



中药药理与临床

Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica

ISSN 1001-859X, CN 51-1188/R

《中药药理与临床》网络首发论文

题目：基于网络药理学和实验验证探究凉血退紫合剂治疗过敏性紫癜的机制
作者：吴静静，任献青，唐进法，李伟霞，许爽
DOI：10.13412/j.cnki.zyyl.20220419.001
网络首发日期：2022-04-20
引用格式：吴静静，任献青，唐进法，李伟霞，许爽. 基于网络药理学和实验验证探究凉血退紫合剂治疗过敏性紫癜的机制[J/OL]. 中药药理与临床.
<https://doi.org/10.13412/j.cnki.zyyl.20220419.001>



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、外文字母、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。

基于网络药理学和实验验证探究凉血退紫合剂治疗过敏性紫癜的机制*

吴静静^{1,2}, 任献青^{1,2**}, 唐进法¹, 李伟霞¹, 许爽^{1,2}

(¹河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000; ²河南中医药大学儿科医学院, 郑州 450046)

摘要 **目的:** 基于网络药理学和实验验证探究凉血退紫合剂治疗过敏性紫癜的分子机制。**方法:** 运用 TCMSP 平台检索凉血退紫合剂各中药的活性成分及对应靶蛋白, 运用 UniProt 数据库将检索的靶蛋白转化为对应靶基因。分别检索 GeneCards、DisGeNet、OMIM 数据库筛选过敏性紫癜 (Henoch-Schonlein purpura, HSP) 疾病靶点, 绘制维恩图提取凉血退紫合剂治疗 HSP 交集靶点, 即为关键靶点。运用 STRING 数据库对关键靶点进行 PPI 网络构建, 导入 Cytoscape 3.8.2 软件进行可视化分析。运用 DAVID 数据库对关键靶点进行 GO 分析与 KEGG 分析。运用 AutoDock 软件对凉血退紫合剂治疗 HSP 起效的关键靶点与方中中药对应的活性成分进行分子对接, 运用 Pymol 软件进行可视化分析。最后通过 ELISA 及组织病理学检测实验验证网络药理学预测结果。**结果:** 获取凉血退紫合剂活性成分 136 个, 260 个对应的靶基因, HSP 疾病相关靶点 293 个, 得到交集靶点 42 个。对关键靶点进行 PPI 网络构建, Degree 值较高的有: TNF、IL6、IL10、CCL2、VEGFA 等。GO 分析和 KEGG 分析显示关键靶点涉及 TNF 信号通路、PI3K-AKT 信号通路、NF- κ B 信号通路、HIF-1 信号通路、NOD 样受体信号通路等。分子对接结果显示关键靶点与重要活性成分结合构象稳定。实验研究显示凉血退紫合剂能够影响血清免疫球蛋白 A (Immunoglobulin A, IgA)、免疫球蛋白 E (Immunoglobulin E, IgE)、免疫球蛋白 M (Immunoglobulin M, IgM)、血清白介素-5 (interleukin 5, IL-5)、血清白介素-6 (interleukin 6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor-alpha, TNF- α) 和 γ -干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 含量而达到治疗 HSP 的目的。**结论:** 凉血退紫合剂主要通过炎症反应、免疫应答达到治疗 HSP 的作用, 为后续实验奠定一定基础。

关键词 凉血退紫合剂; 过敏性紫癜; 网络药理学; 分子对接; 分子机制

过敏性紫癜 (Henoch-Schonlein purpura, HSP), 又称 IgA 血管炎, 是儿童

*基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: U2004107); 河南省中医药科学研究专项课题 (编号: 2019ZYBJ01); 河南省首批中医药拔尖人才培养项目 (豫中医科教[2018]5 号)。

**通信作者: 任献青, 教授, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 儿童肾脏疾病的中西医结合临床与研究, Email: renxq723@163.com; 作者简介: 吴静静, 博士, 医师, 研究方向: 中医药防治儿童肾脏疾病, Email: jjwu0316@163.com。

时期最常见的全身性小血管炎^[1]，通常以非血小板减少性皮肤紫癜为特征，可伴发严重并发症，包括腹痛、胃肠道出血、肠套叠、肠穿孔、关节痛、关节炎和肾损害等，一年内复发率大约有 30%~40%^[2]。HSP 患儿远期预后与肾脏受累的严重程度有关，高达 50% 的 HSP 患儿在发病后 4~6 周内出现肾脏受累的表现^[3]。HSP 患儿中，即使尿常规检查结果仅少量蛋白尿或结果正常者，均可能存在隐匿肾损害，少数有最终发展为终末期肾病的风险^[4]。由此可见，HSP 严重危害患儿身体健康，对本病早期识别诊断及采取有效的治疗方案，对患儿的远期预后起着至关重要的作用。

凉血退紫方为国家级名老中医丁樱教授经验方，应用于临床近 20 年，疗效显著且无副作用，能够减少过敏性紫癜的复发率，同时降低肾脏损伤发生率，该方目前已完成前期质量标准研究^[5]，成功转化为河南中医药大学第一附属医院院内制剂-凉血退紫合剂，制剂批准文号：豫药制字 Z20200002，同时申请的发明专利正在审批中，凉血退紫合剂药物组成：生地黄、牡丹皮、新疆紫草、白芍、川芎、忍冬藤、络石藤、炙甘草，课题组前期研究通过纳入 100 例血热妄行证过敏性紫癜患儿，经过疗程 8 周的凉血退紫合剂口服治疗，总有效率为 96%，其中临床控制 75 例（75%），显效 12 例（12%），好转 9 例（9%），无效 4 例（4%），本次研究通过网络药理学和实验验证探究凉血退紫合剂治疗 HSP 起效的作用机制，为新药的研制和推广提供客观的理论依据，为后续的进一步深入实验奠定基础及提供新的思路。

1 材料与方

1.1 试验药物 生地黄（批号：1706031）、新疆紫草（批号：1802282）、络石藤（批号：1806082），安徽普仁中药饮片有限公司；牡丹皮（批号：180916）、炙甘草（批号：180916），安徽人民中药饮片有限公司；忍冬藤（批号：1809080172，亳州市沪谯药业有限公司），川芎（批号：171229）、白芍（批号：171010）、干姜片（批号：200401），安徽石田中药饮片有限公司；胡椒（批号：2001131）、葶苈（批号：1908311），安徽普仁中药饮片有限公司。

上述中药材饮片经河南中医药大学第一附属医院药学部陈天朝主任药师鉴定，符合 2015 版《中国药典》一部相关规定。热性药液制备：干姜、葶苈、胡椒饮片用高速万能粉碎机粉碎，过 80 目筛，按干姜-葶苈-胡椒质量比为 1 : 1 : 1 加入

纯净水煎煮，大火煮沸后，文火煮 5 min ~10 min，制成浓度为 0.15 g/mL 水煎液。凉血退紫合剂药液制备：将生地黄、牡丹皮、新疆紫草、白芍和川芎各 116.3 g，忍冬藤和络石藤各 174.4 g，炙甘草 69.8 g，加 10 倍水煎煮两次，每次 1 h，合并煎液滤过，滤液浓缩至适量，浓缩液分别配制为 1.05 g/mL（相当于临床等效剂量的 1、2、4 倍）的药液。

1.2 动物

4 周龄雄性 SPF 级 Wistar 大鼠 50 只，体重（80±20）g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，动物生产许可证号 SCXK（京）2016-0006。试验前适应性饲养 3 d，明暗交替保持 12 h 昼夜节律，自由摄食饮水，饲养温度 21℃ ~ 27℃，相对湿度 40% ~ 70%，实验方案由河南中医药大学第一附属医院伦理委员会批准，批准编号为：YFYDW2020003。

1.3 试剂

卵白蛋白（OVA）（批号：SLCC7169）、弗氏完全佐剂（FCA）（批号：SLCC8269），SIGMA 公司；大鼠酶联免疫吸附（ELISA）试剂盒：IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IgA、IgE、IgM、IFN- γ 、TNF- α （批号：Oct 2020），上海茁彩生物科技有限公司。

1.4 仪器

酶标仪 Multiskan FC（Thermo 赛默飞世尔科技有限公司）；正置白光拍照显微镜（Eclipse Ci-L Nikon）；扫描浏览软件（CaseViewer2.4 3DHISTECH）；全景切片扫描仪（PANNORAMIC DESK/MIDI/250/1000 3DHISTECH）；手提式高速分散器（S10 宁波新芝公司）；涡旋混匀器（Vortex Genius 3 德国 IKA® 公司）。1.5 方法

1.5.1 凉血退紫合剂活性成分及靶点筛选

运用中药系统药理学数据库和分析平台 TCMSP（<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>），分别检索凉血退紫合剂各中药的活性成分，以口服生物利用度（oral bioavailability, *OB*） $\geq 30\%$ 和类药性（drug-likeness, *DL*） ≥ 0.18 为筛选标准^[6]，预测各中药的活性成分。对符合筛选标准的活性成分，利用 TCMSP 分别检索其对应的靶蛋白。运用 UniProt 数据库（<https://www.uniprot.org/>）将检索的靶蛋白转化为对应靶基因。

