

基于网络药理学和实验验证探讨大黄素改善脓毒症急性肺损伤的分子机制

邹亚¹ 熊熙² 孙燕妮³

上海市儿童医院 / 上海交通大学医学院附属儿童医院¹ 中医科,² 重症医学科, 上海 200062; ³ 复旦大学附属中山医院吴淞医院急诊内科, 上海 200940

通信作者: 孙燕妮, Email: sunstone1974@163.com

【摘要】目的 应用网络药理学和实验探究大黄素改善脓毒症急性肺损伤的分子机制。**方法** 应用中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP)、SwissTargetPrediction 及相似性集成方法 (SEA) 数据库预测大黄素作用靶点, 并通过药物银行 (DrugBank)、治疗靶点数据库 (TTD) 及疾病-基因网络数据库 (DisGeNET) 搜索脓毒症疾病靶点, 二者取交集, 应用功能富集分析工具 (FunRich) 对共同靶点进行生物功能及通路富集分析, 采用 Cytoscape 软件构建大黄素“成分-靶标-通路-疾病”网络, 并应用 DockThor 分子对接平台 (DockThor) 完成大黄素和共同靶点的分子对接。将 30 只 SD 大鼠按随机数字表法分为假手术组、盲肠结扎穿孔术 (CLP) 组、大黄素组, 每组 10 只。采用 CLP 复制脓毒症模型, 假手术组仅开腹不进行结扎和穿刺处理, 大黄素组于制模前 5 d 连续给予大黄素 ($35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 灌胃处理。通过大鼠存活率、运动状态及体温变化观察大鼠整体状态; 通过苏木素-伊红 (HE) 染色、肺湿质量 / 干质量 (W/D) 比值评估肺损伤情况; 采用实时荧光定量反转录-聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) mRNA 表达水平, 采用蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测凋亡通路相关分子活化的 caspase-3 (cleaved caspase-3) 蛋白表达水平。**结果** 网络分析显示, 共有 98 个大黄素相关作用靶点, 156 个脓毒症相关作用靶点, 10 个共同靶点, 涉及凋亡、蛋白质代谢和能量代谢等生物过程, 腺苷二磷酸核糖基化因子 6 (Arf6)、磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)、黏着斑激酶 (FAK) 等信号通路, 且大黄素与 caspase-3、凝血因子 VII (F7)、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 等 10 个共同靶点均有良好的结合能力。动物实验中, 与假手术组比较, CLP 组大鼠存活率明显降低 [50% (5/10) 比 100% (10/10)], 出现持续发热寒颤、活动减少、纳食量减少、尿量减少等表现; 有肺泡结构改变、炎症细胞浸润等肺病理损伤表现; 肺 W/D 比值、caspase-3 mRNA 表达、cleaved caspase-3 蛋白表达均明显升高 [肺 W/D 比值: 6.33 ± 0.25 比 4.97 ± 0.25 , caspase-3 mRNA 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 65.61 ± 14.55 比 1.00 ± 0.02 , cleaved caspase-3 蛋白表达 (cleaved caspase-3/ β -actin): 1.92 ± 0.17 比 1.00 ± 0.01 , 均 $P < 0.01$]。与 CLP 组比较, 大黄素组存活率明显升高 [60% (6/10) 比 50% (5/10)], 肺 W/D 比值、caspase-3 mRNA 表达、cleaved caspase-3 蛋白表达均明显降低 [肺 W/D 比值: 6.03 ± 0.21 比 6.33 ± 0.25 , caspase-3 mRNA 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 30.11 ± 8.57 比 65.61 ± 14.55 , cleaved caspase-3 蛋白表达 (cleaved caspase-3/ β -actin): 1.36 ± 0.06 比 1.92 ± 0.17 , 均 $P < 0.05$]。**结论** 该研究通过网络药理学探讨大黄素改善脓毒症急性肺损伤的潜在作用机制, 并验证了大黄素对脓毒症肺损伤的保护作用及对 caspase-3 通路的调控作用, 为大黄素防治脓毒症的进一步推广应用提供了科学依据。

【关键词】 网络药理学; 分子对接; 大黄素; 脓毒症; 凋亡; 分子机制

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2026.01.004

Molecular mechanism of emodin in treatment of sepsis-induced acute lung injury based on network pharmacology and experimental verification

Zou Ya¹, Xiong Xi², Sun Yanni²

¹Department of Traditional Chinese Medicine, ²Department of Pediatric Intensive Care, Shanghai Children's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200062, China; ³Department of Emergency Medicine, Zhongshan Hospital Wusong Branch, Fudan University, Shanghai 200940, China

Corresponding author: Sun Yanni, Email: sunstone1974@163.com

【Abstract】Objective To investigate the molecular mechanism of emodin in improving sepsis-induced acute lung injury using network pharmacology and experimental validation. **Methods** The targets of emodin were predicted using the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), SwissTargetPrediction, and Similarity Ensemble Approach (SEA) database. Sepsis-related targets were obtained from DrugBank, Therapeutic Target Database (TTD), and Disease Gene Network (DisGeNET) database. The intersection of emodin targets and sepsis targets was identified. Biological function and pathway enrichment analyses of the common targets were performed using Functional Enrichment Analysis Tool (FunRich). The "component-target-pathway-disease" network of emodin was constructed using Cytoscape software, and molecular docking of emodin with the common targets was performed using the DockThor molecular docking platform. Thirty Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into a sham operation group, a cecal ligation and puncture (CLP) group, and an emodin group, with 10 rats in each group.

