

基于网络药理学和实验验证探讨血府逐瘀汤治疗特发性肺纤维化的作用机制

林 景¹, 莫俊俏¹, 宋 艳^{2*}, 周 欣², 黎咏嫦³

(1. 海南省第五人民医院, 海南 海口 570100; 2. 海南医学院, 海南 海口 571199; 3. 广西中医药大学, 广 西 南 宁 530000)

摘要: **目的** 基于网络药理学和动物实验研究血府逐瘀汤治疗特发性肺纤维化 (IPF) 的作用机制。**方法** 于 TCMSP 数据库筛选血府逐瘀汤的潜在活性成分和作用靶点, 并通过相关数据库分析 IPF 相关靶点, 两者取交集后获得血府逐瘀汤治疗 IPF 的关键靶点; 通过 STRING 平台和 Cytoscape 软件构建血府逐瘀汤潜在活性成分-靶点调控网络和蛋白互作网络, 并对网络进行拓扑分析, 获取血府逐瘀汤治疗 IPF 的核心靶点; 对核心靶点进行功能富集分析, 预测血府逐瘀汤治疗 IPF 的作用机制。通过动物实验对网络药理学研究结果进行验证, 构建 IPF 大鼠模型, 进行 HE 和 Masson 染色, 采用 ELISA 法检测肺组织羟脯氨酸水平, 并对富集分析筛选出的相关信号通路中关键蛋白的表达进行分析。**结果** 共获取血府逐瘀汤治疗 IPF 的 158 个关键靶点, 拓扑分析后, 得到核心靶点 20 个, 主要富集于病毒感染相关通路。动物实验表明, 血府逐瘀汤能改善 IPF 大鼠肺泡炎症反应和纤维化程度, 并降低 Kaposi's 肉瘤相关疱疹病毒感染通路中关键蛋白 STAT3、ERK 和 TLR3 的表达。**结论** 血府逐瘀汤可能通过多成分、多靶点、多途径影响病毒感染相关信号通路, 发挥抗肺纤维化作用。

关键词: 血府逐瘀汤; 特发性肺纤维化; 网络药理学; 分子对接; STAT3; ERK; TLR3

中图分类号: R285. 5; R966 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2024)02-0658-08

doi: 10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2024. 02. 052

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种慢性、不可逆性肺间质纤维化疾病, 可引起肺组织结构改变和功能丧失, 最终导致患者死亡。IPF 的发病率约为 0. 22/100 000~17. 4/100 000 人^[1], 而患者中位生存期仅为 3~5 年^[2-3]。目前, IPF 的具体发病机制尚未完全明确, 但已证实, 病毒感染是导致 IPF 发病和病情进展的主要原因^[4]。现阶段可用于 IPF 临床治疗的手段非常有限, 目前经 FDA 批准可用于 IPF 治疗的药物仅有吡非尼酮和尼达尼布, 但只能延缓病情进展, 并不能阻止或逆转 IPF 的病理改变, 是一种姑息性治疗^[5]。因此, 深入研究 IPF 的发病机制, 探索有效的治疗药物, 对于 IPF 患者的临床治疗具有重要意义。

IPF 临床表现符合中医学“肺痹”等范畴, 血瘀和气虚是其主要病机为^[6]。血府逐瘀汤为中医经典名方, 具有活血化瘀、行气止痛之功效。已有研究表明, 采用血府逐瘀汤联合西药治疗 IPF 可取得较好的临床疗效^[7-8]。然而, 目前关于血府逐瘀汤治疗 IPF 的分子机制仅限于针对某一靶点或通路的动物或细胞实验研究, 缺乏系统、全面和多靶点作用机制的认识。本研究采用网络药理学方法预测血府逐瘀汤治疗 IPF 的分子作用机制, 并进一步通过动

物实验对其进行验证, 以期为今后的临床和基础实验提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 数据库和软件 本研究过程中所使用或涉及的数据库和软件详见表 1。其中, 软件运行于 Window10 64 位操作系统平台, 处理器为 Intel® Core™ i5-7500。本研究中使用的所有软件均以获得授权或为开源软件。

1.2 血府逐瘀汤潜在活性成分获取和作用靶点预测 血府逐瘀汤中桃仁、红花、当归、生地黄、牛膝、川芎、桔梗、赤芍、枳壳、甘草和柴胡 11 味中药的化学成分筛选主要通过 2 个途径: ①从 TCMSP 数据库查询上述中药的主要化学成分, 并根据药代动力学参数, 筛选口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) ≥30%, 且药物相似性 (drug-likeness, DL) ≥0. 18 的化学成分; ②以“血府逐瘀汤”和“Xuefu Zhuyu Decoction”作为关键词检索中国知网 (CNKI) 和美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 相关文献, 搜索并整理血府逐瘀汤水煎剂中相关活性成分。同时, 在 TCMSP 数据库中检索上述药物活性成分相应的作用靶点。

1.3 IPF 疾病相关靶点筛选 在 GeneCards、OMIM、PharmGkb、TTD 和 DrugBank 数据库中, 以“idiopathic

收稿日期: 2023-01-31
基金项目: 海南省自然科学基金项目高层次人才项目 (820RC645)
作者简介: 林 景 (1975—), 男, 硕士, 从事医院药事管理及医疗机构制剂研究。E-mail: linjing666777@ 163.com
* 通信作者: 宋 艳 (1982—), 女, 硕士, 从事中医与康养研究。E-mail: 83224978@ qq.com