1.5.2 HSP 疾病相关靶点预测

以“Henoch Schonlein purpura”为检索词，分别检索 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org>)、DisGeNet 数据库 (<https://www.disgenet.org/>)、OMIM 数据库 (<https://www.omim.org>)，将上述各数据库检索结果合并后删除重复值，最终得到 HSP 疾病相关靶点。

1.5.3 凉血退紫合剂治疗 HSP 关键靶点提取及 PPI 网络构建

将凉血退紫合剂各中药活性成分对应的靶基因与 HSP 疾病相关靶点进行维恩图绘制，提取交集靶点^[7]，即为凉血退紫合剂治疗 HSP 的关键靶点。将关键靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org>) 绘制蛋白互作网络图 (protein-protein interaction, PPI)，展示靶点之间的相互作用关系。将构建好的 PPI 网络导入 Cytoscape 3.8.2 软件 (<http://cytoscape.org/>)，利用 Network Analyzer 插件进行可视化分析。

1.5.4 GO 分析与 KEGG 分析

将凉血退紫合剂治疗 HSP 起效的关键靶点导入生物学信息注释数据库 DAVID (<http://david.nifcrf.gov/>) 进行 GO 功能富集分析与 KEGG 通路富集分析。对关键靶点涉及的生物过程、细胞成分、分子功能及信号通路进行预测

1.5.5 “中药-活性成分-关键靶点-信号通路”网络构建

为明确信号通路与关键靶点之间的关系，运用 Cytoscape 3.8.2 软件，将凉血退紫合剂中各中药、中药活性成分及凉血退紫合剂治疗 HSP 起效的关键靶点和重要信号通路导入，构建“中药-活性成分-关键靶点-信号通路”网络，并利用 Network Analyzer 插件进行拓扑属性分析。

1.5.6 分子对接

对凉血退紫合剂治疗 HSP 起效的关键靶点与方中中药对应的活性成分进行分子对接验证，在 ZINC 数据库 (<http://zinc.docking.org/>) 中下载活性成分的 mol2 文件，在 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中下载靶基因的 3D 结构，保存为 pdb 文件，运用 AutoDock 软件对下载好的靶蛋白结构和小分子配体进行对接，依据结合能来评价靶蛋白与配体结合的稳定性，并运用 Pymol 软件进行可视化分析。

1.5.7 验证试验

大鼠称重后，随机分为正常对照组 8 只、模型对照组 13 只、凉血退紫合剂

10.5、21、42 g/kg 组各 13 只。HSP 动物模型复制^[8]：造模大鼠灌胃干姜-萆薢-胡椒水煎液 0.15 g/kg，连续给药 3 周，1 次/d，正常对照组大鼠灌胃同等体积的生理盐水。在 4~6 周第一天，造模大鼠腹腔注射卵白蛋白与弗氏完全佐剂混合乳液（10 mg/kg），正常对照组大鼠腹腔注射同等体积的生理盐水，连续 3 周。第 3 次腹腔注射卵白蛋白乳液后间隔 3 d，造模大鼠背部皮肤脱毛，分 5 点皮内注射 1 mL 0.3% 的卵白蛋白生理盐水溶液，正常对照组注射生理盐水。从第 6 周开始各给药组灌胃相应药物，连续 9 d，正常对照、模型对照组灌胃生理盐水。第 7 周第一天下午 5 点，造模组尾静脉注射 0.25 mL 卵白蛋白生理盐水溶液（10 mg/kg）建立模型。

1.5.7.1 取材 末次给药后，禁食不禁水 12 h，大鼠腹主动脉取血，离心 10 min（3 500 r/min），吸取血清上清液于 -80℃ 冰箱保存至分析，取舌、肾、脾、小肠、背部皮肤，生理盐水清洗，吸干水分，用 10% 福尔马林固定。

1.5.7.2 指标观察 一般状态观察：观察记录各组大鼠的精神状态、进食进水量、毛发光泽、粪便形态、背部皮肤状况等外观形态。ELISA 指标检测：按照 ELISA 试剂盒说明书操作，检测血清中 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IgA、IgE、IgM、IFN- γ 、TNF- α 的含量。根据标准品的浓度及对应的 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程，根据样品的 OD 值在回归方程上计算出对应的样品浓度。组织病理学检测：在观察内脏形态后，将大鼠舌、肾、脾、小肠、背部皮肤甲醛固定的样本送检于武汉赛维尔生物科技有限公司，经 4% 多聚甲醛固定，固定状态良好后，严格按照病理实验检测标准操作程序进行修剪、脱水、包埋、切片、HE 染色、封片最后镜检合格的样片，于光镜下观察各组织的病理改变。

1.5.8 统计学分析

使用 SPSS v 16.0 和 GraphPad Prism 8 软件进行统计学处理和作图，组间比较采用单因素方差分析， $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学预测

2.1.1 凉血退紫合剂活性成分及靶点筛选

在 TCMSP 数据库中分别检索凉血退紫合剂各中药的活性成分，依据 $OB \geq 30\%$ 且 $DL \geq 0.18$ 进行筛选，并通过查阅相关文献，最终得到凉血退紫合剂有效活

性成分共 136 个。进一步在 TCMSP 数据库检索各活性成分对应的靶蛋白，并在 Uniprot 数据库中将靶蛋白转化为对应的靶基因，合并去重后得到凉血退紫合剂活性成分对应的靶基因共 260 个。

2.1.2 HSP 疾病相关靶点筛选

以“Henoch Schonlein purpura”为检索词，分别检索 GeneCards 数据库、DisGeNet 数据库、OMIM 数据库，上述各数据库依次得到 HSP 疾病相关靶点 114 个、198 个、25 个，将各检索结果合并后删除重复值，最终得到 HSP 疾病相关靶点 293 个。

2.1.3 凉血退紫合剂治疗 HSP 关键靶点筛选及 PPI 网络绘制

将凉血退紫合剂中各中药活性成分对应的靶基因 260 个，与 HSP 疾病相关靶点 293 个，进行维恩图绘制，得到交集靶点 42 个，即为凉血退紫合剂治疗 HSP 起效的关键靶点。见图 1。

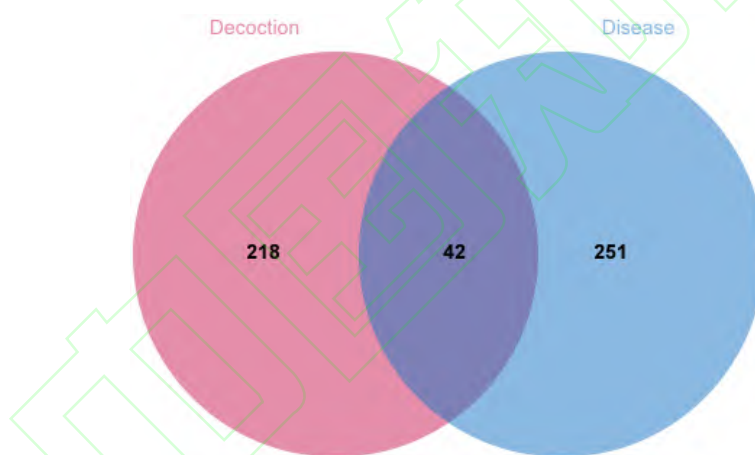


图 1 凉血退紫合剂-HSP 交集靶点维恩图

运用 STRING 数据库，对获得的 42 个关键靶点构建 PPI 网络，得到包含 42 个节点，522 条边，平均节点数 24.9，平均局部聚类系数 0.795 的蛋白互作网络图，详见图 2。将上述 PPI 网络涉及数据以“tsv”文件的形式保存，导入 Cytoscape

3.8.2 软件，利用 Network Analyzer 插件进行可视化分析，详见图 3。该图像显示节点 (node) 越大则 degree 值越高；边 (edge) 越粗则结合分数值越大，该边连接的两个靶点紧密度越高。Degree 值较高的前 10 位靶点基因依次为：IL6 (Degree=38)；TNF (Degree=37)；VEGFA (Degree=36)；IL10 (Degree= 35)；

CCL2、MMP9、PTGS2、CXCL8 (Degree=34); MAPK3、TP53 (Degree=33)。
由此推测，这些靶点可能在凉血退紫合剂治疗 HSP 中起着重要作用。

