

Research
Traditional Chinese Medicine—Article

基于转录组学及多尺度生物测定多模态鉴定宣肺败毒方抑制巨噬细胞免疫反应的活性成分

赵璐^{a,#}, 刘豪^{a,#}, 王迎超^a, 王书芳^a, 苟得金^a, 王毅^{a,b,*}, 程翼宇^{a,b,*}, 张伯礼^b^a Pharmaceutical Informatics Institute, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China^b State Key Laboratory of Component-Based Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 May 2021

Revised 23 July 2021

Accepted 21 September 2021

Available online 15 November 2021

关键词

炎症

巨噬细胞活化

巨噬细胞迁移

多模态鉴定

宣肺败毒方

摘要

宣肺败毒方(XFBD)是一种临床用于治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)病患的中药方剂,在临床实践中表现出了显著的疗效,但对其潜在的药理学机制尚不清楚。本研究结合网络药理学、转录组学和多模型系统生物测定等综合研究方法,研究了XFBD生物活性物质及其药理作用机制。通过高分辨质谱与分子网络相结合,对XFBD中的主要活性物质进行了分析,共鉴定或初步鉴定了104种化合物,包括黄酮类、萜类、羧酸类和其他类型的成分。基于所鉴定的XFBD化学组分,开展了网络药理学分析并将炎症相关通路确定为重要靶点。在脂多糖诱导的急性炎症小鼠模型中,XFBD明显减轻了肺部炎症,降低了血清促炎细胞因子水平。转录组学分析表明,经XFBD治疗后,与巨噬细胞功能相关的基因表达水平发生改变。在巨噬细胞细胞系和斑马鱼创伤模型中,XFBD对巨噬细胞的激活和迁移均有很强的抑制作用。最终,通过多模型系统筛选,发现XFBD中虎杖、芦根、化橘红显著下调巨噬细胞活化,虎杖苷、异甘草苷、毛蕊花糖苷为活性化合物;青蒿和麻黄显著抑制内源性巨噬细胞迁移,麻黄碱、白术内酯和山奈酚为活性化合物。综上所述,本研究通过多模态方法研究了XFBD调节炎症的活性成分以及相关药理学机制,从而为XFBD的临床疗效提供了生物学例证。

© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染引起的严重急性呼吸综合征以非典型肺炎的形式最初引起了世界关注[1]。由于该病毒具有高度传染性,由其引起的新型冠状病毒肺炎(以下简称新冠肺炎)已成为全球公共健康的一大威胁[2–3]。新冠肺炎的全球发病率和死亡率持续上升,截至2021年7月20日,全世界已有超过1.9亿人确诊新冠肺

炎,并已造成超过400万人死亡[4]。为应对全球新冠肺炎疫情并开发有效的治疗和疾病控制方法,医学、公共卫生、药学及许多其他相关领域的研究人员也做出了巨大努力。越来越多的证据表明,部分新冠肺炎患者可能经历细胞因子风暴综合征,其发生与死亡率的增加具有很强的关联[5]。炎症是宿主对病毒感染的主要防御反应,其特征是多种炎性细胞的激活和动员,包括巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞。炎性细胞的过度活化可能导致细胞因子的

* Corresponding authors.

E-mail addresses: chengyy@zju.edu.cn (Y. Cheng), zjuwangyi@zju.edu.cn (Y. Wang).

These authors contributed equally to this work.

失控释放和有害的全身免疫反应，即所谓的“细胞因子风暴”。因此，在这些新冠肺炎病患中，早期识别和抑制炎症反应非常重要。

宣肺败毒方 (XFBD) 是由中国工程院 (CAE) 院士张伯礼和首都医科大学附属北京中医医院刘清泉教授设计的一线中药配方，用于治疗出现“湿毒郁肺” (肺湿痰阻证) 症状的新冠肺炎患者 [6]。一项试点随机临床试验表明，与单独使用抗病毒药物治疗相比，XFBD 联合常规抗病毒药物显著促进了新冠肺炎患者临床症状的消退 [7]。根据中医药理论，XFBD 由 13 种中药和天然材料组成，旨在具有多靶点作用 [6]。计算机药理学分析表明，近 10% 的 XFBD 预测靶点富集于病毒感染和肺损伤的疾病途径中，免疫和炎症是这些靶点调控的主要生物学途径之一 [6]。然而，其具体药理作用机制仍需进一步验证。

与其他许多中药的研究一样，XFBD 药理学研究中遇到的主要困难是其化学成分和生物活性的复杂性。为了应对这一挑战，本研究提出了中药活性成分多模式鉴定的必要性，并强调从不同尺度的多个研究模型中获取和融合信息。在本研究中，基于高分辨质谱 (MS) 实验和小鼠炎症模型的转录组学分析，整合了网络药理学分析结果，确定了 XFBD 的潜在靶向途径 (附录 A 中的图 S1 和图 S2)。然后，从 XFBD 在巨噬细胞介导炎症过激中的预测作用出发，分析了 XFBD 及其活性成分在体外和体内系统中的药理作用。综上所述，本研究确定了 XFBD 及其组分在炎症刺激的巨噬细胞迁移和细胞因子分泌病理过程中的调节作用，这部分解释了 XFBD 控制免疫过度激活的药理机制。

2. 方法

2.1. 材料和试剂

XFBD 颗粒和单味中药提取物由天津现代创新中药科技有限公司提供。绿原酸、阿魏酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、柚皮素、山奈酚、白术内酯 I、大黄素、广藜香酮、新绿原酸、苦杏仁苷、异夏佛塔苷、马鞭草苷、戟叶马鞭草苷、迷迭香酸、异麦角甾苷、异甘草苷、芹菜素、儿茶素、槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖-7-O- β -D-龙胆二苷、隐绿原酸、毛蕊花糖苷、柚皮苷、橙皮苷、芹糖异甘草苷、甘草酸和青蒿素来自上海融禾医药科技发展有限公司。腺苷、白术内酯 III 和芒柄花苷来自上海源叶生物科技有限公司。木犀草素来自上海阿拉丁生物化学科技有限公司。夏佛塔苷和 4,5-二咖啡酰奎宁酸来自成都曼思特生物科技有限公司。盐酸麻黄碱来自国家食品药品

监督管理局。白藜芦醇来自 Sigma Aldrich (美国)。所有化合物纯度均大于 98%，溶解于二甲基亚砜 (DMSO) 中，形成浓度为 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备溶液。

高糖杜尔贝科改良伊格尔培养基 (DMEM)、胎牛血清 (FBS)、胰蛋白酶-乙二胺四乙酸 (Trypsin-EDTA)、抗生素 ($100 \text{ units} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素 G 和 $100 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素) 来自 Gibco BRL (美国)。小鼠外周血单核细胞 (PBMC) 分离试剂盒来自中国皓阳生物技术有限公司。Poly (I:C) 和 Pam3CSK4 来自 Invivogen (美国)。白细胞介素 (IL)-6 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒来自中国博士德生物工程有限公司。甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 小鼠单克隆抗体、细胞裂解缓冲液和苯基甲磺酰氟 (PMSF) 来自中国碧云天生物技术。

2.2. XFBD 及药材供试品溶液的制备

119 g XFBD 颗粒含有以下成分：麻黄 3 g、杏仁 7.5 g、石膏 15 g、薏苡仁 15 g、白术 5 g、藿香 7.5 g、青蒿 6 g、虎杖 10 g、芦根 15 g、葶苈子 7.5 g、化橘红 7.5 g 和甘草 5 g。将 XFBD 颗粒溶于水，形成浓度为 $200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备溶液。

将 100 g 各种中药药材 (或 50 g 麻黄提取物) 加入 1.5 L 水中，分别回流提取 1 h。提取液减压浓缩，冷冻干燥。将提取物溶于水，形成浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备溶液。

2.3. XFBD 的液相色谱四极杆飞行时间质谱 (LC-Q-TOF-MS) 分析

ACQUITY 超高效液相色谱 (UPLC) 系统 (Waters, 美国) 与三重飞行时间 (TOF) 5600 + MS (AB SCIEX, 美国) 联用，配备电喷雾电离 (ESI) 源进行化学鉴别。样品在 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 [$150 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$; internal diameter (i. d.), $1.8 \mu\text{m}$] 上分离，流速为 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，柱温为 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 。流动相如下：0.1% 甲酸-水作为水相流动相 (A)，0.1% 甲酸-乙腈作为有机流动相 (B)。线性梯度洗脱的方法为：0~2 min, 0% B；2~25 min, 0~30% B；25~35 min, 30%~95% B；35~37 min, 95% B。进样体积为 $2 \mu\text{L}$ ，检测波长为 254 nm。质谱分析在正负模式下进行，参数如下：扫描范围，质荷比扫描范围 (m/z) 100~2000 Da (负)，90~1500 Da (正)；离子源 GS1, 50 psi (1 psi = 6.89 kPa)；离子源 GS2, 50 psi；固化气体 (CUR), 35 psi；温度，ESI+ 为 $600 \text{ }^\circ\text{C}$ ，ESI- 为 $550 \text{ }^\circ\text{C}$ ；离子喷雾 (IS) 电压，ESI- 为 -4.5 kV ，ESI+ 为 5.5 kV ；解聚电位 (DP), 100 V；碰撞能量 (CE), 10 V。

2.4. XFBD的分子网络构建

使用 ProteoWizard 软件包中的 MSConvert 软件, 将串联质谱 (MS2) 数据文件从 .wiff (AB SCIEX) 标准数据格式转换为 .mzXML 格式。然后用 MZmine 2 v.40.1 [8] 处理所有 .mzXML 数据。通过设置噪声水平为 5.0×10^4 来进行 MS 检测。使用自动数据分析管道 (ADAP) 色谱生成器, 设置最小扫描组数为 5, 组强度阈值为 5.0×10^4 , 最小最高强度为 5.0×10^4 , m/z 公差为 0.001 Da 或 10 ppm。ADAP 小波反卷积算法[9]: 信噪比阈值=10, 最小特征高度= 5.0×10^4 个计数, 系数/面积阈值=100, 峰值持续 0~1 min, 保留时间 (RT) 小波范围为 0~0.2 min。MS2 扫描采用 0.02 Da 的 m/z 公差范围和 0.1 min 的 RT 公差范围进行配对。采用同位素峰分组算法, 使用连接对准器模块进行峰值对准。峰值列表用峰值搜索器模块进行间隙填充, 然后用峰值列表行过滤器进行过滤。最终, 导出 .mgf 数据文件及其相应的 .csv 元数据文件, 包括峰高和面积积分。

