

安徽医科大学学报
Acta Universitatis Medicinalis Anhui
ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目: 黄芪救逆汤对严重烫伤大鼠急性肝损伤的影响和分子机制
作者: 张宇豪, 赵杰, 孙业祥
收稿日期: 2025-02-08
网络首发日期: 2025-12-02
引用格式: 张宇豪, 赵杰, 孙业祥. 黄芪救逆汤对严重烫伤大鼠急性肝损伤的影响和分子机制[J/OL]. 安徽医科大学学报.
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20251202.0946.004>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字符、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

黄芪救逆汤对严重烫伤大鼠急性肝损伤的影响和分子机制

张宇豪¹, 赵杰², 孙业祥¹

(安徽医科大学第一附属医院¹烧伤科、²中医科, 合肥 230022)

摘要 目的 利用动物实验及现代药理学工具来探讨黄芪救逆汤 (HQJND) 对于严重烫伤大鼠急性肝损伤的影响和可能分子机制。**方法** 首先建立脓毒症大鼠模型, 随机分成 4 组, 生理盐水组使用生理盐水灌胃 1 mL/次, 每日 2 次, 中药组使用浓缩黄芪救逆汤 1 mL/次, 每日 2 次, 72 h 休克期后处死取材, 随后检测血清肝功能和苏木精-伊红 (HE) 染色, 验证该药物的疗效。假手术组及脓毒症组正常饲养, 不进行任何特殊处理。然后利用网络药理学筛选药物和药物反应的靶点, 预测在疾病治疗过程中可能起作用的信号通路。最后进行荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测基因表达, 蛋白质印迹 (WB) 检测肿瘤坏死因子- α (TNF α)、P65 蛋白 (P65)、磷酸化 P65 蛋白 (P-P65) 以及免疫组织化学 (IHC) 检测来验证药物疗效并探索药物治疗机制。**结果** 大鼠血清肝功能和组织病理学显示, 使用 HQJND 可显著改善严重烧伤大鼠的肝功能。采用网络药理学筛查鉴定 353 个疾病相关标记基因和 286 个药物靶点, 预测肿瘤坏死/NF- κ B 因子通路 (TNF/NF- κ B 通路) 可能为 HQJND 治疗严重烧伤急性肝损伤的关键途径。IHC 检测的结果显示, 脓毒症组相比于假手术组及中药组, 大鼠肝脏中 TNF α 的 IHC 染色显色更多。RT-qPCR 与 WB 结果显示, 与假手术组和中药组相比, 脓毒症组大鼠肝脏中 TNF α 、TNFR1 和 P65 蛋白的表达显著升高; 相反, 假手术组和中药组中 IKB α 的表达水平较高, 表明药物治疗有效抑制了 TNF/NF- κ B 信号通路的激活, 减轻了炎症反应, 从而缓解了组织损伤。**结论** 动物实验及网络药理学结果证实, HQJND 对于严重烧伤大鼠的急性肝损伤具有一定的保护作用, 这一作用可能与抑制 TNF/NF- κ B 信号通路有关。

关键词 黄芪救逆汤; 严重烧伤; 急性肝损伤; 网络药理学; 炎症

中图分类号 R 644

文献标志码 A

Effect of Huangqi Jiuni decoction on acute liver injury in severely scalded rats and its molecular mechanism

Zhang Yuhao¹, Zhao Jie², Sun Yexiang¹

(¹Dept of Burns, ²Dept of Chinese Medicine, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effect of HQJND on acute liver injury in severely scalded rats and its possible molecular mechanism by animal experiments and modern pharmacological tools. **Methods** Firstly, the rat model of sepsis was established and randomly divided into 4 groups. The normal saline group was given 1 mL of normal saline twice a day, and the traditional Chinese medicine group was given 1 mL of concentrated Huangqi Jiuni decoction twice a day. After 72 hours of shock, the samples were sacrificed, and then the serum liver function and (+)-haematoxylin eosin staining were

2025-02-08 接收

基金项目：国家自然科学基金（编号：81903994）；安徽医科大学附属第一附属医院临床研究重点项目（编号：LCYJ2021ZD005）

作者简介：张宇豪，男，硕士研究生；

孙业祥，男，教授，主任医师，硕士生导师，通信作者，E-mail:sunyexiang@163.com

performed to verify the efficacy of the drug. Sham Operation Group and sepsis group were fed normally without any special treatment. Then, network pharmacology was used to screen the targets of drugs and drug responses and predict the signaling pathways that might play a role in the treatment of diseases. Finally, fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) was performed to detect gene expression, Western blot (WB) was performed to detect Tumor necrosis factor (TNF α), P65, phosphorylated P65 (P-P65), and immunohistochemical (IHC) were performed assays to verify drug efficacy and explore the mechanism of drug treatment. **Results** Serum liver function and histopathology in rats showed that HQJND significantly improved liver function in severely burned rats. Network pharmacology screening was used to identify 353 disease-related marker genes and 286 drug targets. It was predicted that tumor necrosis/NF-NF- κ B pathway (TNF/NF-NF- κ B pathway) might be a key pathway for HQJND to treat acute liver injury after severe burns. The results of immunohistochemistry (IHC) showed that the staining of TNF- α in the liver of the sepsis group was more than that of the Sham Operation Group and the traditional Chinese medicine group. The results of fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blot (WB) showed that the expression of TNF- α , TNFR1 and P65 proteins in the liver of rats in the sepsis group was significantly higher than that in the Sham Operation Group and the traditional Chinese medicine group; on the contrary, the expression of TNF- α , TNFR1 and P65 proteins in the liver of rats in the sepsis group was significantly higher than that in the Sham Operation Group and the traditional Chinese medicine group. The expression level of IKB α was higher in the Sham Operation Group and the traditional Chinese medicine group, indicating that drug treatment effectively inhibited the activation of the TNF/NF- κ B signaling pathway and alleviated the inflammatory response, thereby alleviating tissue damage. **Conclusion** Animal experiments and network pharmacology results confirm that HQJND has a protective effect on acute liver injury in severely burned rats, which may be related to the inhibition of TNF/NF- κ B signaling pathway.

Key words HQJND; Severe burns; Acute liver injury; Network pharmacology; Inflammation

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 81903994); Clinical Research Key Project of the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University (No. LCYJ2021ZD005).