表 1 数据库和软件

名称	功能	网址
Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology (TCMSP)	药物活性成分和潜在靶点预测	https://old.tcmssp-e.com/tcmssp.php
Uniprot	筛选药物作用靶点结构和功能	https://www.uniprot.org/
Protein Data Bank (PDB)	筛选药物作用靶点结构和功能	https://www.rcsb.org/
GeneCards	疾病相关靶点预测	https://www.genecards.org/
Online Mendelian Inheritance in Man(OMIM)	疾病相关靶点预测	https://www.omim.org/
Pharmacogenetics and Pharmacogenomics Knowledge Base(PharmGkb)	疾病相关靶点预测	https://www.pharmgkb.org/
Therapeutic Target Database (TTD)	疾病相关靶点预测	http://db.idrblab.net/ttd/
DrugBank	疾病相关靶点预测	https://go.drugbank.com/
STRING	药物-疾病靶点蛋白互作网络构建	https://cn.string-db.org/
PubChem	确定药物活性成分的二维化学结构	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov
R (version 4.1.3)	数据统计和可视化	https://www.r-project.org/
Cytoscape (version 3.9.0)	蛋白互作网络分析和可视化	https://cytoscape.org/
Chem3d (version14.0.0.117)	确定药物活性成分的三维化学结构	https://www.chemdraw.com.cn/
AutoDockTools (version 1.5.6)	分子对接	https://autodock.scripps.edu/
PyMOL (version 2.5)	分子对接	https://pymol.org/2/
Vina (version1.2.2)	分子对接	https://vina.scripps.edu/

pulmonary fibrosis”和“IPF”为检测词进行检索，取 5 个数据库的并集靶点作为 IPF 的疾病靶点。使用 R 软件“Venn”包对查询结果进行可视化处理。

1.4 血府逐瘀汤潜在活性成分-靶点调控网络及蛋白互作网络构建 将“1.2”项下筛选得到的血府逐瘀汤潜在活性成分作用靶点与“1.3”项下查询得到的 IPF 疾病靶点进行交集，获得血府逐瘀汤治疗 IPF 的关键靶点，并建立血府逐瘀汤潜在活性成分-靶点调控网络，同时将这些关键靶点导入 STRING 数据库中，选择物种“*Homo sapiens*”，将各节点置信度得分设置为 ≥ 0.9 ，同时删除游离节点，构建蛋白-蛋白质相互作用网络（PPI），并以“tsv”文件输出。

1.5 血府逐瘀汤治疗 IPF 关键靶点的拓扑分析 将“1.4”项下 STRING 数据库输出的“tsv”文件导入 Cytoscape 软件，通过 CytoNCA 插件计算各靶点 Betweenness、Closeness、Degree、Eigenvector、LAC 和 Network 6 个拓扑性质参数及其中心位值，以 6 个拓扑性质参数均大于中心位值作为筛选条件建立子网络，再以相同的方法对子网络进行一次拓扑分析，得到核心网络和靶点。

1.6 GO 和 KEGG 分析 首先，使用 R 语言“org. Hs. eg.db”包将最终核心网络中的靶点基因名称转换为可识别的 entrez ID；然后，调用“clusterProfiler”包对关键靶点进行基因本体（GO）功能分析和京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集分析；最后，通过“ggplot2”和“enrichplot”包对分析结果进行可视化处理。

1.7 分子对接 对核心网络中的靶点按照 Degree 值（连接节点数）进行排序，将排名前 10 位的靶点在血府逐瘀汤化学成分-靶点调控网络中找出相对应的活性化学成分，进行分子对接，以验证药物作用的可能性。从 PDB 数据库获得关键靶点蛋白的三维结构，从 PubChem 数据库查询活性化学成分的三维结构，并通过 Chem3D 软件对化学结构的自由能进行优化。采用 AutoDockTools、PyMOL 和 Vina 软件进行分子对接。

1.8 实验验证

1.8.1 实验动物 60 只 6~8 周龄无特定病原体级雄性 SD 大鼠，由广西医科大学实验中心提供，体质量（ 253.18 ± 5.37 ）g，实验动物使用许可证号 SYXK（桂）2020-0004，实验动物生产许可证号 SCXK（桂）2020-0003。实验过程中予以自由食水，保持环境温度（ 21 ± 2 ）℃，相对湿度 50%~60%，昼夜明暗交替 12 h。本研究动物实验过程经广西中医药大学实验动物福利伦理委员会审查通过（伦理号 2110002）。

1.8.2 药物、试剂和仪器 血府逐瘀汤中的 11 种中药材（桃仁、红花、当归、生地黄、牛膝、川芎、桔梗、赤芍、枳壳、甘草和柴胡）均由广西中医药大学第一附属医院提供。博来霉素（瀚晖制药有限公司，批号 210367）；吡非尼酮（北京凯因科技股份有限公司，批号 211109）；多聚甲醛溶液、Masson 三色染色试剂盒、苏木素伊红染色试剂盒（南京森贝伽生物科技有限公司，批号 2012664、2109321、2101339）；羟脯氨酸 ELISA 检测试剂盒（上海研尊生物科技有限公司，批号 19112589）；磷酸化信号转导和转录激活因子 3 抗体（STAT3）、磷酸化丝裂原活化蛋白激酶（ERK）抗体、Toll 样受体 3（TLR3）抗体（上海雅吉生物科技有限公司，批号 2011339、2009653、2112554）；RIPA 裂解液、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、5%脱脂奶粉（北京伊塔生物科技有限公司，批号 2109338、2110275、21114458）。全波长酶标仪（南京德铁实验设备有限公司）；蛋白质印迹分子成像系统（美国 Azure Biosystems 公司）；冰冻切片机（深圳市瑞沃德生命科技有限公司）。

1.8.3 血府逐瘀汤水煎液制备 血府逐瘀汤由桃仁 12 g，红花、当归、生地黄、牛膝各 9 g，川芎、桔梗各 4.5 g，赤芍、枳壳、甘草各 6 g，柴胡 3 g 组成。将上述 75 g 药材加 0.9 L 水浸泡 30 min，武火煮沸后文火煎煮 1 h，过滤药液，药渣加清水 0.75 L，武火煮沸后继续文火煎煮 1 h，过滤药液，将 2 次煎煮药液混合、过滤，并减压浓缩为生药