根据全球天然产物社会分子网络 (GNPS) [†] 在线创建相应的质谱分子网络[10], 参数设置为: 母离子质量公差为 0.02 Da, MS2 碎片离子公差为 0.02 Da, 最小聚类大小为 1, MScluster 已运行, 过滤前体窗口已关闭。所创建网络的余弦分数高于 0.7, 并且有四个以上的匹配峰。然后根据 GNPS 光谱库对网络中的光谱进行搜索, 使用 Cytoscape (3.7.2 版) 可视化分子网络数据。

2.5. XFBD 化合物-靶点网络

XFBD 主要化合物的靶点收集自《中医药百科全书》(ETCM) [‡]、中药系统药理学 (TCMSP) ^{††} 和 TargetNet ^{‡‡} 数据库 (至 2020 年 3 月 31 日)。所选靶点的标准如下: ETCM 中的数值高于 0.8; 接收器操作特征曲线下的面积 (AUC) ≥ 0.7 , TargetNet 中概率 (Prob) > 0.9 ; TCMSP 中口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 或药物相似度 (DL) ≥ 0.18 。然后对结果进行如下标准化处理: 来自 ETCM 的目标名称是标准基因名称; 来自 TargetNet 的目标名称通过 Uniprot 网站转换为标准基因名称; 来自 TCMSP 的目标名称通过 bioDBnet 转换。将所有数据库检索结果汇总, 构建化合物-靶点对应的数据库。

从 GeneCards ^{†††}、比较毒物基因组学数据库 (CTD) ^{††††}、PubMed Gene ^{†††††}, 以及在线人类孟德尔遗传

学 (OMIM) ^{†††††}, 收集 COVID-19 的疾病基因。

从 GeneMANIA ^{†††††}, 共获得了 5556 个 ACE2 共表达基因, 对其进行归一化处理, 转化为标准基因名称, 这些基因已被证实为 SARS-CoV-2 的受体。将所有基因上传到 STRING ^{†††††} 数据库, 以获得每个基因的相关信息, 并通过 Cytoscape (3.7.2 版) 进行可视化。通过 STRING 数据库和注释、可视化和综合发现数据库 (DAVID) ^{††††††}, 对关键靶点的生物功能进行分析。

2.6. 脂多糖诱导的 C57BL/6 小鼠模型及 XFBD 给药

6~8 周龄的 C57BL/6 小鼠购自上海 SLAC 实验动物有限公司。将小鼠随机分为四组 [对照组、脂多糖 (LPS) 组、低剂量 XFBD 组和高剂量 XFBD 组], 每组 10~15 只。LPS 诱导的小鼠急性炎症的建模策略之前已有大量报道 [11-13], 对照组和 LPS 组的小鼠口服生理盐水 3 d, LPS 组小鼠在第四天腹腔注射 LPS ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 4 h。临床上, XFBD 的日用量与病患体重的关系为 $8.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ [7]。本研究中, XFBD 组小鼠灌胃给予 XFBD (低: $2.16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 高: $4.32 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 3 d, 在第四天腹腔注射 XFBD 和 LPS ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 4 h, 然后将小鼠麻醉处死, 收集血液和肺部。将至少 6 只小鼠的血样进行离心处理, 获得血清。通过 ELISA 试剂盒测量血清中 IL-6、肿瘤坏死因子 (TNF) $-\alpha$ 和 IL-1 β 的浓度。通过 PBMC 分离试剂盒收集另外 6 只小鼠血样中的单核细胞, 并将同一组的两个样本合并为一个样本进行转录组测序。肺组织样本固定后用苏木精和伊红 (H&E) 染色。所有的动物实验都是按照美国国立卫生研究院 (NIH) 公布的《实验动物护理和使用指南》(1996) 进行, 并得到浙江大学实验动物福利伦理审查委员会的批准。

2.7. XFBD 的体内成分和代谢物分析

从 LPS 诱导和 XFBD 处理 ($2.16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的小鼠中获得的血清和肺部样本处理后用于体内成分和代谢物分析。将血清样品 ($60 \mu\text{L}$) 在四倍于其体积的甲醇中进行蛋白质沉淀。混合物以 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 然后将上清液蒸发至干。残余物用 $150 \mu\text{L}$ 80% 的甲醇溶解, 采用与提取液相同的分析方法进行 LC-Q-TOF-MS 分析。肺部样品在五倍于其体积的 80% 甲醇中均质, 均质物在

[†] <http://gnps.ucsd.edu>.

[‡] <http://www.tcmip.cn/ETCM>.

^{††} <https://tcmspw.com/>.

^{‡‡} <http://targetnet.scbdd.com/>.

^{†††} <https://www.genecards.org/>.

^{††††} <http://ctdbase.org/>.

^{†††††} <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>.

^{†††††} <https://www.omim.org/>.

^{††††††} <http://genemania.org/>.

^{†††††††} <https://string-db.org>.

^{††††††††} <https://david.ncicrf.gov/>.

12 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 15 min。然后将上清液用于 LC-Q-TOF-MS 分析。MS 数据与之前的 XFBD 的 MS 分析进行比较, 确定成分。

对于定量分析, 将 100 μL 血清样品加入四倍于其体积的甲醇中进行蛋白质沉淀。全肺组织样品在 1 mL 80% 的甲醇中均质化。离心后, 将血清和肺部样本的上清液蒸发至干; 最后, 将残留物全部用 100 μL 80% 的甲醇溶解, 用于 LC-Q-TOF-MS 分析。

2.8. 小鼠单核细胞转录组分析

使用 DESeq2 R 软件包 (1.16.1 版) 对 LPS 组和 XFBD 组的单核细胞进行了差异性表达分析。DESeq2 提供了统计程序, 使用基于负二项分布的模型确定数字基因表达数据中的差异表达。使用 Benjamini 和 Hochberg 的方法 [14] 对所得 P 值进行调整, 以控制假阳性率。将 DESeq2 所发现调整后 $P < 0.05$ 的基因指定为差异表达。对 STRING 数据库进行了差异表达基因的蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 分析, 使用 DAVID 生物信息学资源 6.8[†] 进行路径富集。

2.9. 评估抗炎活性的巨噬细胞活化模型

RAW 264.7 细胞系来自中国科学院上海细胞库, 培养于含有 10% FBS 和抗生素 (100 $\text{units} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素和 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素) 的高糖 DMEM 中。细胞以 10^5 孔⁻¹ 的密度种板于 12 孔板中。24 h 后, 将细胞与 Poly(I:C) (10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) + Pam3CSK4 (100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) (P2P) 以及相应测试药物共同培养 24 h, 由过往研究 [15] 设定药物浓度如下: 白术、化橘红和芦根分别为 800 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 苦杏仁、何首乌和甘草分别为 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 亭蒴子/播娘蒿为 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 贝母为 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 青蒿为 4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 马鞭草为 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 广藿香为 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 0.25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 麻黄为 0.125 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.0625 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 0.0313 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。使用 1.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的地塞米松 (DEX) 处理 24 h 作为阳性对照。最终, 收集细胞培养液, 使用 ELISA 试剂盒检测 IL-6 浓度。

2.10. 蛋白质印迹试验

将用相应药物预处理 24 h 的 RAW 264.7 细胞 (3×10^5 个 \cdot 孔⁻¹), 用 P2P 处理 1 h, 使用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的裂解缓冲液裂解细胞, 生成细胞裂解液。用加载缓

冲液制备裂解物, 用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 然后转移到聚偏二氟乙烯膜上。用 5% 的牛血清白蛋白 (BSA) 对膜进行封闭, 并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下用特定的第一抗体孵育过夜。使用 TBST 缓冲液清洗三次后, 将膜与相应的第二抗体在室温下孵育 1 h, 随后进行清洗。用化学发光法检测膜上的信号, 使用 Image Lab v5.2 软件 (Bio-Rad, USA) 进行条带密度分析。

2.11. 斑马鱼剪尾模型及药效评估

Tg (mpeg: eGFP) [16] 和 Tg (Lyz: dsRED2) [17] 转基因斑马鱼来自浙江大学实验动物中心, 采用 E3 培养液 (氯化钠 0.29 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 氯化钾 0.013 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 二水合氯化钙 0.048 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 六水合氯化镁 0.082 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.2$) 进行培养 [18]。胚胎通过自然产卵获得, 所有斑马鱼实验均按照浙江大学实验动物福利伦理审查委员会的指导方针进行。

将受精后 5 天 (dpf) 的斑马鱼胚胎在含有 XFBD、XFBD 中药提取物/化合物的培养基中培养 24 h。对于单一药物给药时, 浓度如下: 麻黄 0.25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 广藿香 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 马鞭草 2.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 青蒿 6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 何首乌 34 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 薏苡仁 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 其他中药为 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。对于测试药物协同作用时, 每种中药的剂量减少到单一给药时的一半。对于化合物活性测试, 白术内酯 I 的浓度为 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 其他所有化合物的浓度为 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。上述给药浓度均根据中药提取物和化合物的毒性、溶解度及前述研究 [19] 所确定。斑马鱼尾鳍损伤模型已在大量研究 [18–20] 中所报道, 首先将胚胎在 0.016% 三卡因 (A5040; Sigma Aldrich) 中麻醉, 并在相同的解剖部位用无菌解剖刀进行了尾部截肢手术, 该部位略位于尾部循环末端的后方。尾部横切约 5 min 后, 在新鲜胚胎培养基中回收斑马鱼, 成像前在各自的药物溶液中再培养 4 h。

2.12. 显微成像和图像分析

使用荧光显微镜 (DMI3000B; Leica, 德国) 对巨噬细胞或中性粒细胞的尾部积聚进行成像, 并用 Image J 软件 (1.52q 版本; NIH, 美国) 进行量化。如前述报道 [20–21], 在受伤的尾部区域手动计数相同大小定义区域内的细胞数量。为了进行延时成像和自动跟踪巨噬细胞迁移, 将截尾的幼鱼置于含有或不含药物溶液的 1.2% 低熔点琼脂糖 (0815; Amresco, 美国) 培养基中, 置于科研用玻璃底细胞培养皿 (F15mm, NEST, 中国) 进行拍摄。共聚焦显微成像采用共聚焦激光扫描显微镜 (TCS SP8, Leica) 和 10 \times 光电倍增管 (PMT) 检测器物镜进行。延时显

[†] <https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>

微成像在 28 °C 下进行，间隔时间为 8 min。使用 Leica Application Suite X 软件，从获得的 z-stacks 中生成对齐的最大投影图像和视频。为了进行速度分析，使用 Image J 软件手动追踪迁移的巨噬细胞。