Corresponding author Sun Yexiang, E-mail: sunyexiang@163.com

严重烧伤几乎可以损伤全身所有器官，急性肝损伤就是其中一项严重的并发症^[1]。有研究^[2]表明，恰当的液体疗法有助于减轻烧伤休克患者的组织缺血缺氧状况，降低全身炎症反应和多器官功能衰竭的风险。早期大面积烧伤导致肝脏缺血缺氧，继发应激与炎症反应从而加重对肝脏的损伤，而大多数中药的有效成分具有抗炎和抗氧化的作用，这对于预防早期急性肝损伤有很好的作用^[3]。烧伤后急性肝损伤目前已被证实跟多种炎症介质介导的炎症反应息息相关，如早期烧伤发生时，B 细胞淋巴瘤-2 样蛋白-xL(Bcl-2-like protein-xL, Bcl-xL)转录增加，从而诱导肝细胞的凋亡，损害了肝血清蛋白的产生；热休克蛋白如 HSP32 称为血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)，具有抗氧化、抗炎和血管舒张特性，烧伤后的 HO-1 诱导的适应性反应可以保护肝脏受进一步的氧化损伤；以及由核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路介导的肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factors, TNF)、白介素-6 (interleukin-6, IL-6) 等等炎症因子的共同参与^[4]。

网络药理学注重于多靶点、多通路的调节机制，有利于发现多种成分、多靶点的中药作用机制^[5]，该方法可以从网络拓扑分析中识别潜在的机制和关键靶点，为临床医师中药组方提供参考价值^[6]，它从系统层次和生物网络的角度分析中药用药规律，为中药理论体系研究提供强有力的帮助^[7]。使用液相色谱-串联质谱法根据质谱峰进行分析，同时具有液相色谱优异的分离能力与质谱高灵敏度、高选择性的检测能力，在分析中药成分方面具有显著的优势^[8]。

1 材料与方法

1.1 浓缩药物

黄芪救逆汤的成分组成为 12 种中药，分别为：黄芪、当归、丹参、白芍、白术、茯苓、猪苓、党参、车前子、五味子、生地黄、泽泻。将全部草药（所有药物均由安徽医科大学第一附属医院中药房提供）加纯水至完全没过全部药材，浸泡 30 min，使用滤斗滤出全部水分，将全部药材倒入煎药锅中，用烧杯取 800 mL 纯水倒入煎药锅中，大火煎煮至沸腾，每 10 min 翻动药材 1 次，使药材受热均匀，后小火煎熬 30 min，同样每 10 min 翻动 1 次，时间到后，过滤出全部液体 300 mL，将其倒入密闭玻璃容器中。再取 600 mL 纯水倒入剩余药渣中，大火煎煮至沸腾，后小火煎熬 30 min，期间同样每 10 min 翻动 1 次，时间到后，过滤出全部液体 400 mL，将其倒入同一密闭玻璃容器中，共得到 700 mL 药液。最后，使用旋转蒸发仪对 700 mL 药液进行浓缩，可获得约 100 mL 浓缩药液。

1.2 建立动物模型

挑选体质量 250 g、年龄 8 周的健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 32 只，经过 1 周的适应性饲养后，随机分成 4 组：假手术组、脓毒症组、生理盐水组和中药组，每组 8 只。先对所有大鼠施以 6 mL/kg 的三溴乙醇进行腹腔注射麻醉，接着用脱毛膏去除背部毛发。假手术组大鼠背部仅用常温蒸馏水湿润 10 s；而脓毒症组、生理盐水组和中药组的大鼠则将背部皮肤暴露于 98 °C 沸水中 15 s，之后用无菌纱布吸干水分，并用碘伏对创面及周围皮肤进行消毒，最后用创口贴和胶带进行固定。接着，脓毒症组、生理盐水组和中药组的大鼠均接受腹腔注射 2 mg/kg 的脂多糖（lipopolysaccharide, LPS），从而成功构建了烧伤面积 30%、III 级深度并伴有脓毒症的烧伤大鼠模型。之后，开始灌胃处理，中药组根据人-大鼠体表面积比例换算，每次灌胃量为 1 mL，生理盐水组则每次给予相同体积 1 mL 的生理盐水进行灌胃。灌胃频率为每日 2 次，持续时间覆盖烧伤休克期的 3 d。

1.3 样本收集

第 3 天灌胃后，静置大鼠等待 1 h，同样使用腹腔注射 6 mL/kg 三溴乙醇麻醉大鼠，取仰卧位，进行心脏取血。每只大鼠取血约 5 mL，置于 4 °C 冰箱冷存静置 4 h。然后使用冷冻离心机 4 °C、3 000 r/min 离心血液 10 min，取得上层血清后置于 -80 °C 冰箱保存。沿腹中线剪开大鼠腹腔，充分暴露肝脏，完整取下大鼠全部肝脏，置于固定液中保存用于后续病理学检测。

1.4 血清肝功能检测

使用全自动生化仪检测所取样本血清中的谷丙转氨酶（alanine transaminase, AST）、谷草转氨酶（aspartate transaminase, ALT）水平。

1.5 肝脏组织学分析

采用常规石蜡切片技术对大鼠肝脏组织进行处理和分析。首先，使用 4% 多聚甲醛溶液固定大鼠肝脏组织 24 h，以确保组织结构的完整性和细胞形态的稳定性。固定完成后，依次用 70%、80%、90%、95% 和 100% 的乙醇梯度脱

水，每次 1 h。随后将组织置于二甲苯中透明化处理，并用熔化的石蜡进行浸渍和包埋。使用旋转式切片机将包埋好的组织切成 4~5 μm 厚的连续切片。切片脱蜡时，依次用二甲苯I、二甲苯II各处理 10 min，然后经 100%、95%、90%、80%、70% 的乙醇梯度水化。采用苏木精-伊红（HE）染色法进行染色：苏木精染色 5 min，盐酸乙醇分化 30 s，伊红染色 2 min。染色后的切片经乙醇梯度脱水、二甲苯透明后，用中性树胶封片。在光学显微镜下观察时，重点评估肝小叶结构的完整性、肝细胞形态学改变（包括细胞核固缩、细胞质空泡化等）、炎症细胞浸润程度（如淋巴细胞、中性粒细胞等）、肝细胞坏死区域以及纤维组织增生情况等病理学特征。通过系统观察这些指标，可以全面评估肝损伤的程度和特征。

1.6 免疫组化（immunohistochemistry, IHC）

脱蜡与水化同 HE 染色步骤。脱蜡切片放入柠檬酸盐缓冲液，微波煮沸后冷却 5 min，重复加热 5 min，自然冷却。PBS 冲洗 3 次 \times 5 min。组化笔圈组织，滴加 3% H_2O_2 孵育 20 min，PBS 洗 3 次 \times 5 min。山羊血清封闭 1 h，吸弃封闭液。滴加 KIM1 一抗（稀释液），4 °C 过夜。次日室温复温，PBS 洗 3 次 \times 5 min。滴加二抗（37 °C 孵育 1 h），PBS 洗 3 次 \times 5 min。DAB 镜下控时显色，水洗终止。苏木精复染 1 min，水洗 \rightarrow 梯度酒精脱水 \rightarrow 二甲苯透明 \rightarrow 中性树胶封片。

