

基于转录组数据解析麻杏石甘汤治疗肺炎的多尺度作用机制

李鹏^{1*}, 张元媛¹, 张浩然¹, 詹灵敏¹, 张武霞¹, 白辰², 陈建新²

(1. 山西农业大学基础部, 中兽医现代化山西省重点实验室, 山西 晋中 030801;

2. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029)

[摘要] 目的:肺炎是由细菌、病毒等病原体感染引起的肺泡、远端气道和肺间质的感染性炎症。麻杏石甘汤出自《伤寒论》,是治疗肺炎的经典名方,临床疗效显著,但其整体治病机制仍不明确。方法:该研究采用基于转录组数据的网络药理学方法从组织、细胞、病理过程、生物过程、信号通路及靶标6个尺度解析麻杏石甘汤治疗肺炎的整体作用机制。结果:在组织层面,麻杏石甘汤主要作用于肺炎病灶组织-肺脏及主要炎症免疫组织-血液和脾脏。细胞、病理过程和生物过程多层次分析提示麻杏石甘汤可通过逆转炎症免疫反应相关功能,同时改善肺炎引起的心肺血管损伤治疗肺炎。信号通路和靶点层面分析显示麻杏石甘汤调节炎症免疫反应通路如“Coronavirus disease/COVID-19”和“Toll-like receptor signaling pathway”,以及相关靶点如“MAPKAPK3”和“NRG1”。结论:该研究从分子到组织多层次出发揭示麻杏石甘汤主要通过调节炎症免疫反应及相关心肺血管损伤治疗肺炎。

[关键词] 转录组; 网络药理学; 麻杏石甘汤; 肺炎; 免疫反应

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)01-0082-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221417

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220913.1513.001.html>

[网络出版日期] 2022-09-14 10:49

Multi-scale Mechanisms of Mxing Shigantang in Treating Pneumonia Based on Transcriptomic Data

LI Peng^{1*}, ZHANG Yuanyuan¹, ZHANG Haoran¹, ZHAN Lingmin¹, ZHANG Wuxia¹, BAI Chen²,
CHEN Jianxin²

(1. Shanxi Key Lab for Modernization of Traditional Chinese Veterinary Medicine, College of Basic Sciences, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China;

2. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** Pneumonia is an infectious inflammation of the alveoli, distal airway, and interstitium caused by bacterial, viral, and other pathogens. Mxing Shigantang, originated from *Treatise On Cold Damage Diseases*, is a classic prescription for treating pneumonia, with significant clinical efficacy. However, its treatment mechanism is still elusive. **Method:** In that paper, the transcriptome-based multi-scale network pharmacology was used to reveal the overall pharmacological mechanism of Mxing Shigantang in treating pneumonia from six scales of tissue, cell, pathological process, biological process, signaling pathway, and target. **Result:** At the tissue level, Mxing Shigantang mainly acted on the focal tissue of pneumonia-lung and the main inflammatory immune tissues-blood and spleen. Analysis of cell, pathological process and

[收稿日期] 2022-06-30

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82274363);国家自然科学基金青年基金项目(81703945);山西省基础研究计划面上项目(202103021224129)

[通信作者] *李鹏,副教授,硕士生导师,从事中药治疗疾病机制研究,E-mail:lip@sxau.edu.cn

biological process suggested that Maxing Shigantang could treat pneumonia by reversing inflammatory and immune functions and improving cardiopulmonary and vascular injury caused by pneumonia. Analysis of signaling pathway and target showed that Maxing Shigantang regulated inflammatory immune response pathways such as "coronavirus disease-COVID-19" and "Toll-like receptor signaling pathway", and related targets such as "MAPKAPK3" and "NRG1". **Conclusion:** This paper, from molecular to tissue levels, indicated Maxing Shigantang treated pneumonia mainly by regulating inflammatory immune response and improving cardiopulmonary and vascular injury.

[Keywords] transcriptome; network pharmacology; Maxing Shigantang; pneumonia; immune response

肺炎是由细菌、病毒等病原体进入呼吸道诱发的肺部炎性疾病,可导致肺组织损伤。肺炎长期困扰人类健康,2003年的严重急性呼吸综合征和2012年的中东呼吸综合征都是由冠状病毒引起的肺炎,近年来,又爆发由冠状病毒引起的新型冠状病毒肺炎。在我国,中医药在应对感冒、肺炎等流行性疾病方面已有数千年的经验。在新型冠状病毒肺炎爆发后,中医药介入治疗取得显著的临床疗效,总有效率达90%以上^[1]。据统计,出自《伤寒论》的经典名方麻杏石甘汤是所有治疗方案中使用次数最多的方剂^[2]。麻杏石甘汤,由麻黄(9 g)、苦杏仁(9 g)、甘草(6 g)、石膏(18 g)4味中药熬制而成,方中麻黄辛温,宣肺平喘,用为君药;石膏辛寒,清泄肺热并制约麻黄之温,以防助热,用为臣药;苦杏仁苦温,宣利肺气,助麻黄以止咳平喘用为佐药;甘草甘平,调和诸药为使。四药配伍,具有辛凉宣泄,清肺平喘之功效,主治外感风邪,热壅肺证。现代药理研究表明,麻杏石甘汤具有抗病毒、调节免疫炎症、抑制肺损伤等特点^[3-4]。临床常用于感冒、上呼吸道感染、急性支气管炎、支气管肺炎、鼻窦炎等多种疾病^[5]。然而,由于中药复方的复杂性,其治病机制仍不明确。