The sepsis model was induced using CLP. The sham operation group was subjected to laparotomy without ligation or puncture. The emodin group received emodin ($35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) by gavage for 5 consecutive days before modeling. The overall status of rats was evaluated by survival rate, motor activity, and body temperature changes. Lung injury was assessed by hematoxylin-eosin (HE) staining and lung wet/dry (W/D) weight ratio. The mRNA expression level of caspase-3 was detected by real-time fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR), and the protein expression level of cleaved caspase-3 was measured by Western blotting. **Results** Network analysis showed that there were 98 emodin-related targets, 156 sepsis-related targets, and 10 common targets. These common targets were involved in biological processes such as apoptosis, protein metabolism, and energy metabolism, and were enriched in signaling pathways including adenosine diphosphate ribosylation factor 6 (Arf6), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), and focal adhesion kinase (FAK). Molecular docking demonstrated that emodin had good binding affinity with the 10 common targets, including caspase-3, coagulation factor VII (F7), and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). In animal experiments, compared with the sham operation group, the CLP group showed significantly decreased survival rate [50% (5/10) vs. 100% (10/10)], with manifestations including persistent fever, chills, decreased activity, reduced food intake, and decreased urine output. Pathological lung injury, including alveolar structure disruption and inflammatory cell infiltration, was observed. The lung W/D ratio, caspase-3 mRNA expression, and cleaved caspase-3 protein expression were significantly increased [lung W/D ratio: 6.33 ± 0.25 vs. 4.97 ± 0.25 , caspase-3 mRNA expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 65.61 ± 14.55 vs. 1.00 ± 0.02 , cleaved caspase-3 protein expression (cleaved caspase-3/ β -actin): 1.92 ± 0.17 vs. 1.00 ± 0.01 , all $P < 0.01$]. Compared with the CLP group, the emodin group showed significantly increased survival rate [60% (6/10) vs. 50% (5/10)], and significantly decreased lung W/D ratio, caspase-3 mRNA expression, and cleaved caspase-3 protein expression [lung W/D ratio: 6.03 ± 0.21 vs. 6.33 ± 0.25 , caspase-3 mRNA expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 30.11 ± 8.57 vs. 65.61 ± 14.55 , cleaved caspase-3 protein expression (cleaved caspase-3/ β -actin): 1.36 ± 0.06 vs. 1.92 ± 0.17 , all $P < 0.05$]. **Conclusions** This study explored the potential mechanism of emodin in improving sepsis-induced acute lung injury through network pharmacology, and verified the protective effect of emodin on sepsis-induced lung injury and its regulatory effect on the caspase-3 pathway, which provides a scientific basis for the further application of emodin in the prevention and treatment of sepsis.

【Key words】 Network pharmacology; Molecular docking; Emodin; Sepsis; Apoptosis; Molecular mechanism
DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2026.01.004

脓毒症是一种机体对感染反应异常引起的危及生命的器官功能障碍,已成为全球危重病领域面临的重要医疗问题,每年影响数百万例患者^[1]。急性肺损伤是脓毒症最常见和最严重的并发症之一,其机制极为复杂,涉及全身炎症反应、肺血管内皮屏障和肺泡上皮屏障损伤、细胞凋亡及自噬等多种机制与信号通路的激活^[2]。近年来临床实践显示,采用中西医结合治疗脓毒症及脓毒性休克,可显著降低病死率,改善预后并截断病情进展,指南推荐在脓毒症早期(热毒证期)可应用以大黄为代表的清热类中药联合抗菌药物控制感染引起的机体反应失调^[3-4]。大黄素是中药大黄的主要药物活性成分,具有抗菌、抗炎、抗病毒、抗氧化、调节免疫、改善微循环、调节肺水代谢,修复肠道屏障损伤等作用^[5-6],但其作用机制尚不明确。

近年来,随着人工智能技术的进步与多组学数据的广泛应用,网络药理学作为一门新兴交叉学科,通过系统性的网络关系挖掘、靶标定位与靶标导航等步骤,能将分散、零星的前期知识整合为精准、全面的相互作用网络^[7-8],这为系统揭示大黄素治疗脓毒症的复杂作用机制提供了全新的研究范式与有力支持。本研究拟采用网络药理学和实验验证的方法探索大黄素改善脓毒症急性肺损伤的作用机制,

初步揭示其改善脓毒症急性肺损伤的潜在作用靶点和相关通路,以期今后的研究提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物: 选择 30 只成年雄性 SPF 级 SD 大鼠,体质量 180 ~ 200 g,由浙江维通利华实验动物有限公司提供(合格证书:20230512Aazz061900253)。均于上海市化工研究院 SPF 级饲养房饲养。环境湿温适宜,自由摄食饮水。

