

· 专题报道 ·

基于靶标网络分析的治痹寒热经方抗类风湿关节炎作用机制对比研究

李玮婕^{1,2}, 卢建秋^{1,3}, 毛霞², 郭秋岩², 王晓月², 郭敏群², 张彦琼^{2*}, 林娜^{2*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;
3. 北京中医药大学图书馆, 北京 100029)

摘要: 乌头汤和白虎加桂枝汤分别为寒、热痹的代表经方, 临床治疗类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 疗效确切, 但其作用特点及潜在药理机制均尚未明确。本研究借助大鼠佐剂性关节炎 (adjuvant-induced arthritis, AIA) 模型, 开展全基因组表达谱芯片检测和网络药理学挖掘的整合研究。结果表明, 乌头汤和白虎加桂枝汤均可有效降低 AIA 大鼠的发病率并改善关节炎症状, 但两者对冷痛敏和热辐射反应的干预效果有明显差异。进一步的靶标网络分析发现, 乌头汤和白虎加桂枝汤中分别筛选出 106 和 132 个抗 RA 效应基因, 这些抗 RA 的关键候选靶标均分别参与矫正 RA 相关炎症-免疫失衡网络, 但前者还可调节机体激素和能量代谢反应。本研究对比分析了寒热痹经方抗 RA 作用靶点和通路的异同点, 为深入揭示经方治痹功效的生物学内涵提供了初步的科学依据。

关键词: 乌头汤; 白虎加桂枝汤; 类风湿关节炎; 网络分析; 作用机制

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2018) 09-1387-11

A comparative study on the mechanisms of two classical herbal formulae for rheumatoid arthritis applying cold and heat patterns based on target network

LI Wei-jie^{1,2}, LU Jian-qiu^{1,3}, MAO Xia², GUO Qiu-yan², WANG Xiao-yue²,
GUO Min-qun², ZHANG Yan-qiong^{2*}, LIN Na^{2*}

(1. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
3. Library of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: Wu-tou decoction (WTD) and Baihu-Guizhi decoction (BHGZD) as described in the Synopsis of the Golden Chamber have been used extensively for the treatment of rheumatoid arthritis (RA) with apparent therapeutic efficacy. However, characteristics of pharmacological effects and their underlying molecular mechanisms have not been fully elucidated due to a lack of appropriate scientific methodology. In the current study, we performed an integrative approach applying gene expression profiling and network analysis to examine the therapeutic effects and molecular mechanisms of WTD and BHGZD based on adjuvant-induced arthritis (AIA) animal model. Results demonstrated that both WTD and BHGZD could relieve the severity of arthritis in AIA rats, while the significant differences were observed in the changes of the withdrawal response scores and latency time of AIA rats treated with WTD and BHGZD. Mechanistically, our network pharmacology-based investigation demonstrated that the major candidate targets of WTD and BHGZD were significantly associated

收稿日期: 2018-06-01; 修回日期: 2018-06-26.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81630107, 81673834); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (L2017018).

*通讯作者 Tel: 86-10-64014411-2869, E-mail: yqzhang@icmm.ac.cn; nlin@icmm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0519

with several inflammation-immune regulatory pathways, such as Toll-like receptor signaling pathway, T cell receptor signaling pathway, cytokine-cytokine receptor interaction, chemokine signaling pathway, B cell receptor signaling pathway, antigen processing and presentation, Fc epsilon RI signaling pathway, natural killer cell mediated cytotoxicity, as well as leukocyte transendothelial migration. In particular, the major candidate targets of WTD were also involved in the regulation of hormone and energy metabolism, which might be imbalanced during RA progression. In conclusion, the current study revealed differences and similarities regarding the effects and network regulatory mechanisms of WTD and BHGZD. These findings may present a scientific basis for elucidation of mechanisms by which WTD and BHGZD alleviates RA.

Key words: Wu-tou decoction; Baihu-guizhi decoction; rheumatoid arthritis; network analysis; mechanism

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以慢性滑膜炎并侵蚀软骨、最终导致骨与关节破坏为特征的世界难治性自身免疫性疾病, 具有发病率和致残率高的特点^[1, 2]。目前, 治疗 RA 的主要药物包括改善病情的抗风湿药 (disease-modifying anti-rheumatic drugs, DMARDs)、非甾体抗炎药 (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)、糖皮质激素 (glucocorticoid, GC)、生物制剂如 TNF 抑制剂、抗 IL-6 受体抗体等以及靶向小分子药物^[3]。临床研究表明, 上述药物虽具有缓解疼痛、抑制疾病活动、预防关节损伤和减缓疾病发展的作用^[4], 但会产生一定的毒副作用^[5, 6]。