中药复方以多成分、多靶点的方式发挥整体药效,采用常规提取-分离-鉴定方法可探索单个成分的药理药效,但难以从整体上揭示复方与机体作用的复杂性。近年来,网络药理学方法的提出为中药整体作用机制研究提供了有效工具^[6]。该方法将中药视为化学成分的组合,根据成分信息预测靶点,随后将靶点映射到生物信号通路、生物过程或疾病基因网络等生物网络中,以此构建中药成分-靶标-疾病网络,揭示中药治疗疾病的物质基础和作用机制。至今,网络药理学方法在中医药领域已得到大量应用^[7]。本团队前期结合文献挖掘和网络药理学方法,发现麻杏石甘汤可通过免疫炎症调节、肺功能改善等多种机制治疗肺炎,提示麻杏石甘汤治疗

肺炎的机制复杂性^[8-9]。然而,网络药理学质量参差不齐,网络药理学结果往往存在不一致的问题需要进行限制。更重要的是,中药治病过程必然涉及从分子到细胞到组织多层面复杂效应,当前仍缺乏从多尺度视角解析中药-机体复杂相互作用的研究思路和方法。

本研究提出了一种基于转录谱的多尺度网络药理学研究新模式(TMNP, <http://www.bcxnfz.top/TMNP>)^[10],该模式有2个关键步骤,首先建立从分子到组织不同层面的转录谱标签,如靶点基因、通路、生物过程、病理过程、细胞和组织,随后通过计算疾病/药物的转录谱标签和不同生物尺度转录谱标签的相关性。TMNP绕过中药化学成分的复杂性,直接从生物效应角度揭示中药治病的多尺度作用机制。本研究通过脂多糖诱导构建肺炎大鼠动物模型,麻杏石甘汤给药治疗后,通过RNA-seq高通量测序技术测定麻杏石甘汤治疗肺炎模型所诱导的转录谱数据,在此基础上,利用TMNP挖掘麻杏石甘汤和肺炎在组织、细胞、病理过程、生物过程、通路、靶标6个生物尺度上的关联,解析麻杏石甘汤治疗肺炎的整体药效机制。

1 材料

1.1 动物 动物模型采用SPF级、8~9周龄雄性SD大鼠体质量(110±10)g,购自斯贝福(北京)生物技术公司,合格证号SCXK(京)2016-0002。根据机构指南,实验动物在特定的无病原体条件下饲养。所有大鼠均置于12 h光/暗循环中饲养,自由获取水和食物。整个实验程序经北京中医药大学动物研究伦理委员会批准(BUCM-4-2019082701-3040),并按照美国国立卫生研究院《实验动物护理和使用指南》进行。

1.2 药品 生麻黄(产自中国河南省)、苦杏仁(产自中国河北省)、炙甘草(产自中国宁夏省)、生石膏(产自中国山西省),4种药材均购买自北京市顺义区大同路北京康仁堂药业有限公司,药材严格按照

中国食品药品监督管理局发布的《药品生产质量保证规范》要求进行质量控制,经北京中医药大学顾晓红教授鉴定均符合2020年版《中华人民共和国药典》要求。

1.3 试剂 脂多糖(德国默克公司,批号0000153963);RNeasy Mini提取试剂盒(德国Qiagen公司,批号74106)。

1.4 仪器 HiSeq™ 4000型高通量测序仪(美国Illumina公司)。

2 方法

2.1 麻杏石甘汤颗粒剂的制备 参考人民卫生出版社《方剂学》,称取麻黄9g、苦杏仁9g、甘草6g、石膏18g。采用煎煮法提取中药,提取后浓缩干燥成颗粒剂^[11]。

2.2 动物实验分组与模型构建 将30只大鼠随机分为3组,空白组、肺炎模型组、麻杏石甘汤组。肺炎模型组和麻杏石甘汤组给予0.5 g·L⁻¹脂多糖雾化干预,每日30 min,连续3 d,建立肺炎大鼠模型。3 d后,麻杏石甘汤组通过灌胃给药方式给予麻杏石甘汤颗粒剂治疗,每日1次,连续3 d,给药剂量为2.2 g·kg⁻¹,给药剂量根据临床剂量人和大鼠等效剂量系数6.3折算。肺炎模型组和空白组给予等量生理盐水。给药后,大鼠自由饮水禁食12 h后处死,采集肺组织快速冷冻,保存在-80℃冰箱中。

2.3 RNA-seq测序和基因转录谱定量分析 从空白组、肺炎模型组、麻杏石甘汤组分别随机选取3个肺组织样本,采用RNeasy Mini提取试剂盒,提取总RNA,利用Oligo(dT)磁珠分离出mRNA,使用链特异性建库方式构建cDNA文库,然后在HiSeq™ 4000测序仪上进行末端测序,测序得到的fastq格式数据使用Salmon(1.5.2)软件直接进行转录本定量分析,得到基因count值,进行后续定量分析。通过方差稳定变换(VST)方法标准化基因count数据,随后可对标准化后的数据进行样相关性分析、聚类分析和主成分分析(PCA)。基于基因count数据,利用R语言DESeq2包(1.28.1)计算各组之间的基因表达差异谱,通过基因表达差异倍数和显著性筛选显著差异基因。

2.4 基于基因表达谱的多尺度网络药理学平台 基于基因表达谱的TMNP可从基因表达水平,解析中药/疾病在机体多尺度水平上的内在关联。TMNP包括基因标签的构建和中药-疾病多尺度关联计算2个模块。当前,TMNP为组织器官、细胞、病理过程、生物过程、信号通路和靶标6个生物尺度