1.2 试剂与设备: 大黄素购自中国阿拉丁公司(纯度 > 96%,批号: E106693); 羧甲基纤维素钠购自中国罗恩科技有限公司(批号: R000685); 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)购自美国 Sigma 公司(货号: L2880); 苏木素购自美国 Sigma 公司(批号: H9627); 水溶性伊红购自国药集团化学试剂有限公司(批号: 71014544); 反转录试剂盒(货号: RR036A)和实时荧光定量反转录-聚合酶链反应(real-time fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-qPCR)试剂盒均购自日本 Takara 公司(货号: RR036A、RR820A); 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测所用 β -肌动蛋白(β -actin)、活化的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(cleaved caspase-3)抗体以及辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标

记二抗均购自美国 CST 公司(货号:4967S, 9664S, 7074S);医用宠物电子体温计购自中国可孚医疗(型号:20182070156),引物设计由上海生工有限公司提供;聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜购自美国 Millipore 公司(批号:IPVH00010);双向电泳系统和转膜仪均购自美国 Bio-Rad 公司(货号:PowerPac 系列);聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪购自美国 Applied Biosystems 公司(货号:ABI7300 型);病理图像分析仪购自德国 Leica 公司(货号:LAS Image Analysis 型)。

1.3 方法

1.3.1 网络药理学

1.3.1.1 大黄素作用靶点数据库构建:登录中药系统药理学数据库与分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP),搜索大黄素的作用靶标。同时,应用化学物质索引数据库(PubChem)检索大黄素的简化分子线性输入规范(Simplified Molecular Input Line Entry System, SMILES)结构。随后,登录 SwissTargetPrediction 数据库和相似性集成方法(Similarity Ensemble Approach, SEA)数据库,基于配体结构预测大黄素的作用靶点。其中,SwissTargetPrediction 数据库以可信度 >0.1 为筛选阈值获取预测靶点,SEA 数据库以“human”为筛选条件进行人源化基因筛选。将上述 3 个平台所得的靶点数据进行合并,删除重复靶点,组建大黄素靶标数据库。最后,登录通用蛋白资源知识库(Universal Protein Resource, UniProt)网站进行基因名的标准化转换,并将所得数据输入 Cytoscape 3.2.1 软件,完成网络的可视化分析。

1.3.1.2 脓毒症疾病靶点数据库的构建及核心网络分析:登录治疗靶点数据库(Therapeutic Target Database, TTD)、药物银行(DrugBank)和疾病-基因网络(Disease Gene Network, DisGeNET)数据库检索脓毒症相关靶点。其中,从 DisGeNET 数据库获取的靶点,将置信度阈值设为 >0.2 进行筛选。合并以上 3 个数据库所得靶点数据,删除重复值,并应用 UniProt 完成基因名称的标准化转换。使用相互作用基因/蛋白质检索工具(Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, STRING)数据库获取蛋白质-蛋白质相互作用数据,并对相互作用置信度得分进行阈值设定(≥ 0.4),筛选出高质量的相互作用数据。将所得数据输入 Cytoscape 3.2.1

软件,完成相互作用网络的可视化。通过网络拓扑结构分析,筛选自由度 >25.9 的靶点组成核心网络,并应用分子复合物检测插件(Molecular Complex Detection, MCODE)及重叠邻域扩展聚类插件(Clustering with Overlapping Neighborhood Expansion, ClusterONE)进行靶点聚类分析。

1.3.1.3 大黄素-脓毒症共同靶点筛选:使用 Venny 2.1.0 工具,将大黄素作用靶点与脓毒症靶点进行合并,筛选交集靶点,并绘制韦恩图。

1.3.1.4 生物功能和通路富集分析:运用功能富集分析工具(functional enrichment analysis tool, FunRich)对共同靶点进行生物功能分析和通路富集分析。以 $P<0.01$ 为阈值,并按照 P 值升序进行排列,选取排序居前 8 位的生物学过程和前 19 位的通路,并绘制条形图和气泡图进行可视化。

1.3.1.5 核心靶点的分子对接验证:利用 DockThor 分子对接平台(DockThor Molecular Docking Platform, DockThor)对大黄素及共同靶点进行分子对接验证。首先应用布鲁克海文蛋白质数据库(the Brookhaven Protein Data Bank, PDB)下载靶点蛋白的晶体结构, Pubchem 下载大黄素配体 3D 结构并进行加氢、加电荷等预处理,定义活性位点,应用 DockThor 在线分子对接工具进行分子对接,对接结果以结合能大小显示结合活性,一般结合能值 <-20 kJ/mol 提示有良好的结合活性。