1.7 荧光定量 PCR（quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR）

在冰面上使用 RNA 提取试剂盒按照说明书步骤提取肝脏组织中的 RNA，EP 管和枪头等均使用无酶型，将提取的 RNA 放入-80 °C 冰箱中保存。将各样本的 RNA 充分混匀。先用 DEPC 水将微量紫外荧光光度计调零，再用移液枪吸取 2 μL 样本的 RNA，滴于探头上检测 RNA 浓度。使用 ToloBio 一步法试剂盒同时进行基因组 DNA 去除和逆转录两个反应。将 cDNA、引物和 ToloBio 的 pcr 试剂盒中的试剂进行混合配置，混合均匀后在系统下进行扩增和荧光定量。

1.8 蛋白质印迹（Western blot, WB）

取 20 mg 左右肝实质组织，加入含 RIPA 裂解液（含 PMSF、蛋白酶/磷酸酶抑制剂）的研磨器中，冰上研磨至组织完全裂解，冰浴 30 min。-4 °C、10 000 r/min 离心 12 min，取上清液分装，-80 °C 保存。按试剂盒说明配置工作液，加入标准品和样本至 96 孔板，37 °C 孵育 30 min，测 562 nm 吸光度。计算浓度后，加入 SDS-PAGE 上样缓冲液，煮沸 8 min，8 000 r/min 离心 5 min，-80 °C 保存。清洗玻璃板，按试剂盒比例配制下层胶，加异丙醇压平；凝固后冲洗，加上层胶，插入梳子。上样前煮沸样本 5 min，离心后上样。恒压电泳至目的蛋白分离（注意控温）。胶/膜夹于滤纸间（0.45 μm NC 膜），冰浴转膜（避免气泡）。5% BSA 室温摇育 1 h。一抗 4 °C 孵育 4 h，TBST 洗 6 次。二抗室温 1 min，TBST 洗 6 次。使用化学发光显影（Tanon 5200），ImageJ 分析条带灰度值。

1.9 网络药理学

1.9.1 筛选 HQJND 蛋白质靶点

为了确定 HQJND 实际成分的蛋白质靶点，课题组参考了中药系统药理学数据库，并收集了 HQJND 中的活性成分。此外，由于黄芪甲苷、地黄苷、梓醇、毛蕊花糖苷、五味子乙素具有许多药理作用，但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）数据库并不包括上述药物的作用靶点，因此从 PharmMapper 上添加了上述化学成分的靶点。设定限制为：口服生物利用度（OB）

$\geq 30\%$ ，药物相似性 (DL) ≥ 0.18 。这些选定的标准并不是完全固定的，例如，黄芪甲苷不在这个范围内，但课题组保留了这个活性成分，因为考虑到它具有重要的药理作用，并且确实可以在药物中检测到。筛选后借助 UniProt 的帮助，将获得的目标信息从蛋白质名称转换为规范的基因名称。

1.9.2 建立药物活性成分-靶点网络

Cytoscape 是一款功能强大的网络分析与可视化软件，广泛应用于生物信息学、药物研发等领域。通过将药物、活性成分及其靶点信息导入 Cytoscape，用户可以构建复杂的相互作用网络，其中节点代表药物、成分或靶点，边则代表它们之间的关联关系。Cytoscape 内置的算法能够自动计算每个节点的度值（即连接数），用户可根据度值对节点进行排序，识别网络中的关键节点。为了更直观地展示网络结构，用户可以通过调整节点的颜色深度和面积大小来突出显示高连接度的重要节点，从而快速定位核心靶点或关键药物成分，为药物筛选和机制研究提供有力支持。

1.9.3 预测重要靶点

将 HQJND 作用的目标与疾病基因进行了交叉分析，然后将这些交叉结果以韦恩图的形式进行可视化展示。

1.9.4 关键靶点的富集分析

对在 2.2.3 节中获得的目标靶点进行了基因本体 (gene ontology, GO) 以及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析及可视化。

1.9.5 建立蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interactions, PPI) 网络

将 2.2.3 节中获得的基因导入 STRING 数据库 (STRING: functional protein association networks)，以便分析相关蛋白质之间的相互关系。所获得的蛋白质相关关系网被导入到 Cytoscape 中，从而将蛋白质节点可视化。

1.10 统计学处理

GraphPad Prism 9 用于统计分析。图中的实验数据表示为 $\bar{x} \pm s$ ，两组或多组之间的差异分别采用 *t* 检验或单因素方差分析 (ANOVA) 进行比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肝脏组织病理学

大鼠肝脏组织切片的 HE 染色分析评估了不同处理组对脓毒症诱导的肝损伤的修复效果。组织学观察显示，假手术组肝小叶结构完整，肝细胞排列整齐，肝窦形态规则，未见明显病理改变。脓毒症模型组呈现显著的肝损伤特征，表现为肝小叶结构紊乱，肝细胞大面积坏死溶解形成空洞样改变，肝窦扩张充血，提示脓毒症可导致严重的肝脏病理损伤。生理盐水对照组肝损伤程度较模型组有所减轻，但仍可见部分肝小叶结构破坏，肝细胞坏死现象较为普遍。中药组在促进组织再生方面展现出最优异的疗效，肝小叶结构基本完整，肝窦形态规则，仅见少量肝细胞坏死，表明中药合剂能有效减轻脓毒症引起的肝损伤，促进肝组织修复。使用 Knodell 评分系统的组织学活动指数 (histological activity index, HAI) 对四组大鼠的肝脏进行炎症和纤维化分级，分值范围为 0-22 分，分值越大，表明肝脏的损伤越大。然后将四组大鼠的肝脏评分绘制成柱状图，结果显示，假手术组的评分最低，表明其肝脏损伤程度最低；脓毒症组的评分最高，表明其肝脏损伤程度最高；生理盐水组较脓毒症组评分有少量降低，中药组评分较脓毒症组有显著降低。结果表明中药合剂对于减轻烧伤脓毒症大鼠的肝损伤具有明显作用。组织病理学及 HAI 评分