构建了相应的基因标签集。

2.4.1 组织基因标签 从UCSC Xena数据库(<https://xenabrowser.net/datapages/>)下载组织表达数据集(GGTEX),该数据包含9 783个样本的RNA-seq数据,从中整理了31个有明确分类的组织,共7 845份组织特异性样本,每个样本包含13 247个基因的表达值。首先通过Z-score标准化方法计算每个样本基因表达值相对于所有样本均值的差异表达谱,随后按照基因的Z值从大到小排序,再通过Borda排序方法整合每个组织对应的所有样本,最终为31个组织建立了唯一表达谱标签集。

2.4.2 细胞基因标签 从Cellmarker数据库^[12](<http://bio-bigdata.hrbmu.edu.cn/CellMarker/>)中搜集整理了2 431个人类细胞的标志性基因,以每种细胞的标志基因作为核心基因,通过SEEK数据库^[13](<http://seek.princeton.edu/>)的基因共表达算法,在全基因组水平收集和细胞的标志基因显著共表达其他基因($P \leq 0.01$),针对每种细胞,其标志基因和显著共表达基因共同构成该细胞的特异性基因标签。

2.4.3 病理过程基因标签 《医学主题词表》(MeSH)是美国国家医学图书馆(NLM)编制的权威性主题词表(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>)。从MeSH收集整理了337个病理过程主题词,基于这些主题词,利用文本挖掘在PubMed文献数据库中,收集和病理过程显著相关的基因作为病理过程的标志基因,随后通过SEEK算法收集病理过程标志基因的显著共表达基因($P \leq 0.01$),最终建立337个病理过程的特异性基因标签集。

2.4.4 生物过程基因标签 基因本体(GO)数据库(<http://www.geneontology.org/>)将基因分为生物过程、细胞组分、分子功能3个类别。TMNP从GO数据库中下载了所有16 144个生物过程与相应的基因集合,最终整理得到5 864个生物过程,每个生物过程所对应的基因集合构成其基因标签。

2.4.5 通路基因标签 京都基因与基因组百科全书(KEGG,<https://www.kegg.jp/>)是一个系统分析基因功能、联系基因组信息和功能通路信息的数据库。从KEGG数据库收集345个人类通路注释和其基因集合,每个通路所对应的基因集合构成其基因标签集。

2.4.6 靶标基因标签 从Connectivity Map(CMap)数据库^[14](<https://clue.io/>)中收集了4 540个靶点及其对应的138 310个转录谱,这些转录谱来源于靶

点对应的化合物配体和 shRNA 所作用的细胞。结合 Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) 共表达分析和 Borda 排序方法, 合并每个靶点的基因表达谱, 作为该靶点的特异性效应谱, 至今已经为 3 275 个靶点建立了特异性基因标签。

2.4.7 中药-疾病多尺度关联计算 在已知药物和疾病诱导转录谱数据的基础上, TMNP 通过 GSEA 方法[7]计算药物/疾病和不同生物尺度基因标签集之间的关联。本研究中, 以麻杏石甘汤组与肺炎模型组比较的差异基因谱代表麻杏石甘汤诱导的表达谱数据, 以肺炎模型组与空白组比较的差异基因谱代表肺炎模型诱导的表达谱数据。首先将差异基因谱中所有大鼠基因名称转换成同源的人类基因名称; 随后对所有基因差异表达值从大到小排序, 最终得到能够反映麻杏石甘汤或肺炎模型生物效应的基因表达谱标签; 最后采用 TMNP 关联算法计算麻杏石甘汤/肺炎模型的表达谱标签和组织器官、细胞、病理过程、生物过程、信号通路和靶标基因标签集的关联分数(NCS)和错误发现率(FDR), 根据 NCS 和 FDR 值, 可定量描述麻杏石甘汤/肺炎模型对不同生物尺度的影响, 进而解析麻杏石甘汤从不同生物层次改善肺炎的作用机制。

2.5 不同生物层次关联网络的构建 通过肺炎模型组与麻杏石甘汤组的基因表达特征与 6 个生物尺度关联的结果, 选取显著关联结果(FDR \leq 0.05)构建麻杏石甘汤和肺炎模型在不同生物层次的关联网络, 网络通过 Cytoscape 3.8.2 软件进行可视化。

3 结果

3.1 转录组数据的定量分析 本研究首先对空白组、肺炎模型组、麻杏石甘汤组转录组数据进行整体分析。主成分分析和基因聚类分析的结果显示不同组别样本较好的分离开来, 麻杏石甘汤治疗组明显改善肺炎模型组的状态, 提示麻杏石甘汤对肺炎模型组具有一定的治疗效果。进一步分析不同分组间的差异表达基因, 以 $|\log FC| > 1$ 和 $P < 0.05$ 为阈值筛选各组差异基因, 结果显示肺炎模型组与空白组有 333 个差异表达基因, 麻杏石甘汤组与肺炎模型组有 88 个差异表达的基因。两组差异基因的比较显示, 经过麻杏石甘汤治疗, 肺炎模型所诱导的差异基因中, 52 个基因发生显著逆转。通路富集分析显示, 这 52 个差异基因显著富集到 8 个信号通路(FDR \leq 0.05), 包括 NOD-like receptor signaling pathway、Necroptosis 等免疫反应相关通路,

及 Hepatitis C、Herpes simplex infection、Measles、Influenza A、Epstein-Barr virus infection 等病原体感染相关通路, 表明麻杏石甘汤可通过抗病毒、调节免疫反应等作用发挥其治疗效果。