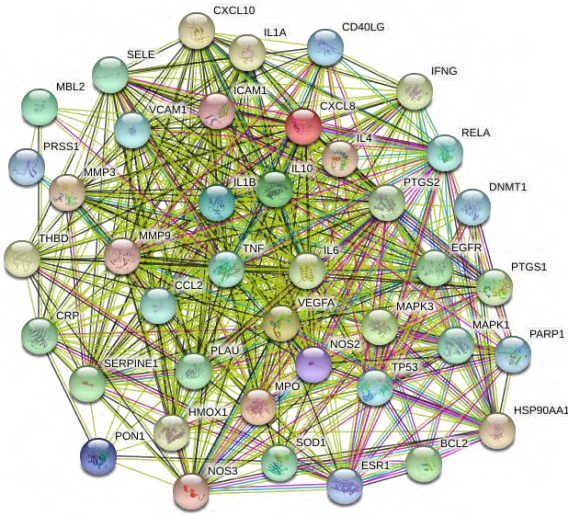


图 2 凉血退紫合剂治疗 HSP 关键靶点 PPI 网络图

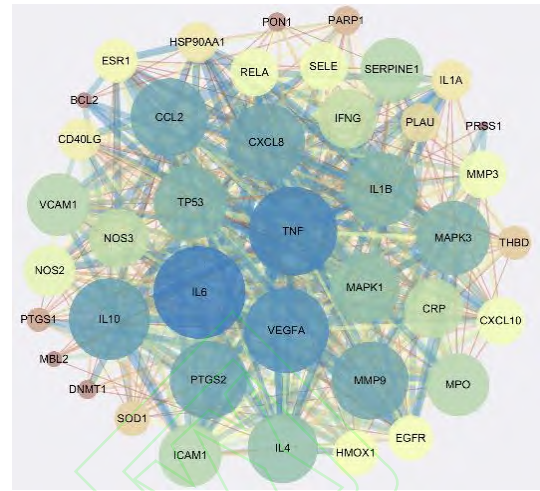


图 3 凉血退紫合剂治疗 HSP 关键靶点网络可视化分析

2.1.4 凉血退紫合剂治疗 HSP GO 富集分析

将凉血退紫合剂治疗 HSP 起效的 42 个关键靶点导入 DAVID 数据库，进行基因本体 (gene ontology, GO) 富集分析，筛选 $P < 0.05$ 的条目共 248 条，包括生物过程 (Biological process, BP) 196 条，细胞成分 (cellular component, CC) 18 条，分子功能 (molecular function, MF) 34 条。各条目按照富集程度排序，其中 BP 涉及聚合酶 II 启动子转录的正向调节 (positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter)、炎症反应 (inflammatory response)、免疫应答 (immune response)、凋亡过程负调控 (negative regulation of apoptotic process)、信号转导 (signal transduction); CC 涉及胞外空间 (extracellular space)、胞外区 (extracellular region)、膜 (membrane)、细胞表面 (cell surface)、小凹 (caveola)、细胞质核周区 (perinuclear region of cytoplasm); MF 涉及蛋白质结合 ((protein binding))、细胞因子活性 (cytokine activity)、蛋白质同二聚化活性 (protein homodimerization activity)、转录因子结合 (transcription factor binding)、酶结合 (enzyme binding)、受体结合 (receptor binding) 等。见图 4。

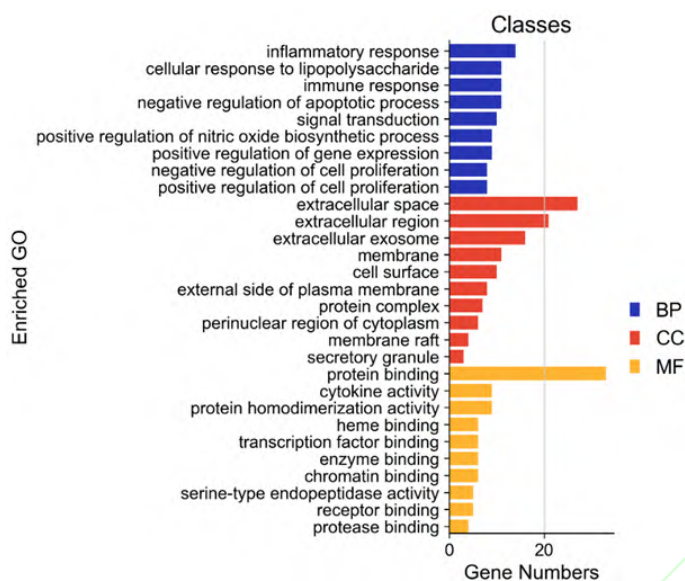


图 4 凉血退紫合剂治疗 HSP 关键靶点 GO 富集分析

2.1.5 凉血退紫合剂治疗 HSP KEGG 通路分析

运用 DAVID 数据库，对 42 个关键靶点进行京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路分析，筛选 $P < 0.05$ 的条目共 85 条，按富集程度排序，详见表 4。富集程度较高的条目包括：TNF 信号通路 (TNF signaling pathway)、HIF-1 信号通路 (HIF-1 signaling pathway)、细胞因子-细胞因子受体相互作用 (Cytokine-cytokine receptor interaction)、PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)、NF- κ B 信号通路 (NF-kappa B signaling pathway)、NOD 样受体信号通路 (NOD-like receptor signaling pathway)、T 细胞受体信号通路 (T cell receptor signaling pathway)、Toll 样受体信号通路 (Toll-like receptor signaling pathway)、MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway)、趋化因子信号通路 (Chemokine signaling pathway)、HTLV-1 感染 (HTLV-I infection)、FoxO 信号通路 (FoxO signaling pathway)、Ras 信号通路 (Ras signaling pathway) 等。见图 5。