结果为中药合剂的肝保护作用提供了直接的形态学证据，提示其在脓毒症相关肝损伤治疗中具有潜在的应用价值。

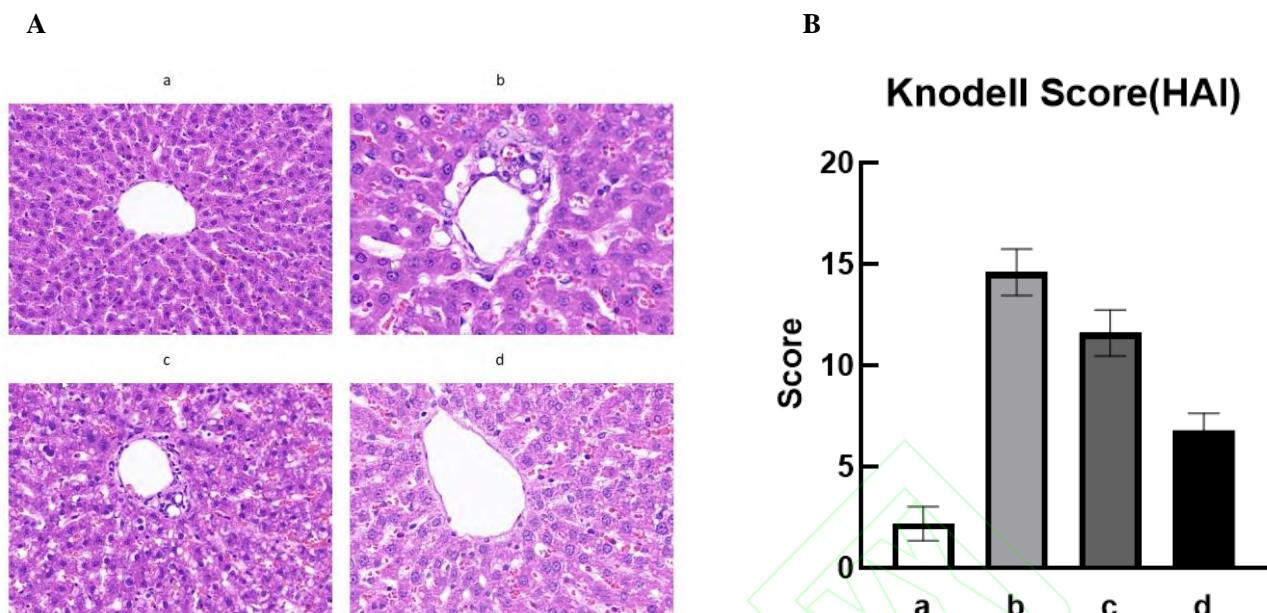


图 1 大鼠肝脏切片 H&E 染色(A)及肝脏 Knodell 评分(B) $\times 400$

Fig.1 HE staining (A) and Knodell score (B) of rat liver sections $\times 400$

注: a: Sham operation group; b: Sepsis Group; c: Normal saline group; d: Traditional Chinese medicine group.

2.2 大鼠血清肝功能水平

每组随机抽选 5 只检测血清肝 ALT 和 AST 水平并绘制柱状图, 与假手术组相比, 脓毒症组和生理盐水组大鼠的 ALT 与 AST 水平均升高 ($P=0.04$); 相比脓毒症组和生理盐水组, 中药组大鼠的 ALT 与 AST 水平有显著降低并接近于假手术组($P=0.04$), 证明中药合剂对于改善严重烧伤后大鼠肝功能具有良好的效果。

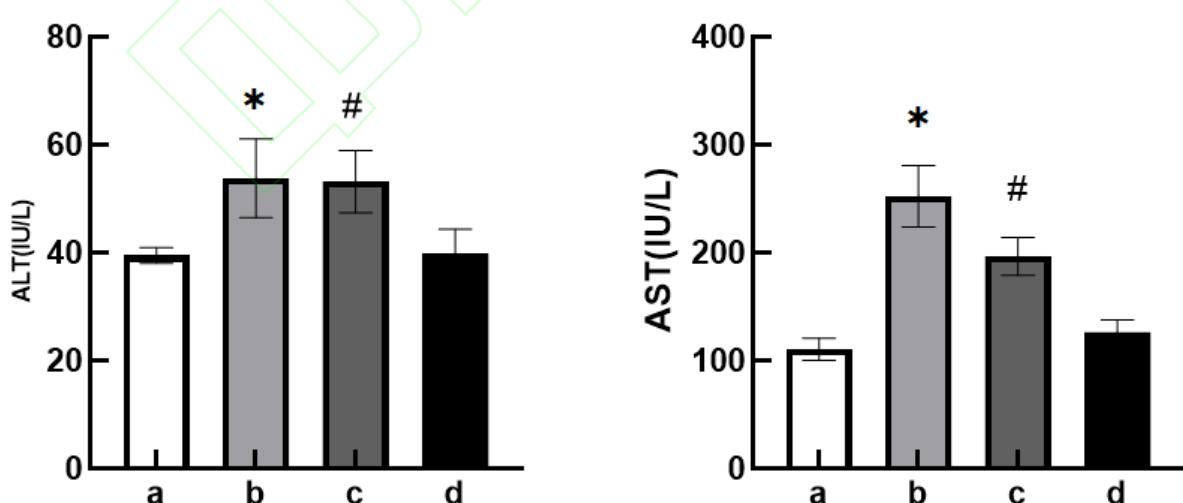


图 2 大鼠血清肝功能水平

Fig.2 Serum liver function level of rats

注: a: Sham group; b: Sepsis Group; c: Normal saline group; d: traditional Chinese medicine group; $^*P<0.05$ vs Sham group; $^{\#}P<0.05$ vs traditional Chinese medicine group.

2.3 网络药理学

2.3.1 药物的靶点信息

根据 2.2.1 部分的研究结果, 12 味中药中共鉴定出 139 个主要活性成分, 这些成分作用于 286 个靶点。图 3A 展示了药物有效成分与其靶点之间的相互作用网络。图中, 菱形节点代表药物作用的基因靶点, 颜色深浅和大小反映了多个药物共同作用的靶点数量, 颜色越深、面积越大表示该靶点被越多的药物成分作用。圆形节点代表药物的有效成分, 其颜色深浅和面积大小与成分的数量及其作用的靶点数量成正比, 即成分越多或作用的靶点越多, 节点颜色越深、面积越大。

2.3.2 疾病药物的 PPI 网络

通过整合 GeneCard、Disgenet 和 OMIM 这 3 个主要的疾病数据库, 识别出 356 个与疾病紧密相关的基因。这些基因与 HQJND 数据库中的 286 个靶点有 42 个共同基因, 如图 3C 所示。对这 42 个共同基因执行蛋白质-蛋白质相互作用分析后, 得到图 3B 所示的 PPI 网络图, 与炎症相关的靶点在 PPI 网络中扮演了关键角色。