3.2 组织尺度的关联分析 基于肺炎模型和麻杏石甘汤治疗所诱导的差异基因谱, 利用 TMNP 关联算法计算了肺炎模型/麻杏石甘汤与 31 个人类组织的标准化关联分数(NCS)和 FDR。NCS 绝对值越大, 意味着药物/疾病对该组织的影响越大, 如果药物/疾病与某个组织的 NCS 值正负相反, 意味着两者对该组织的影响相反。结果显示, 肺炎模型(PM)与麻杏石甘汤(MXSGD)的作用分别与 23、12 个组织显著关联(FDR \leq 0.05), 在肺炎模型显著影响的 23 个组织中, 有 6 个组织经麻杏石甘汤治疗后显著逆转。进一步计算了两者在整体组织层面关联分数的皮尔逊相关性, 结果显示肺炎模型与麻杏石甘汤在组织层面具有较小的负相关性(Cor=-0.27), 这些结果可以很明显的在 NCS 热图中看出, 提示麻杏石甘汤的治疗效应在组织层面具有较强的特异性。

在麻杏石甘汤治疗肺炎模型所逆转的 6 个组织中, 血液 Blood 与肺炎模型的关联性最大(NCS=13.73), 并且麻杏石甘汤作用于血液治疗的效果也是最强的(NCS=-10.95), 其次为肺组织 Lung (PM NCS=5.76, MXSGD NCS=-6.42)、脾脏 Spleen (PM NCS=7.71, MXSGD NCS=-6.03)、唾液腺 Salivary Gland (PM NCS=5.40, MXSGD NCS=-4.49)、心脏 Heart (PM NCS=-5.31, MXSGD NCS=3.64)、脂肪组织 Adipose Tissue (PM NCS=-6.80, MXSGD NCS=3.16)。这些结果表明麻杏石甘汤治疗可以显著改善肺炎所影响的核心组织, 比如血液、脾脏和脾。

3.3 细胞尺度的关联分析 在细胞层面, 利用 TMNP 算法计算了肺炎模型/麻杏石甘汤与 2 431 个人类细胞基因标签的关联性。结果显示, 肺炎模型和麻杏石甘汤分别与 2 351 和 2 349 个细胞标签显著关联(FDR \leq 0.05), 在肺炎模型显著关联的 2 351 个细胞中, 通过麻杏石甘汤治疗显著逆转 1 903 个细胞(80.94%), 两者在细胞层面具有较强的负相关性(cor=-0.78), 表明麻杏石甘汤可以调节绝大部分肺炎影响的细胞。

为了进一步在细胞尺度分析麻杏石甘汤改善肺炎的具体特征, 重点关注麻杏石甘汤治疗肺炎模型后显著逆转的 1 903 种细胞。按照麻杏石甘汤 NCS 绝对值从大到小排序, 结果发现麻杏石甘汤

主要从2个方面治疗肺炎,①麻杏石甘汤逆转肺炎模型对炎性免疫细胞的影响,如“M1 Macrophage”(PM NCS=11.57, MXSGD NCS=-11.10)、“Monocyte”(PM NCS=11.56, MXSGD NCS=-10.51)、“Macrophage”(PM NCS=12.51, MXSGD NCS=-10.46)、“M2 Macrophage”(PM NCS=11.48, MXSGD NCS=-10.09)、“Classical monocyte”(PM NCS=11.42, MXSGD NCS=-10.02)、“Neutrophil”(PM NCS=11.73, MXSGD NCS=-9.87)、“Dendritic cell”(PM NCS=11.35, MXSGD NCS=-9.85)等。②麻杏石甘汤可改善肺炎模型对肺泡-毛细血管屏障相关细胞的破坏,如“Endothelial cell”(PM NCS=-12.09, MXSGD NCS=6.42)、“Pericyte”(PM NCS=-11.36, MXSGD NCS=6.30)、“Hemangioblast”(PM NCS=-11.90, MXSGD NCS=5.99)、“Endothelial progenitor cell”(PM NCS=-10.74, MXSGD NCS=5.85)、“Vascular endothelial cell”(PM NCS=-10.71, MXSGD NCS=5.81)等。另外,细胞尺度与组织尺度的结果具有明显的一致性,关联的细胞均与肺炎影响的核心组织紧密相关。提示麻杏石甘汤可通过调节炎症免疫反应和肺组织损伤两方面治疗肺炎。

3.4 病理过程尺度的关联分析 基于麻杏石甘汤和肺炎模型诱导的差异基因谱数据, TMNP计算了两者与337个病理过程基因标签的关联性。结果显示,肺炎模型与麻杏石甘汤分别显著关联到275和300个病理过程($FDR \leq 0.05$),两者比较显示麻杏石甘汤治疗可显著逆转与肺炎模型显著关联的275个病理过程中的160个病理过程。类似的,两者在整体病理尺度上呈现一定的负相关性($cor = -0.54$),体现了麻杏石甘汤在病理过程层面对肺炎模型的调节能力。

进一步深入分析了麻杏石甘汤治疗肺炎模型相关的160个病理过程,和细胞层面的分析结果类似,麻杏石甘汤主要从两个方面调节肺炎模型相关的病理过程发挥治病功效,一方面是炎症免疫相关病理过程如“Hemorrhagic Septicemia, Viral”(PM NCS=9.55, MXSGD NCS=-9.91)、“Serositis”(PM NCS=9.65, MXSGD NCS=-8.72)、“Granuloma, Giant Cell”(PM NCS=9.40, MXSGD NCS=-7.61)、“Granuloma, Plasma Cell”(PM NCS=7.96, MXSGD NCS=-7.57)、“Symptom Flare Up”(PM NCS=6.71, XSGD NCS=-6.17)、“Inflammation”(PM NCS=6.85, MXSGD NCS=-5.60)。另一方面是肺炎损伤