量 9.0 g/mL 的水煎液^[9]。

1.8.4 分组、造模与给药 将 60 只大鼠适应性饲养 3 d，按照体质量随机分为正常组、模型组、吡非尼酮组和血府逐瘀汤低、中、高剂量组，每组 10 只。除正常组外，其余各组采用多次雾化吸入博来霉素法造模，具体方法为博来霉素（60 g/L）吸入 30 min，连续 3 d^[10]。造模后次日，正常组和模型组给予以 0.9% 氯化钠注射液灌胃；吡非尼酮组给予吡非尼酮 50 mg/kg 灌胃，每天 2 次；血府逐瘀汤低、中、高剂量组剂量参考 Meng 等^[9] 研究，分别给予 3.9、7.8、15.6 g/kg 血府逐瘀汤水煎液进行灌胃，每天 1 次，持续给药 21 d。于末次灌胃 3 h 后以颈椎离断法处死大鼠，取所有大鼠右肺下叶于 4% 多聚甲醛固定液中固定，其余肺组织经液氮快速冷冻，置于 -80 ℃ 超低温冰箱保存备用。

1.8.5 组织病理学检测 取固定于 4% 多聚甲醛中的大鼠肺下叶组织，常规脱色和石蜡包埋，纯净水冲洗过夜，并由梯度乙醇脱水，经二甲苯透明，浸蜡、包埋，于 4 ℃ 冰箱保存过夜，取出包埋组织以 5 μm 厚度切片，具体染色步骤按照试剂盒说明书进行，染色结束后中性树胶封片，于光学显微镜下观察 HE 染色的肺泡炎症反应程度及 Masson 染色的胶原增殖情况，并参考 Szapiel 等^[11] 研究，对 HE 和 Masson 染色结果进行半定量评分。具体方法为根据肺组织肺泡充血、出血、粒细胞浸润聚集或肺泡间隔增厚等情况对 HE 染色结果进行评分，以评价肺组织的炎性反应程度；同时根据肺组织蓝色胶原沉积情况对 Masson 染色结果进行评分，评分均为 0~5 分，其中 0 分代表正常，1~5 分分别定义为每 1 个高倍视野下炎症病变或蓝色胶原沉积范围 ≤ 10%、10%~30%、30%~50%、50%~80%、>80%。

1.8.6 羟脯氨酸水平检测 采用酶联免疫吸附法对大鼠肺组织的羟脯氨酸水平进行检测，检测试剂盒由深圳子科生物科技有限公司提供，具体步骤为称取大鼠肺组织 30 mg，以匀浆器将其充分匀浆，3 000 r/min 离心 20 min，收集上

清液，同时配制不同浓度标准品用于绘制标准曲线。将标准液和待测样品置于羟脯氨酸酶标板中，上机后先后加入试剂盒中的抗体工作液、底物工作液和终止液，并在 450 nm 波长处检测吸光度，根据标准曲线计算羟脯氨酸水平。

1.8.7 蛋白质免疫印迹法检测 STAT3、ERK 和 TLR3 蛋白表达 取适量肺组织于冰上剪碎后加入 RIPA 裂解液进行裂解，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液，采用 BCA 法对蛋白质进行定量。将制得的蛋白质样品按照每孔上样量为 40 μg 进行蛋白质凝胶电泳实验，转膜后以 5% 脱脂奶粉溶液封闭 2 h，洗膜后，根据说明书加入目的蛋白一抗和内参 GAPDH 一抗，4 ℃ 孵育过夜，再次洗膜后，加入 HRP 标记的二抗，37 ℃ 孵育 1 h。通过 ECL 高敏发光液进行显影，胶片曝光，采用凝胶成像系统分析目的蛋白和内参 GAPDH 蛋白灰度值的比值，以该比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.8.8 统计学分析 通过 SPSS 软件进行处理，计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血府逐瘀汤治疗 IPF 的关键靶点分析 查询 TCMSP 数据库，检索出符合筛选标准的血府逐瘀汤 11 味中药潜在活性成分共计 197 种。通过检索 CNKI 和 NCBI 数据库，检索到 4 篇血府逐瘀汤活性成分的文献研究^[12-14]，共得到 54 种活性成分。将 2 种检索方式得到的血府逐瘀汤活性成分进行合并，删除重复成分后，共计得到血府逐瘀汤活性化学成分 237 种，相应作用靶点 236 个。

从 GeneCards、OMIM、PharmGkb、TTD 和 DrugBank 数据库检索 IPF 疾病相关靶点共计 3 395 个（图 1A），与血府逐瘀汤各味中药潜在活性成分对应的 236 个作用靶点取交集后，共获得 175 个关键靶点（图 1B）。