素以整体观念、辨证论治为指导的中医药, 因具有药效持久、毒副作用少、复发率低等特点和优势而备受重视。根据中医理论, RA 属于“痹症”的范畴, 机体正气不足, 风、寒、湿等外邪侵入人体而诱发疾病^[7]。临床上张仲景《金匮要略》中多个经典方剂对 RA 均有效^[8], 鉴于寒、热证是 RA 主要证型^[9], 乌头汤和白虎加桂枝汤分别为治寒痹、热痹代表方, 且临床治疗 RA 疗效确切^[10, 11], 因此, 本研究以二者为研究对象进行对比研究。其中乌头汤, 由制川乌、麻黄、黄芪、芍药及甘草组成, 具有温阳散寒、除湿止痛, 并兼通达经络之效^[12, 13]。白虎加桂枝汤, 由石膏、知母、桂枝、粳米和甘草组成, 具有清热泻火、通络止痛之功效^[14]。目前, 已有关于乌头汤和白虎加桂枝汤治疗 RA 的临床疗效^[8]和药理药效学对比研究的报道, 提示二者均能显著对抗佐剂性关节炎 (adjuvant-induced arthritis, AIA) 模型的炎症反应以及血清白介素-6 (interleukin-6, IL-6)、类风湿因子 (rheumatoid factor, RF)、抗 CCP 抗体 (anti-cyclic citrullinated peptides antibody, AC-PA) 的异常^[15]; 二者通过调控 Toll 样受体 2 (Toll like receptor, TLR2)/肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6) 信号通路和凋亡受体

Faslg (tumor necrosis factor ligand superfamily member 6) 基因产生抗炎作用^[16], 并显著调节外周血 T 细胞亚群^[17]; 但乌头汤具有较好的抗炎和镇痛作用, 白虎加桂枝汤则具有明显拮抗急性炎症作用^[18]等特点。然而, 上述研究尚未从系统的视角较全面地对二者抗 RA 的作用和机制进行比较。

近年来, 转录组学 (transcriptomics)、生物信息学 (bioinformatics) 及网络药理学 (network pharmacology) 等多种新兴学科的发展和运用, 为中药方剂整体药效评价及其多成分-多靶点-多途径的作用机制挖掘提供有效的技术支撑^[19–22]。转录组学分析有利于揭示基因表达与生命表征的内在联系, 并挖掘机体发育和病理生理机制^[23]。网络药理学, 则开创了多成分、多靶点、整合协同的研究模式, 从生物网络切入, 全面解析方剂作用原理^[24]。因而, 将转录组学数据挖掘与网络药理学研究策略相整合, 不仅有利于系统阐释疾病发生、发展和转归相关的动态演变分子机制, 还为药物靶标的高效预测及潜在分子机制的揭示提供强有力手段。因此, 本研究拟采用 AIA 大鼠模型, 开展全基因组表达谱芯片检测和网络药理学挖掘的整合研究, 初步揭示乌头汤和白虎加桂枝汤治疗 RA 的作用和机制, 为深入阐明二者抗 RA 的作用机制提供依据。

材料与方法

实验用动物 雄性 Lewis 大鼠, 健康 6~7 周龄 (30 只, 体重 200±20 g), 清洁级, 购自中国生物制品鉴定所动物中心。动物许可证: SCXK (京) 2007-0017, SCXK (京) 2009-0017。所有动物均饲养在温度为 (24±1) °C 的恒温条件下, 光照/黑暗周期为 12 h, 给予自由饮食。

实验药品、试剂及仪器 黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge.]、麻黄 [*Ephedra sinica* Stapf]、芍药 [*Paeonia lactiflora* Pall.]、甘草 [*Glycyrrhiza*

uralensis Fisch.)、制川乌 (*Aconitum carmichaelii* Debx.)、知母 (*Anemarrhena asphodeloides* Bunge.)、桂枝 (*Cinnamomum cassia* Presl) 和石膏 (*Gypsum fibrosum*) 均购自北京同仁堂药店, 经中国中医科学院中药研究所张村研究员鉴定为合格药材。甲氨蝶呤片 (上海信谊药厂有限公司产品; 国药准字 H31020644); 完全弗氏佐剂 (Chondrex 公司产品; 货号: 7002); 乙醇 (批号: 20101222)、丙酮 (批号: 20101223) 购自北京化工厂; 液体石蜡 (江西德成制药有限公司; 批号: 150702)。Von frey hair 疼痛测试仪 (美国 Stoeltingco 公司); 热辐射疼痛测试仪 (意大利 Ugo Basile 公司); 旋涡混合器 (北京金北德工贸有限公司; 型号: KA-1000)。