相关病理过程如“Carotid-Cavernous Sinus Fistula”(PM NCS=-7.98, MXSGD NCS=6.85)、“Visceral Prolapse”(PM NCS=-7.76, MXSGD NCS=6.79)、“Malacoplakia”(PM NCS=-7.01, MXSGD NCS=5.44)、“Leukoplakia, Hairy”(PM NCS=-7.00, MXSGD NCS=4.74)、“Microvascular Rarefaction”(PM NCS=-7.44, MXSGD NCS=4.38)、“Vascular Remodeling”(PM NCS=-6.71, MXSGD NCS=3.84)等,见增强出版附加材料。

3.5 生物过程尺度的关联分析 通过TMNP方法计算麻杏石甘汤/肺炎模型的转录谱与生物过程的关联性。结果显示肺炎模型与麻杏石甘汤分别与2399和1968个生物过程显著关联($FDR \leq 0.05$),两者比较显示麻杏石甘汤治疗可显著逆转与肺炎模型相关2399个生物过程中的775个(23.31%)生物过程,两者在生物过程层面具有较小的负相关性($cor = -0.24$)。

进一步分析麻杏石甘汤逆转肺炎模型相关的775个生物过程,发现与细胞、病理过程层面的结果类似,在生物过程层面,麻杏石甘汤同样可从两个方面改善肺炎,①调节炎症免疫反应相关生物过程如“Defense response to other organism”(PM NCS=9.10, MXSGD NCS=-9.08)、“Immune effector process”(PM NCS=9.42, MXSGD NCS=-7.70)、“Myeloid leukocyte activation”(PM NCS=9.47, MXSGD NCS=-6.56)、“Leukocyte activation involved in immune response”(PM NCS=9.37, MXSGD NCS=-6.49)、“cell activation involved in immune response”(PM NCS=9.22, MXSGD NCS=-6.39)、“Granulocyte activation”(PM NCS=8.87, MXSGD NCS=-5.40)、“Neutrophil activation involved in immune response”(PM NCS=9.00, MXSGD NCS=-5.17)等。②调节肺炎引起的心肺血管损伤相关生物过程如“Circulatory system development”(PM NCS=-8.05, MXSGD NCS=3.01)、“Cardiovascular system development”(PM NCS=-6.97, MXSGD NCS=2.98)、“Vasculature development”(PM NCS=-7.06, MXSGD NCS=2.90)、“Blood vessel development”(PM NCS=-7.30, MXSGD NCS=2.77)、“Blood vessel morphogenesis”(PM NCS=-7.08, MXSGD NCS=2.63)、“Angiogenesis”(PM NCS=-6.71, MXSGD NCS=2.44)等。

3.6 信号通路关联分析 在TMNP平台上,麻杏

石甘汤/肺炎模型与KEGG信号通路的关联计算结果显示,肺炎模型与麻杏石甘汤分别与158、160个信号通路显著关联($FDR \leq 0.05$),两者比较显示麻杏石甘汤治疗可以显著逆转与肺炎模型相关的65个(20.44%)通路。两者在通路尺度上具有较小的负相关性($cor = -0.2$)。

进一步分析麻杏石甘汤治疗肺炎相关的65个通路,按麻杏石甘汤NCS绝对值从大到小排序,结果显示麻杏石甘汤治病作用的发挥大多与炎症免疫反应通路相关,如麻杏石甘汤影响最大的通路是冠状病毒/COVID-19($PM\ NCS = 6.90$, $MXSGD\ NCS = -5.58$),实际上麻杏石甘汤是中药新型冠状病毒肺炎中所有方案中使用次数最多的方剂,前期研究也证明麻杏石甘汤可通过调节炎症通路治疗新冠肺炎^[11,15]。其他炎症通路包括NOD样受体信号通路($PM\ NCS = 3.49$, $MXSGD\ NCS = -4.01$)、系统性红斑狼疮($PM\ NCS = 4.28$, $MXSGD\ NCS = -3.74$)、Toll样受体信号通路($PM\ NCS = 3.80$, $MXSGD\ NCS = -3.04$)、吞噬体($PM\ NCS = 4.50$, $MXSGD\ NCS = -2.86$)等。另外,麻杏石甘汤也可以调节与肺组织炎症相关的经典通路如Rap1信号通路($PM\ NCS = -3.90$, $MXSGD\ NCS = 1.81$)、钙离子信号通路($PM\ NCS = -2.34$, $MXSGD\ NCS = 1.80$)、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路($PM\ NCS = -3.08$, $MXSGD\ NCS = 1.77$)。这些典型的信号通路均可以刺激相应的免疫细胞诱导免疫应答^[16-18]。

3.7 靶标尺度的关联分析 基于CMap转录组大数据, TMNP构建了3 275个靶标的特异性基因表达谱标签,利用关联算法计算了所有靶标表达谱标签和肺炎模型/麻杏石甘汤转录谱之间的关联性。结果显示肺炎模型与麻杏石甘汤分别与1 948和1 423个靶标显著关联($FDR \leq 0.05$),两者比较显示麻杏石甘汤可以显著逆转与肺炎模型显著关联的710个靶点(36.48%)。NCS值相关性计算结果表明两者在靶标尺度具有较小的相关性($cor = -0.36$)。