1.3.2 实验验证

1.3.2.1 模型的建立及分组给药:参照 Wang^[9]等的文献报告,采用盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture, CLP)复制大鼠脓毒症模型。将 30 只 SD 大鼠按随机数字表法分为假手术组、CLP 组、大黄素组,每组 10 只。连续喂食常规饲料 2 周。之后 5 d 大黄素组给予大黄素 $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,假手术组、CLP 组大鼠灌胃相同体积的 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液,最后 1 次灌胃 6 h 后进行 CLP,具体操作如下:所有大鼠以 5% 戊巴比妥溶液(0.6 mL)腹腔注射麻醉,然后将麻醉好的大鼠仰卧固定于操作台,清理腹部皮毛,碘酒消毒腹部,于左下腹皮肤纵向切开 1 cm 切口,剪开腹膜,显露盲肠及临近肠组织,分离盲肠并结扎,用 21 g 针头于盲肠末端穿刺,并从穿孔处挤出少量粪便。完成后将盲肠还纳腹腔,逐层缝合腹部并消毒皮肤,背部注射 1 mL 预温无菌生理盐水以补充第三间隙液体丢失,并将其放置在温暖的垫子上恢复。假手术组大鼠取出盲肠后不进行结

扎和穿刺处理,暴露盲肠后直接将其还纳至腹腔内。

1.3.2.2 伦理学:本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准,并经上海市儿童医院实验动物伦理委员会批准(审批号:SHCH-IACUC-2021-XMSB-9)。

1.3.2.3 观察指标及方法:术后3 d内每12 h内检查1次,观察动物生存状态及体温,于制模后72 h处死动物,取肺组织、血液、肺泡灌洗液进一步分析。

1.3.2.3.1 肺组织苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察肺组织病理学改变:取4%多聚甲醛溶液固定大鼠肺脏组织,经脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、染色和封片步骤后,行HE染色,光镜下观察肺组织病理学改变,并参照Matute-Bello等^[10]的文献报告进行肺组织病理学损伤评分。

1.3.2.3.2 肺组织湿质量/干质量(wet/dry weight, W/D)比值测定:各组分别取3只大鼠,全肺称取湿质量后,置于80℃烘箱干燥48 h,记录干质量,计算肺组织W/D比值。

1.3.2.3.3 采用RT-qPCR检测肺组织天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3(caspase-3)mRNA表达:取50 mg肺组织与TRIzol试剂匀浆后裂解,加入氯仿混匀,离心分层,转移水相并加入异丙醇沉淀总RNA,采用RT-qPCR法检测caspase-3 mRNA的表达水平,以3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行定量分析,引物设计见表1。

表1 引物碱基序列			
引物	序列(5'-3')		引物长度(bp)
	上游	下游	
caspase-3	AGCTGGACTGCGGTATTGAG	CGCGTACAGTTTCAGCATGG	182
GAPDH	ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	TTTGAGGGTGCAGCGAACTT	252

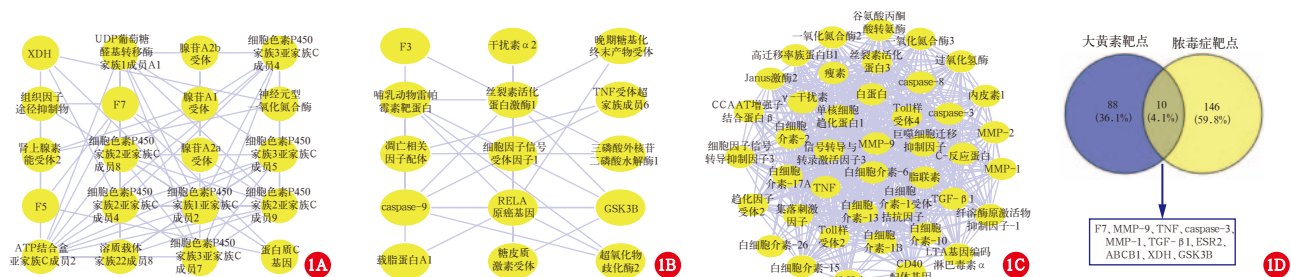
1.3.2.3.4 Western blotting检测肺组织cleaved caspase-3蛋白表达水平:剪碎肺脏组织,加入裂解液,冰上研磨,制备肺组织匀浆,4℃12 000 r/min

(离心半径:100 mm)离心15 min取上清液,测定蛋白浓度。取等量蛋白进行电泳、转膜后,分别加入cleaved caspase-3及 β -actin一抗(稀释度均为1:1 000),4℃孵育过夜,之后完成洗膜、二抗孵育、洗膜等步骤后,用电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)显影,以目的蛋白cleaved caspase-3与 β -actin的比值表示目的蛋白的表达水平。

1.4 统计学方法:使用SPSS 19.0统计软件分析数据,符合正态分布且方差齐性的计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析或t检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大黄素-脓毒症靶点分析(图1):综合检索TCMSP、SwissTargetPrediction、SEA数据库,并删除重复值,共得到98个大黄素相关作用靶点。综合检索TTD、DrugBank、DisGeNet数据库,并删除重复值,共得到156个脓毒症相关靶点。上述靶点去除细菌、真菌及其他物种基因后,得到人源化基因137个。存在3 444种蛋白与蛋白相互作用关系。大黄素、脓毒症靶点经网络拓扑结构分析、MCODE和ClusterONE聚类分析得到3个主要核心网络亚群,结果分别见图1A~C。98个大黄素作用靶点与156个脓毒症疾病靶点取交集后,共得到10个共同靶点,分别为:凝血因子VII(coagulation factor VII, F7)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、caspase-3、MMP-1、转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、雌激素受体2(estrogen receptor 2, ESR2)、三磷酸腺苷依赖性转位酶(adenosine triphosphate-dependent transporters, ABCB1)、黄嘌呤脱氢酶(xanthine dehydrogenase, XDH)、糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK3B)(图1D)。