2.13. RNA 分离、互补 DNA 合成和定量聚合酶链反应

斑马鱼胚胎的总 RNA 用 RNA 快速纯化试剂盒 (RN001; EZ Bioscience, 美国) 提取，然后用 HiFiScript cDNA 合成试剂盒 (CW2569M, ComWin Biotech, 中国) 将其转化为单链 cDNA。实时聚合酶链反应 (RT-PCR) 使用 2 × SYBR green qPCR mater mix (B21202; Bimake, 中国) 进行两步定量 RT-PCR。引物序列为: *efla* (内参) 正向 AGAAGGCTGCCAAGACCAAG, 反向 AGAGGTTGGGAAGAACACGC; *il6* 正向 CGCTAAGGCAACTGGAAGAC, 反向 CCAGACCACTGGGAAACT; *il1b* 正向 TGTGTTTGGGAATCTCCA, 反向 CTGATAAACACGGGACA。

2.14. 数据分析

所有数据均以平均值±标准差表示，两组之间的差异用双尾学生 *t* 检验进行分析，多组比较采用单因素方差分析 (ANOVA) 的方法。数据分析使用 GraphPad PRISM 8.0 软件 (GraphPad Software, Inc., 美国) 进行， $P < 0.05$ 被认为是有统计学意义的。

3. 结果

3.1. 基于高分辨质谱的 XFBD 化学成分表征

虽然 XFBD 在 COVID-19 治疗中具有显著的临床疗效，但对它的化学成分仍研究尚浅，阻碍了对其药理机制的进一步阐述。因此，首先通过 UPLC-Q-TOF-MS 分析了 XFBD 的化学成分 [图 1 (a)]。通过分析原始数据，发现 171 个单独的离子峰并将其确认为主要化合物。由高分辨 *m/z* 分析，得到了这些化合物的分子式，然后参考文献和公共数据库初步推断出它们的结构，并通过 MS 碎片进一步确认。最终，在 XFBD 中共鉴定或推断了 104 个化合物 (附录 A 中的表 S1)。鉴定的化合物包括 36 种黄酮类、22 种萜类、21 种羧酸、3 种生物碱、3 种蒽醌和 19 种其他类型。此外，与参考标准品在保留时间和质谱方面比较，明确鉴定了 33 个化合物 (附录 A 中的图 S3)。

根据 MS2 谱图的相似性，利用 MS2 数据构建了 XFBD 的分子网络 [图 1 (b)]。将从原始数据中识别出的每一个具有 MS2 数据的离子都视为一个节点。基于负模

式的质谱，检索到 1125 个节点和 1686 个连接，其中 23 个簇有 5 个以上的节点，从正模式的质谱中得到 616 个节点和 1272 个连接，其中 9 个簇包含 5 个以上的节点 (附录 A 中的图 S4)。与 MS 鉴定结果一致，黄酮类、萜类和羧酸构成了分子网络中的主要簇，验证了这些化合物是 XFBD 的主要成分。

3.2. 基于 MS 的网络药理学分析表明 XFBD 在病毒感染、炎症和肺损伤中起调节作用

采用网络药理学分析 LC-MS 所鉴定的 XFBD 化合物的潜在功能靶点。通过在数据库 (如 ETCM、TCMSP 和 TargetNet) 中搜索，获得化合物的靶点，共有 751 个靶点被预测为 XFBD 化合物靶点，其中超过 33.5% 的预测靶点为 COVID-19 相关的基因 (详见 2.5 节)。使用上述重叠的基因来构建靶点网络。在该网络中，245 个靶点共建立了 2897 个连接，平均每个靶点有 23.6 个连接 (附录 A 中的图 S5)。然后，通过 STRING 对枢纽靶点进行了功能富集分析。结果表明，17% 的富集途径与肺部损伤有关，13% 与细菌或病毒感染有关，12% 与免疫调节有关 (附录 A 中的图 S6)。XFBD 化合物的抗病毒活性、免疫调节和抗肺损伤活性的化合物-靶点-途径之间的综合关系如附录 A 中的图 S7 所示。Toll 样受体 (TLR) 和核苷酸结合寡聚结构域 (NOD) 样受体信号通路这两个主要的模式识别受体的激活对微生物感染的免疫反应至关重要 [22]。它们的激活是 XFBD 相关的最主要调节通路，其靶基因包括 *TNF- α* 、磷脂酰肌醇-4,5-双磷酸 3-激酶催化亚单位 c 基因 (*PIK3CG*) 和前列腺素内过氧化物合成酶 1/2 基因 (*PTGS1/2*)。

综上所述，基于 MS 的网络药理学的结果表明，XFBD 在对病原体入侵的免疫反应中具有调节作用。

3.3. XFBD 抑制 LPS 诱导的小鼠急性炎症

为了验证网络药理学分析的 XFBD 的免疫调节作用，本研究在 LPS 诱导的炎症小鼠模型中测试了 XFBD 的功能。使用 20 mg·kg⁻¹ 的 LPS 给药 4 h 可以诱发小鼠的急性炎症，使得血清中促炎症细胞因子的水平大大增加，包括 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 。研究发现，在 LPS 刺激前用 XFBD 预处理 3 d，可显著抑制促炎症细胞因子的释放，表明 XFBD 在 LPS 诱导的免疫过度激活中表现出显著抑制作用 [图 2 (a) ~ (d)]。此外，组织病理学检查检测到 LPS 处理后肺部组织的典型炎症变化 [图 2 (e)]。与对照组相比，LPS 刺激的小鼠的肺泡间隔急剧增厚，有严重的炎症细胞浸润。经 XFBD 预处理的小鼠肺部病理改变在很大程

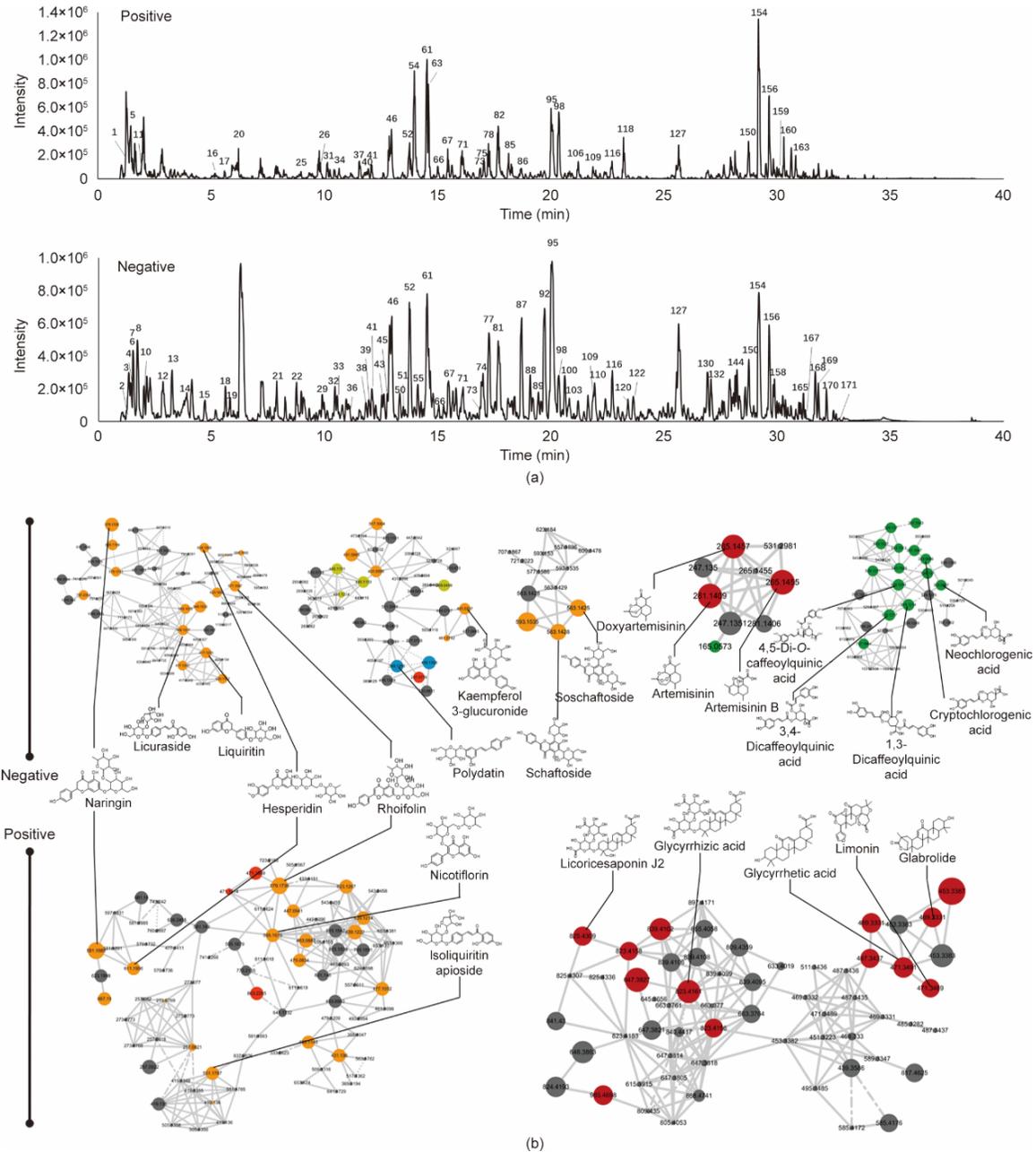


图1. 基于MS的XFBF的分子网络和网络药理学分析。(a)具有正负模式的XFBF的基峰质谱图；(b)XFBF分子网络的主要簇。不同颜色的节点代表不同的化合物。黄色：黄酮类；红色：萜类；绿色：羧酸；蓝色：糖苷类。

度上被削弱，表明XFBF对LPS引起的肺部损伤有保护作用。进一步量化间质性肺组织面积与充满空气的肺泡空间对比的病理图像证明，LPS处理小鼠的肺泡间隔增厚，表明炎性浸润增加，而在XFBF治疗的小鼠中这种表型基本上被逆转了[图2(f)]。

为了分析服用XFBF后的体内成分和代谢物，对灌胃XFBF后LPS刺激的小鼠的血清和肺部样本进行LC-Q-TOF-MS分析(附录A中的图S8)。研究发现，血清中存在67种成分，其中仅一种成分作为原型存在，20种既作为原型成分又作为代谢物存在，而46种作为代谢物存在。