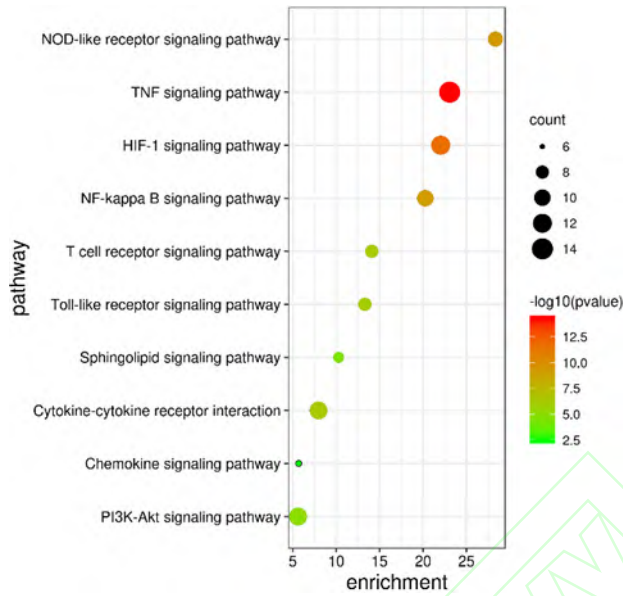


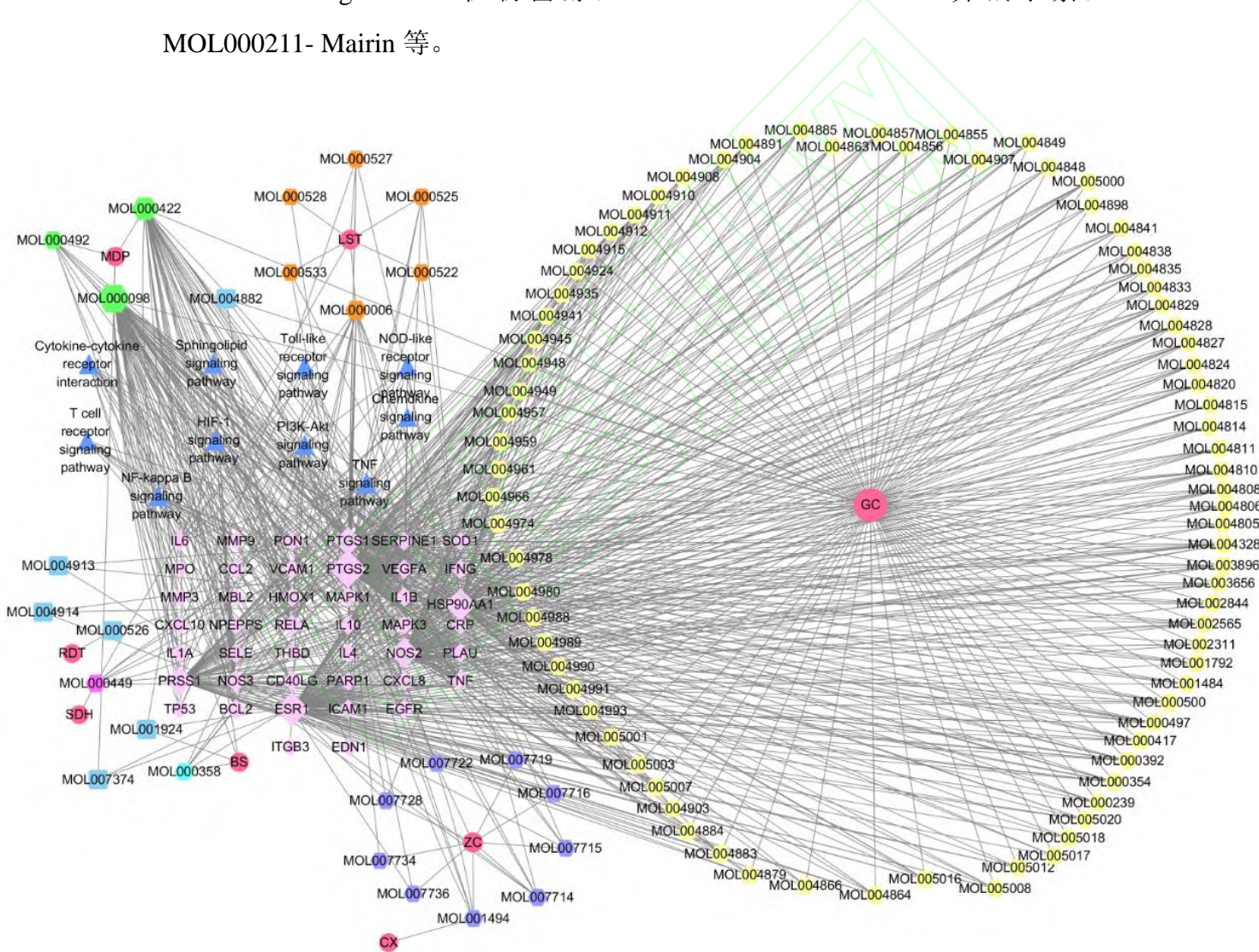
图 5 凉血退紫合剂治疗 HSP 关键靶点 KEGG 通路分析

表 1 凉血退紫合剂治疗过敏性紫癜起效的关键靶点的京都基因和基因组百科全书通路

编号	信号通路	度值	靶点	P 值
hsa04668	TNF signaling pathway	14	VCAM1, MMP3, PTGS2, SELE, TNF, MMP9, RELA, ICAM1, CXCL10, IL6, IL1B, CCL2, MAPK1, MAPK3	5.77E-15
hsa04066	HIF-1 signaling pathway	12	BCL2, MAPK1, HMOX1, RELA, EGFR, MAPK3, VEGFA	1.92E-12
hsa04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	11	IL10, IL4, IL1A, CXCL10, IL6, CXCL8, CD40LG, IFNG, IL1B, CCL2, TNF	4.97E-07
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	11	IL4, IL6, HSP90AA1, NOS3, BCL2, MAPK1, TP53, RELA, EGFR, MAPK3, VEGFA	1.19E-05
hsa04064	NF-kappa B signaling pathway	10	VCAM1, CXCL8, CD40LG, PLAU, IL1B, BCL2, PTGS2, TNF, RELA, ICAM1	6.56E-10
hsa04621	NOD-like receptor signaling pathway	9	IL6, HSP90AA1, CXCL8, IL1B, MAPK1, CCL2, TNF, RELA, MAPK3	4.65E-10
hsa04660	T cell receptor signaling pathway	8	IL10, IL4, CD40LG, IFNG, MAPK1, TNF, RELA, MAPK3	9.69E-07
hsa04620	Toll-like receptor signaling pathway	8	CXCL10, IL6, CXCL8, IL1B, MAPK1, TNF, RELA, MAPK3	1.44E-06
hsa04071	Sphingolipid signaling pathway	7	NOS3, BCL2, MAPK1, TNF, TP53, RELA, MAPK3	4.35E-05
hsa04062	Chemokine signaling pathway	6	CXCL10, CXCL8, MAPK1, CCL2, RELA, MAPK3	0.003331

2.1.6 凉血退紫合剂治疗 HSP 活性成分-关键靶点-信号通路网络

将凉血退紫合剂中药，对应活性成分，治疗 HSP 起效的关键靶点，重要信号通路导入 Cytoscape 3.8.2 软件，绘制网络图，并利用 Network Analyzer 插件进行可视化分析，该网络包含 167 个节点，795 条作用关系，利用 Network Analyzer 插件进行可视化分析，见图 6。可见甘草对应的活性成分最多，其次为紫草，络石藤；Degree 值排名靠前的中药活性成分包括：MoL000098-quercetin-槲皮素、MoL000422- kaempferol- 山柰酚， MoL000492-(+)-catechin- 儿茶素、MoL000449-Stigmasterol- 植物甾醇， MoL000354- isorhamnetin- 异鼠李素，MOL000211- Mairin 等。



红色圆形：中药；环绕红色圆形图标排列的各色六边形：各中药相对应的活性成分；粉色菱形：关键靶点；蓝色三角形：信号通路；图中节点与其他节点之间的连线越密集，说明该节点起到的作用越为关键。白芍：BS；川芎：CX；甘草：GC；络石藤：LST；牡丹皮：MDP；生地黄：SDH；紫草：ZC。

图 6 凉血退紫合剂治疗 HSP -活性成分-信号通路-关键靶点网络图

2.1.7 分子对接

运用 Autodock 软件,对 PPI 网络中 Degree 值排名前 10 位的靶点(IL6、TNF、VEGFA、IL10、CCL2、MMP9、PTGS2、CXCL8、MAPK3、TP53)与凉血退紫合剂组方中药对应的 Degree 值排名靠前的活性成分进行分子对接验证,对接结果显示,与 IL10 结合较好的小分子有: MOL000211- Mairin, 结合能为-5.33 kcal/mol, 在 CYS-62、LEU-65、PRO-113 和 LEU-23 处形成氢键; MOL000449-Stigmasterol, 结合能为-5.94 kcal/mol, 在 LEU-23、LEU-65、LEU-105 和 LEU-112 处形成氢键。见图 7。

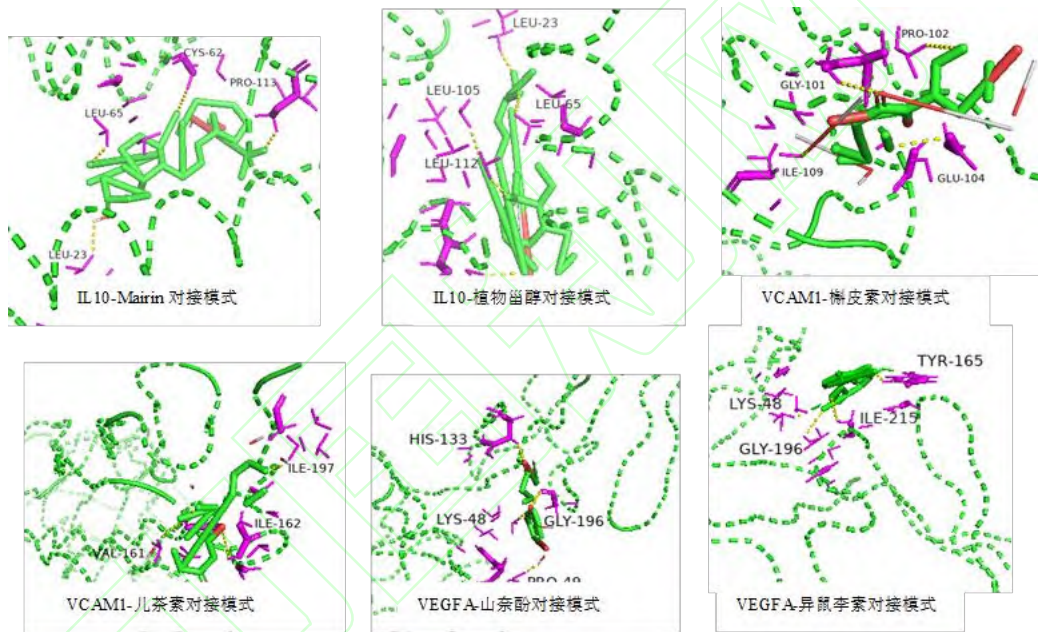
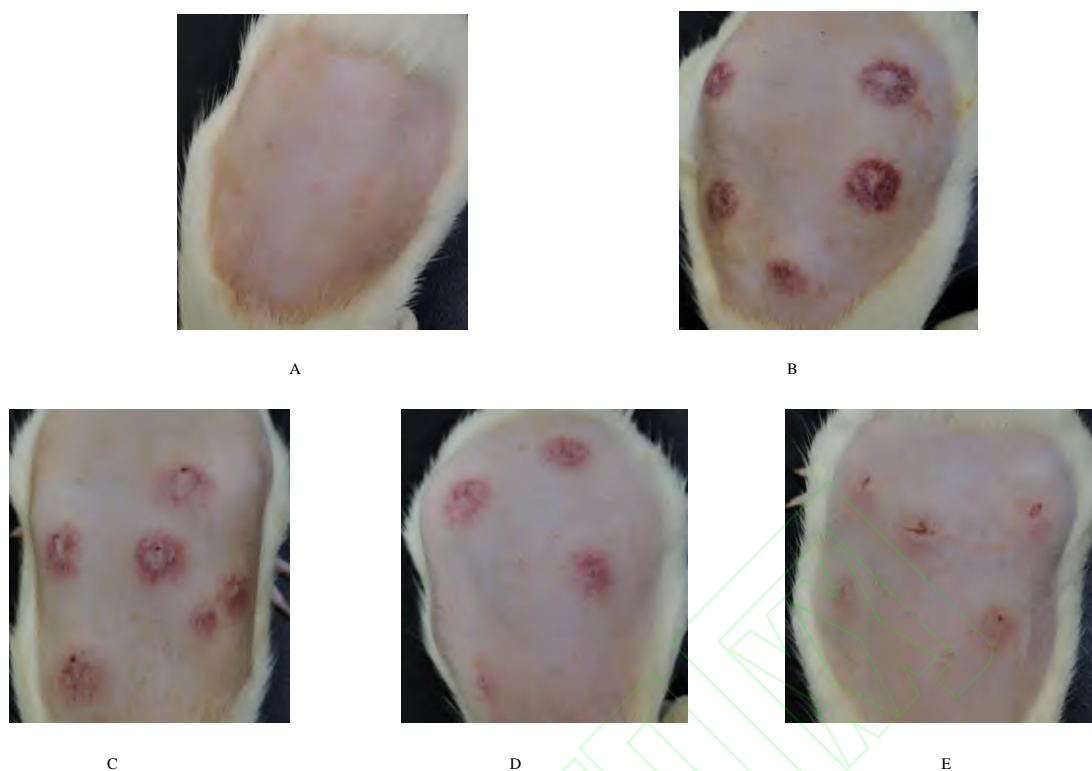