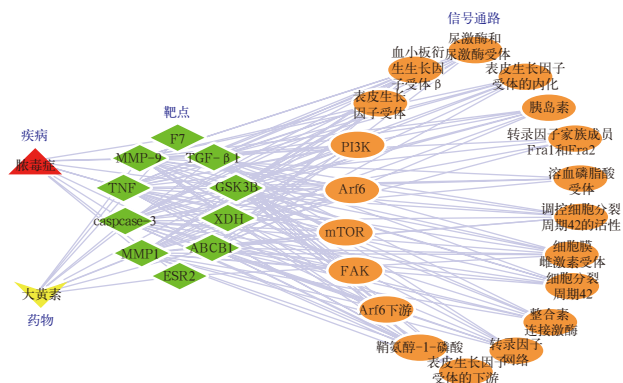


注:A为网络拓扑结构分析得到的核心网络亚群,B为ClusterONE聚类分析得到的核心网络亚群,C为MCODE聚类分析得到的核心网络亚群,D为大黄素和脓毒症交集靶点的韦恩图

图1 大黄素、脓毒症相关靶点分析及韦恩图

2.2 生物功能和通路富集分析: FunRich 生物功能和通路富集分析表明, 10 个共同靶点涉及细胞凋亡、代谢、能量转化、细胞通讯等生物功能(图 2A)。涉及腺苷二磷酸核糖基化因子 6(adenosine diphosphate ribosylation factor 6, Arf6)、磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)、胰岛素、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)等信号通路(图 2B)。

2.3 “成分-靶标-通路-疾病”网络(图 3): 采用 Cytoscape 软件构建“大黄素-靶标-通路-脓毒症”网络, 其中“红色”节点表示疾病“脓毒症”, “黄色”节点表示药物“大黄素”, “绿色”节点表示 10 个共同作用靶点, “橘色”节点表示 19 个主要信号通路。“紫色”边用来连接药物、疾病、作用靶点及其注释的相关信号通路。由此构建网络探讨大黄素、多靶点和多通路改善脓毒症的作用机制。



注: “红色”表示疾病“脓毒症”, “黄色”表示药物“大黄素”, “绿色”表示靶点, “橘色”表示信号通路

图 3 “大黄素-靶标-通路-脓毒症”网络

2.4 分子对接结果(表 2): DockThor 分子对接显示, 大黄素与以下 10 个共同靶点对接后, 结合能均 < -20 kJ/mol, 说明结合能力较好, 且配体与受体的结合自由能越低, 构象越稳定。

靶点	PBD 编号	活性位点中心坐标			靶点结合能 (kJ/mol)
		X 轴	Y 轴	Z 轴	
F7	6JHS	4.96	89.97	-92.66	-35.24
MMP-9	1I6J	39.32	35.94	34.43	-33.82
caspase-3	2XYP	31.71	20.51	40.22	-30.44
TGF-β 1	5VQP	77.02	45.18	36.64	-29.70
ESR2	5TOA	17.72	29.12	30.66	-27.48
ABCB1	6A6N	24.80	44.91	37.07	-28.74
XDH	2W3S	4.54	34.37	30.78	-32.21
GSK3B	6GN1	1.02	-2.51	-36.27	-34.91
MMP-1	8WON	6.40	0.81	35.06	-31.92
TNF	4QQL	240.61	-426.01	261.82	-31.05

2.5 大黄素对 CLP 大鼠整体生存状态的影响(图 4): 与假手术组比较, CLP 组大鼠有活动量减少、反应迟钝、身体蜷缩、进食进水量下降, 尿量减少、发热或低体温、毛发竖立等典型脓毒症表现, 提示脓毒症模型复制建立。与 CLP 组比较, 大黄素组大鼠上述症状减轻, 发热时间缩短, 热峰降低。在大鼠生存分析中, 截至术后 72 h, 假手术组大鼠无死亡, 存活率为 100% (10/10); CLP 组大鼠死亡 5 只, 存活率为 50% (5/10); 大黄素组大鼠死亡 4 只, 存活率为 60% (6/10), 生存曲线见图 4A。在体温变化方面, 假手术组大鼠肛温 (38.3 ± 0.4) °C, CLP 组大鼠出现发热时间较早, 热峰 39.8 °C, 发热持续时间较长, 其中 2 只大鼠术后 12 h 出现低体温, 低至