在肺部共检测到57种成分，其中两种为原型，21种为原型成分和代谢物，34种为代谢物。定量分析显示，在灌胃XFBF 3 d后，几个有代表性的化合物，包括甘草酸、柚皮苷和异槲皮苷存在于LPS处理的小鼠血清或肺部样品中，浓度在0.4-35 ng·mL⁻¹范围。此外，与血清相比，在肺部样本中观察到化合物的浓度更高，这表明肺部可能是XFBF的关键靶器官之一。代表性化合物的分布见附录A中的图S9，详细信息见附录A中的表S2、表S3、图S10。

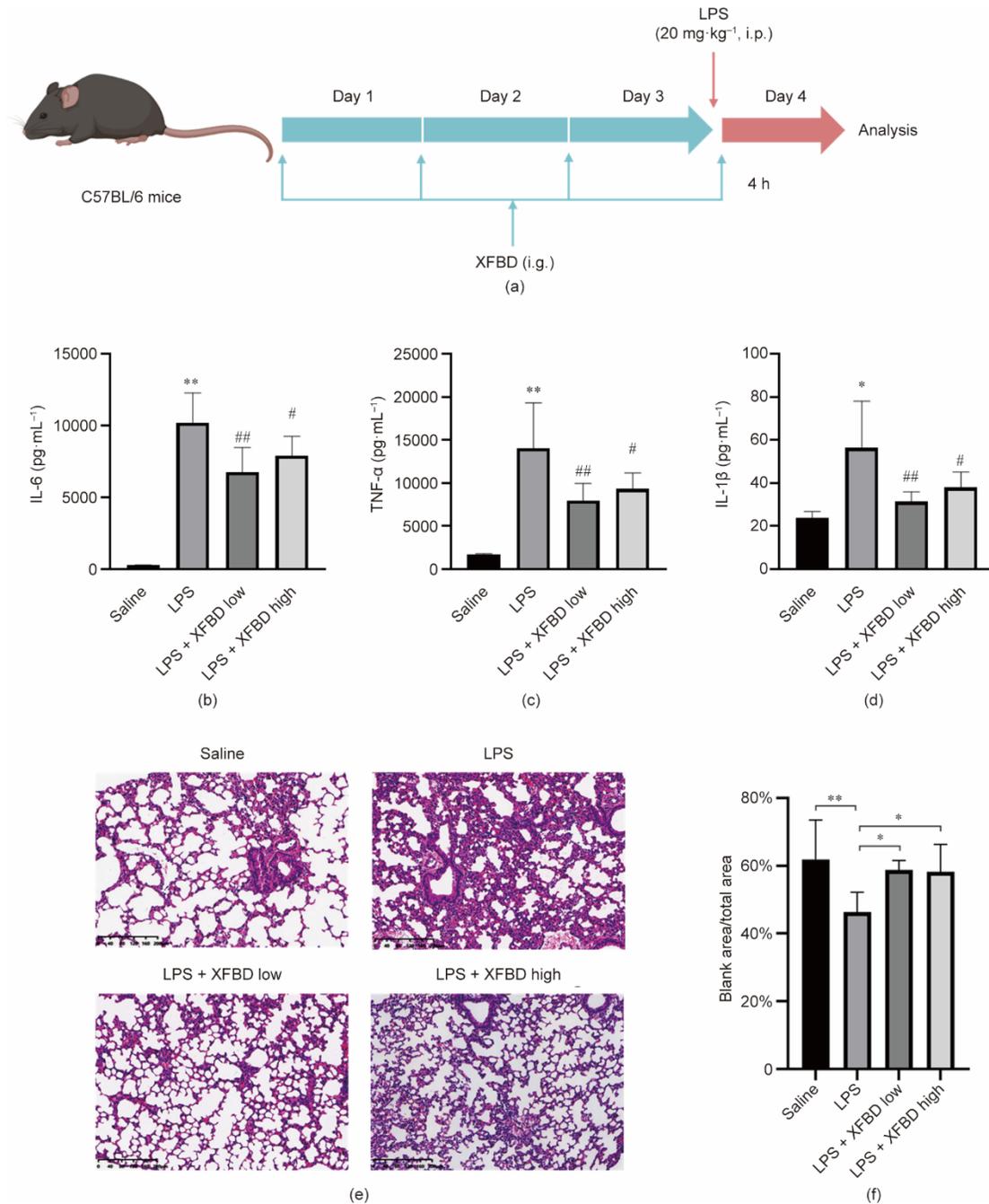


图2. XFB D抑制LPS引起的小鼠急性炎症。(a) XFB D给药和LPS造模的实验方案。(b)~(d) XFB D(高: $4.32 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$; 低: $2.16 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)对LPS($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 4 h)诱导的血清中炎症细胞因子分泌的作用。每组至少含有6只小鼠(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 生理盐水组; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs LPS组)。(e) 各组的肺组织的H&E染色。(f) 小鼠肺部病理切片的量化方法:(空白区域的大小/总面积的大小) $\times 100\%$ 。每只小鼠拍摄一个切片的图像,每组包括三只小鼠(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 生理盐水组)。i.p.: 腹腔注射; i.g.: 灌胃给药。

3.4. XFB D调控多种感染和炎症相关途径的基因表达

为了系统地评估XFB D对LPS刺激小鼠基因表达谱的影响,收集了PBMCs并通过信使RNA(mRNA)测序的方式进行检查。根据对有无XFB D处理的LPS诱导小鼠的转录组分析,确定了1077个差异表达基因(DEGs),其中871个基因上调,206个基因下调[图3(a)]。此外,357个差异表达基因(DEGs)在对照组和LPS组之间有

差异表达,这可能与LPS诱导的炎症发展有关[图3(b)]。然后,我们将357个DEGs进行PPI(附录A中的图S11)和信号通路富集分析。结果表明:血小板激活、细胞外基质(ECM)-受体相互作用和白细胞跨内皮迁移是富集度最高的途径,这些都是免疫反应的关键过程[图3(c)]。在357个DEGs中,107个DEGs的表达在XFB D治疗后被逆转回或部分挽救到正常水平(附录A中的图

S12)。重要的是，XFBD 治疗后，炎症过程中多个关键调节因子的表达发生了变化。例如，血管内皮生长因子 A (VEGFA) 被认为在 SARS-CoV-2 感染期间促进了炎症的发生[23]，它被确定为具有最多联系的靶点，可以被 XFBD 下调。特别值得注意的是，受调控基因中的多个预测靶点已被报道在巨噬细胞功能中起作用。例如，可溶性 CD93 (sCD93) 被报道诱导单核细胞分化为巨噬细胞[24]，并且 sCD93 的增加与巨噬细胞的浸润有关[25]。核因子红系 2 相关因子 1 (NFE2L1) 的长异构体作为单核细胞 M1 型分化 (巨噬细胞的炎症表型) 和促炎症反应的负调控因子发挥重要作用[26]。由于巨噬细胞是先天免疫反应中强有力的免疫调节细胞，因此研究 XFBD 是否通过调节巨噬细胞的功能而发挥作用至关重要。由于巨噬细胞激活和迁移这两个过程是巨噬细胞介导的免疫反应的两个关键过程，本研究继续分析 XFBD 对巨噬细胞激活和迁移的影响。

3.5. XFBD 及其活性化合物在体外模型中抑制巨噬细胞的激活

巨噬细胞的激活在炎症的启动中起着关键作用，故本

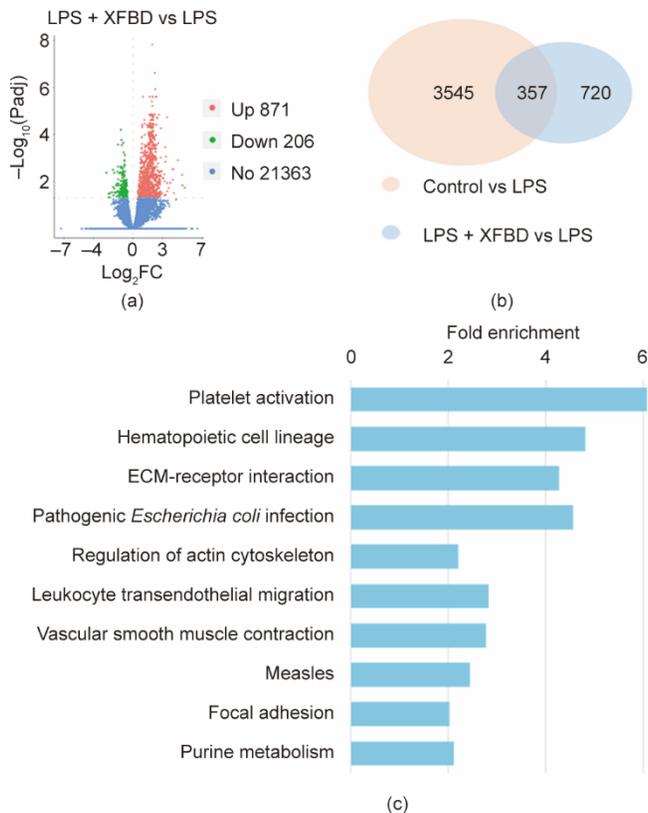


图 3. XFBD 调控多个感染和炎症相关途径的基因表达。(a) 有或无 XFBD 处理的 LPS 刺激的小鼠的 DEGs 计数和分布。红色：上调的基因；绿色：下调的基因；蓝色：没有明显变化的基因。Padj：调整 *P* 值。(b) 各组 DEGs 的韦恩图。(c) 《京都基因与基因组百科全书》(KEGG) 途径富集 357 个重叠 DEGs 的可视化分析。FC：差异倍数。