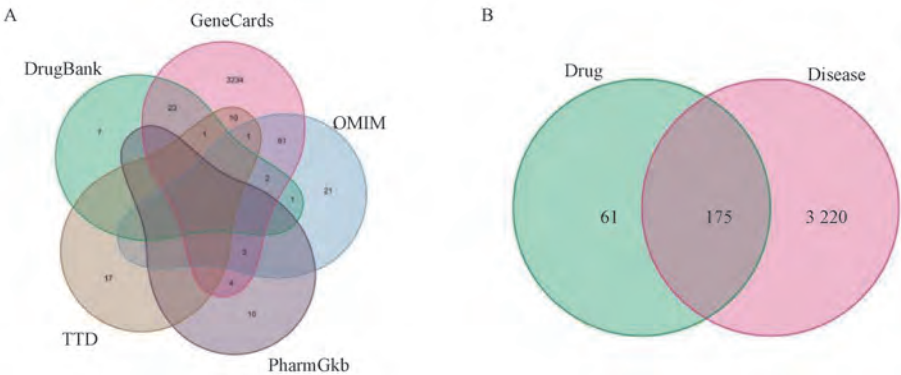
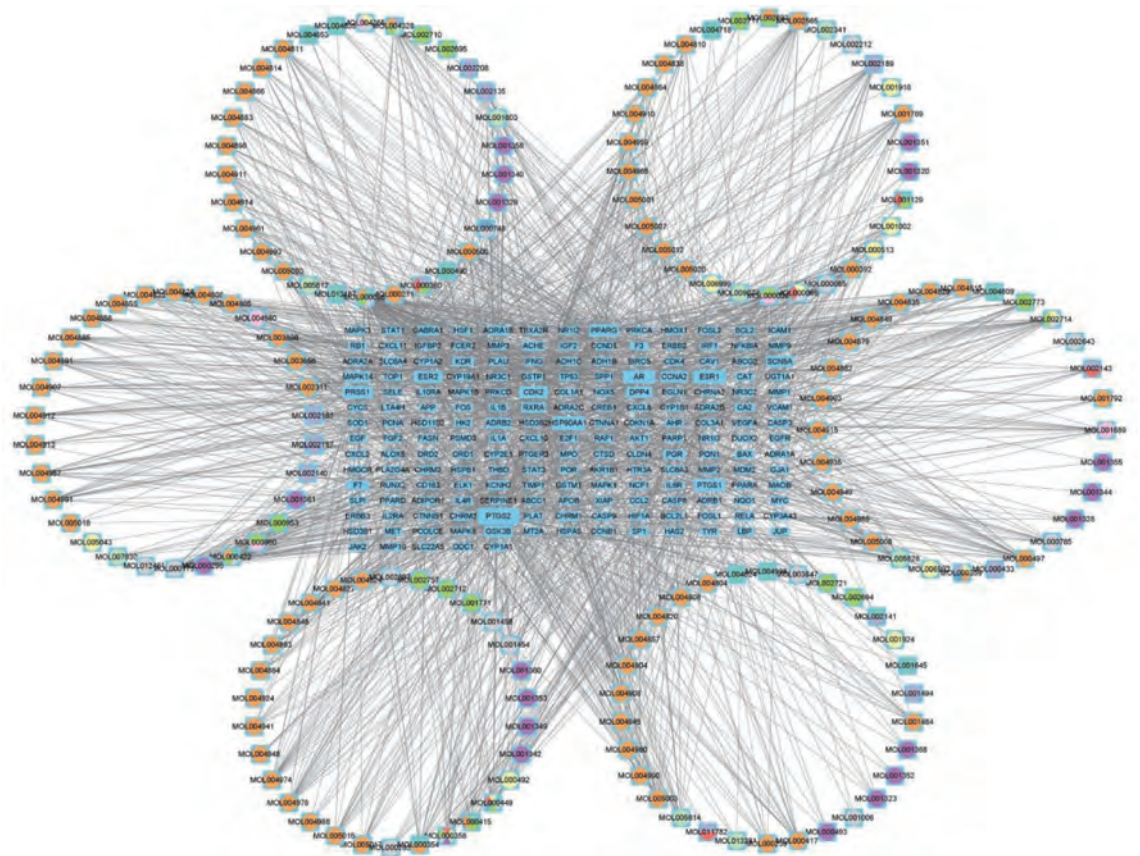


图 1 IPF 疾病相关靶点 (A) 和血府逐瘀汤治疗 IPF 的关键靶点 (B) 预测

2.2 血府逐瘀汤潜在活性成分-靶点调控网络模型构建 将 175 个关键靶点通过 Cytoscape 软件建立血府逐瘀汤潜在活性成分-靶点调控网络。由图 2 可知，血府逐瘀汤中化学成分槲皮素 (MOL000098) 作用的靶点最多，共计 110 个，其次为木犀草素 (MOL000006) 和山柰酚 (MOL000422) 分别有

42、38 个。而在交集靶点中，受到血府逐瘀汤中化学成分作用最多的靶点为 PTGS2，共计有 127 种化学成分可作用于该靶点，其次为 ESR1 和 HSP90AA1，分别有 90、86 个。

2.3 血府逐瘀汤治疗 IPF 核心靶点的筛选 基于关键靶点在 STRING 数据库建立 PPI 网络，于 Cytoscape 软件中导出



注：活性成分中代表来源于柴胡，代表来源于赤芍，代表来源于川芎，代表来源于当归，代表来源于熟地黄，代表来源于甘草，代表来源于红花，代表来源于桔梗，代表来源于牛膝，代表来源于桃仁，代表来源于枳壳。

图 2 血府逐瘀汤化潜在活性成分-靶点调控网络

网络图（图 3A），使用 Cyto NCA 插件计算各靶点的 Betweenness、Closeness、Degree、Eigenvector、LAC、Network 的中位值分别为 55.20、0.09、12.00、0.03、4.00、5.04，得到所有参数值均大于中位值的靶点共计 46 个，并建

立子网络（图 3B）；再次计算子网络各靶点的上述拓扑性质参数中位值分别为 16.50、0.56、24.00、0.13、11.11、12.24，得到所有参数值均大于中位值的靶点共计 20 个，以该 20 个靶点作为核心靶点并建立核心网络（图 3C）。

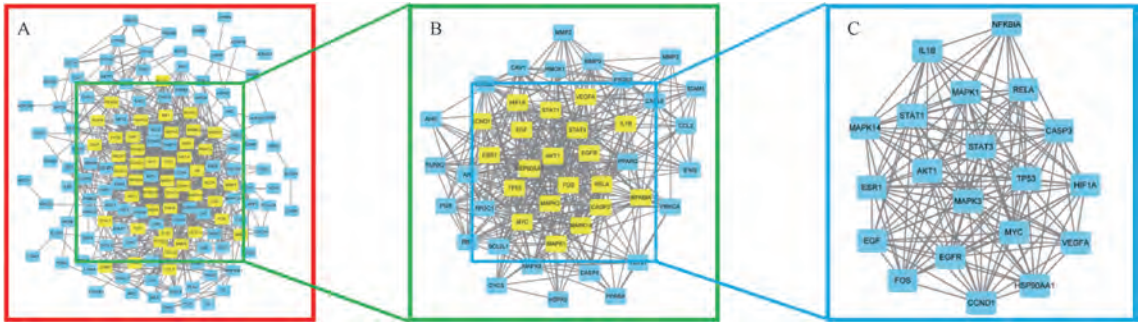


图 3 血府逐瘀汤治疗 IPF 核心靶点的筛选

2.4 GO 和 KEGG 通路分析 将核心网络中的 20 个靶点进行 GO [包括分子生物学过程（biological process, BP）、分子功能（molecular function, MF）及细胞成分（cellular component, CC）] 和 KEGG 通路富集分析，以 $P<0.05$ 为筛选标准，并以升序进行排列，分别取前 10 和 30 位进行分析。GO 富集分析表明，在生物学进程、分子功能和细胞