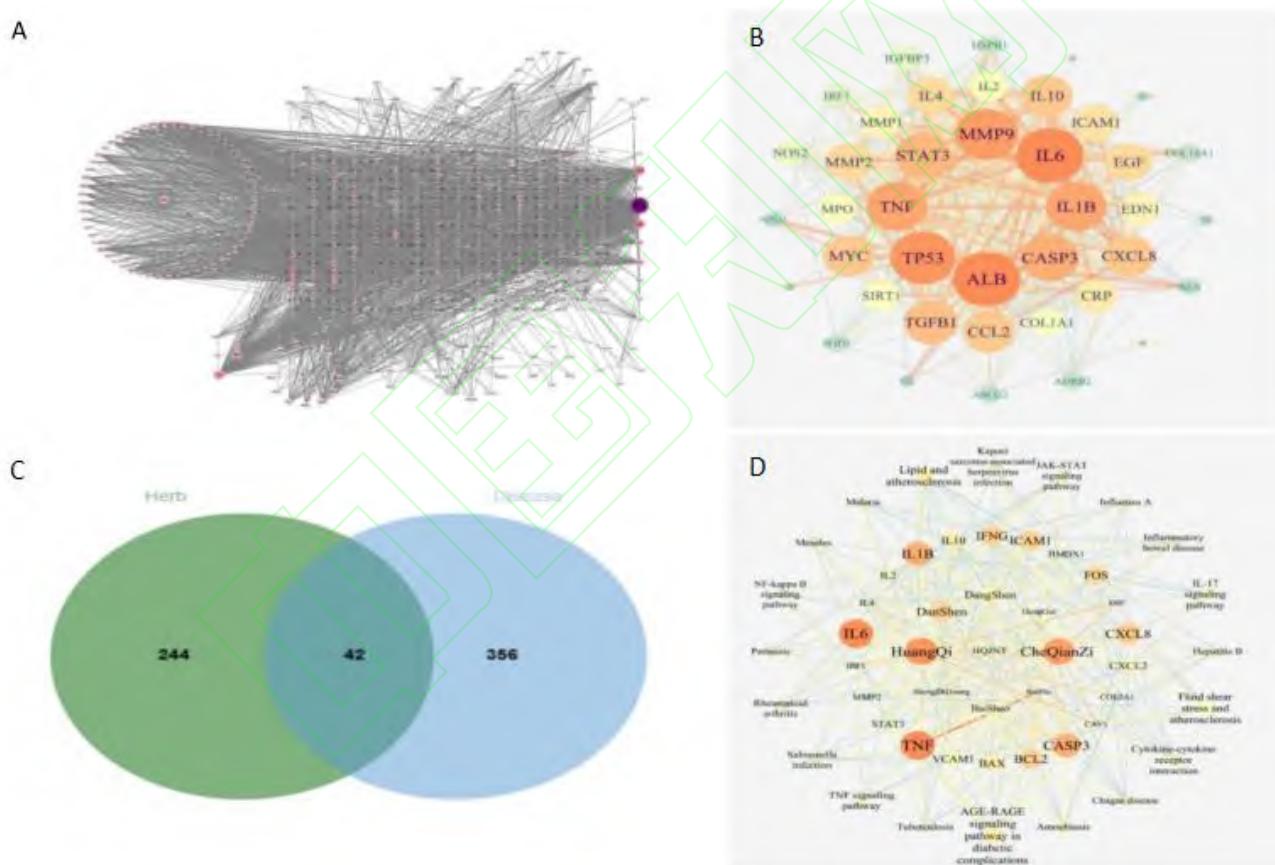


图 3 网络药理学基因相关联系及作用图

Fig.3 Gene correlation and action map generated through network pharmacology

注: A: herbal-active ingredient-target information network diagram; B: Intersection gene PPI network diagram; C: Intersection of disease genes and drug target genes; D: Drug gene association diagram.

2.3.3 KEGG 与 GO 富集分析

随后, 将 42 个交集目标基因进行富集分析可以得到相关基因的目标通路, 得到其中较为靠前的 20 条, 与 24 个基因关系紧密, 药物与基因的关系如图 3D 所示, 而丹参、当归、车前子、白术、白芍、生地黄、黄芪、党参正

是这 24 个基因的作用靶点, 所以这 8 味药材在 HQJND 中所作用的效果更为显著。从富集分析的结果来看, HQJND 的作用机制与炎症密切相关, 其中 TNF 信号通路与 NF- κ B 信号通路相互联系且与炎症分发生发展更为密切, 所以预测大鼠受到严重烧伤并发脓毒症后, 肝脏发生严重的炎症反应, HQJND 正是通过 TNF/NF- κ B 信号通路抑制大鼠肝脏炎症反应从而改善大鼠肝损伤的。