研究研究了 XFBD 对用 TLR2 激动剂 Pam3CSK4 和 TLR3 激动剂 Poly (I:C) 刺激的巨噬细胞模型的影响[27]。前述研究表明[28]，与单个 TLR 的激活不同，多个 TLR 的激活可能会刺激巨噬细胞中更严重的细胞因子反应。IL-6 是由巨噬细胞分泌的一种主要的促炎症细胞因子，并与 M1 型巨噬细胞的分化有关[29]，这里通过 IL-6 的释放来评估巨噬细胞的激活水平。和上述预期一致，TLR 激动剂极大地诱发了 IL-6 的释放[图 4 (a)、(b)]。重要的是，XFBD 在 6.25~100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度范围内预处理后，以剂量依赖的方式显著抑制 IL-6 的释放[图 4 (b)]。随后，在细胞毒性试验确定的剂量水平下，对 XFBD 配方中的 12 种中药提取物的抗炎作用进行了评估。结果虎杖、芦根、化橘红、甘草和薏苡仁，以剂量依赖的方式显著抑制 IL-6 的释放，而苦杏仁对 IL-6 的释放有一定影响[图 4 (c)]。进一步筛选这些有效药材的代表性化合物，其中异甘草苷、毛蕊花糖苷和虎杖苷在 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时以剂量依赖性方式抑制 IL-6 分泌，异甘草苷和毛蕊花糖苷的抑制作用在浓度为 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时具有统计学意义[图 4 (d)]。大量研究[30–31]表明，丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 家族，包括 p38 MAPK、c-Jun N 端激酶 (JNK) 和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)-细胞外信号调节激酶 (ERK) (MEK)，在调节由巨噬细胞和其他免疫细胞介导的炎症反应中发挥着重要作用。因此，进一步以异甘草苷为 XFBD 代表成分研究了其对 MAPK 信号的影响。研究发现，异甘草苷极大地降低了磷酸化 JNK 的蛋白水平，但提高了 p38 的磷酸化水平[图 4 (e)、(f)]。目前研究一致认为 P38 具有负向调控 JNK 磷酸化的作用[32]，而 JNK 的磷酸化激活能够促进 M1 型巨噬细胞的分化[33]。综上所述，这些结果证明 XFBD 及其主要成分可以抑制巨噬细胞激活。

3.6. XFBD 抑制炎症引起的巨噬细胞迁移

免疫细胞从微循环中被招募到受损组织是后续炎症反应的一个前提步骤，因此被视为炎症过激治疗的一个关键靶点。本研究采用由断尾诱导的斑马鱼炎症模型，动态观察巨噬细胞迁移的内源性过程，研究了 XFBD 及其成分对巨噬细胞动员过程的影响。前述研究[20]表明，在断尾后 4 h (hpa)，分别在 Tg (mpeg: eGFP) 和 Tg (Lyz: dsRED2) 转基因系斑马鱼中检测到荧光素标记的巨噬细胞和中性粒细胞的积聚。本研究中，斑马鱼断尾前 24 h 和断尾后都培养在含有一定浓度 XFBD 的培养液中，直到进行显微分析[图 5 (a)、(b)]。结果显示，XFBD 以剂量依赖的方式在 4 h 内减少了断尾部位的巨噬细胞数量[图 5

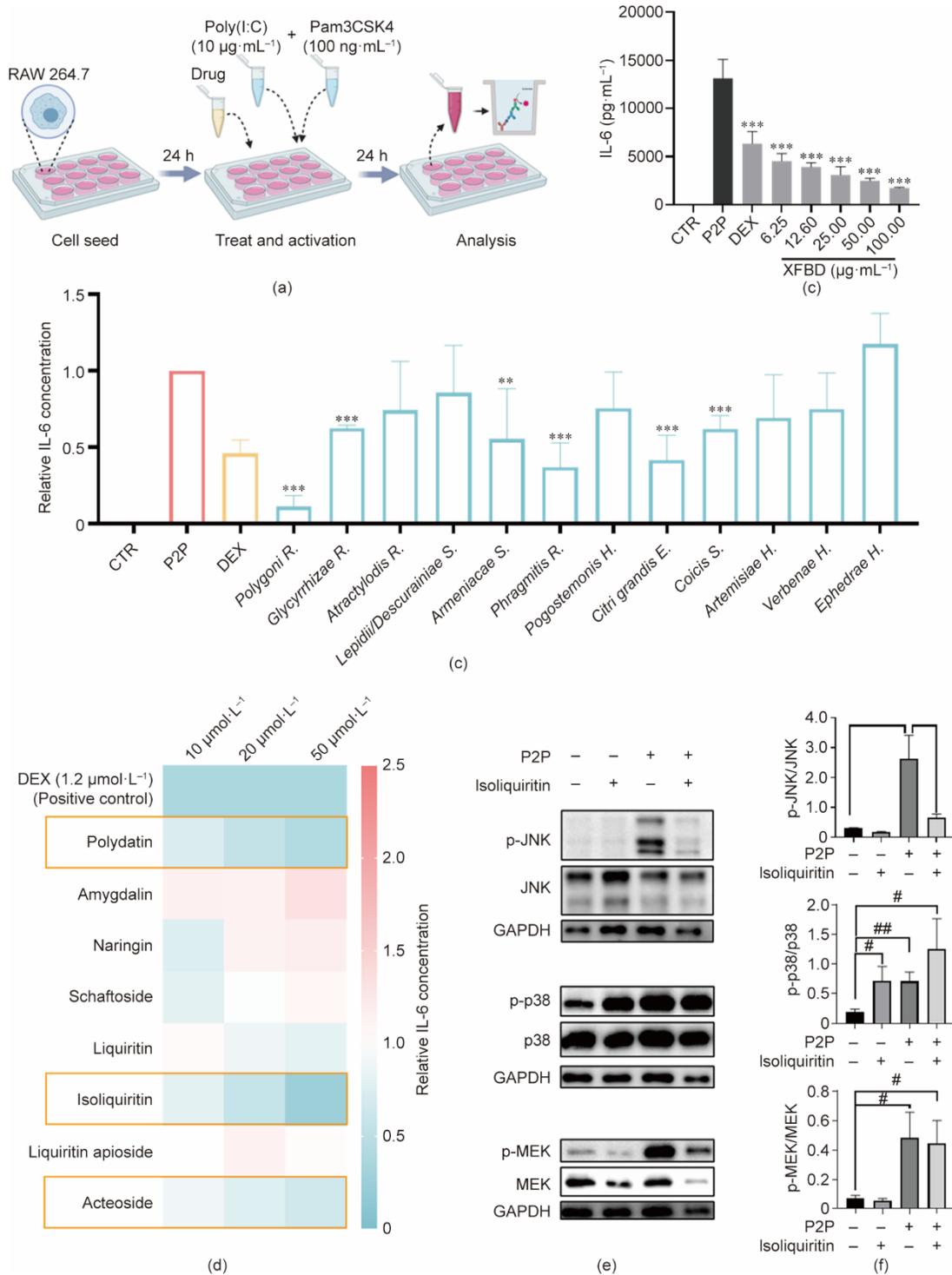


图4. XFBF及其活性化合物在体外模型中抑制巨噬细胞的激活。(a) 巨噬细胞活化模型实验方法。(b) XFBF提取物在6.25~100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内以剂量依赖的方式抑制巨噬细胞IL-6的释放 ($n=3$, $***P<0.001$ vs P2P)。(c) 所示化合物处理后巨噬细胞中IL-6的蛋白水平 ($n=3$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ vs P2P)。地塞米松(DEX)作为阳性对照。每种化合物的详细浓度见第2.9节。(d) 在P2P刺激的巨噬细胞活化模型中,不同剂量的代表性XFBF化合物对IL-6释放的影响。通过比较每个化合物组和模型组的数值,计算出IL-6的相对浓度。(e)、(f) 异甘草苷(50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对JNK(p-JNK)、p38(p-p38)和MEK(p-MEK)的磷酸化的影响。代表性的免疫印迹结果显示在(e)中,统计图显示在(f)中($n=3$; $*P<0.05$ vs P2P; $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$ vs 对照组)。CTR: 对照组。

(c)、(d)]。此外, XFBF对免疫细胞迁移的负向调节作用似乎具有一定的选择性,中性粒细胞在断尾部位的聚集不受XFBF的影响[图5(e)、(f)]。综上, XFBF选择性

地抑制了斑马鱼尾部截肢模型中炎症引起的巨噬细胞聚集。

通过延时共聚焦成像技术,动态地记录了巨噬细胞在

尾部横切后的迁移过程。结果显示，在使用XFBD处理的斑马鱼中，巨噬细胞向截尾部位移动的速度大大降低，这表明XFBD直接抑制了巨噬细胞的动员[图5 (g)、(h)，附录A中的视频S1、S2]。此外，为了评估药物对断尾后斑马鱼的炎症状态的影响，对IL-6和IL-1 β 的转录水平进行检测，发现在XFBD处理后，这两种促炎症细胞因子的表达都明显减弱[图5 (i)]。

3.7. 多种XFBD中药成分协同作用抑制巨噬细胞迁移

此外，本研究还对XFBD配方中是否存在下调巨噬细胞迁移的协同效应进行研究。从XFBD总溶液中共制备了12种中药提取物，并筛选了每种提取物对巨噬细胞迁移的调节作用。青蒿和麻黄显著抑制了巨噬细胞在断尾部位的富集，白术也显示出轻微的抑制作用，但没有统计学意义[图6 (a)]。

义[图6 (a)]。

炎症的病理过程与中医理论中描述的“热”和“毒”的症状有关。因此，从XFBD总方中选择了有文献记载的具有“清热解毒”功能的药材，并进一步考察其与青蒿和麻黄的协同性。为了确定其协同作用，与每次单一给药相比，大多数药材提取物在组合中的浓度被降低到一半。结果发现，与单独使用任何一种草药相比，青蒿和麻黄的组合显示出卓越的效果。此外，当与白术或虎杖合用时，麻黄在抑制巨噬细胞迁移方面也显示出惊人的效果，这与双倍浓度麻黄单独使用相比具有更强的作用。在麻黄和化橘红的组合中也观察到对巨噬细胞迁移的明显抑制作用[图6 (b)]。综上所述，这些发现有力地证明XFBD配方中不同中药成分之间存在着协同效应。