药液制备方法 乌头汤制备方法: 称取制川乌 6 g, 麻黄、黄芪、白芍及炙甘草各 9 g, 温水浸泡 1 h。先将制川乌加入 420 mL 水中, 加热至沸腾后开始计时, 煮沸 1.5 h, 然后同时加入其他 4 味中药材, 继续煎煮 1.5 h, 倒出药液。再加入 336 mL 水, 煎煮 1.5 h 后, 合并两次药液, 纱布过滤。将全部药液转移至旋转蒸发仪浓缩为含饮片 $0.42 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 以此浓度稀释至给药浓度。白虎加桂枝汤制备方法: 称取石膏 60 g、知母 15 g、甘草 5 g、粳米 30 g、桂枝 10 g, 温水浸泡 1 h。先将石膏单独煎 30 min 后加入其他药物, 加水至 1 000 mL, 保持微沸, 煎煮 30 min, 纱布过滤; 取药渣加水 500 mL 二次煎煮 20 min, 纱布过滤并与第一次滤液合并, 并将全部药液转移至旋转蒸发仪浓缩为含饮片 $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 以此浓度稀释至给药浓度。

实验分组及给药方式 雄性 Lewis 大鼠 30 只, 随机分为 5 组, 每组 6 只。组别如下: 正常对照组 (Con)、佐剂性关节炎模型组 (AIA)、乌头汤治疗组 (AIA-WTD)、白虎加桂枝汤治疗组 (AIA-BHGZD) 和甲氨蝶呤阳性对照组 (AIA-MTX)。按照本课题组前期研究的最佳药效计量和给药方式进行给药^[25]: 乌头汤剂量为 $7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 相当于 2 倍临床等效剂量; 根据预实验, 白虎加桂枝汤剂量为 $21.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 相当于 2 倍临床等效剂量时的疗效最佳; 甲氨蝶呤剂量为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (相当于临床等效剂量)。大鼠给药溶剂按照 $1 \text{ mL}/100 \text{ g}$ 体重灌胃, 从免疫当天开始给药, 乌头汤和白虎加桂枝汤组每给药 6 天, 间歇 1 天; 甲氨蝶呤每给药 3 天, 间歇 1 天; 正常组和 AIA 模型组灌服等体积蒸馏水^[25]; 给药至免疫第 25 天。

AIA 大鼠模型的建立及造模方法 本研究使用的是完全弗氏佐剂 (CFA: 热灭活的结核分枝杆菌酪酸的液体石蜡混悬液, Difco), 按照浓度 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,

将热灭活的结核分枝杆菌酪酸加入到液体石蜡中, 用吸管吹打混悬, 置于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。根据预实验, 造模前 2 h 配制效果最佳, 造模时分别吸取造模剂, 吸取前注意吹打, 以避免沉淀导致浓度不准确^[26]。每只 Lewis 大鼠于尾根单次皮内注射 0.1 mL CFA, 建立 AIA 模型; 正常组注射等量生理盐水代替。除正常组外其他 4 组即 AIA 模型组、乌头汤、白虎加桂枝汤及甲氨蝶呤治疗组均建立 AIA 模型。在实验中观察到按照此方法建立的 AIA 模型, 造模后第 11 天开始出现临床红肿症状。

关节炎评价方法 发病率: 截至取材前一天, 每组发病动物数占本组动物总数的比例 (踝关节或者掌关节大于 1 分算发病)^[26]; 关节炎评分: 自免疫 8 天开始, 参考文献每 2~3 天进行 1 次临床积分 (双人目测), 计算出临床积分, 每足 20 分制, 共 80 分^[27,28]; 后肢肿胀度: 自免疫 8 天开始, 每日用游标卡尺测量大鼠的右后肢直径, 截止至取材前一天^[29]。

疼痛测定方法 大鼠的痛阈通过 Von frey hair 机械疼痛测试仪^[30,31]、热辐射疼痛测试仪和丙酮分别检测机械痛觉超敏 (机械痛敏)、热辐射痛敏和冷诱发痛 (冷痛敏)。分别在造模前、造模后测量 (每隔 2 天测量 1 次), 每次测量维持 3 个周期, 中间间隔 5 min, 最后计算取平均值。