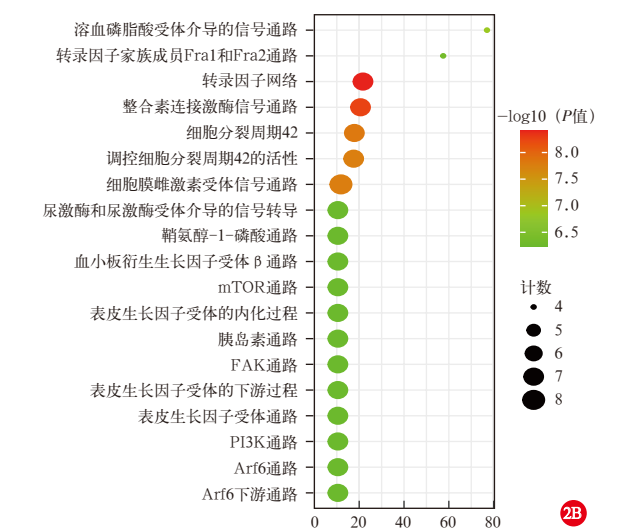
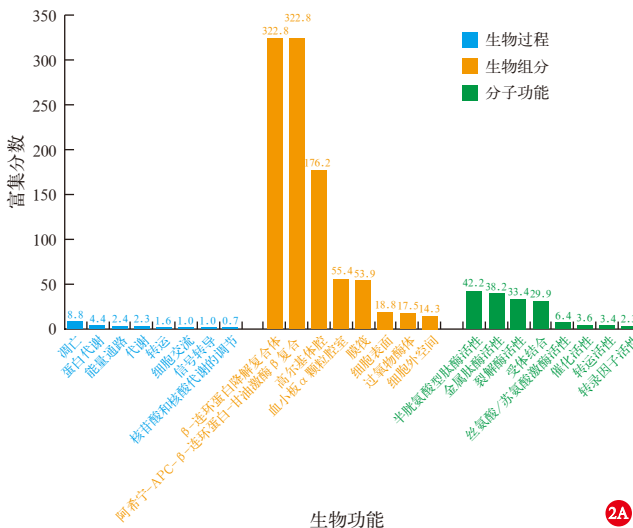


图 2 大黄素防治脓毒症靶点的生物功能分析(A)和通路富集分析(B)

35.5 ℃；与 CLP 组比较,大黄素组发热出现时间较晚,热峰低,持续时间较短(图 4B)。

2.6 大黄素对 CLP 大鼠肺组织病理学损伤的影响(图 5;表 3): HE 染色结果显示,假手术组肺泡壁结构完整,排列有序,无明显炎症浸润,与假手术组相比,CLP 组大鼠肺组织炎症细胞大量浸润,肺泡结构破损,肺泡壁增厚,肺泡腔渗出物增多,部分伴出血,肺组织病理学损伤评分显著增高。与 CLP 组比较,大黄素组上述病理学损伤减轻,肺组织病理学损伤评分降低;与假手术组比较,CLP 组肺组织 W/D 比值明显升高,与 CLP 组比较,大黄素组肺组织 W/D 比值明显降低(均 $P < 0.05$)。

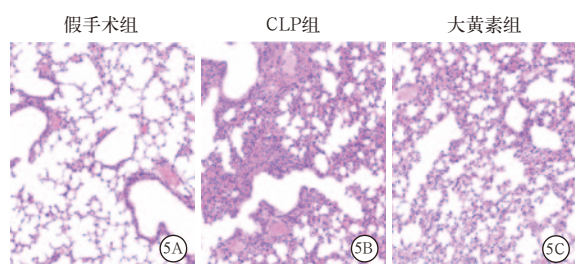


图 5 光镜下观察各组大鼠肺组织病理学改变 HE 染色 高倍放大

表 3 各组大鼠肺组织病理学损伤结果比较

组别	动物数 (只)	肺组织病理学损伤评分(分)	肺 W/D 比值
假手术组	3	0.67 ± 0.58	4.97 ± 0.25
CLP 组	3	9.67 ± 0.58 ^a	6.33 ± 0.25 ^a
大黄素组	3	7.00 ± 1.00 ^{ab}	6.03 ± 0.21 ^{ab}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与 CLP 组比较,^b $P < 0.05$

2.7 大黄素对 CLP 大鼠凋亡分子 caspase-3 mRNA、cleaved caspase-3 蛋白表达的影响(图 6;表 4):与假手术组比较,CLP 组 caspase-3 mRNA、cleaved caspase-3 蛋白表达水平均明显升高(均 $P < 0.05$);

与 CLP 组比较,大黄素组 caspase-3 mRNA、cleaved caspase-3 蛋白表达水平均明显降低(均 $P < 0.05$)。



图 6 大黄素对 CLP 大鼠 caspase-3 mRNA、cleaved caspase-3 蛋白表达的影响

表 4 各组大鼠肺组织 caspase-3 mRNA、cleaved caspase-3 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