图 7 凉血退紫合剂中药活性成分与治疗 HSP 起效的关键靶点分子对接模式图

2.2 验证试验

2.2.1 卵白蛋白溶液对 HSP 大鼠外观形态的影响

与正常对照组比较,模型对照组大鼠毛发几乎无光泽,多见烦躁,进食量大、喜饮,粪便形态较硬,注射部位皮肤出现红色斑块,伴周围红肿,可见脾脏、肾脏粘膜增厚,形态增大;凉血退紫合剂各剂量组光泽较差,精神状态、进食饮水基本正常,红色斑块较模型对照组直径减小且色浅,脾脏、肾脏增厚不明显,形态基本正常,造模成功率为 90%。见图 8。



A: 正常对照; B: 模型对照; C: 凉血退紫合剂 10.5 g/kg; D: 凉血退紫合剂 21 g/kg; E: 凉血退紫合剂 42 g/kg

图 8 凉血退紫合剂对 HSP 大鼠模型皮肤的影响

2.2.2 凉血退紫合剂对 HSP 大鼠模型血清免疫因子和炎症因子的影响

与正常对照组比较，模型对照组大鼠血清免疫因子明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，TNF- α 含量显著升高 ($P < 0.01$)，IFN- γ 含量显著降低 ($P < 0.01$)；与模型对照组比较，凉血退紫合剂各剂量组大鼠血清中 IgA、IgE、IgM、IL-5、IL-6 和 TNF- α 的含量明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，IFN- γ 的含量明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2、3。

表 2 凉血退紫合剂对 HSP 大鼠模型血清免疫因子的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂 量 (g/ kg)	免疫球蛋白 A (ug/ml)	免疫球蛋白 E (ug/ml)	免疫球蛋白 M (ug/ml)	白介素 5 (pg/ml)	白介素 6 (pg/ml)
正常对照		14.49 \pm 6.18**	1.80 \pm 0.53**	90.74 \pm 24.60**	3.99 \pm 1.14*	5.84 \pm 1.79**
模型对照		23.55 \pm 3.19	2.64 \pm 0.15	136.95 \pm 21.26	6.67 \pm 2.21	8.50 \pm 1.40
凉血退紫	10.5	12.03 \pm 3.81**	1.82 \pm 0.28**	84.29 \pm 22.75**	5.34 \pm 0.34	5.61 \pm 1.30**
凉血退紫	21	14.33 \pm 3.01**	1.76 \pm 0.49**	83.64 \pm 14.71**	3.15 \pm 1.63**	4.95 \pm 0.84**

凉血退紫 42 23.26±7.49 2.68±0.52 128.41±32.91 3.50±1.00** 6.17±1.96**

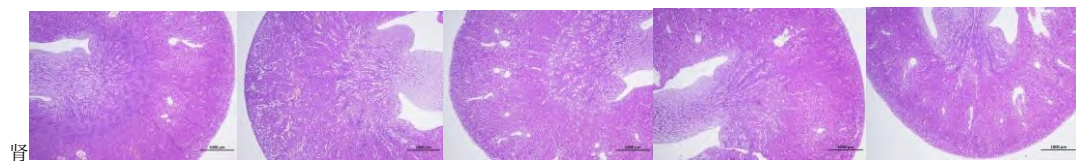
与模型对照组比较* $P<0.05$, ** $P<0.01$ (下同)。

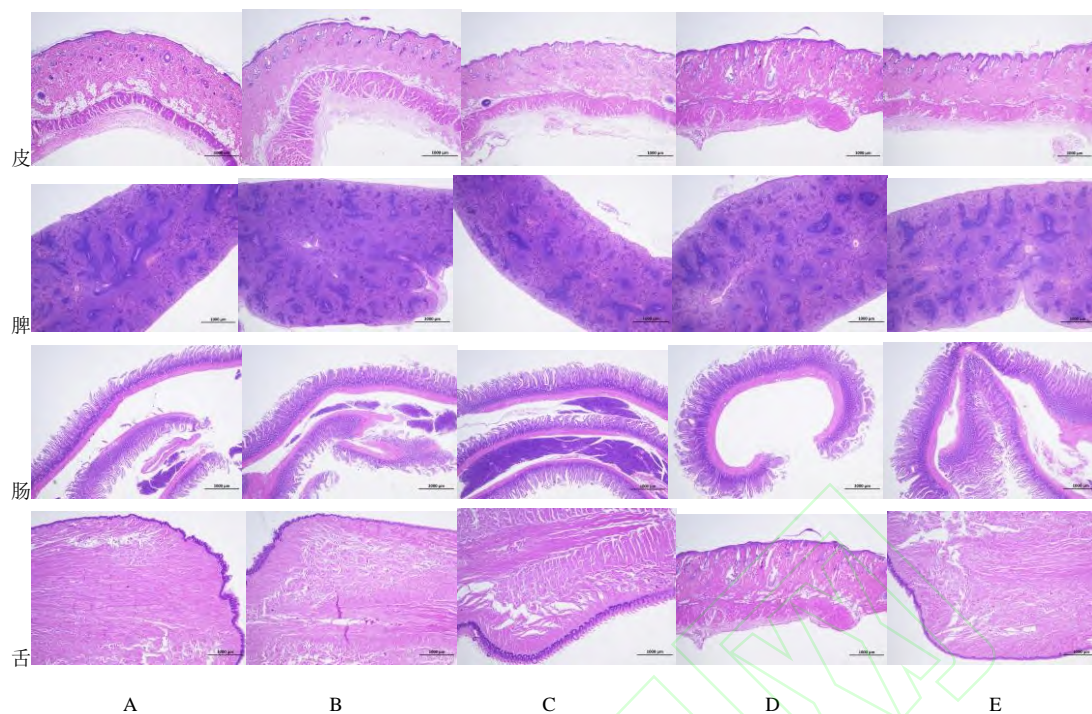
表 3 凉血退紫合剂对 HSP 大鼠模型血清炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量 (g/kg)	抗肿瘤坏死因子- α (pg/ml)	γ -干扰素 (pg/ml)	白介素 4 (pg/ml)	白介素 10 (pg/ml)
正常对照		30.62±8.54**	214.22±15.78**	5.92±1.59	6.36±0.43
模型对照		58.05±9.69	166.80±31.01	7.97±1.92	6.32±0.33
凉血退紫	10.5	43.82±3.52*	229.13±17.86**	7.02±1.29	6.38±0.33
凉血退紫	21	38.79±11.14**	183.12±12.38	6.02±1.87	6.27±0.42
凉血退紫	42	43.85±9.60**	216.31±24.63**	8.83±2.04	6.93±1.40

2.2.3 凉血退紫合剂对 HSP 大鼠模型组织病理的影响

空白对照组大鼠肾表面光滑，颜色浅褐，皮、髓质分界清晰；模型组皮、髓分界模糊，肾盂轻度扩张，髓质受到挤压变窄，肾小管及集合管轻度扩张，上皮扁平化，肾小管内可见嗜酸性物质；给药凉血退紫合剂后仍有嗜酸性物质，扩张稍有减轻，均未见明显的炎性改变。空白对照组脾脏组织表面被膜均匀，白髓与红髓分界清晰；模型组脾脏白髓与红髓分界清晰，组织被膜局部增厚，结缔组织增生并伴有多量的炎性细胞浸润，白髓数量丰富、形状不规则、边缘带明显，见有髓窦扩张；给药凉血退紫合剂后偶见结缔组织增生并伴有多量的炎性细胞浸润红髓偶见多量的髓外造血细胞，可见多量的粒细胞浸润。空白对照组背部皮组织细胞形态结构正常，未见明显的炎性改变；模型组非卵蛋白溶液注射部位表皮层轻度增厚，角质层大面积角化不全，未见明显的炎性改变；给药凉血退紫合剂后，偶见表皮层增厚或角化不全，未见明显出血点和炎性改变。空白对照及模型组舌体均未见明显异常，小肠各层结构清晰，可见大量的肠绒毛顶端上皮细胞脱落或缺失，均未见明显的炎性改变，给药凉血退紫合剂前后基本无差别，各组织给药凉血退紫合剂无明显剂量差异。见图 9。





A: 正常对照; B: 模型对照; C: 凉血退紫合剂 10.5 g/kg; D: 凉血退紫合剂 21 g/kg; E: 凉血退紫合剂 42 g/kg.