样品采集 造模第 25 天, 麻醉大鼠后, 综合考虑大鼠的关节炎评分、后肢肿胀度和痛敏等具体情况, 每组取 3 只大鼠, 于冰上快速准确取滑膜组织, 迅速放入 Trizol 中, 置于液氮冻存, 待全基因组表达谱芯片检测。

全基因组表达谱芯片检测及差异表达基因筛选 采用 Agilent 表达谱芯片配套试剂盒 (Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-Color, Cat.# 5190-2305, 美国 Agilent Technologies 公司) 提取各组关节滑膜组织的 RNA 样本, 并用 RNeasy mini kit (德国 QIAGEN 公司, Cat.# 74106) 纯化标记后的 cRNA。采用全基因组表达谱芯片 (Agilent Whole Rat Genome Microarray 4×44K, Cat.# G4131F, 上海伯豪生物技术有限公司), 检测正常组、AIA 模型组及各治疗组受累关节滑膜组织的全基因组表达谱。采用 R 软件中 Limma 包对芯片检测原始数据进行归一化, 并计算基因组间表达量差异倍数 (fold-change) 及 *t* 检验 (student's *t*-test), 以 $\text{fold change} \leq 0.5$ 或者 $\text{fold change} \geq 2$, 且 *t* 检验 $P < 0.05$ 为标准, 分别筛选 RA 发病相关基因 (AIA vs Con)、乌头汤抗 RA 效应基因 (AIA-WTD vs AIA) 以及白

虎加桂枝汤抗 RA 效应基因 (AIA-BHGZD vs AIA)。

已知抗 RA 靶标分子的收集 已知抗 RA 靶标信息从以下数据库收集: DrugBank 数据库 (<http://www.drugbank.ca/>, version: 3.0)、OMIM 数据库 (<http://www.omim.org/>, last updated: October 31, 2013)、GAD 数据库 (Genetic Association Database, <http://geneticassociationdb.nih.gov/>, last updated: August 18, 2013) 和 KEGG 通路数据库 (<http://www.genome.jp/kegg/>, last updated: October 16, 2012)。

网络构建与分析 基于 String 数据库 (<http://string-db.org/>, version 10.5), 提取上述已知抗 RA 靶标基因、RA 发病相关基因、乌头汤抗 RA 效应基因和白虎加桂枝汤抗 RA 效应基因的相互作用信息。限定物种为大鼠, 获取基因间相互作用信息, 结果保存成 TSV 格式, 选取相互作用可信度评分 (combined score) 等于或大于所有相互作用评分中位数的基因间相互作用信息, 并导入 Cytoscape 软件 (version 3.4.0, 美国 Cytoscape Consortium 公司) 构建网络并计算节点在网络中的连接度 (degree)、紧密度 (closeness) 和介度 (betweenness)。以上述网络拓扑特征参数的中位数作为卡值, 选取 3 个特征参数值均大于卡值的节点蛋白质作为关键网络靶标。采用 Navigator software (version 2.2.1, 美国 Bentley Systems 公司) 进行网络可视化。

基因功能和通路富集分析 基于 GO 数据库 (Gene Ontology, <http://www.geneontology.org/>, last updated:

March 28, 2018) 和 KEGG 数据库 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>, last updated: Oct 16, 2012) 利用 Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>, version 6.7) 进行基因功能和通路的富集分析。

统计学分析 采用 SPSS version 15.0 for Windows 软件 (美国 SPSS Inc 公司) 进行统计学分析。计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。受累关节比例的组间比较采用卡方检验; 关节炎评分和后肢肿胀度的组间比较采用非参数统计检验 (Kruskal-Wallis 检验); 其他指标的组间比较采用单因素方差分析。P < 0.05 作为统计学具有显著性差异的标准。应用 Microsoft Office 2016、GraphPad Prism 6.0 和 Adobe Photoshop CS6 软件进行图表制作。

结果

1 乌头汤和白虎加桂枝汤均可显著降低 AIA 大鼠发病率, 缓解关节炎严重程度

本研究采用雄性 Lewis 大鼠成功构建了 AIA 模型。造模 11 天开始, AIA 模型组大鼠关节红肿、畸形症状明显, 而乌头汤及白虎加桂枝汤治疗组虽也见关节红肿症状, 但严重程度已明显减轻, 与甲氨蝶呤治疗组相似 (图 1A)。