针对麻杏石甘汤治疗肺炎的710个相关靶标的具体分析显示,很多打分较高的靶标均具有炎症免疫应答作用,如丝裂原激活蛋白激酶3(MAPKAPK3)($PM\ NCS = -7.82$, $MXSGD\ NCS = 4.26$)、神经调节蛋白1(NRG1, $PM\ NCS = -6.05$, $MXSGD\ NCS = 3.96$)、淋巴毒素B受体(LTBR, $PM\ NCS = -6.02$, $MXSGD\ NCS = 2.57$)、人 γ 干扰素诱导蛋白(16IF116, $PM\ NCS = 6.40$, $MXSGD$

$NSC = -3.88$)、BNIP1($PM\ NCS = 6.03$, $MXSGD\ NCS = -2.44$)、白细胞介素(IL)12B($PM\ NCS = 4.41$, $MXSGD\ NCS = -3.25$)、MAPK14($PM\ NCS = -2.96$, $MXSGD\ NCS = 2.65$)等。为了更全面揭示麻杏石甘汤治疗肺炎相关靶点的功能通路机制,对这710个靶点进行基因富集分析,这些靶点显著富集到101个通路($FDR \leq 0.05$),其中大量通路参与炎症免疫反应,如TRP通道炎症介质调节、MAPK信号通路、叉头框蛋白O(FoxO)信号通路、两面神激酶(JAK)/信号转导及转录激活蛋白(STAT)信号通路、志贺氏菌病、百日咳等通路。靶标尺度上的结果进一步说明麻杏石甘汤可通过调节炎症免疫反应治疗肺炎。

4 讨论

麻杏石甘汤在肺炎治疗方面临床效果显著^[19-22]。在当前全球大流行的新型冠状病毒肺炎治疗中,麻杏石甘汤也是应用最广泛的中药方剂^[23]。然而目前对麻杏石甘汤作用机制的相关研究仍缺乏深入性和系统性,其主要原因在于中药成分的复杂性阻碍其整体作用机制的研究。

为了克服中药复杂性问题,本研究提出TMNP创新方法, TMNP利用基因表达谱代表中药/疾病生物学特征,避开中药化学成分复杂性,直接从分子到更高组织水平的不同生物学尺度评价中药的整体功效,体现了中医多途径、多层面的整体治疗理念。例如,前期利用TMNP方法发现中药血塞通可调节巨噬细胞功能治疗缺血型中风,与文献中实验研究结果相一致^[10]。本研究测定了麻杏石甘汤给药和肺炎模型所诱导的基因表达谱数据,利用TMNP方法计算麻杏石甘汤/肺炎模型和组织、细胞、病理过程、生物过程、信号通路、分子靶标6个生物尺度的关联性,解析麻杏石甘汤治疗肺炎的多尺度机制。结果发现,麻杏石甘汤主要通过逆转炎症免疫反应功能和改善心肺血管损伤两方面治疗肺炎。

从炎症免疫角度,在肺炎发生过程中,机体调动免疫系统对病原菌入侵作出反应,同时爆发的炎症反应会破坏正常组织细胞,导致肺部损伤。血液中含有白细胞、淋巴细胞、抗体等各种物质,针对外界的病原微生物的侵入,血液中白细胞和中性粒细胞数量增加、血小板数量减少^[24]。而麻杏石甘汤具有较强抗炎作用,可有效降低血液中相关炎症细胞数量^[8]。和文献结果一致, TMNP在组织层面的分析显示,肺炎模型对血液组织的影响最大($NCS =$

13.73),并且麻杏石甘汤在该组织的治疗效果也是最强的(NCS=-10.95)。脾脏是人体最大的淋巴器官,产生大量的淋巴细胞和单核细胞参与免疫应答反应,脾内巨噬细胞吞噬侵入的细菌、病毒等病原体^[25-26]。肺炎严重到一定程度,也会导致脾脏功能发生紊乱,甚至脾脏破裂^[27-28]。TMNP分析显示,肺炎模型中脾脏是除了血液外变化最大的组织(NCS=7.71),同时,麻杏石甘汤治疗显著逆转肺炎模型对脾脏的影响(NCS=-6.03)。类似的,细胞、病理过程和生物过程多层面分析提示麻杏石甘汤可通过逆转炎症免疫反应相关功能治疗肺炎。大量临床前和临床实验均证实,经麻杏石甘汤治疗的肺炎动物模型或病人,体内淋巴细胞、单核细胞等炎性免疫细胞及肿瘤坏死因子(TNF)、IL-6等相关炎症因子均显著减少^[29-30]。动物实验表明,麻杏石甘汤可通过调节Toll样受体通路、PI3K/Akt通路、两面神激酶(JAK)/信号传导及转录激活因子(STAT)通路发挥抗炎作用^[3,31-32]。与文献结果一致,TMNP在靶点层面的分析显示710个麻杏石甘汤治疗肺炎模型显著相关靶点富集到大量炎性通路,如TRP通道炎性介质调节、志贺氏菌病、百日咳、MAPK通路、FoxO通路、JAK/STAT通路等通路,表明麻杏石甘汤可调节大量炎性相关靶点。