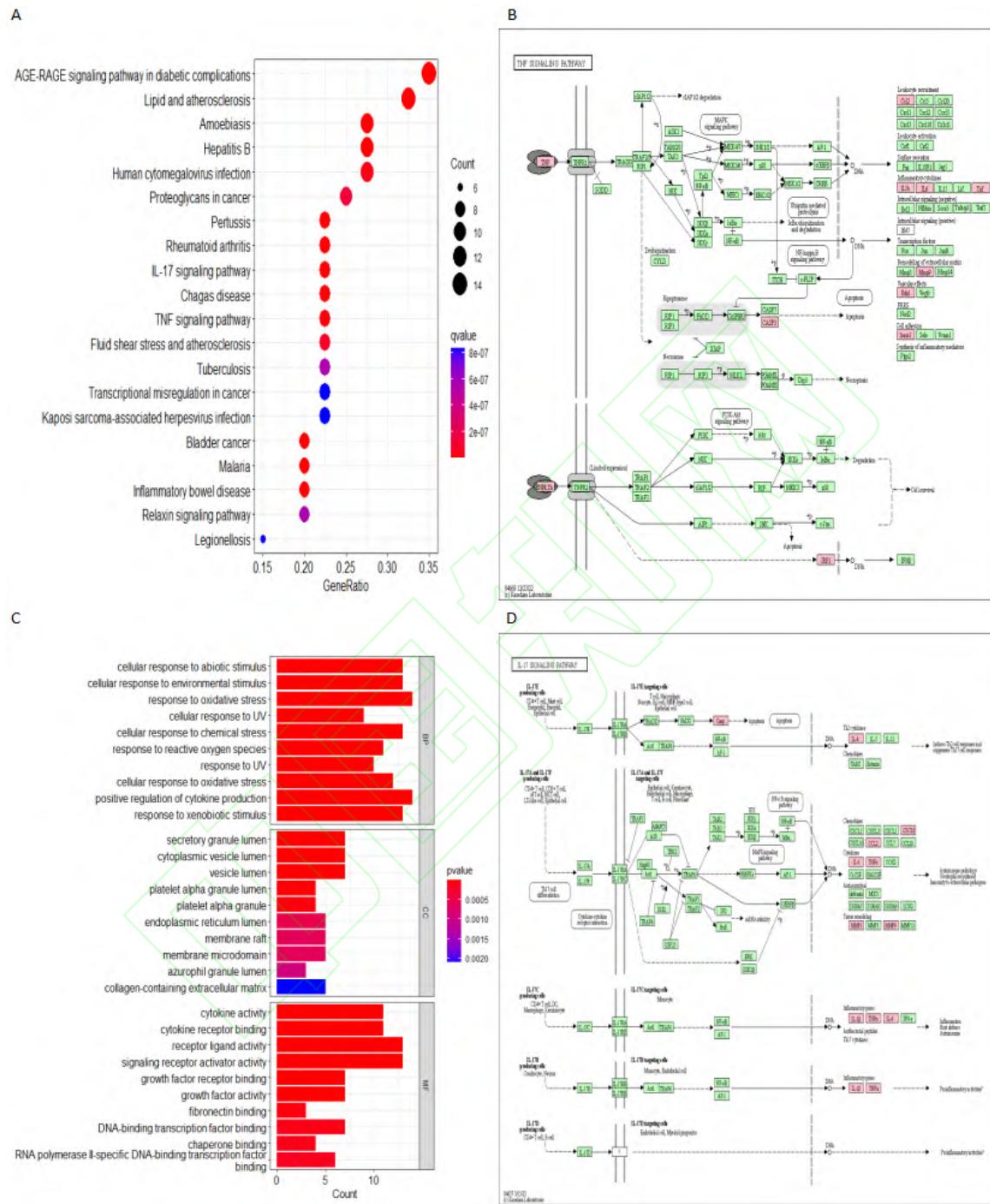


图 4 GO 以及 KEGG 富集分析及可视化

Fig.4 KEGG (A,B,D) and GO (C) enrichment analysis and visualization

2.4 HQJND 对 TNF/NF- κ B 信号通路的影响

根据图 5 大鼠肝脏的 TNF α 的 IHC 染色所示, 相比假手术组及中药组, 脓毒症组显色更多, 说明 TNF α 通路在脓毒症组肝脏中的激活更多。依据网络药理学的预测, RT-qPCR 实验对 TNF/NF- κ B 信号通路中的几个主要靶点进行验证, 如 TNF α 、TNFR1、P65 和 IKB α 。WB 检测 TNF α 、P65 和 P-P65 的表达水平。在正常生理状态下, IKB α

与 P65 结合，抑制 P65 的核移位，从而阻断其介导的基因转录。然而，当 TNF α 与 TNFR1 结合后，IKB α 的磷酸化受到干扰，导致其无法继续将 P65 滞留在细胞质中，促使 P65 向细胞核内转移。这一过程激活了 NF- κ B 信号通路，引发炎症反应的失控，最终导致组织损伤。实验结果正如图 6、7 所示，与假手术组和中药组相比，脓毒症组大鼠肝脏中 TNF α 、TNFR1 和 P65 蛋白的表达显著升高 ($P=0.03$)。相反，假手术组和中药组中 IKB α 的表达水平较高 ($P=0.03$)，表明药物治疗有效抑制了 TNF/NF- κ B 信号通路的激活，减轻了炎症反应，从而缓解了组织损伤。这一结果提示，中药可能通过调控 TNF/NF- κ B 信号通路发挥抗炎和保护组织的作用。