结果表明, 造模 25 天后, 模型组的发病率 100%, 而乌头汤和白虎加桂枝汤给药后发病率分别下降了

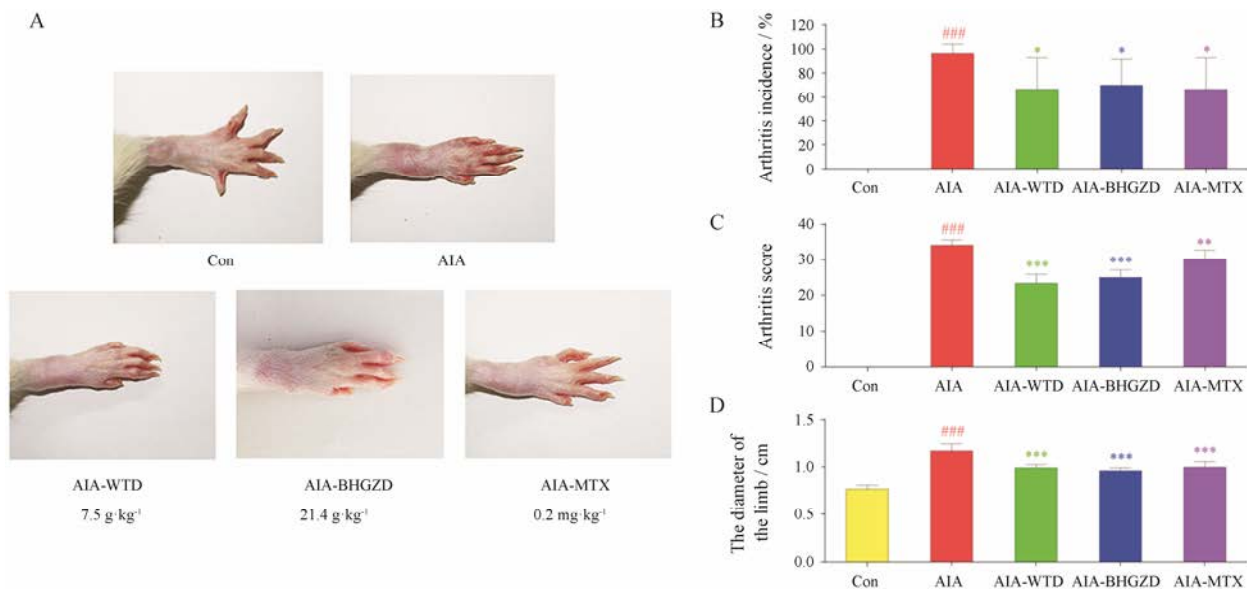


Figure 1 Effects of Wu-tou decoction (WTD) and Baihu-guizhi decoction (BGHZD) on the severity of arthritis in adjuvant-induced arthritis (AIA) rats. A: Microscopic evidence of arthritis of AIA rats in different groups; B: Arthritis incidence of AIA rats in different groups; C: Arthritis score of AIA rats in different groups; D: The swelling degree of inflamed limbs of AIA rats in different groups. ###P < 0.001 vs normal control group (Con); *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs AIA group

33%和30% (均 $P < 0.05$, 图 1B); 模型组的关节临床积分可达 34.17, 乌头汤和白虎加桂枝汤给药后分别下降了 10.78 和 9.17 (均 $P < 0.001$, 图 1C); 模型组的关节肿胀度可达 1.17 cm, 乌头汤和白虎加桂枝汤给药后分别下降了 0.18 和 0.21 cm (均 $P < 0.001$, 图 1D)。

2 乌头汤和白虎加桂枝汤均可缓解 AIA 大鼠疼痛作用

与正常组相比, AIA 模型组大鼠机械痛阈值 (图 2A)、冷痛阈值 (图 2B) 及热辐射反应时间 (图 2C) 均显著降低, 表明造模成功 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$); 与 AIA 模型组相比, 各治疗组均具镇痛作用, 可不同程度提高痛阈值, 其中, 乌头汤最快发挥药效作用, 5 天起就能明显降低机械痛阈值和热辐射痛阈值 ($P < 0.05$, $P < 0.001$), 10 天起显著降低冷痛痛阈 ($P < 0.01$); 白虎加桂枝汤降低痛阈值的起效时间虽然比乌头汤慢, 但镇痛强度与阳性药甲氨蝶呤相似且略强, 特别是对热辐射的抑制作用, 15 天起比乌头汤更明显 ($P < 0.001$)。

3 RA 发生相关基因及乌头汤和白虎加桂枝汤抗 RA 效应基因筛选

基于芯片检测结果和差异表达数据分析, 共获得 637 个 RA 发生相关基因 (包括 394 个上调表达基因和 243 个下调表达基因)、568 个乌头汤抗 RA 效应基因 (包括 338 个上调表达基因和 230 个下调表达基因) 和 704 个白虎加桂枝汤抗 RA 效应基因 (包括 363 个上调表达基因和 341 个下调表达基因)。