最后，对XFBD对创伤诱导的巨噬细胞迁移进行负调

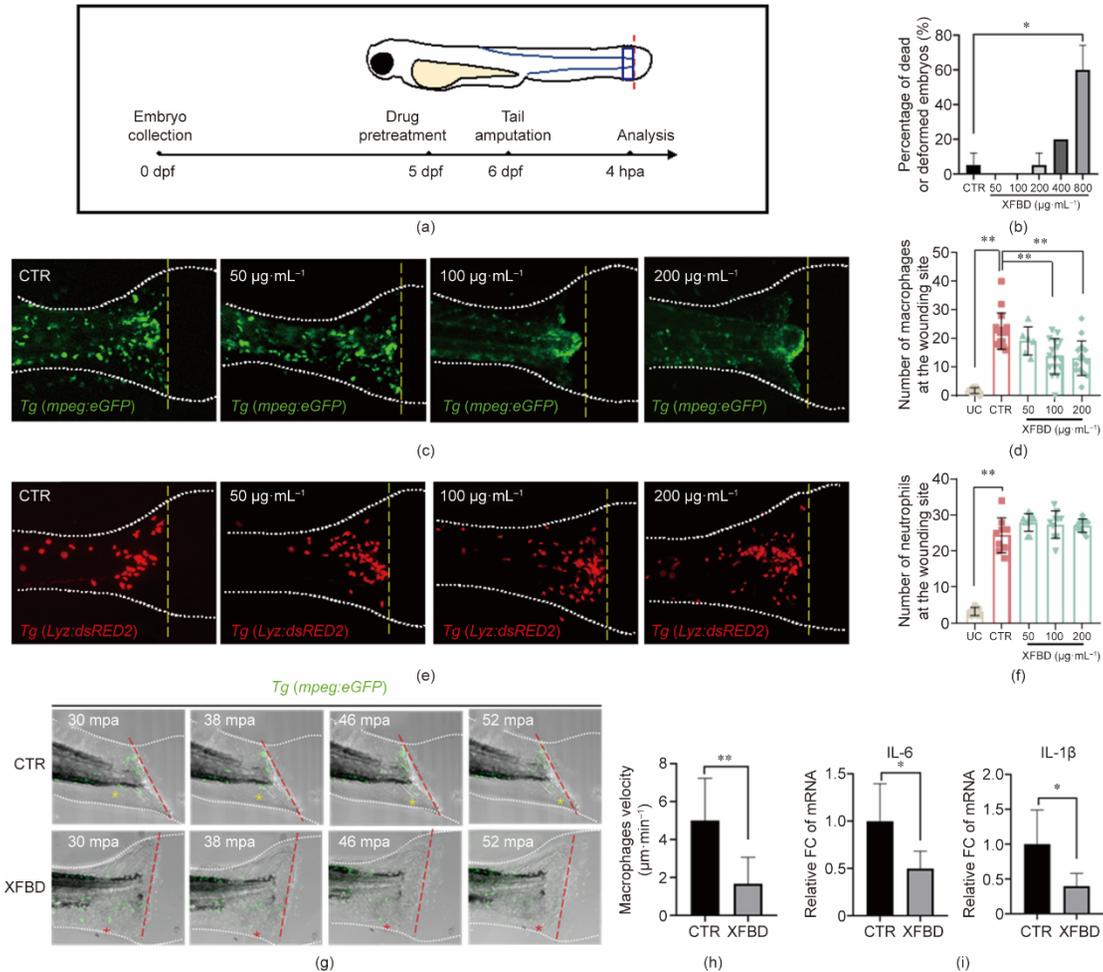


图5. XFBD抑制斑马鱼体内炎症引起的巨噬细胞积聚。(a) 药物保护和断尾造模的时间线图。红色虚线代表截肢部位，蓝色方框代表对招募的炎症细胞进行细胞计数的区域。(b) 不同剂量的XFBD (50~800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对斑马鱼生存和一般发育的毒性影响。(c)、(d) 对照组或经XFBD (50~200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理的斑马鱼断尾部位巨噬细胞积累的代表图像和量化分析。(e)、(f) 对照组或经XFBD (50~200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理的斑马鱼断尾部位中性粒细胞积累的代表图像和量化分析。(g) 对照组和经XFBD (200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理的斑马鱼在断尾后指定时间内巨噬细胞运动的延时成像。(h) 巨噬细胞移动速度的量化分析。(i) 对照或XFBD (200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理的斑马鱼断尾模型中细胞因子IL-6和IL-1 β 的基因表达。在(c)、(e)和(g)中，白色虚线勾勒出斑马鱼的轮廓；黄色(c, e)或红色(g)虚线标记出横切部位；黄色和红色星号标志着代表巨噬细胞的移动轨迹。mpa: 截肢后几分钟；UC: 未断尾的幼鱼；CTR: 未处理的断尾幼鱼；XFBD: 不同剂量的XFBD处理下的断尾幼鱼。 $*P < 0.05$; $**P < 0.01$ 。

控的活性化合物进行筛选。根据单味中药提取物的筛选结果，我们选择了有效的XFBD药材中的9个代表性化合物，并在斑马鱼尾部截肢模型中进行了测试[图6(c)、(d)]。研究发现，麻黄与白术中的麻黄素和白术内酯I，

并在斑马鱼尾部截肢模型中进行了测试[图6(c)、(d)]。研究发现，麻黄与白术中的麻黄素和白术内酯I，

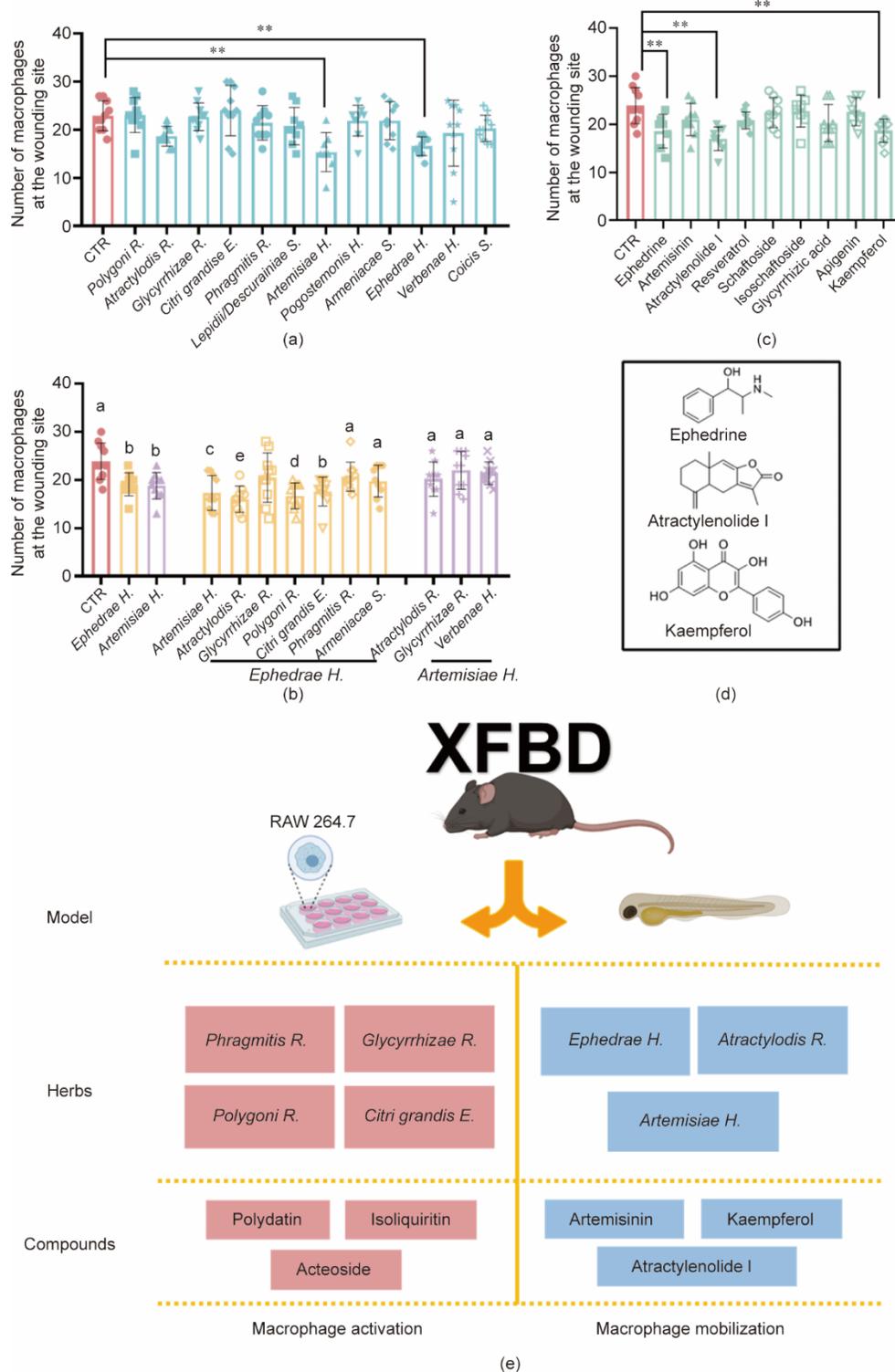


图6. 巨噬细胞迁移模型中筛选XFBD配方的活性中药、中药组合和中药单体化合物。(a)~(c) XFBD中药提取物、中药组合和中药单体化合物处理后斑马鱼截尾部位巨噬细胞数量的量化。药物的详细剂量详见2.9节、2.11节中。 $**P < 0.01$ 。(b)组中无共同字母标记的组差异有统计学意义($P < 0.05$)。(d)显著抑制巨噬细胞富集的化合物的分子结构。(e) XFBD及其成分对巨噬细胞介导的炎症反应的调节作用。红色方框突出了从P2P刺激的RAW 264.7细胞的巨噬细胞激活模型中确定的活性药材；蓝色方框突出了从断尾斑马鱼巨噬细胞迁移模型中确定的活性药材。CTR：不经处理的断尾幼鱼。

在抑制幼鱼中巨噬细胞迁移方面表现出显著的效果。青蒿、麻黄和白术都含有的山奈酚在很大程度上减少了伤口部位积累的巨噬细胞数量。

4. 讨论

尽管目前已经开发了许多针对 COVID-19 的药物，但治疗结果仍不令人满意。研究提示抗埃博拉病毒药物 remdesivir 治疗可使 COVID-19 患者住院时间缩短，但对死亡率并无明显影响[34]。其他多种药物，包括羟氯喹（一抗疟疾药）[35]、洛匹那韦-利托那韦（抗 HIV 药）[36] 和阿奇霉素（抗生素）[36–38]，在治疗 COVID-19 患者中都未观察到相应临床疗效。

SARS-CoV-2 感染会导致免疫反应失调，并伴有急性呼吸窘迫综合征（ARDS），这些现象可直接导致 COVID-19 危重患者呼吸衰竭[39]。细胞因子风暴被认为是 ARDS 的主要原因之一[40]，在部分 COVID-19 患者中，可观察到全身性炎症过激反应，这可能是由细胞因子风暴或巨噬细胞过度激活引起的。小剂量皮质类固醇可下调促炎症细胞因子的表达，加速肺炎中全身性炎症的平息。然而，它们也可能减少病原体清除，增加病毒复制[41–42]。因此，皮质类固醇在 COVID-19 治疗中的应用仍在争论之中[43]。COVID-19 疗法的随机评估（RECOVERY 试验）初步结果表明，DEX 可降低 COVID-19 严重呼吸道并发症患者的 28 天死亡率。然而，DEX 治疗对未接受辅助呼吸的患者没有任何效果[39]。