从肺损伤角度,肺炎可导致肺脏相关组织发生一些列器质性病变,如肺组织有大量炎性免疫细胞浸润,肺部灶性出血,肺部呈斑点状,肺泡充血,肺泡上皮细胞增生;小血管内皮细胞脱落,血栓栓塞;脾脏贫血性梗死^[25]。这些肺炎相关病变和TMNP在组织、细胞、生物过程、病理过程等层面结果相吻合。肺炎模型显著影响肺组织(NCS=5.76);相关细胞如内皮细胞(Endothelial cell, NCS=-12.09)、周皮细胞(Pericyte, NCS=-11.36)、成血管细胞(Hemangioblast, NCS=-11.90)等;相关病理过程如病毒引起的出血性败血症(Hemorrhagic Septicemia, Viral, NCS=9.55)、软化斑(Malacoplakia, NCS=-7.01)等;相关生物过程如脉管系统发育过程(Vasculature development, NCS=-7.06)、血管形态发生过程(Blood vessel morphogenesis, NCS=-7.08)等,且肺炎模型所造成的影响,经麻杏石甘汤治疗后均发生显著逆转。脂多糖诱导肺炎模型动物实验证实,经麻杏石甘汤治疗后,肺部炎性细胞浸润数量减少,肺泡充血、水肿程度减弱,肺部损伤得到显著缓解^[8];经麻杏石甘汤的加减治疗后的儿童肺炎患者,肺部阴影消失或减

少^[33]。麻杏石甘汤还可以通过NRG1参与的NRG1/ErbB信号通路促进血管生成^[34],延缓主动脉粥样硬化病变进程来改善肺炎引起的心肺血管损伤。

中医理论认为肺炎多起于外感邪袭,肺宣降失司,上逆而喘,导致肺入里化热,邪热内盛,炼津为痰的病证。而麻杏石甘汤全方包含4味中药,即解表散寒平喘之效的麻黄,润肺下气之效的苦杏仁,除寒郁之热的石膏及具补肺和调和诸药配伍作用的甘草,四药合用,共奏辛凉宣泄、清肺平喘、化痰行水之功效^[35-36]。TMNP分析显示,麻杏石甘汤可从不同生物尺度逆转肺炎模型对机体的影响,符合中医临床中麻杏石甘汤对肺炎有标本兼治之功效的认识。另外,中医临床证明清除肺热是麻杏石甘汤治疗肺炎的关键,在临床上对细菌性、病毒性、间质性肺炎等各种肺炎均取得了良好疗效^[37]。与中医临床效果相一致,本研究同样证明麻杏石甘汤可显著改善肺炎模型中炎性反应以及细菌和病毒等病原微生物所诱导的病理过程。

本研究的局限性主要有以下几点:①尽管TMNP可绕过中药化学成分的复杂性,直接从基因表达层面探究中药与机体的关系。但不可否认,中药药效依赖于其所包含的多种化学成分,因此,揭示中药药效成分和机体的复杂相互作用仍然是下一步需要解决的关键问题;②在TMNP方法中,不同尺度的生物标签数量和质量对最终的分析结果影响显著,因此,后续研究仍需进一步对各个尺度生物标签进行不断升级;③尽管TMNP分析为中药-机体相互作用提供大量有效信息,但其分析结果主要依赖于基因表达层面的相互关联,还需要进一步临床前和临床研究进行验证。

总的来说,本研究采用TMNP方法从生物多层次角度研究麻杏石甘汤治疗肺炎的整体作用,揭示麻杏石甘汤主要是通过调节炎性免疫反应以及改善炎症引起的心肺血管损伤来达到治疗效果。与麻杏石甘汤已知的抗炎、抗病毒、免疫调节、以及改善肺损伤等研究结果相一致^[38-39]。证明了TMNP方法在麻杏石甘汤治疗肺炎多尺度机制研究中的合理性和有效性。本研究为麻杏石甘汤的整体机制研究提供理论依据和指导框架,为后续实验研究提供丰富线索。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 中国政府网. 中医药治疗新冠肺炎总有效率逾90%