4 乌头汤抗 RA 关键网络靶标可调节机体能量代谢和炎症-免疫相关信号通路

参考本课题组以往的研究策略^[22, 26, 32, 33], 建立“乌头汤抗 RA 效应基因-RA 相关基因”相互作用网络, 并计算网络中节点的连接度、紧密度和介度值, 筛选具有重要作用关键网络靶标, 结果共筛选到 126 个关键网络靶标, 其中有 106 个为乌头汤抗 RA 效应基因, 32 个为 RA 相关基因 (表 1)。

构建上述关键网络靶标的直接相互作用网络, 并进行通路富集分析, 结果显示, 乌头汤抗 RA 的关

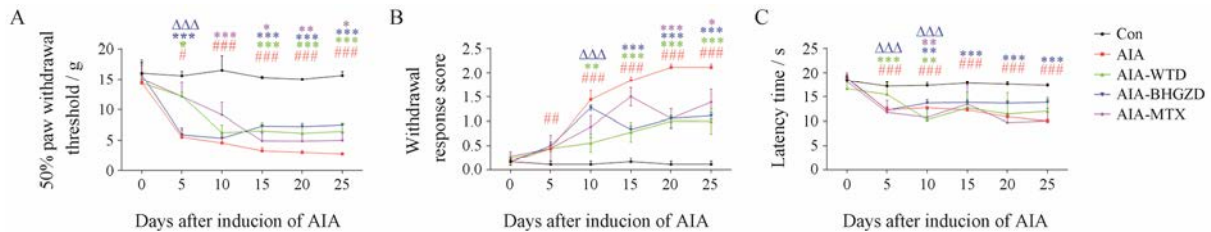


Figure 2 Effects of WTD and BHGZD on 50% paw withdrawal threshold (A), withdrawal response score (B) and the latency time (C) of AIA rats. $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$, $^{\#\#\#}P < 0.001$ vs normal control group; $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs AIA group; $^{\Delta\Delta\Delta}P < 0.001$ vs AIA-WTD group

Table 1 Key network target gene list of WTD acting on RA

Gene symbol	Degree	Closeness	Betweenness	Gene symbol	Degree	Closeness	Betweenness
A2M	14.000	4.575	0.464	IRF4	19.000	4.598	0.677
ADCY2	28.000	4.600	1.418	IRF5	16.000	4.603	0.685
ADCY7	27.000	4.592	1.121	IRF7	13.000	4.582	0.399
ALOX15B	9.000	4.527	0.252	IRS2	11.000	4.561	0.470
ATIC	11.000	4.538	2.740	ITGA7	12.000	4.539	0.467
BDKRB1	27.000	4.594	0.337	ITGA9	13.000	4.533	0.290
CACNA1S	11.000	4.506	0.663	ITGAL	8.000	4.525	0.124
CACNB1	7.000	4.491	0.324	ITGAV	19.000	4.564	0.896
CACNB3	7.000	4.491	0.324	ITGB2	12.000	4.547	0.430
CAMK2B	10.000	4.524	0.775	JUN	62.000	4.708	10.204
CAMK4	5.000	4.497	0.163	LCK	23.000	4.594	3.134
CCL11	13.000	4.572	0.212	LEP	29.000	4.636	1.849
CCL2	31.000	4.657	1.244	MMP1	22.000	4.622	0.661
CCL3	14.000	4.588	0.102	MMP13	12.000	4.600	0.440
CCL5	29.000	4.609	0.400	MMP2	41.000	4.672	3.899
CCR5	36.000	4.640	3.064	MMP3	11.000	4.575	0.317
CCR7	32.000	4.627	1.299	NCAM1	15.000	4.544	2.022