图 9 凉血退紫合剂对 HSP 大鼠模型各组织病理的影响 (HE, $\times 200$)

3 讨论

HSP 在儿童中的年发病率为 15/100000^[9], 虽多数预后良好, 但病程迁延, 病情易反复, 复发间隔时间数周至数月不等, 可反复发作持续 1 年以上^[10], 本病常常伴随消化道症状、关节症状及肾脏损伤, 大约 1% 的患者进展为终末期肾病 (end-stage renal disease, ESRD) 而需要肾移植^[11], 对患者身心健康造成巨大的危害, 给家庭带来沉重的负担。HSP 发病机制尚未完全明了, 其病理特点为较广泛的急性无菌性毛细血管和小动脉的炎性反应, 细胞免疫、体液免疫紊乱与 HSP 发病密切相关^[12], 一些细胞因子进一步刺激凝血系统的激活, 凝血系统的主要成分又促进炎症反应的发生、发展^[13], 炎症反应在发病过程中起着至关重要的作用^[14]。既往研究表明, 大多数 HSP 患儿发病前出现上呼吸道感染, 感染是本病的重要触发因素; 其中 IgA 在整个病程中发挥了重要作用, 由感染、过敏原或药物引起的 IgA 类免疫复合物和补体 C3 沉积于皮肤、关节、胃肠道和肾脏毛细血管^[15], 过敏原与肥大细胞表面的 IgE 结合沉积于血管内膜并激活补体从而

释放炎性介质，致使小血管炎性损害^[16]，内皮细胞在血管损伤的局部免疫和炎症调节中起关键作用，内皮细胞的损伤或凋亡使其丧失屏障功能的完整性，增加内皮的通透性，进而导致全身免疫性疾病如血管炎的发生，而 TNF- α 等炎症介质的变化可在一定程度上反应血管内皮损伤的程度^[17]。综上，体液免疫紊乱、细胞免疫失衡、凝血机制异常、炎症反应、血管内皮细胞凋亡均与 HSP 发病密切相关。治疗上，西医治疗本病一般运用糖皮质激素、抗凝剂或抗血小板聚集药物、血管紧张素转换酶抑制剂或血管紧张素受体拮抗剂、免疫抑制剂等^[18]，副作用较大；中医治疗本病具有潜在优势，但中药复方具有多成分、多靶点、多作用通路协同起效的特点，药效物质基础及作用机制不明确，一定程度上局限了其推广应用。中药网络药理学建立了一种新的研究范式，基于高通量数据分析，筛选中药复方中具有协同作用的化合物，阐明中药复方组方规律和网络调控作用^[19]，为研究中药复方的作用机制提供了新的思路。

本研究运用网络药理学，筛选凉血退紫合剂活性成分 136 个，包括豆甾醇 (sitosterol)、植物甾醇 (Stigmasterol)、Mairin、山柰酚 (kaempferol)、儿茶素 ((+)-catechin)、槲皮素 (quercetin)、乙酰紫草素 (acetylshikonin)、柚皮素 (naringenin)、木犀草素 (luteolin)、异鼠李素 (isorhamnetin) 等，分属黄酮类、萜类、木酚素、植物甾醇等。山柰酚药理作用广泛，具有抗炎、抗氧化、抗癌、免疫调节等多种保护作用。山柰酚通过不同的机制发挥作用：诱导细胞凋亡，降低细胞活力，下调 PI3K/AKT 和 HTLV-I 信号通路，抑制蛋白表达及转移相关标记，如 MMP-2^[20]。有研究证实，山柰酚可明显降低 iNOS、COX2、NF- κ B 炎症因子的表达，减轻 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞炎症反应^[21]。儿茶素可抑制促氧化酶，如 NADPH-氧化酶；或调节配体与受体的相互作用，如 TNF- α ；也可抑制许多氧化应激相关通路的炎症反应过程^[22]。槲皮素与儿茶素具有协同抗氧化应激的作用，它们之间可能通过相互作用共同参与构建协同保护细胞抗氧化应激的调控网络，对维持细胞氧化还原稳态起重要作用^[23]。乙酰紫草素通过抑制 TNF- α 启动而减轻角叉菜胶诱导的急性炎症反应^[24]。有研究认为，乙酰紫草素的抗炎作用与抑制 NO、PGE2 和诱导 iNOS 通过 NF- κ B 通路有关^[25]。柚皮素作用于巨噬细胞，诱导 Nrf2 激活，Nrf2 是一种核因子，可诱导抗氧化和抗炎反应，诱导 HO-1 表达^[26]。有研究证实低剂量木犀草素可抑制 NLRP3 炎性体的激活，促进

巨噬细胞向 M2 表型极化，为木犀草素的抗炎活性提供了新的证据^[27]。异鼠李素可能通过灭活 NF- κ B 信号通路，拮抗 TLR4 和消除 ROS 积累，从而抑制 BV2 小胶质细胞中 LPS 介导的炎性反应^[28]。芍药苷具有抗炎作用，能够下调 TNF- α 和 IL6 水平^[29]，降低炎性因子 IL-8 和炎症介质 COX-2 的表达，抑制炎症信号通路 NF- κ B 的活化^[30,31]。由此可见，以上活性成分在凉血退紫合剂治疗 HSP 起效的过程中发挥了重要的作用。

本研究结果显示，凉血退紫合剂治疗 HSP 起效的关键靶点有：IL6、TNF、IL10、VEGFA、CCL2、MMP9、PTGS2、CXCL8、MAPK3、TP53 等，既往研究证实，与健康儿童相比，HSP 患儿 IL-6、TNF- α 水平均升高，HSP 患儿急性期可能参与炎症和氧化应激反应，而炎症和氧化应激反应的强度与肾脏受累的程度有关^[32]。此外，HSP 病程中 IL-17A、IL-18、IL-23 水平升高，正常 T 细胞表达和分泌 CCL5、RANTES 及 IFN- γ 诱导 IP10 影响白细胞向炎症部位的聚集而参与 HSP 的发生^[33]，CCL2、VEGF 和 ACE 基因在发生 HSP 疾病中可能的基因-基因相互作用效应提供了证据^[34]。有研究发现 HSP 急性期患者趋化因子 CCL2 和 CCL5 水平较正常对照组明显升高 ($P<0.05$)，趋化因子可能是 HSP 发生发展过程中的重要影响因素，影响着病情的严重程度^[35]。VEGF 是一种能够特异性的作用于血管内皮的多功能细胞因子，在内皮细胞的分裂、增殖和迁移中发挥重要作用^[36]。TGF- β 1 和 MCP-1 的表达与 HSP 的发生相关^[37]。MMP9 属于基质金属蛋白酶，其主要功能是降解细胞外基质^[38]，细胞外基质金属蛋白酶诱导因子 (EMMPRIN) 可以通过 Toll 样受体-4 通路调节巨噬细胞自噬水平^[39]，在血管重塑的整个过程中，由 MMPs 主导的细胞外基质的合成和降解同时存在^[40]。此外，分子对接的结果显示上述部分关键靶点与凉血退紫合剂的重要活性成分结合构象稳定，上述已有研究成果也间接证明了本研究预测具有一定的准确性和可靠性。

本研究结果预测了凉血退紫合剂治疗 HSP 涉及的潜在重要信号通路包括 TNF 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、NF- κ B 信号通路、HIF-1 信号通路、NOD 样受体信号通路、T 细胞受体信号通路、Toll 样受体信号通路、HTLV-1 感染等。HSP 患儿存在 Toll 样受体 2 (TLR2) mRNA 和蛋白的水平上调，且伴有肾损害的患儿尤为明显，提示机体内存在免疫表达失衡的情况，TLR2 可能参与 HSP 的

免疫发病机制^[41]。有研究证实，HSP 患儿 NF- κ B mRNA 水平均较正常儿童显著升高，免疫上游因子 NF- κ B 对免疫下游细胞因子 IL-6、TNF- α 释放具有同步关联性，TLR9-My D88-NF- κ B 信号通路参与 HSP 发病，并在其中起重要作用^[42]。陈治峰等^[43]经研究发现，通过益气化斑汤治疗 HSP 患儿的 NF- κ B、ICAM-1 和 Gd-IgA1 水平均低于对照组，能够得到明显改善。PI3K/AKT 通路在细胞增殖、分化、凋亡以及血管生成等生物过程中起着重要作用^[44]，在 VEGF 的作用下，活化的 AKT 和 eNOS 结合，eNOS 被磷酸化丝氨酸激活，产生 NO，从而引起血管舒张、血管重塑和血管生成^[45]。上述部分信号通路已被既往研究证实与 HSP 病机具有相关性。