成分上，核心靶点基因主要富集于 DNA-结合转录因子活性的调控（regulation of DNA-binding transcription factor activity）、磷酸酶结合（phosphatase binding）和囊泡腔（vesicle lumen）上（图 4A）。KEGG 富集分析表明，在 20 个核心靶点基因中，有 15 个基因富集于 Kaposi’s 肉瘤相关疱疹病毒感染（Kaposi sarcoma-associated herpes virus

infection) 通路,是富集最多的通路,其次分别为人类巨细胞病毒感染 (human cytomegalovirus infection) 和丙型肝炎病毒 (hepatitis C) 通路,分别有 14 和 13 个核心靶点基因富集 (图 4B)。

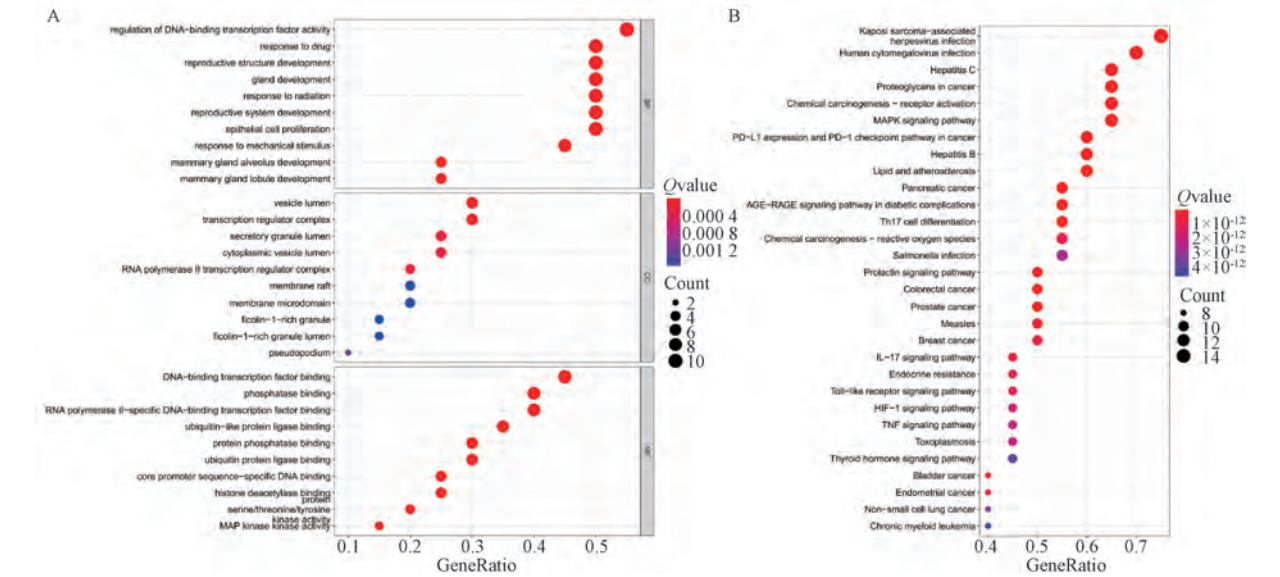


图 4 血府逐瘀汤治疗 IPF 关键靶点的 GO (A) 和 KEGG 通路 (B) 富集分析

2.5 分子对接 将核心靶点按照 Degree 值进行排名,取排名前 10 位的靶点与相应的血府逐瘀汤化学成分进行分子对接。表 2 为靶点蛋白与潜在活性成分对接结果,由此可知,各靶点蛋白与血府逐瘀汤中潜在活性成分的最低结合能均

小于-5.0 kcal/mol。经可视化处理后发现,上述靶点和活性化学成分可自发结合,并可借助氢键等分子间作用力形成较为稳定的构象,见图 5。

表 2 部分核心靶点蛋白与血府逐瘀汤潜在活性成分的分子对接结果

关键靶点	PDB ID	化合物	中文名称	PubChem CID	分子结合能/(kcal·mol ⁻¹)
STAT3	5AX3	licochalcone a	甘草查尔酮 A	5318998	-7.5
MAPK3	2ZOQ	naringenin	柚皮素	439246	-8.1
AKT1	7NH5	quercetin	槲皮素	5280343	-10.4
TP53	1GZH	quercetin	槲皮素	5280343	-7.3
EGFR	livo	luteolin	木犀草素	5280445	-8.3
HSP90AA1	7LT0	isorhamnetin	异鼠李素	5281654	-9.1
RELA	1NFI	isorhamnetin	异鼠李素	5281654	-8.4
MAPK1	7E75	quercetin	槲皮素	5280343	-7.5
EGF	1APQ	quercetin	槲皮素	5280343	-8.0
CASP3	5IC4	acacetin	金合欢素	5280442	-7.8