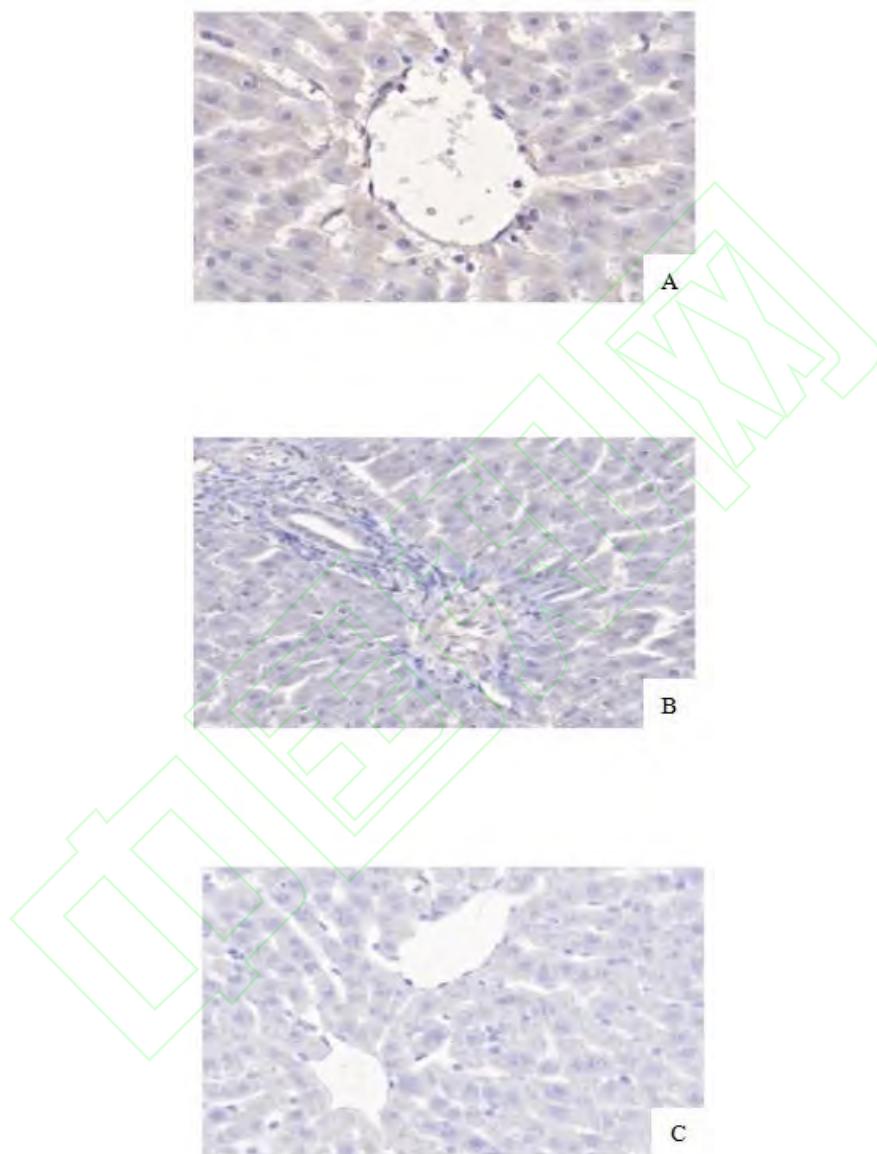


图 5 大鼠肝脏 TNF α 的 IHC 染色 $\times 400$

Fig.5 IHC staining of TNF α in rat liver $\times 400$

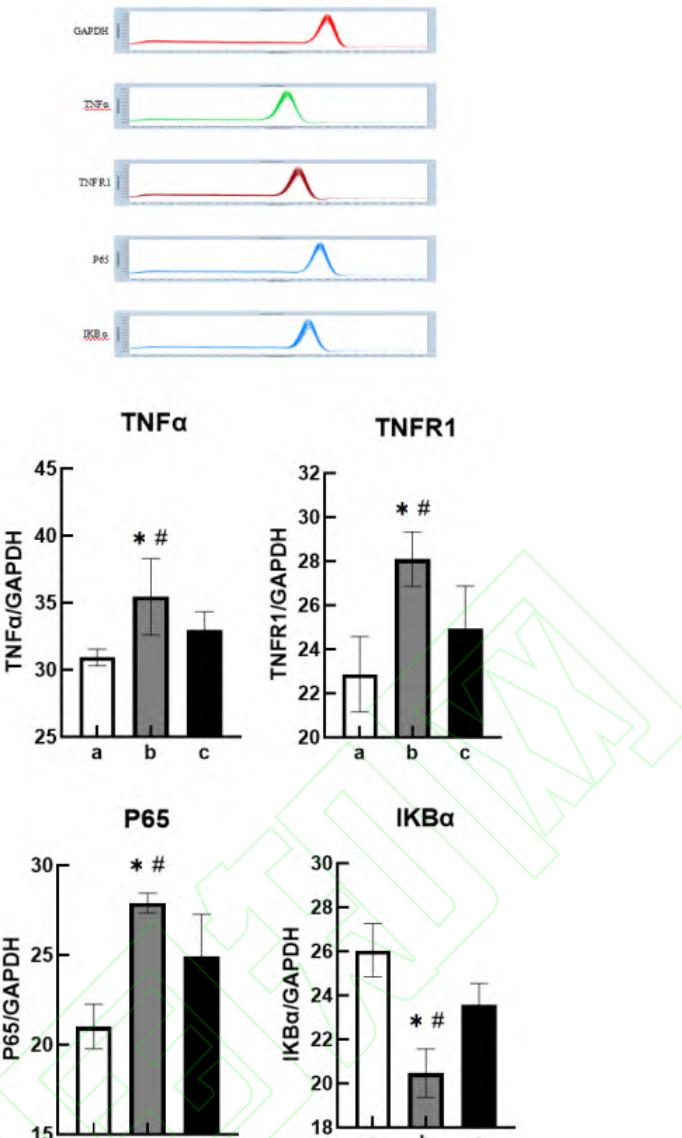
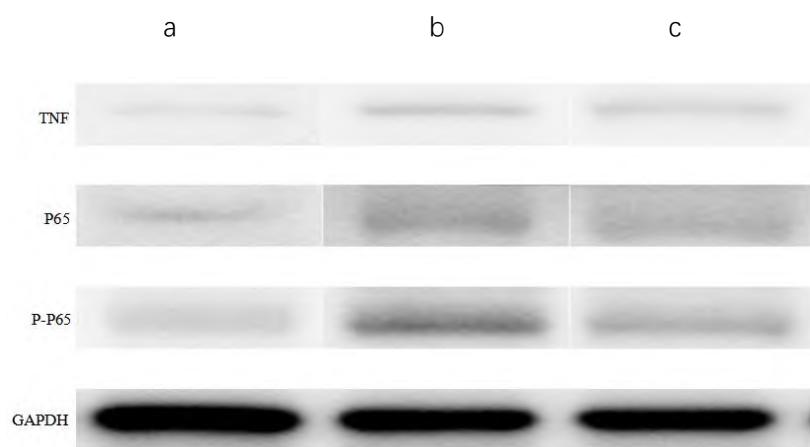


图 6 qRT-PCR 检测 TNF α , TNFR1, P65, IKB α

Fig.6 qRT-PCR detected the expression level of TNF α , TNFR1, P65, and IKB α

注: a: Sham group; b: Sepsis group; c: Traditional Chinese medicine group; * $P<0.05$ vs Sham group; # $P<0.05$ vs Traditional Chinese medicine group.



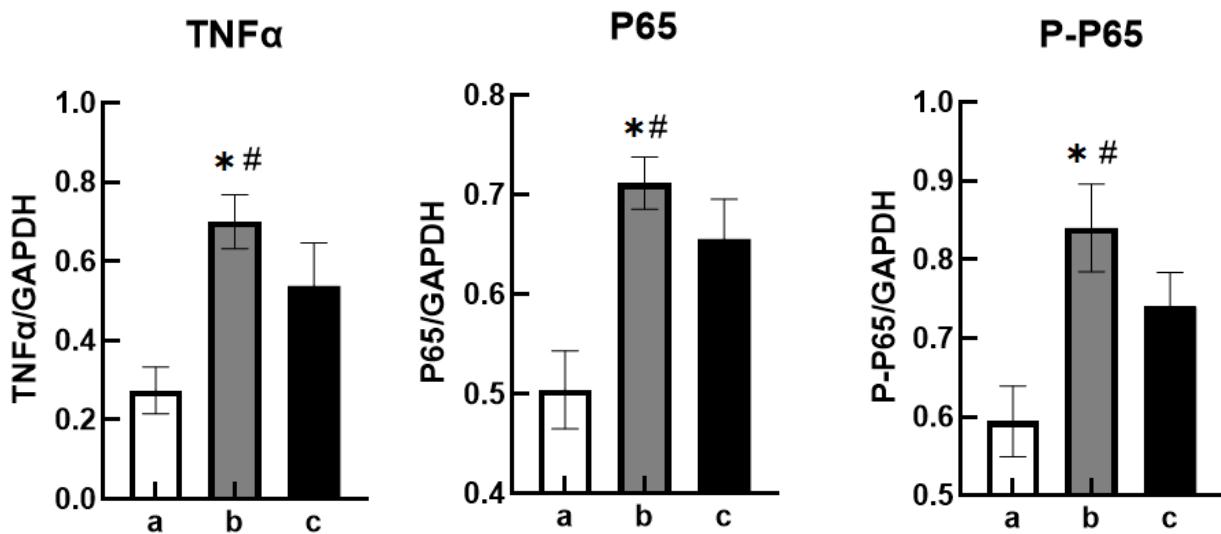


图 7.WB 检测 TNF α , P65, P-P65

Fig.7 WB detected the expression level of TNF α , P65, and P-P65

注: a: Sham group; b: Sepsis group; c: Traditional Chinese medicine group; * $P<0.05$ vs Sham group; # $P<0.05$ vs Traditional Chinese medicine group.

