疾病的作用机制研究提供了新思路, 为血必净干预脓毒症作用机制的深入研究提供一定参考和方向。

References

- [1] Zhao ZG, Tang ZZ, Liu J, et al. Influence of Xuebijing injection on inflammatory factors and function of vascular endothelial cells in patients with severe sepsis [J]. Mil Med J S Chin (华南国防医学杂志), 2015, 29: 101-103.
- [2] Dai XG. The Effect of AICD of Regulatory T Cell in Septic Rats on Immunological Function of Effector T Lymphocytes Induced by Xuebijing Injection (脓毒症大鼠调节性 T 细胞凋亡对效应 T 细胞免疫功能的影响及血必净注射液的干预作用) [D]. Changsha: Central South University, 2008.
- [3] Gui YG. Effects of Xuebijing Injection on Tissue Factor of Monocyte and Coagulation Parameters in Septic Rats (血必净对脓毒症大鼠单核细胞组织因子及凝血功能的影响) [D].

- Tianjin: Tianjin Medical University, 2009.
- [4] Li YP, Qiao YJ, Wu ZX, et al. Effects of Xuebijing injection on tissue tumor necrosis factor- α and blood coagulation parameters in septic rats [J]. *Chin J Integr Tradit West Med Intensive Crit Care* (中国中西医结合急救杂志), 2007, 14: 104–107.
- [5] Li YP, Zheng GJ, Wu ZX, et al. Effects of Xuebijing injection on activated protein C and coagulation parameters in septic rats [J]. *Chin J Integr Tradit West Med Intensive Crit Care* (中国中西医结合急救杂志), 2008, 15: 361–364.
- [6] Luo GA, Xie YY, Liang QL, et al. Integrated medicine for traditional Chinese medicine: the third discussion on the proposal of holistic system medicine [J]. *World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med* (世界科学技术—中医药现代化), 2015, 17: 7–15.
- [7] Hopkins AL. Network pharmacology [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 1110.
- [8] Liu J, Huang YM, Wang H. Advances in network pharmacology [J]. *West China J Pharm Sci* (华西药科学杂志), 2014, 29: 723–725.
- [9] Fischer E. Influence of configuration on the action of enzymes [J]. *Ber Dtsch Chem Ges*, 1894, 27: 2985–2993.
- [10] Fan SJ, Li XJ. The new way to observe and validate the reverse docking-drug target [J]. *Prog Physiol Sci* (生理科学进展), 2012, 43: 367–370.
- [11] Liu XF, Ouyang SS, Yu B, et al. PharmMapper server: a web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: W609–W614.
- [12] Gao Y, Gao L, Gao XA, et al. An exploration in the action targets for antidepressant bioactive components of Xiaoyaosan based on network pharmacology [J]. *Acta Pharm Sin* (药科学报), 2015, 50: 1589–1595.
- [13] Huang H, Ji L, Song S, et al. Identification of the major constituents in Xuebijing injection by HPLC-ESI-MS [J]. *Phytochem Anal*, 2011, 22: 330–338.
- [14] Zhen YS, Xie P, Shi HB, et al. Online mendelian inheritance in man [J]. *Mol Cardiol China* (中国分子心脏病学杂志), 2001, 1: 46–48.
- [15] Ding LS, Zhang YW. The use of OMIM and library information consultation service [J]. *J Med Intell* (医学情报工作), 2004, 25: 181–183.
- [16] Peng S, Hang N, Liu W, et al. Andrographolide sulfonate ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by down-regulating MAPK and NF- κ B pathways [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2016, 6: 205–211.
- [17] Xu Z, Ford GD, Crosland DR, et al. Neuroprotection by neuregulin-1 following focal stroke is associated with the attenuation of ischemia-induced pro-inflammatory and stress gene expression [J]. *Neurobiol Dis*, 2005, 19: 461–470.
- [18] Song Z, Zhang LY, Dong HB, et al. Advances in JAK-STAT signaling pathway [J]. *China Anim Husbandry Veter Med* (中国畜牧兽医), 2012, 39: 128–132.
- [19] Liu H, Yao YM. Advances in cross-talk of cellular signaling pathways associated with inflammatory response [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2005, 8: 1607–1613, 1627.
- [20] Yao YM, Lin HY. Development of pathogenesis and management of sepsis [J]. *Continu Med Edu* (继续医学教育), 2006, 24: 35–40.
- [21] Jiang M, Zhou M, Han Y, et al. Identification of NF- κ B inhibitors in Xuebijing injection for sepsis treatment based on bioactivity-integrated UPLC-Q/TOF [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 147: 426–433.
- [22] Guo RB, Wang GF, Zhao AP, et al. Paeoniflorin protects against ischemia-induced brain damages in rats *via* inhibiting MAPKs/NF- κ B-mediated inflammatory responses [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e49701.
- [23] Lü GF, Zheng J, Zhou H, et al. The screening and isolation of an effective anti-endotoxin monomer from Radix Paeoniae Rubra using affinity biosensor technology [J]. *Int Immunopharmacol*, 2005, 5: 1007–1017.
- [24] Wang J, Zhang Y, Guo LL, et al. Salvianolic acid B inhibits the TLR-4-NF- κ B-TNF- α pathway and attenuates neonatal rat cardiomyocyte injury induced by lipopolysaccharide [J]. *Chin J Integr Med*, 2011, 17: 775–779.
- [25] Zhan YE. Research progress on pharmacologic actions of salvianolic acid B [J]. *Milit Med J South China* (华南国防医学杂志), 2007, 21: 37–39, 54.
- [26] Yang FG, Zhang AY, Chen ZY, et al. Effect of salvianolic acid B on cardiovascular endothelial cells and platelet activation in a rabbit model of ischemia-reperfusion [J]. *J Chin Integr Med* (中西医结合学报), 2008, 6: 1250–1254.
- [27] Li W, Zhang JP, Xu SX, et al. Effect of salvianolic acid B on the Platelet aggregation and sP-sel and sCD40L release [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中华中医药学刊), 2013, 01: 48–50.
- [28] Lu ZW, Liu F, Hu J, et al. Suppressive effects of safflower yellow on immune functions [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1991, 12: 537–542.