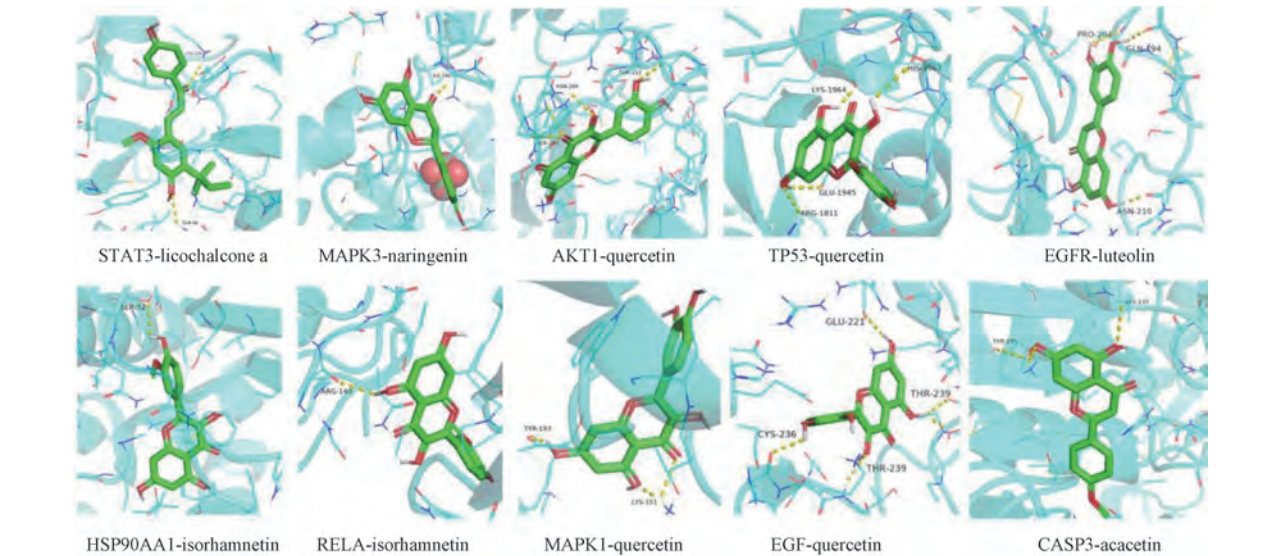


图 5 分子对接模式示意图

2.6 血府逐瘀汤对 IPF 大鼠肺组织肺泡炎症和纤维化程度的影响 由图 6、表 3 可知,与正常组比较,模型组大鼠肺泡中出现大量炎性细胞浸润和蓝色胶原沉积,且 HE 和 Masson 染色评分均升高 ($P<0.01$);与模型组比较,吡非尼酮组和血府逐瘀汤各剂量组大鼠肺泡炎性细胞浸润程度缓解,蓝色胶原沉积减少,且 HE 和 Masson 染色评分均降

低 ($P<0.01$)。

羟脯氨酸为胶原蛋白中的特有成分,是目前用于评价肺组织纤维程度的重要指标^[15]。由图 7 可知,与正常组比较,模型组大鼠肺组织羟脯氨酸水平升高 ($P<0.01$);与模型组比较,吡非尼酮组和血府逐瘀汤高剂量组大鼠肺组织羟脯氨酸水平降低 ($P<0.01$)。

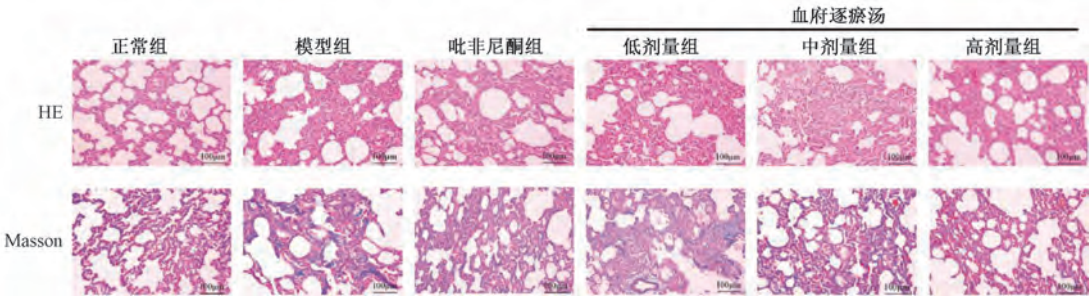
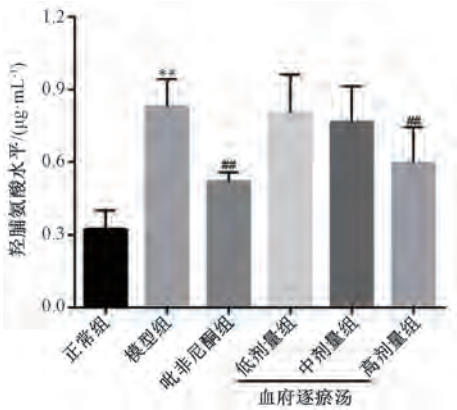


图 6 各组大鼠肺组织 HE 和 Masson 染色 (×400)

表 3 各组大鼠 HE 和 Masson 染色评分比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	HE 染色评分/分	Masson 染色评分/分
正常组	—	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	—	3.61±0.51 **	3.60±0.60 **
吡非尼酮组	0.05	2.23±0.28 ##	2.35±0.35 ##
血府逐瘀汤低剂量组	3.9	2.50±0.48 ##	2.41±0.62 ##
血府逐瘀汤中剂量组	7.8	1.88±0.45 ##	2.00±0.43 ##
血府逐瘀汤高剂量组	15.6	1.72±0.34 ##	1.55±0.19 ##