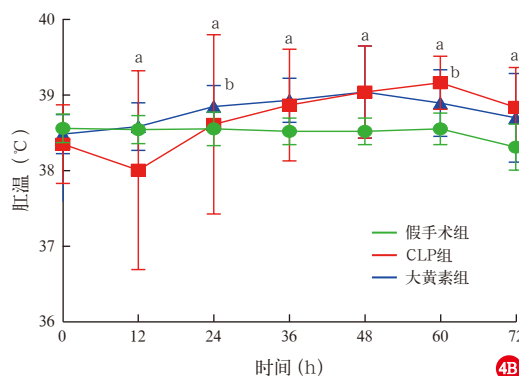
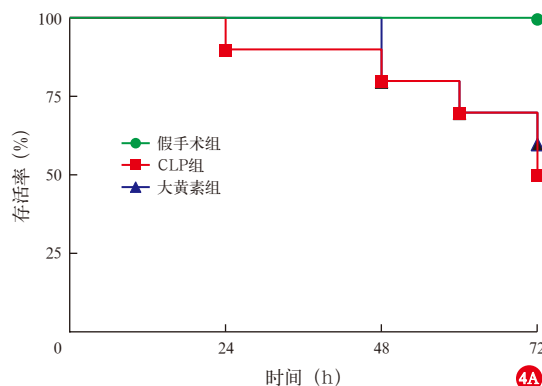
组别	动物数 (只)	caspase-3 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	cleaved caspase-3 蛋白 (cleaved caspase-3/ β -actin)
假手术组	3	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.01
CLP 组	3	65.61 ± 14.55 ^a	1.92 ± 0.17 ^a
大黄素组	3	30.11 ± 8.57 ^{ab}	1.36 ± 0.06 ^{ab}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与 CLP 组比较,^b $P < 0.05$

3 讨论

大黄素作为中药大黄的主要活性成分,能显著降低脓毒症模型的炎症因子水平,改善氧化应激,调节肺水代谢和免疫平衡,对肺、肾、心、胃肠等器官起保护作用^[11-12]。本研究通过构建“活性成分-靶标-通路-疾病”网络对大黄素防治脓毒症的机制进行了系统分析,并通过动物实验验证了大黄素对脓毒症肺损伤的保护作用,以及对肺组织凋亡分子 caspase-3 mRNA、cleaved caspase-3 蛋白的调控作用。表明大黄素可能通过调控 caspase-3 的作用机制改善脓毒症的肺损伤。

在网络药理学分析中,本研究筛选出大黄素治疗脓毒症的共同靶点共 10 个,预测出 8 个重要的生物过程和 19 条主要的信号通路。其中 caspase-3 是



注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与 CLP 组比较,^b $P < 0.05$

图 4 大黄素对 CLP 大鼠存活率及温度的影响

大黄素治疗脓毒症的共同靶点之一,既往研究表明,caspase-3 是参与凋亡级联反应的重要环节,能裂解和抑制丝氨酸/苏氨酸蛋白酶 B 以应对氧化应激,其诱导的免疫细胞凋亡是脓毒症免疫抑制病理生理的重要因素^[13]。之后的 FunRich 通路富集分析结果也显示大黄素能通过参与细胞凋亡、物质代谢、能量转化、细胞通讯等生物过程防治脓毒症,涉及的信号通路主要包括 Arf6、PI3K、FAK、胰岛素、mTOR 等。其中 PI3K 信号通路与蛋白酶 B、mTOR、caspase-3 等密切相关,通过调节细胞生长、凋亡、迁移,细胞黏附、血管生成、线粒体凋亡等生物过程参与脓毒症肺损伤的过程^[14],研究显示,多种中药单体化合物能通过激活 PI3K,在脓毒症肺损伤过程起保护作用^[15]。mTOR 是自噬信号通路中的关键蛋白,参与细胞的新陈代谢、凋亡及多条信号通路转导途径,在脓毒症肺损伤及免疫抑制中有重要作用^[16]。此外,本研究进一步采用分子对接技术对大黄素与共同靶点 F7, MMP-9, TNF 和 caspase-3 等的结合能力进行了研究。研究显示,大黄素与上述共同靶点的氨基酸残基均可形成较强的亲和力,表明大黄素治疗脓毒症可能有较高的药效活性。以上研究结果充分展示了大黄素多靶点、多途径的作用特点。为阐明大黄素防治脓毒症的作用靶点及作用途径提供了重要理论依据。但网络药理学也存在一定的局限性,如不能直接反应药物-靶点-通路的激活抑制作用,需进一步在体内或体外实验中进行验证。

在动物实验中,本研究首先验证了大黄素对 CLP 组大鼠存活率、生存状态的影响,结果显示,给予大黄素干预可提高 CLP 大鼠的存活率,缩短大鼠发热时间,降低热峰,改善大鼠生存状态,这与 Dong^[17]等的研究结果一致。之后研究验证了大黄素对脓毒症急性肺损伤的保护作用,发现大黄素可显著减轻肺病理损伤,减少肺炎症浸润,降低肺 W/D 比值。这与 Guo^[11]等的研究结果一致。最后分别从基因及蛋白层面验证了大黄素对 CLP 大鼠肺组织凋亡分子 caspase-3 mRNA、cleaved caspase-3 蛋白的调控作用,发现大黄素可显著降低肺组织中 caspase-3 mRNA、cleaved caspase-3 蛋白的表达,提示大黄素可能通过 caspase-3 通路调控细胞凋亡的机制改善大鼠肺损伤。这与 Gao 等^[18]研究大黄素对 CLP 大鼠的脑损伤保护机制的结果一致,但目前对于肺损伤中 caspase-3 调控的研究较少。以上研究结果证实,大黄素能有效提高 CLP 大鼠的存活率,