3 讨论

急性肝损伤是严重烧伤后可能引起的并发症之一,发病后治疗难度大,治疗周期长且可能引起其他的并发症,留下难以愈合的后遗症。急性肝损伤的初期,人体皮肤表面会形成大面积的裸露创面,皮肤屏障受损严重,大量体液会从这些创面中流失,导致人体出现休克,同时烧伤后血管通透性增加,血流量减少导致血管收缩,体内器官血液供应不足,形成局部器官休克状态^[9]。同时为了保持大脑以及心脏这两个重要器官的血氧供应,大部分血液会优先供给大脑及心脏,导致肝脏进一步缺血缺氧^[10]。紧接着肝脏的缺血缺氧又会继发应激与炎症反应从而加重对肝脏的损伤,造成肝脏损伤的恶循环。而在治疗后期,由于大面积的烧伤创面愈合较慢,皮肤屏障难以恢复,大量细菌等病原体会轻易通过入侵人体,导致脓毒症的发生,从而导致肝损伤,减缓甚至加重肝脏功能的恢复。

中药在治疗烧伤后导致的器官炎症反应方面具有很多优势,因为很多中药成分具有抗炎抗氧化的作用,这对预防与治疗严重烧伤后急性肝损伤具有良好的作用。而中药的作用机制通常都是多种成分在多个作用靶点上共同发挥作用,其中部分存在协同作用,本实验显示, HQJND 对于减轻机体炎症反应的作用也是通过多成分多靶点共同作用,而其中, TNF/NF- κ B 通路都是与炎症相关的通路,且通过 KEGG/GO 富集分析得知,其与 HQJND 的作用机制关系最为密切^[11]。虽然中药合剂中有 12 种药物,但是通过之前的预测发现,其中 32 个靶点更加重要,那么这 32 个靶点是丹参、当归、车前子、白术、白芍、生地黄、黄芪、党参的目标靶点,所以这 8 味药物对于减轻严重烧伤大鼠急性肝损伤的作用更为重要。

在正常生理状态下, IKB α 与 P65 结合,抑制 P65 的核移位,从而阻断其介导的基因转录。然而,当 TNF α 与 TNFR1 结合后, IKB α 的磷酸化受到干扰,导致其无法继续将 P65 滞留在细胞质中,促使 P65 向细胞核内转移。这一过程激活了 NF- κ B 信号通路,引发炎症反应的失控,最终导致组织损伤。HQJND 可能通过多靶点、多途径的方式,抑制 TNF/NF- κ B 信号通路的过度激活,下调 IL-6、IL-1 β 等促炎因子的表达,同时上调 IL-10 等抗炎因子的水

平，从而减轻肝脏炎症反应，改善肝功能。这种多成分、多靶点的作用特点体现了中药复方治疗复杂疾病的优势，为 HQJND 在烧伤后脓毒症相关肝损伤的治疗提供了科学依据。

所以，对于严重烧伤后急性肝损伤而言，相较于现阶段临床较为常见的西药疗法，中药合剂不仅作用靶点多而且各种成分之间存在协同作用，相比于单一药物而言可以大大降低每种药物的用量和毒性并且增强疗效^[12]。中药合剂靶点广泛，作用机制全面，药效更好，治疗范围更广。所以这种“多靶点，多机制”的网络药理学研究模式也更适用于中药研究，能够更快，更全面的帮助研究者认识及研究药物。

经过以上动物实验及网络药理学结果证实，HQJND 对于严重烫伤大鼠的急性肝损伤具有一定的保护作用，这一作用可能与抑制 TNF/NF- κ B 信号通路有关。

参考文献

- [1] Mert S, Bulutoglu B, Chu C, et al. Multiorgan metabolomics and lipidomics provide new insights into fat infiltration in the liver, muscle wasting, and liver-muscle crosstalk following burn injury[J]. *J Burn Care Res*, 2021, 42(2): 269-87. doi:10.1093/jbcr/iraa145.
- [2] Kao Y, Loh E W, Hsu C C, et al. Fluid resuscitation in patients with severe burns: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Acad Emerg Med*, 2018, 25(3): 320-9. doi:10.1111/acem.13333.
- [3] Li X, Zhang W, Li P, et al. The protective effect and mechanism of lentinan on acute kidney injury in septic rats[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(14): 883. doi:10.21037/atm-20-5158.
- [4] Muro I, Qualman A C, Kovacs E J, et al. Burn-induced apoptosis in the livers of aged mice is associated with caspase cleavage of bcl-xL[J]. *J Surg Res*, 2023, 290: 147-55. doi:10.1016/j.jss.2023.04.020.
- [5] Li S, Zhang B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application[J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(2): 110-20. doi:10.1016/S1875-5364(13)60037-0.
- [6] Lin H, Wang X, Liu M, et al. Exploring the treatment of COVID-19 with YinQiao powder based on network pharmacology[J]. *Phytother Res*, 2021, 35(5): 2651-64. doi:10.1002/ptr.7012.
- [7] Liu J, Liu J, Tong X, et al. Network pharmacology prediction and molecular docking-based strategy to discover the potential pharmacological mechanism of Huai Hua San against ulcerative colitis[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 3255-76. doi:10.2147/DDDT.S319786.
- [8] Yu Y, Yao C, Guo D A. Insight into chemical basis of traditional Chinese medicine based on the state-of-the-art techniques of liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(6): 1469-92. doi:10.1016/j.apsb.2021.02.017.
- [9] 余慧林, 王建丰, 刘义, 等. TLR4/RhoA 信号通路调控连续血液滤过治疗引起脓毒症内皮细胞通透性变化的机制[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(7): 1159-64. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.07.016.
- [9] Yu H L, Wang J F, Liu Y, et al. Mechanism of TLR4/RhoA signaling pathway in endothelial cell permeability changes induced by continuous hemofiltration therapy in sepsis[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(7): 1159-64. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.07.016.

- [10] John S. Lessons learned from kidney dysfunction: preventing organ failure[J]. *Med Klin Intensivmed Notfmed*, 2020, 115(Suppl 1): 21-7. doi:10.1007/s00063-020-00659-2.
- [11] Hu W, Zhao J, Hu Y, et al. Huangqi Jiuni decoction prevents acute kidney injury induced by severe burns by inhibiting activation of the TNF/NF-κB pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 320: 117344. doi:10.1016/j.jep.2023.117344.
- [12] Nogales C, Mamdouh Z M, List M, et al. Network pharmacology: curing causal mechanisms instead of treating symptoms[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2022, 43(2): 136-50. doi:10.1016/j.tips.2021.11.004.