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。



注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

图 7 血府逐瘀汤对大鼠肺组织羟脯氨酸水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

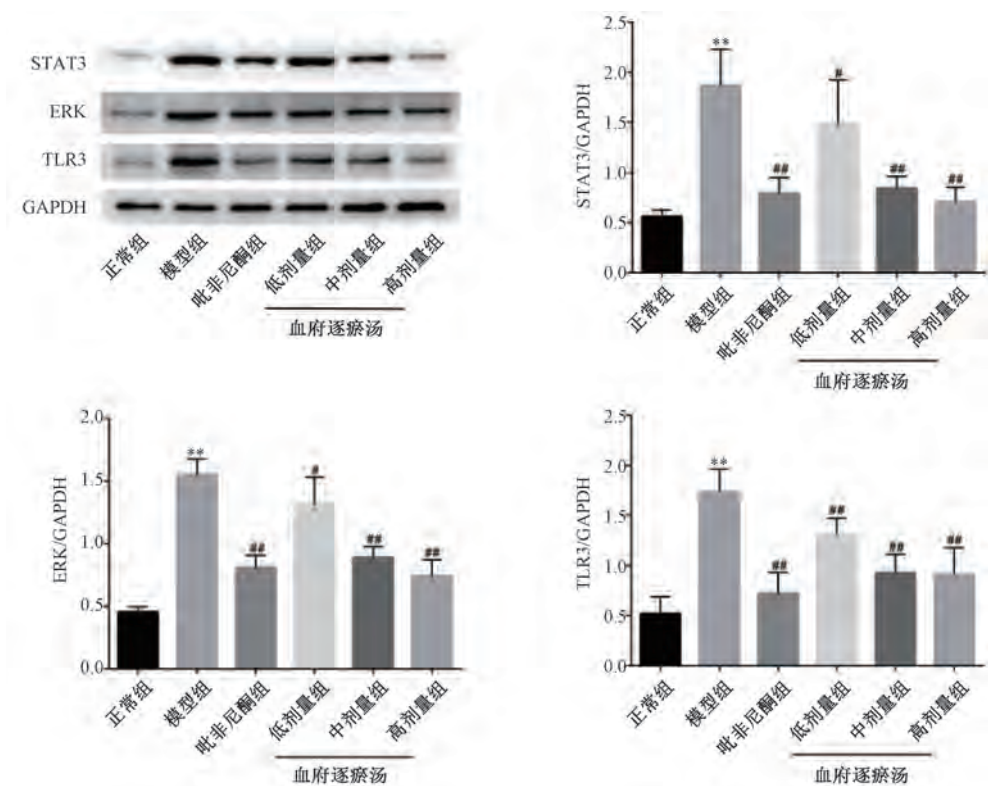
2.7 血府逐瘀汤对 IPF 大鼠肺组织 Kaposi’s 肉瘤相关疱疹病毒感染信号通路中关键蛋白表达的影响 由图 8 可知,与正常组比较,模型组大鼠肺组织 STAT3、ERK 和 TLR3 蛋白表达升高 ($P<0.01$);与模型组比较,吡非尼酮组和血府逐瘀汤各剂量组大鼠肺组织 STAT3、ERK 和 TLR3 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

3 讨论

通过网络药理学分析,本研究共获得血府逐瘀汤治疗 IPF 的 175 个关键靶点。由活性成分-靶点调控网络模型可

知,作用于 IPF 靶点的主要活性成分为槲皮素和木犀草素,提示上述化合物可能在血府逐瘀汤抗肺纤维化的过程中发挥重要作用。研究发现,成纤维细胞衰老是 IPF 的主要分子机制,而槲皮素可以通过上调 FasL 和 caveolin-1 表达,抑制 Akt 活化,增强成纤维细胞衰老和凋亡的抵抗力,从而阻止 IPF 病理进展^[16-17]。此外,还有研究认为,槲皮素和木犀草素发挥抗肺纤维作用可能与抑制 SphK1/S1P 信号传导^[18]和成纤维细胞中 TGF- β 1 诱导的 Smad3 磷酸化有关^[16]。本研究进一步建立 PPI 互作网络,并经拓扑分析获得核心靶点 20 个。富集分析显示,核心靶点富集最多的通路为疱疹病毒感染、丙型肝炎病毒感染和人类巨细胞病毒感染方面,提示血府逐瘀汤很可能是通过影响上述信号转导通路发挥治疗 IPF 的作用。

已有证据表明,病毒感染是 IPF 的发病和急性加重的重要风险因素,尤其是持续性和慢性感染病毒如疱疹病毒和人类巨细胞病毒等可显著增加 IPF 发病风险^[19]。其中以疱疹病毒与 IPF 发病的相关性最受关注。研究发现,96% 的 IPF 患者肺中疱疹病毒 DNA 检测呈阳性,且可从肺泡上皮细胞发现疱疹病毒的潜伏证据^[20]。此外,疱疹病毒感染可能还参与了 IPF 的急性加重过程。Saraya 等^[21]研究发现,疱疹病毒可增加 IPF 患者急性加重风险,增加患者的短期死亡率。本研究进一步对 KEGG 富集得到的疱疹病毒感染、丙型肝炎病毒感染和人类巨细胞病毒感染通路中的关键靶点进行分析发现,在上述通路中均包含了 STAT3 蛋白。



注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图 8 血府逐瘀汤对大鼠肺组织 STAT3、ERK 和 TLR3 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

STAT3 是一种细胞质转录因子，在腺病毒介导的肺损伤中发挥重要作用^[22]，也是促进成纤维细胞衰老的重要因子^[23]。Prêle 等^[24]在 2012 年即提出 STAT3 蛋白表达异常可能是肺组织纤维化的核心致病机制。

本研究分子对接结果表明，获得的核心靶点可以与活性成分形成较为稳定的构象，这进一步验证了血府逐瘀汤对 IPF 治疗作用的药效物质基础。动物实验发现，血府逐瘀汤可明显缓解 IPF 大鼠肺泡内炎性细胞浸润程度，减少蓝色胶原纤维沉积，同时降低肺组织羟脯氨酸水平，这提示血府逐瘀汤可改善 IPF 大鼠肺组织纤维化的病理情况。

Kaposi’s 肉瘤相关疱疹病毒感染信号通路是本研究中核心靶点富集率最高的通路。通过检索 KEGG 数据库可知，该通路主要涉及 MAPK、JAK-STAT 和 Toll 样受体信号通路等。其中，ERK、STAT3 和 TLR3 分别是上述 3 个通路中的关键蛋白之一。既往研究发现，MAPK 信号通路与成纤维细胞的激活和增殖有关，而 ERK 则是该通路的重要调节蛋白^[25]。Liu 等^[26]在关于 IPF 的动物实验中，将 ERK 作为主要目标蛋白进行分析。此外，Toll 样受体信号通路与 IPF 的相关性已经得到证实^[27]。其中，Toll 样受体 3 (TLR3) 作为该通路中的关键调节蛋白，激活后可加强纤维增殖反应，并可引起 IPF 大鼠肺功能下降，增加死亡风险^[28]。因此，本研究将 ERK、TLR3 和 STAT3 作为目标蛋白，分析血府逐瘀汤治疗 IPF 的主要机制。结果发现，血府逐瘀汤各剂量组 STAT3、ERK 和 TLR3 蛋白表达低于模型组，且血府逐瘀汤高剂量组与吡非尼酮组较为接近，提示血府逐瘀汤可通

过抑制 Kaposi’s 肉瘤相关疱疹病毒感染通路中 STAT3、ERK 和 TLR3 蛋白表达发挥抗 IPF 的作用。

综上所述，本研究基于网络药理学和分子对接技术对血府逐瘀汤多成分、多靶点、多途径治疗 IPF 的作用机制进行分析，并在此基础上进行了动物实验论证。结果表明，血府逐瘀汤可能通过疱疹病毒感染、丙型肝炎病毒感染和人类巨细胞病毒感染等信号通路发挥其抗纤维化的作用。

参考文献：

[1] Wakwaya Y, Brown K K. Idiopathic pulmonary fibrosis: Epidemiology, diagnosis and outcomes [J]. *Am J Med Sci*, 2019, 357(5): 359-369.