- [EB/OL]. (2020-03-24) [2022-06-30]. http://www.gov.cn/xinwen/2020-03/24/content_5494788.html.
- [2] 郑文科,张俊华,杨丰文,等. 中医药防治新型冠状病毒肺炎各地诊疗方案综合分析[J]. 中医杂志, 2020, 61(4):277-280.
- [3] HSIEH C F, LO C W, LIU C H, et al. Mechanism by which ma-xing-shi-gan-tang inhibits the entry of influenza virus[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 143(1): 57-67.
- [4] 黄晓洁,魏刚,张龙,等. 麻杏石甘汤的药理作用和临床应用研究进展[J]. 广东药学院学报, 2014, 30(1): 110-114.
- [5] 任晓婷,徐炎,孙丽平. 麻杏石甘汤现代研究进展及展望[J]. 吉林中医药, 2020, 40(8):1106-1109.
- [6] LI S, ZHANG B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: Theory, methodology and application[J]. Chin J Nat Med, 2013, 11(2): 110-120.
- [7] 陈健,陈启龙. 网络药理学在中医药研究中的现状及思考[J]. 上海中医药大学学报, 2021, 35(5):1-6, 13.
- [8] 程赛,陈伟,吴钢伟,等. 基于网络药理学探讨麻杏石甘汤治疗急性肺损伤的机制[J]. 西北药学杂志, 2022, 37(1):51-58.
- [9] 付新,刘阳,王雪梅,等. 麻杏石甘汤的研究进展[J]. 中医药信息, 2017, 34(2):126-128.
- [10] LI P, ZHANG H, ZHANG W, et al. TMNP: A transcriptome-based multi-scale network pharmacology platform for herbal medicine[J]. Brief Bioinform, 2022, doi:10.1093/bib/bbab542.
- [11] LI Q, BAI C, YANG R, et al. Deciphering the pharmacological mechanisms of Ma Xing Shi Gan decoction against COVID-19 through integrating network pharmacology and experimental exploration [J]. Front Pharmacol, 2020, 11:581691.
- [12] ZHANG X, LAN Y, XU J, et al. CellMarker: A manually curated resource of cell markers in human and mouse [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47 (D1): D721-D728.
- [13] ZHU Q, WONG A K, KRISHNAN A, et al. Targeted exploration and analysis of large cross-platform human transcriptomic compendia [J]. Nat Methods, 2015, 12 (3):211-214.
- [14] SUBRAMANIAN A, NARAYAN R, CORSELLO S M, et al. A next generation connectivity map: L1000 platform and the first 1, 000, 000 profiles [J]. Cell, 2017, 171(6):1437-1452.
- [15] YANG Z, ZOU X, FENG P, et al. Inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway or overexpression of beclin1 blocks reinfection of *Streptococcus pneumoniae* after infection of influenza A virus in severe community-acquired pneumonia [J]. Inflammation, 2019, 42(5):1741-1753.
- [16] 汪雪峰,陈思煜,陈锋,等. Epac/Rap1 信号通路在急性肺损伤中作用的研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(5):680-683.
- [17] 吴盈盈,胥文春,尹一兵,等. NF- κ B 和 PI3K-Akt 通路调节肺炎链球菌 HSP40 诱导小鼠巨噬细胞免疫应答 [J]. 免疫学杂志, 2017, 33(1):18-22.
- [18] 李玲,卢芳国,何清湖. 麻杏石甘汤联合西药治疗小儿肺炎的系统综述和 meta 分析[J]. 中西医结合学报, 2009, 7(9):809-813.
- [19] 刘毅,胡娇娇,潘杰,等. 麻杏石甘汤加减对痰热壅肺型社区获得性肺炎肺功能及免疫系统的影响[J]. 世界中医药, 2019, 14(9):2295-2299.
- [20] 林慧洋. 中药麻杏石甘汤对于急性肺炎的治疗效果分析[J]. 中国实用医药, 2022, 17(3):175-177.
- [21] 赵淑萍. 中药麻杏石甘汤在急性肺炎治疗中的应用效果研究[J]. 北方药学, 2019, 16(4):27-28.
- [22] 苏克雷,熊兴江. 新型冠状病毒肺炎的经典名方治疗策略与思考[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(2): 494-503.
- [23] FRATER J L, ZINI G, D'ONOFRIO G, et al. COVID-19 and the clinical hematology laboratory [J]. Int J Lab Hematol, 2020, 42(Suppl 1):11-18.
- [24] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 关于印发新型冠状病毒肺炎防控方案(第九版)的通知[EB/OL]. (2022-06-27) [2022-06-30]. http://www.gov.cn/xinwen/2022-06/28/content_5698168.html.
- [25] TARANTINO G, SCALERA A, FINELLI C. Liver-spleen axis: intersection between immunity, infections and metabolism [J]. World J Gastroenterol, 2013, 19 (23):3534-3542.
- [26] COCCOCIA S, LENTI M V, SANTACROCE G, et al. Liver-spleen axis dysfunction in COVID-19 [J]. World J Gastroenterol, 2021, 27(35):5919-5931.
- [27] DOMINGO P, RODRÍGUEZ P, LÓPEZ-CONTRERAS J, et al. Spontaneous rupture of the spleen associated with pneumonia [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1996, 15(9):733-736.
- [28] 文杨,张军,王毅. 麻杏石甘汤对重症肺炎大鼠肺组织炎症的影响及其机制[J]. 安徽医药, 2020, 24(9): 1725-1728.
- [29] 孙媛,杜敏. 麻杏石甘汤加味治疗小儿肺炎喘嗽的临床效果及其对炎症因子、T 细胞亚群的影响[J]. 临床医学研究与实践, 2022, 7(15):115-118.
- [30] 李玲,魏科,卢芳国,等. 基于 TLR4-MyD88-TRAF6 信号通路的麻杏石甘汤抗 A 型流感病毒感染小鼠所

- 致的病毒性肺损伤研究[J]. 中草药,2017,48(8):1591-1596.
- [31] 赵澄,张香港,陈纯静,等. 麻杏石甘汤通过JAK1/2-STAT1信号通路改善流感病毒感染所致肺组织与结肠组织损伤[J]. 中国中药杂志,2022,doi:10.19540/j.cnki.cjcm.20220520.402.
- [32] 王萍,方晓艳,白明,等. 基于中西医临床病症特点的肺炎动物模型分析[J]. 中药药理与临床,2020,36(5):198-202.
- [33] 张晓娟,杨竟,张俊艳. 麻杏石甘汤加减治疗小儿肺炎临床观察[J]. 光明中医,2020,35(11):1617-1619.
- [34] XIAO J, LI B, ZHENG Z, et al. Therapeutic effects of neuregulin-1 gene transduction in rats with myocardial infarction [J]. Coron Artery Dis, 2012, 23 (7) : 460-468.
- [35] 范海婷,杨一民. 麻杏石甘汤治疗小儿肺系疾病的研究进展[J]. 中国民族民间医药,2022,31(12):63-66.
- [36] 刘颖,王东强,李志军. 麻杏石甘汤治疗肺炎浅析[J]. 武警后勤学院学报:医学版,2017,26(1):72-73.
- [37] 袁丽丽. 加味麻杏石甘汤治疗肺热病疗效观察及其对炎性指标的影响[D]. 福州:福建中医学院,2008.
- [38] 董艳艳,张广超. 麻杏石甘汤对小儿支原体肺炎血清炎性因子水平及临床疗效的影响[J]. 山西医药杂志,2021,50(22):3108-3110.
- [39] 朱玉,黎玉婷,姚德蛟. 从中西医不同角度分析麻杏石甘汤治疗新型冠状病毒肺炎的作用[J]. 西部中医药,2020,33(4):5-7.
- [责任编辑 顾雪竹]