病理学研究发现，巨噬细胞和单核细胞是 COVID-19 患者肺泡中浸润免疫细胞中最丰富的一组[44]。巨噬细胞是控制感染的关键，其具有吞噬、抗原呈递和分泌细胞因子这三种基本的生物功能[45]。在巨噬细胞中已经确定了两个主要的亚群：经典的活化或炎症性 M1 型巨噬细胞；以及交替活化或抗炎的 M2 型巨噬细胞[46]。M1 型巨噬细胞可以被不同的病理刺激所诱导，如创伤或感染，然后它们积极迁移到受伤部位，并通过分泌细胞因子和细胞毒性功能帮助消除刺激信号。然而，巨噬细胞的过度激活也可能导致高炎症和细胞因子风暴。据报道，COVID-19 患者的 C 反应蛋白（CRP）和细胞因子谱也高度升高，包括 IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-17、IL-8、TNF- α 和趋化因子配体 2（CCL2）[47]。人单核/巨噬细胞是 IL-1 β 和 IL-6 的主要生产者[48]，前者会进一步增强后者的生产。在这些促炎症细胞因子中，IL-6 已被证明会降低自然杀伤细胞的细胞溶解功能，导致先天性和适应性免疫细胞之间的互动延长，最终细胞因子级联的数量增加[49]。因此，常使用外

周血中 IL-6 的浓度来评估患者全身细胞因子反应的严重程度[50]。目前 IL-6（和其他一些细胞因子，包括 IL-1）的拮抗疗法正在开发中，用于治疗免疫失调的 COVID-19 患者。

在中国，除上述药物外，中药已广泛用于治疗新冠肺炎。超过 74 000 名患者接受了中药治疗，多个医疗中心的临床观察显示，总体有效率超过 90%，表现为总恢复时间显著缩短和疾病预后改善[51–52]。根据中医药理论，XFBD 在调节免疫反应、抑制炎症、调节肝脏和胆汁代谢以及支持肺部正常功能方面发挥着作用[6]。然而，与大多数化学药物相比，XFBD 的基本药理机制仍然未知，这主要是与其成分极其复杂有关。面对这一严峻挑战，本研究结合了各种生物和化学技术及模型系统的优势，提出了一种多模式的中药有效成分鉴定研究策略。基于 MS 网络药理学的无偏倚分析，发现 XFBD 针对免疫功能和炎症的调节作用。继而，利用经典小鼠炎症模型，验证了 XFBD 的抗炎作用。转录组检测进一步表明，XFBD 治疗后许多基因的表达发生改变，这些基因与巨噬细胞介导的免疫反应和白细胞迁移息息相关。因此，采用体外细胞模型和体内斑马鱼模型来系统筛选 XFBD 配方中有效成分。值得注意的是，本研究确定了不同 XFBD 中药组分在调节免疫应答发展中两个高度相关的病理过程（巨噬细胞活化和巨噬细胞迁移）中的作用[图 6（e）]。

虎杖、芦根和化橘红等在抑制巨噬细胞活化方面表现出优异的活性，特别是虎杖在治疗炎症和感染表现出显著疗效[53]，本研究也表明虎杖具有显著的抗炎作用。芦根是另一种具有多种功能的草本植物，有报道证明其含有的豆甾-3,5-二烯-7-酮可以通过核因子（NF）- κ B 通路降低 LPS 诱导的巨噬细胞的一氧化氮（NO）、前列腺素 E2 和促炎细胞因子水平[54]。化橘红是一种经典的具有止咳、祛痰、抗炎作用的中药[55–56]，所有的这些功效都与其在治疗呼吸系统疾病中的作用有关。

此外，在多种 XFBD 组分中观察到明显的协同效应，特别是在青蒿、麻黄、白术和虎杖中，它们在抑制巨噬细胞迁移过程中表现出很强协同作用。根据中医药理论，青蒿、虎杖具有清热解毒之功效（“清热解毒”），与现代医学的抗炎过程相呼应。此外，麻黄具有解热和缓解呼吸窘迫的作用，而白术的主要功能在于散寒。这些中药以及其他 XFBD 中药组分的组合，在治疗 COVID-19 患者“湿毒郁肺”（肺湿瘀阻证）症状方面显示出显著的功效。尽管从现代医学和生物科学的角度完全解释中医药理论仍然较为困难，也并不恰当，但我们关于上述中药之间的正向协同作用的观察结果有力地支持了中药配伍理论。

最终, 通过化合物筛选, 我们鉴定出6个能够抑制巨噬细胞活化或迁移的XFBD组分及化合物。虎杖苷是一种用于止咳、调节血脂、降低胆固醇和抗休克的多效化合物, 据报道, 虎杖苷在抑制LPS诱导的RAW 264.7巨噬细胞中NO和前列腺素E₂ (PGE₂)的产生, 以及NF- κ B活化和MAPKs磷酸化方面发挥重要作用[57]。异甘草苷可通过调控巨噬细胞募集和炎症反应促进伤口愈合[58], 并可通过抑制诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 和环氧化酶-2 (COX-2) 的表达来抑制LPS诱导的小鼠巨噬细胞炎症反应[59]。有趣的是, 在LPS处理的RAW 264.7巨噬细胞中, 异甘草苷抑制NK- κ B激酶抑制剂 (IKK)、ERK1/2和p38的磷酸化, 而JNK1/2的磷酸化不受影响[60]。然而, 本研究结果表明, 异甘草苷下调了Poly(I:C)/Pam3CSK4诱导的巨噬细胞上的JNK1/2磷酸化。一种可能的解释是, 不同TLR激动剂诱导的抗炎机制可能不同。

麻黄碱是一种拟肾上腺素药物, 已知具有松弛支气管平滑肌的功能。此外, 在LPS刺激的小鼠模型中, 盐酸麻黄碱对促炎细胞因子的产生具有负调节作用[61]。然而, 由于麻黄碱化学结构属于甲基苯丙胺类, 其使用在许多区域是非法的或受到严格控制。白术内酯I和山奈酚已被确认具有广泛的药理活性, 包括抗炎、抗肿瘤和抗氧化特性。在LPS诱导的小鼠败血症模型中, 经白术内酯I处理的小鼠的促炎症细胞因子 (包括IL-1 β 和IL-6) 水平降低, 存活率显著提高[62]。作为一种低成本的天然膳食黄酮醇, 山奈酚也被广泛用于各种慢性和急性炎症的预防治疗[63]。

然而, 本研究也具有一定的局限性。为了评估XFBD这一复杂的中药配方的多靶点作用, 我们利用多种炎症相关模型筛选了XFBD和XFBD组分的药物作用。然而, 对XFBD或其活性化合物在特定途径上的分子机制的深入研究仍然缺乏, 需要在未来的研究中进一步探索。此外, 尽管采用了网络药理学和转录组学分析的方法来全面了解XFBD的可能作用途径, 但还需要进一步的生物学研究来验证这些预测结果。此外, 值得注意的是, 虽然我们在小鼠血清和肺组织中检测到多种XFBD化合物, 但与体外模型中的有效浓度相比, 其浓度非常低。一个可能的原因是这些化合物的代谢产物也可能在内源性环境中发挥重要的调节作用。此外, 与体外试验相比, 不同有效化合物之间协同合作所需的浓度可能显著低于每种化合物单独使用所需的有效浓度。由于XFBD等典型中药方剂含有大量的化合物, 每一种化合物进入人体后都可能产生数十甚至数百种代谢产物, 因此很难用实验来验证这些假设。在内源性模型系统或器官芯片中开展药物以及多种化合物组合的大

规模药物筛选, 可能有助于在未来更好地诠释中药防病治病的科学内涵。

5. 结论

本研究确定了用于治疗COVID-19的中药XFBD对炎症诱导的巨噬细胞激活的负向调控作用。通过多模态研究方法 (包括基于MS的网络药理学、转录组学分析和多尺度生物测定), 从XFBD方剂中鉴定出单个中药组分、中药组分配伍以及在抑制巨噬细胞介导的免疫反应方面具有活性作用的化合物。这些结果说明了XFBD在炎症调节中的一个关键药理学机制, 这可能有助于理解XFBD在新冠肺炎中的治疗效果。

致谢

本研究工作得到国家重点研发计划 (2020YFA0708004)、国家自然科学基金 (81822047, 31971088) 及组分中药国家重点实验室基金 (CBCM2020104) 资助。作者王毅受国家中医药多学科交叉创新团队基金 (ZYCYXTD-D-202002) 资助。感谢浙江大学药物信息学研究所与Molecular Devices高内涵成像共建示范实验室的支持和帮助。

Compliance with ethics guidelines

Lu Zhao, Hao Liu, Yingchao Wang, Shufang Wang, Dejin Xun, Yi Wang, Yiyu Cheng, and Boli Zhang declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.09.007>.

References

- [1] Asselah T, Durantel D, Pasmant E, Lau G, Schinazi RF. COVID-19: discovery, diagnostics and drug development. *J Hepatol* 2021;74(1):168–84.
- [2] Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* 2021;19(3):141–54.
- [3] Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell* 2021;184(4):861–80.
- [4] www.who.int [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2021 [cited 2021 Sep 22]. Available from: <https://covid19.who.int>.
- [5] Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ; Across