依据网络药理学预测的凉血退紫合剂治疗 HSP 起效的重要靶点，结合文献研究（IgA、IgE、IgM、IL-5、IFN- γ 在 HSP 发病中起着关键作用），本研究通过基础实验验证凉血退紫合剂对 HSP 模型大鼠血清中 IgA、IgE、IgM、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、TNF- α 和 IFN- γ 表达的影响。研究结果显示凉血退紫合剂能够显著改善 HSP 模型大鼠精神状态、食欲等一般情况。与空白对照组比较，HSP 模型组大鼠血清中 IgA、IgE、IgM、IL-5、IL-6 和 TNF- α 的含量显著升高，IFN- γ 的含量显著降低。凉血退紫合剂可降低 IgA、IgE、IgM、IL-5、IL-6 和 TNF- α 的含量，上调 IFN- γ 的含量。组织病理学检测结果显示 HSP 模型组大鼠肾脏和脾脏组织均有一定程度的损伤，凉血退紫合剂能够显著减轻 HSP 模型组大鼠肾脏和脾脏病理改变。目前 HSP 病因和发病机制尚不清楚，已证实 HSP 发病机制与细胞免疫、体液免疫紊乱密切相关^[46]，HSP 典型皮疹由 IgA 沉积于血管内壁，发生免疫反应，中性粒细胞、淋巴细胞等浸润，红细胞外渗以致间质水肿，形成无菌性脉管炎，T 细胞功能障碍在 HSP 发病机制中起着关键作用^[47]。T 淋巴细胞过度表达，致使 B 淋巴细胞的抗原阈值下降，活性增强，诱导抗体形成及同种型的转换，分泌大量 IgA、IgE、IgM 等，生成免疫复合物，导致变态反应产生，增强毛细血管通透性，引起患儿皮肤发生紫癜样病变^[48]。此外，2010 年欧洲抗风湿病联盟会议强调了组织活检发现 IgA 沉积在 HSP 诊断标准中的重要性，IgA 在 HSP 的发病中扮演了重要角色，沉积在全身各小血管的 IgA1 可通过激活自身免疫介导组织炎症损伤参与 HSP 的发病^[49]。炎性因子（IL-5、IL-6、TNF- α ）的过度表达被多数学者认为是 HSP 发病机制之一，B 细胞增殖与炎性因子的产

生导致全身炎症反应，引发 HSP 患者皮损表现^[50]。IFN- γ 由 Th1 细胞分泌发挥抑制 Th2 细胞分化的作用，HSP 患儿血清中 IFN- γ 表达降低，说明 Th1 细胞功能抑制，而 Th2 细胞过度激活，分化加剧，可能进一步抑制 Th1 细胞功能，造成 HSP 患儿细胞免疫和体液免疫失衡^[51]。综上，凉血退紫合剂能够通过影响血清 IgA、IgE、IgM、IL-5、IL-6、TNF- α 和 IFN- γ 的含量而达到治疗 HSP 的目的。

综上，本研究通过网络药理学结合实验验证揭示了凉血退紫合剂治疗 HSP 多活性成分、多靶点、多通路起效的机制，主要活性成分有山奈酚、儿茶素、槲皮素、柚皮素、芍药苷、乙酰紫草素等，通过调控关键靶点炎症因子（IL5、IL6）及免疫因子（IgA、IgE、IgM、TNF- α 、IFN- γ ），影响 TNF 信号通路、PI3K-Akt、NF- κ B、Toll 样受体等信号通路而起效，揭示了凉血退紫合剂主要通过炎症反应、免疫应答达到治疗 HSP 的作用。这与本研究结果有助于新药的研制开发与推广，也为本课题组后续进一步深入的实验研究提供新的研究思路。

参考文献：

- [1] JENNETTE J C, FALK R J, BACON P A, et al. 2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides [J]. *Arthritis & Rheumatism*, 2013, 65(1): 1-11.
- [2] 吴小川, 唐雪梅, 胡坚, 等. 儿童过敏性紫癜循证诊治建议 [J]. *中华儿科杂志*, 2013, 51(7): 502-507.
- [3] CHEN J Y, MAO J H. Henoch-Schönlein purpura nephritis in children: incidence, pathogenesis and management [J]. *World J Pediatr*, 2015, 11(1): 29-34.
- [4] 黎书, 王峥. 儿童过敏性紫癜诊疗指南解读 [J]. *中华妇幼临床医学杂志(电子版)*, 2014, 10(6): 733-736.
- [5] 段晓颖, 宋少华, 张辉, 等. 凉血退紫合剂的质量标准研究 [J]. *中国新药杂志*, 2019, 28(23): 2909-2913.
- [6] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *Journal of Cheminformatics*, 2014, 6(1): 1-6.
- [7] PHILIPPE B, JÉRÔME M, FRÉDÉRIC E, et al. jvenn: an interactive Venn

- diagram viewer [J]. BMC bioinformatics, 2014, 15:293.
- [8] LI Y H, FENG X C, HUANG L, et al. Hematologic and immunological characteristics of Henoch-Schönlein purpura in rat and rabbit models induced with ovalbumin based on type III hypersensitivity. [J]. Scientific reports, 2015, 5:8862.
- [9] HWANG H H, LIM I S, CHOI B S, et al. Analysis of seasonal tendencies in pediatric Henoch-Schönlein purpura and comparison with outbreak of infectious diseases [J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(36): e12217.
- [10] 汪受传, 虞坚尔. 中医儿科学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012.
- [11] JOEL B, D G R. Henoch-Schönlein purpura in children: limited benefit of corticosteroids [J]. Canadian family physician Medecin de famille canadien, 2014, 60(11): 1007-1010.
- [12] 陈玉梅, 蒋蕾. PD-1~+Tfh 介导 ICOS 和 OX40 信号通路参与 HSP 患儿发病的免疫学机制研究 [J]. 免疫学杂志, 2021, 37(11): 995-1000.
- [13] FOLEY J H, CONWAY E M. Cross Talk Pathways Between Coagulation and Inflammation [J]. Circ Res, 2016, 118(9): 1392-1408.
- [14] 赵利平, 梁卫章, 张俊民, 等. 过敏性紫癜患儿血清呼吸道病毒感染特异性 IgM 及炎症因子检测及临床意义 [J]. 标记免疫分析与临床, 2021, 28(8): 1344-1348.
- [15] TRNKA P. Henoch-Schönlein purpura in children [J]. J Paediatr Child Health, 2013, 49(12): 995-1003.
- [16] 孙培静, 刘海霞, 张心梅. 过敏性紫癜患者血清中过敏原特异性 IgE 和总 IgE 水平及临床意义 [J]. 中国实验诊断学, 2021, 25(6): 821-824.
- [17] PARK S J, SUH J S, LEE J H, et al. Advances in our understanding of the pathogenesis of Henoch-Schönlein purpura and the implications for improving its diagnosis [J]. Expert Rev Clin Immunol, 2013, 9(12): 1223-1238.
- [18] 朱春华, 黄松明. 紫癜性肾炎诊治循证指南(2016) [J]. 中华儿科杂志, 2017, 55(9): 647-651.
- [19] LI S, ZHANG B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2013, 11(2): 110-120.
- [20] MUHAMMAD I, ABDUR R, ALI S Z, et al. Chemo-preventive and therapeutic

effect of the dietary flavonoid kaempferol: A comprehensive review [J]. *Phytotherapy research* : PTR, 2019, 33(2): 263-275.

[21] 蔡美云, 庄文欣, 吕娥, 等. 山奈酚通过抑制 p38 MAPK 通路减轻 6-羟多巴胺 (6-OHDA) 诱导的 PC12 细胞炎症 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2020, 36(7): 583-589.

[22] FAN F Y, SANG L X, JIANG M. Catechins and Their Therapeutic Benefits to Inflammatory Bowel Disease [J]. *Molecules*, 2017, 22(3): 484.

[23] 王丹. MicroRNAs 介导槲皮素与儿茶素协同抗氧化应激作用的分子机制 [D]. 山东农业大学, 2020.

[24] KUNDAKOVIC T, FOKIALAKIS N, DOBRIC S, et al. Evaluation of the anti-inflammatory and cytotoxic activities of naphthazarine derivatives from *Onosma leptantha* [J]. *Phytomedicine*, 2006, 13(4): 290-294.

[25] CHENG Y W, CHANG C Y, LIN K L, et al. Shikonin derivatives inhibited LPS-induced NOS in RAW 264.7 cells via downregulation of MAPK/NF-kappaB signaling [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 120(2): 264-271.