改善大鼠生存状态,减轻肺损伤,其作用机制与调控 caspase-3 信号通路抑制细胞凋亡有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021 [J]. *Intensive Care Med*, 2021, 47 (11): 1181-1247. DOI: 10.1007/s00134-021-06506-y.
- [2] Li WL, Li D, Chen YS, et al. Classic signaling pathways in alveolar injury and repair involved in sepsis-induced ALI/ARDS: new research progress and prospect [J]. *Dis Markers*, 2022, 2022: 6362344. DOI: 10.1155/2022/6362344.
- [3] 刘清泉, 张晓云, 孔立, 等. 高热(脓毒症)中医诊疗专家共识意见 [J]. *中国中医急症*, 2014, 23 (11): 1961-1963. DOI: 10.3969/j.issn.1004-745X.2014.11.001.
- [4] 黄坡, 赵国桢, 陈奕杉, 等. 《中医药单用/联合抗生素治疗常见感染性疾病临床实践指南·脓毒症》解读与展望 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43 (24): 4782-4785.
- [5] Sun L, Han YQ, Shen CQ, et al. Emodin alleviates high glucose-induced oxidative stress, inflammation and extracellular matrix accumulation of mesangial cells by the circ_0000064/miR-30c-5p/Lmp7 axis [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2022, 42 (3): 302-312. DOI: 10.1080/10799893.2021.1933028.
- [6] 郭丽纳, 孙燕妮. 大黄素对急性肺损伤保护作用研究进展 [J]. *中国中医急症*, 2017, 26 (4): 663-665. DOI: 10.3969/j.issn.1004-745X.2017.04.031.
- [7] Zhang P, Zhang DF, Zhou WA, et al. Network pharmacology: towards the artificial intelligence-based precision traditional Chinese medicine [J]. *Brief Bioinform*, 2023, 25 (1): bbad518. DOI: 10.1093/bib/bbad518.
- [8] 世界中医药学会联合会. 网络药理学评价方法指南 [J]. *世界中医药*, 2021, 16 (4): 527-532. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7202.2021.04.001.
- [9] Wang JF, Wang YP, Xie J, et al. Upregulated PD-L1 delays human neutrophil apoptosis and promotes lung injury in an experimental mouse model of sepsis [J]. *Blood*, 2021, 138 (9): 806-810. DOI: 10.1182/blood.2020009417.
- [10] Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 44 (5): 725-738. DOI: 10.1165/rmb.2009-0210ST.
- [11] Guo RM, Li YJ, Han M, et al. Emodin attenuates acute lung injury in Cecal-ligation and puncture rats [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 85: 106626. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106626.
- [12] Li YJ, Guo RM, Zhang MY, et al. Protective effect of emodin on intestinal epithelial tight junction barrier integrity in rats with sepsis induced by cecal ligation and puncture [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19 (6): 3521-3530. DOI: 10.3892/etm.2020.8625.
- [13] Cao C, Yu MM, Chai YF. Pathological alteration and therapeutic implications of sepsis-induced immune cell apoptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10 (10): 782. DOI: 10.1038/s41419-019-2015-1.
- [14] Margaria JP, Moretta L, Alves-Filho JC, et al. PI3K signaling in mechanisms and treatments of pulmonary fibrosis following sepsis and acute lung injury [J]. *Biomedicines*, 2022, 10 (4): 756. DOI: 10.3390/biomedicines10040756.
- [15] Li YK, Ai SN, Li Y, et al. The role of natural products targeting macrophage polarization in sepsis-induced lung injury [J]. *Chin Med*, 2025, 20 (1): 19. DOI: 10.1186/s13020-025-01067-4.
- [16] Deng RM, Huang GM, Wang TT, et al. Regulated programmed cell death in sepsis associated acute lung injury: from pathogenesis to therapy [J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 148: 114111. DOI: 10.1016/j.intimp.2025.114111.
- [17] Dong Y, Zhang L, Jiang Y, et al. Emodin reactivated autophagy and alleviated inflammatory lung injury in mice with lethal endotoxemia [J]. *Exp Anim*, 2019, 68 (4): 559-568. DOI: 10.1538/expanim.19-0004.
- [18] Gao LL, Wang ZH, Mu YH, et al. Emodin promotes autophagy and prevents apoptosis in sepsis-associated encephalopathy through activating BDNF/TrkB signaling [J]. *Pathobiology*, 2022, 89 (3): 135-145. DOI: 10.1159/000520281.

(收稿日期: 2025-10-21)

(责任编辑: 邸美仙)