- Speciality Collaboration HLH, UK. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* 2020;395(10229):1033–4.
- [6] Wang Y, Li X, Zhang JH, Xue R, Qian JY, Zhang XH, et al. Mechanism of Xuanfei Baidu Tang in treatment of COVID-19 based on network pharmacology. *China J Chin Mater Med* 2020;45(10):2249–56. Chinese.
- [7] Xiong WZ, Wang G, Du J, Ai W. Efficacy of herbal medicine (Xuanfei Baidu decoction) combined with conventional drug in treating COVID-19: a pilot randomized clinical trial. *Integr Med Res* 2020;9(3):100489.
- [8] Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Oresic M. MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinform* 2010;11:395.
- [9] Myers OD, Sumner SJ, Li S, Barnes S, Du X. One step forward for reducing false positive and false negative compound identifications from mass spectrometry metabolomics data: new algorithms for constructing extracted ion chromatograms and detecting chromatographic peaks. *Anal Chem* 2017;89(17):8696–703.
- [10] Wang M, Carver JJ, Phelan VV, Sanchez LM, Garg N, Peng Y, et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat Biotechnol* 2016;34(8):828–37.
- [11] Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, Ebbert KV, Patel KD, Kubes P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood* 2005;106(7):2417–23.
- [12] Wessels I, Pupke JT, von Trotha KT, Gombert A, Himmelsbach A, Fischer HJ, et al. Zinc supplementation ameliorates lung injury by reducing neutrophil recruitment and activity. *Thorax* 2020;75(3):253–61.
- [13] Andonegui G, Bonder CS, Green F, Mullaly SC, Zbytniuk L, Rahaarjo E, et al. Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. *J Clin Invest* 2003;111(7):1011–20.
- [14] Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stat Soc Ser B* 1995;57(1):289–300.
- [15] Wang S, Wang H, Liu Y, Wang Y, Fan X, Cheng Y. Rapid discovery and identification of anti-inflammatory constituents from traditional Chinese medicine formula by activity index, LC-MS, and NMR. *Sci Rep* 2016;6(1):31000.
- [16] Ellett F, Pase L, Hayman JW, Andrianopoulos A, Lieschke GJ. *mpeg1* promoter transgenes direct macrophage-lineage expression in zebrafish. *Blood* 2011;117(4):e49–56.
- [17] Hall C, Flores MV, Storm T, Crosier K, Crosier P. The zebrafish lysozyme C promoter drives myeloid-specific expression in transgenic fish. *BMC Dev Biol* 2007;7(1):42.
- [18] Westerfield M. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). In: Westerfield M, editor. *The zebrafish book*. Eugene: University of Oregon Press; 2000.
- [19] Yu Y, Chen J, Zhang X, Wang Y, Wang S, Zhao L, et al. Identification of anti-inflammatory compounds from Zhongjing formulae by knowledge mining and high-content screening in a zebrafish model of inflammatory bowel diseases. *Chin Med* 2021;16(1):42.
- [20] Xie Y, Tolmeijer S, Oskam JM, Tonkens T, Meijer AH, Schaaf MJM. Glucocorticoids inhibit macrophage differentiation towards a proinflammatory phenotype upon wounding without affecting their migration. *Dis Model Mech* 2019;12(5):dmm037887.
- [21] Hu W, van Steijn L, Li C, Verbeek FJ, Cao Lu, Merks RMH, et al. A novel function of TLR2 and MyD88 in the regulation of leukocyte cell migration behavior during wounding in zebrafish larvae. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:624571.
- [22] Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010;140(6):805–20.
- [23] Rovas A, Osiaevi I, Buscher K, Sackarnd J, Tepaspe PR, Fobker M, et al. Microvascular dysfunction in COVID-19: the MYSTIC study. *Angiogenesis* 2021;24(1):145–57.
- [24] Jeon JW, Jung JG, Shin EC, Choi HI, Kim HY, Cho ML, et al. Soluble CD93 induces differentiation of monocytes and enhances TLR responses. *J Immunol* 2010;185(8):4921–7.
- [25] Greenlee MC, Sullivan SA, Bohlson SS. Detection and characterization of soluble CD93 released during inflammation. *Inflamm Res* 2009;58(12):909–19.
- [26] Wang H, Zhu J, Liu Z, Lv H, Lv P, Chen F, et al. Silencing of long isoforms of nuclear factor erythroid 2 like 1 primes macrophages towards M1 polarization. *Free Radic Biol Med* 2018;117:37–44.
- [27] Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of doublestranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413(6857):732–8.
- [28] Ting Tan RS, Lin B, Liu Q, Tucker-Kellogg L, Ho B, Leung BPL, et al. The synergy in cytokine production through MyD88-TRIF pathways is co-ordinated with ERK phosphorylation in macrophages. *Immunol Cell Biol* 2013;91(5):377–87.
- [29] Nguyen-Chi M, Laplace-Builhe B, Travnickova J, Luz-Crawford P, Tejedor G, Phan QT, et al. Identification of polarized macrophage subsets in zebrafish. *eLife* 2015;4:e07288.
- [30] Kim HS, Asmis R. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 (MKP-1) in macrophage biology and cardiovascular disease. A redox-regulated master controller of monocyte function and macrophage phenotype. *Free Radic Biol Med* 2017;109:75–83.
- [31] Nakata S, Tsutsui M, Shimokawa H, Tamura M, Tasaki H, Morishita T, et al. Vascular neuronal NO synthase is selectively upregulated by platelet-derived growth factor: involvement of the MEK/ERK pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(12):2502–8.
- [32] Muniyappa H, Das KC. Activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) by widely used specific p38 MAPK inhibitors SB202190 and SB203580: a MLK-3-MKK7-dependent mechanism. *Cell Signal* 2008;20(4):675–83.
- [33] Guo M, Härtlöva A, Gierlin'ski M, Prescott A, Castellvi J, Losa JH, et al. Triggering MSR1 promotes JNK-mediated inflammation in IL-4-activated macrophages. *EMBO J* 2019;38(11):e100299.
- [34] Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, Mehta AK, Zingman BS, Kalil AC, et al. Remdesivir for the treatment of COVID-19—preliminary report. *N Engl J Med* 2020;383(19):1813–36.
- [35] Liu J, Cao R, Xu M, Wang Xi, Zhang H, Hu H, et al. Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection *in vitro*. *Cell Discov* 2020;6(1):16.
- [36] Cao B, Wang Y, Wen D, Liu W, Wang J, Fan G, et al. A trial of lopinavir-ritonavir in adults hospitalized with severe COVID-19. *N Engl J Med* 2020;382(19):1787–99.
- [37] Ledford H. Coronavirus breakthrough: dexamethasone is first drug shown to save lives. *Nature* 2020;582(7813):469.
- [38] Vinez JM. Lack of efficacy of hydroxychloroquine in COVID-19. *BMJ* 2020;369:m2018.
- [39] Horby P, Lim WS, Emberson JR, Mafham M, Bell JL, Linsell L, et al.; RECOVERY Collaborative Group. Dexamethasone in hospitalized patients with COVID-19. *N Engl J Med* 2021;384(8):693–704.
- [40] Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol* 2020;20(6):363–74.
- [41] Montón C, Ewig S, Torres A, El-Ebiary M, Filella X, Rañó A, et al. Role of glucocorticoids on inflammatory response in nonimmunosuppressed patients with pneumonia: a pilot study. *Eur Respir J* 1999;14(1):218–20.
- [42] Russell CD, Millar JE, Baillie JK. Clinical evidence does not support corticosteroid treatment for 2019-nCoV lung injury. *Lancet* 2020;395(10223):473–5.
- [43] Rizk JG, Kalantar-Zadeh K, Mehra MR, Lavie CJ, Rizk Y, Forthal DN. Pharmacomodulatory therapy in COVID-19. *Drugs* 2020;80(13):1267–92.
- [44] Yao XH, Li TY, He ZC, Ping YF, Liu HW, Yu SC, et al. A pathological report of three COVID-19 cases by minimally invasive autopsies. *Chin J Pathol* 2020;49(5):411–7.
- [45] Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 2013;496(7446):445–55.
- [46] Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol* 2018;233(9):6425–40.
- [47] Wan S, Yi Q, Fan S, Lv J, Zhang X, Guo L, et al. Characteristics of lymphocyte subsets and cytokines in peripheral blood of 123 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus pneumonia (NCP). *MedRxiv* 2020.
- [48] Norelli M, Camisa B, Barbiera G, Falcone L, Purevdorj A, Genua M, et al. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells. *Nat Med* 2018;24(6):739–48.
- [49] Crayne CB, Albeituni S, Nichols KE, Cron RQ. The immunology of macrophage activation syndrome. *Front Immunol* 2019;10:119.
- [50] Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, Farrar J, Martin TR, Katze MG. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol Mol Biol Rev* 2012;76(1):16–32.
- [51] www.gov.cn [Internet]. Beijing: The State Council of the People's Republic of China; 2020 [cited 2021 Sep 22]. Available from: http://english.www.gov.cn/news/topnews/202003/23/content_WS5e787a9dc6d0c201c2cbf3b4.html.
- [52] Yang Q, Sun Q, Jiang B, Xu H, Luo M, Xie P, et al. Retrospective clinical study on treatment of COVID-19 patients with integrated traditional Chinese and western medicine. *Chin Tradit Herb Drugs* 2020;51(8):2050–4. Chinese.
- [53] Peng W, Qin R, Li X, Zhou H. Botany, phytochemistry, pharmacology, and potential application of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.: a review. *J Ethnopharmacol* 2013;148(3):729–45.

- [54] Park SJ, Kim YW, Park MK, Byun SH, Kim SC, Lee JR. Anti-inflammatory steroid from *Phragmites Rhizoma* modulates LPS-mediated signaling through inhibition of NF- κ B pathway. *Inflammation* 2016;39(2):727–34.
- [55] Jiang K, Song Q, Wang L, Xie T, Wu X, Wang P, et al. Antitussive, expectorant and anti-inflammatory activities of different extracts from *Exocarpium Citri grandis*. *J Ethnopharmacol* 2014;156:97–101.
- [56] Yuan YP, Zhai HQ, Guo ZJ, Kong LT, Jia XY, Wang NN, et al. Analysis of historical origin and standardization system construction of *Citri Grandis Exocarpium*. *China J Chin Mater Med* 2017;42(11):2214–8. Chinese.
- [57] Lou T, Jiang W, Xu D, Chen T, Fu Y. Inhibitory effects of polydatin on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Inflammation* 2015;38(3):1213–20.
- [58] Liu YY, Wu JQ, Fan RY, He ZH, Li CY, He MF. Isoliquiritin promote angiogenesis by recruiting macrophages to improve the healing of zebrafish wounds. *Fish Shellfish Immunol* 2020;100:238–45.
- [59] Wang R, Zhang CY, Bai LP, Pan HD, Shu LM, Kong AN, et al. Flavonoids derived from liquorice suppress murine macrophage activation by up-regulating heme oxygenase-1 independent of Nrf2 activation. *Int Immunopharmacol* 2015; 28(2):917–24.
- [60] Kim JY, Park SJ, Yun KJ, Cho YW, Park HJ, Lee KT. Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF- κ B in RAW 264.7 macrophages. *Eur J Pharmacol* 2008;584(1):175–84.
- [61] Zheng Y, Guo Z, He W, Yang Y, Li Y, Zheng A, et al. Ephedrine hydrochloride protects mice from LPS challenge by promoting IL-10 secretion and inhibiting proinflammatory cytokines. *Int Immunopharmacol* 2012;13(1):46–53.
- [62] Wang A, Xiao Z, Zhou L, Zhang J, Li X, He Q. The protective effect of atractylenolide I on systemic inflammation in the mouse model of sepsis created by cecal ligation and puncture. *Pharm Biol* 2016;54(1):146–50.
- [63] Ren J, Lu Y, Qian Y, Chen B, Wu T, Ji G. Recent progress regarding kaempferol for the treatment of various diseases. *Exp Ther Med* 2019;18(4):2759–76.