[26] MANCHOPE M F, CALIXTO-CAMPOS C, COELHO-SILVA L, et al. Naringenin Inhibits Superoxide Anion-Induced Inflammatory Pain: Role of Oxidative Stress, Cytokines, Nrf-2 and the NO-cGMP-PKG-KATP Channel Signaling Pathway [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0153015.

[27] ZHANG B C, LI Z, XU W, et al. Luteolin alleviates NLRP3 inflammasome activation and directs macrophage polarization in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(1): 265-273.

[28] KIM S Y, JIN C Y, KIM C H, et al. Isorhamnetin alleviates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in BV2 microglia by inactivating NF-κB, blocking the TLR4 pathway and reducing ROS generation [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(2): 682-692.

[29] 刘俊彤, 李轶聪, 董丽强, 等. 芍药苷对抗炎反应因子 TNF-α 和 IL6 的作用研究 [J]. *中西医结合心血管病电子杂志*, 2020, 8(30): 1+6.

[30] 陈莉, 范晓迪, 史大卓, 等. 芍药苷抑制 NF-κB/YY1 信号通路改善 TNF-α 诱导

人脐静脉内皮细胞炎症反应的实验研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(22): 3756-3763.

[31] 陈谱, 阮安民, 周俊, 等. 基于 NF- κ B 信号通路探讨芍药苷对 LPS 诱导的人软骨细胞炎症及退变的作用机制 [J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(11): 903-909.

[32] ZHU Y, DONG Y, WU L, et al. Changes of inflammatory mediators and oxidative stress indicators in children with Henoch-Schönlein purpura and clinical effects of hemoperfusion in the treatment of severe Henoch-Schönlein purpura with gastrointestinal involvement in children [J]. BMC Pediatr, 2019, 19(1): 409.

[33] JASZCZURA M, MIZGAŁA-IZWORSKA E, ŚWIĘTOCHOWSKA E, et al. Serum levels of selected cytokines [interleukin (IL)-17A, IL-18, IL-23] and chemokines (RANTES, IP10) in the acute phase of immunoglobulin A vasculitis in children [J]. Rheumatol Int, 2019, 39(11): 1945-1953.

[34] MOHAMMADIAN T, BONYADI M, NABAT E, et al. Association of ACE, VEGF and CCL2 gene polymorphisms with Henoch-Schönlein purpura and an evaluation of the possible interaction effects of these loci in HSP patients [J]. Adv Clin Exp Med, 2017, 26(4): 661-664.

[35] YU H H, LIU P H, YANG Y H, et al. Chemokine MCP1/CCL2 and RANTES/CCL5 gene polymorphisms influence Henoch-Schönlein purpura susceptibility and severity [J]. J Formos Med Assoc, 2015, 114(4): 347-352.

[36] 王俊岩, 陈文娜, 贾连群, 等. 二陈汤合桃红四物汤对 ApoE^{-/-}动脉粥样硬化小鼠主动脉 Nox4/NF- κ B/HIF-1 α 信号通路作用研究 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(6): 2417-2420.

[37] SHUIAI Z, HUIJUN S, WEIZHONG G, et al. Evaluation of TGF- β 1 and MCP-1 expression and tubulointerstitial fibrosis in children with Henoch-Schönlein purpura nephritis and IgA nephropathy: A clinical correlation [J]. Clinics (Sao Paulo), 2017, 72(2): 95-102.

[38] OHSHIBA T, MIYAURA C, INADA M, et al. Role of RANKL-induced osteoclast formation and MMP-dependent matrix degradation in bone destruction by breast cancer metastasis [J]. Br J Cancer, 2003, 88(8): 1318-1326.

- [39]赵嫦清, 王志明, 梁星, 等. 细胞外基质金属蛋白酶诱导因子通过 Toll 样受体-4 信号通路调节巨噬细胞自噬水平 [J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2021, 20(2):132-136.
- [40]翟小亚, 郭航远, 池菊芳, 等. 黄酒多酚对 LDLR^{-/-}小鼠 MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2 表达和动脉粥样硬化斑块的影响 [J].中国动脉硬化杂志, 2013, 21(12): 1069-1074.
- [41]孙洪强, 郑静娴, 陈晓蕊, 等.过敏性紫癜患儿外周血 Toll 样受体 2 与血浆细胞因子的相关性 [J].临床血液学杂志, 2021, 34(2): 86-89.
- [42]王子威. TLR9、MyD88 及 NF- κ B 在过敏性紫癜中的表达及临床意义 [D].郑州大学, 2017.
- [43]陈治峰, 王丽, 杜娟, 等. 益气化斑方治疗过敏性紫癜疗效及对患儿 Gd-IgA1、NF- κ B 水平的影响 [J].陕西中医, 2019, 40(2): 237-240.
- [44]YU J, SONG S, JIAO J, et al. ZiYinHuaTan Recipe Inhibits Cell Proliferation and Promotes Apoptosis in Gastric Cancer by Suppressing PI3K/AKT Pathway [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020:2018162.
- [45]高俊, 程卉, 李庆林.新藤黄酸通过 PTEN-PI3K/AKT/VEGF/eNOS 信号通路干预人脐静脉内皮细胞血管生成的研究 [J].安徽中医药大学学报, 2021, 40 (1): 81-87.
- [46] Mauro A, Mauro S, Rega R, et al. Successful treatment of hemorrhagic bullous Henoch-Schonlein purpura with intravenous immunoglobulins [J]. Pediatric dermatology, 2019, 36(1):e34-e36.
- [47]LI Y, ZHOU Y, ZHU D, et al. The role of T cells in the development of Henoch-Schonlein purpura [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2018, 23:837-851.
- [48]Solomou EE, Rezvani K, Mielke S, et al. Deficient CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in acquired aplastic anemia [J]. Blood, 2007, 110(5):1603-1606.
- [49]Tan Y, Li JLY, Lee BTK, et al. Nanostring Analysis of Skin Biopsies from Patients with Henoch-Schönlein Purpura Reveals Genes Associated with Pathology and Heterogeneity in the Disease Process [J]. Acta Derm Venereol. 2018, 98(9):896-897.
- [50]OSHIMA Y, HOSHINO J, SUWABE T, et al. Multicentric Castleman's disease

associated with IgA vasculitis (Henoch-Schönlein purpura) responding well to tocilizumab: a case report [J]. Clin Rheumatol, 2017,36(3):729-733.

[51]白涛敏.儿童过敏性紫癜血清中 IFN- γ 、IL-10、TGF- β 、PFP、GNLY 的表达及意义[J].海南医学院学报,2018,24(23):2054-2057.

Mechanism of Liangxue Tuizi Mixture (凉血退紫合剂) in Treating Henoch-Schonlein Purpura Based on Network Pharmacology and Experimental Verification*

Wu Jingjing^{1,2}, Ren Xianqing^{1,2**}, Tang Jinfan¹, Li Weixia¹, Xu Shuang^{1,2}

(¹The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000;

²School of Pediatrics, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

Objective: To explore the molecular mechanism of Liangxue Tuizi mixture (凉血退紫合剂) in treating Henoch-Schonlein purpura (HSP) based on network pharmacology and experimental verification. **Methods:** The active components and corresponding target proteins of Liangxue Tuizi mixture were screened out from Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), and the target proteins were transferred to target genes by UniProt. Disease targets of HSP were retrieved from Genecards, DisGenet, and Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) databases. The crossing targets of Liangxue Tuizi mixture in treating HSP were obtained by Venn diagram, which were the key targets. STRING was used to construct the protein-protein interaction (PPI) network for the key targets, and visual analysis was conducted by Cytoscape 3.8.2. The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) was used to conduct Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses. AutoDock was used to conduct molecular docking between the active components and key targets of Liangxue Tuizi mixture in treating HSP, and Pymol was used to make visual analysis. The prediction results of network pharmacology were verified by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and histopathological tests. **Results:** A total of 136 active components and 260

corresponding target genes related to Liangxue Tuizi mixture were obtained. A total of 293 disease targets of HSP and 42 key targets were obtained. PPI network construction show that key targets with high Degree values were tumor necrosis factor (TNF), interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10), C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2), Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA), etc. GO and KEGG enrichment analyses revealed that the key targets involved in signaling pathways of TNF, phosphoinositide 3 kinase-protein kinase B (PI3K-Akt), nuclear factor kappa B (NF- κ B), hypoxia-inducible factor (HIF-1), and nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor, etc. The results of molecular docking showed that Liangxue Tuizi mixture treated HSP by affecting immunoglobulin A (IgA), immunoglobulin E (IgE), immunoglobulin M (IgM), interleukin 5 (IL-5), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interferon- γ (IFN- γ). **Conclusion:** Liangxue Tuizi mixture has active effects on HSP through inflammatory response and immune response, which lays foundation for the further study.

Key words Liangxue Tuizi mixture, Henoch-Schonlein purpura, network pharmacology, molecular docking, molecular mechanism