				Continued			
Gene symbol	Degree	Closeness	Betweenness	Gene symbol	Degree	Closeness	Betweenness
CD8B	8.000	4.541	0.282	NCOA3	15.000	4.581	0.206
CDK1	18.000	4.579	6.422	NFKB2	9.000	4.570	0.282
CDKN1A	22.000	4.627	3.869	NOS2	12.000	4.613	1.144
CEBPG	5.000	4.526	0.125	OXTR	15.000	4.596	1.111
CHRM4	23.000	4.572	0.418	PDLIM7	10.000	4.555	0.429
CHUK	24.000	4.622	1.867	PDPK1	10.000	4.534	0.377
CIITA	14.000	4.570	0.670	PLA2G4A	10.000	4.543	0.471
COL1A1	15.000	4.548	0.578	PLAU	8.000	4.574	0.079
COL1A2	15.000	4.569	0.805	PPARD	9.000	4.558	0.111
CSF1	8.000	4.554	0.096	PPARG	34.000	4.637	3.096
CSF2	29.000	4.641	1.508	PRKACA	23.000	4.567	4.079
CTLA4	11.000	4.546	0.408	PRKAR1B	16.000	4.564	2.916
EGR2	10.000	4.580	0.112	PRKCQ	13.000	4.550	0.356
ESR1	20.000	4.625	1.051	PTGS2	32.000	4.657	4.596
FCGR2A	8.000	4.511	0.706	PTK2B	18.000	4.622	1.862
FGF2	35.000	4.651	6.558	RAC2	14.000	4.588	1.853
FGF7	12.000	4.561	0.760	REL	9.000	4.571	0.123
FLNC	9.000	4.495	0.758	SAA1	29.000	4.581	0.441
GAL	23.000	4.597	0.138	SLC2A4	13.000	4.553	0.926
GNAO1	17.000	4.582	1.742	SPP1	16.000	4.584	0.659
HNF4A	9.000	4.564	0.185	SREBF1	14.000	4.556	2.587
ICAM1	43.000	4.686	5.173	STAT4	10.000	4.563	0.973
IL10	30.000	4.653	1.382	TEK	10.000	4.555	0.174
IL13	15.000	4.612	0.300	TGFB1	43.000	4.675	4.145
IL17A	20.000	4.621	0.630	TGFB2	14.000	4.609	0.866
IL18	16.000	4.622	11.137	TGFB3	10.000	4.566	0.066
IL1A	18.000	4.616	0.632	TLR2	18.000	4.604	0.272
IL1B	45.000	4.684	3.953	TLR4	18.000	4.622	0.684
IL1R1	8.000	4.544	0.064	TLR9	10.000	4.565	0.401
IL2	34.000	4.655	2.379	TNF	42.000	4.657	3.097
IL23A	15.000	4.596	0.190	TNFSF11	14.000	4.605	0.819
IL3	11.000	4.596	0.198	TRAF1	11.000	4.515	0.818
IL4	36.000	4.648	2.406	TRH	11.000	4.544	0.549
IL4R	15.000	4.569	0.261	VAV3	8.000	4.502	0.352
IL6	56.000	4.703	7.180	VDR	11.000	4.556	0.206
IL8	48.000	4.667	2.606	VEGFA	43.000	4.672	4.339

键网络靶标显著参与激素和能量代谢相关的通路,如:发热正调控、脂肪细胞因子信号传导通路、促性腺激素释放激素 (GnRH) 信号传导通路、对 ATP 的反应、磷脂酰肌醇 3-激酶活性的正调控、脂质激酶活性的正调控、脂肪酸衍生物转运等,以及 RA “炎症-免疫失衡”相关通路,如:破骨细胞分化、NOD 样受体信号通路、Toll 样受体信号通路、T 细胞受体信号通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用、Jak-STAT 信号通路、趋化因子信号通路、B 细胞受体信号通路、抗原处理与呈递、FcεRI 信号通路、天然杀伤细胞介导的细胞毒性、白细胞跨内皮迁移,进而影响 RA 病程中的主要病理学改变 (图 3)。

5 白虎加桂枝汤可矫正 RA 相关“炎症-免疫失衡”网络

采用同样方法^[22, 26, 32, 33],建立“白虎加桂枝汤抗 RA 效应基因-RA 相关基因”相互作用网络,并计算网络中节点的连接度、紧密度和介度值,筛选具有重要作用关键网络靶标,结果共筛选到 162 个关键网络靶标,其中有 132 个为白虎加桂枝汤抗 RA 效应基因,58 个为 RA 相关基因 (表 2)。

构建上述关键网络靶标的直接相互作用网络,并进行通路富集分析,结果显示,白虎加桂枝汤抗 RA 的关键网络靶标显著参与 RA “炎症-免疫失衡”相关通路,如:FcεRI 信号通路、Toll 样受体信号通路、