[2] Raghu G, Chen S Y, Yeh W S, *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis in US medicare beneficiaries aged 65 years and older: incidence, prevalence, and survival, 2001-11 [J]. *Lancet Respir Med*, 2014, 2(7): 566-572.

[3] Nathan S D, Shlobin O A, Weir N, *et al.* Long-term course and prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis in the new millennium [J]. *Chest*, 2011, 140(1): 221-229.

[4] Huang W J, Tang X X. Virus infection induced pulmonary fibrosis [J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 496.

[5] Spagnolo P, Kropski J A, Jones M G, *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis: Disease mechanisms and drug development [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 222: 107798.

[6] 张 珊, 马 君. 从气虚络瘀论特发性肺纤维化自噬机制 [J]. *安徽中医药大学学报*, 2020, 39(6): 7-10.

[7] 袁 杰, 颜 武, 王 欣, 等. 血府逐瘀汤联合 N-乙酰半胱氨酸抑制特发性肺纤维化进展的有效性和安全性分析 [J]. 天津中医药大学学报, 2020, 39(1): 55-58.

[8] 王 敏. 血府逐瘀汤联合西药治疗肺间质纤维化疗效研究 [J]. 陕西中医, 2019, 40(7): 893-895.

[9] Meng F, Lai H, Luo Z, *et al.* Effect of Xuefu Zhuyu Decoction pretreatment on myocardium in sepsis rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 2939307.

[10] 王 鹤, 张广平, 侯红平, 等. 博来霉素不同给药方式致大鼠肺纤维化模型探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(11): 73-79.

[11] Szapiel S V, Elson N A, Fulmer J D, *et al.* Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120(4): 893-899.

[12] Fu C, Xia Z, Liu Y, *et al.* Qualitative analysis of major constituents from Xue Fu Zhu Yu Decoction using ultra high performance liquid chromatography with hybrid ion trap time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2016, 39 (17): 3457-3468.

[13] Zhang L, Zhu L, Wang Y, *et al.* Characterization and quantification of major constituents of Xue Fu Zhu Yu by UPLC-DAD-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 62: 203-209.

[14] Zhang H J, Cheng Y Y. An HPLC/MS method for identifying major constituents in the hypocholesterolemic extracts of Chinese medicine formula ‘Xue-Fu-Zhu-Yu decoction’ [J]. *Biomed Chromatogr*, 2006, 20(8): 821-826.

[15] 王 璇, 徐 泳, 罗子宸, 等. 基于网络药理学探索桔梗治疗肺纤维化的作用机制 [J]. 药学报, 2021, 56(11): 2957-2967.

[16] Chen C Y, Peng W H, Wu L C, *et al.* Luteolin ameliorates experimental lung fibrosis both *in vivo* and *in vitro*: implications for therapy of lung fibrosis [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58 (22): 11653-11661.

[17] Hohmann M S, Habel D M, Coelho A L, *et al.* Quercetin enhances ligand-induced apoptosis in senescent idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts and reduces lung fibrosis *in vivo* [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019, 60(1): 28-40.

[18] Zhang X, Cai Y, Zhang W, *et al.* Quercetin ameliorates pulmonary fibrosis by inhibiting SphK1/S1P signaling [J]. *Biochem Cell Biol*, 2018, 96(6): 742-751.

[19] Sheng G, Chen P, Wei Y, *et al.* Viral infection increases the risk of idiopathic pulmonary fibrosis: A meta-analysis [J]. *Chest*, 2020, 157(5): 1175-1187.

[20] Tsukamoto K, Hayakawa H, Sato A, *et al.* Involvement of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 in disease progression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Thorax*, 2000, 55(11): 958-961.

[21] Saraya T, Kimura H, Kurai D, *et al.* Clinical significance of respiratory virus detection in patients with acute exacerbation of interstitial lung diseases [J]. *Respir Med*, 2018, 136: 88-92.

[22] Matsuzaki Y, Xu Y, Ikegami M, *et al.* Stat3 is required for cytoprotection of the respiratory epithelium during adenoviral infection [J]. *J Immunol*, 2006, 177(1): 527-537.

[23] Waters D W, Blokland K E C, Pathinayake P S, *et al.* STAT3 regulates the onset of oxidant-induced senescence in lung fibroblasts [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019, 61 (1): 61-73.

[24] Prêle C M, Yao E, O’Donoghue R J, *et al.* STAT3: a central mediator of pulmonary fibrosis? [J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2012, 9(3): 177-182.

[25] Guo H, Jian Z, Liu H, *et al.* TGF-β1-induced EMT activation *via* both Smad-dependent and MAPK signaling pathways in Cu-induced pulmonary fibrosis [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2021, 418: 115500.

[26] Liu H, Zhang X, Shao Y, *et al.* Danshensu alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhibiting lung fibroblast-to-myofibroblast transition *via* the MEK/ERK signaling pathway [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 3113-3124.

[27] Waters D W, Blokland K E C, Pathinayake P S, *et al.* Fibroblast senescence in the pathology of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2018, 315 (2): L162-L172.

[28] O’Dwyer D N, Armstrong M E, Trujillo G, *et al.* The Toll-like receptor 3 L412F polymorphism and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 188(12): 1442-1450.