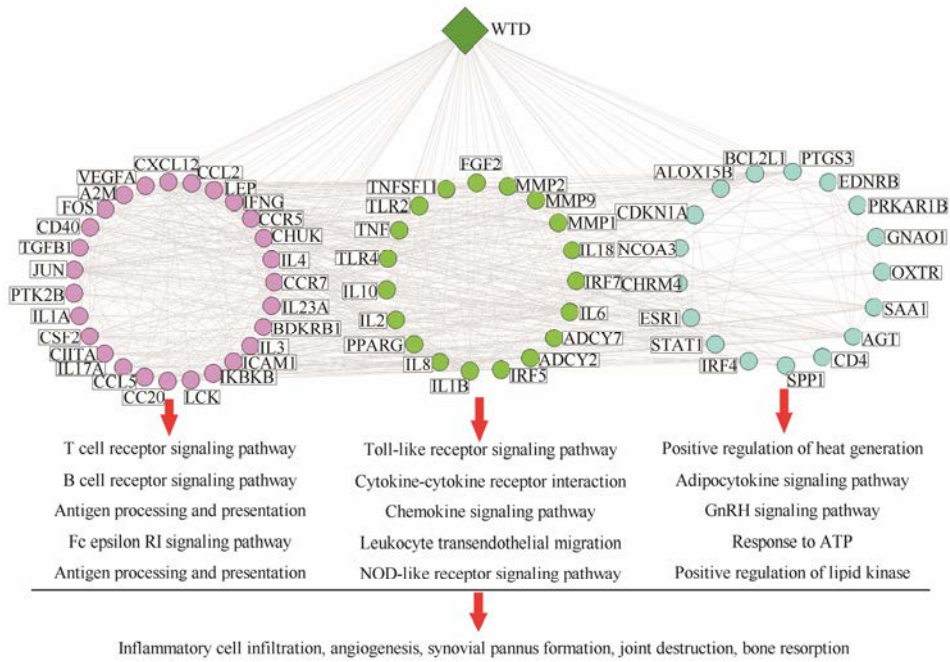


Figure 3 Interaction network of WTD key targets and rheumatoid arthritis (RA)-related genes, and its involved pathway and major pathological changes during RA progression. The square node refers to the herbal formula WTD and the round node refers to the key network targets

Table 2 Key network target gene list of BHGZD acting on RA

Gene symbol	Degree	Closeness	Betweenness	Gene symbol	Degree	Closeness	Betweenness
AGTR1	85.000	0.474	0.009	IGF2	37.000	0.437	0.001
AGTR2	72.000	0.423	0.001	IL13	47.000	0.419	0.001
AKT1	142.000	0.534	0.043	INS	138.000	0.534	0.099
ALDOA	29.000	0.393	0.002	INSR	70.000	0.453	0.017
ANXA1	106.000	0.474	0.007	ITGB1	42.000	0.427	0.007
APLN	62.000	0.433	0.002	ITGB3	33.000	0.408	0.001
AR	41.000	0.457	0.007	KIT	46.000	0.451	0.003
ARRB1	43.000	0.434	0.002	LEP	57.000	0.459	0.004
ARRB2	40.000	0.432	0.002	LHCGR	37.000	0.410	0.003
AVP	92.000	0.476	0.020	MAP2K1	42.000	0.459	0.002
AVPR2	46.000	0.425	0.002	MC4R	33.000	0.412	0.001
BCL2	66.000	0.466	0.005	MCHR2	99.000	0.450	0.002
BDKRB2	101.000	0.462	0.003	MED1	29.000	0.403	0.003
C3	68.000	0.427	0.001	MTOR	57.000	0.471	0.004
CACNA1C	41.000	0.423	0.006	MYD88	36.000	0.400	0.001
CACNA1D	37.000	0.422	0.004	NCOA1	32.000	0.407	0.004
CACNA1F	32.000	0.393	0.004	NFKB1	91.000	0.483	0.008
CACNB2	28.000	0.415	0.002	NMUR2	99.000	0.450	0.002
CALCA	33.000	0.408	0.001	NOS1	33.000	0.421	0.008
CAMK2D	42.000	0.417	0.009	NOS2	30.000	0.419	0.002
CAMK2G	45.000	0.433	0.014	NOTCH1	46.000	0.438	0.004
CAT	39.000	0.433	0.012	NR3C1	32.000	0.464	0.002
CAV1	33.000	0.442	0.003	NTSR1	48.000	0.419	0.003
CCR7	83.000	0.436	0.003	PDGFB	48.000	0.437	0.001
CD34	29.000	0.419	0.001	PF4	89.000	0.444	0.007
CDC42	50.000	0.453	0.005	PIK3CA	156.000	0.528	0.035
CDKN1A	31.000	0.418	0.001	PIK3CB	92.000	0.492	0.008
CFTR	33.000	0.451	0.006	PIK3CD	83.000	0.489	0.005

Continued

Gene symbol	Degree	Closeness	Betweenness	Gene symbol	Degree	Closeness	Betweenness
CHRM1	60.000	0.440	0.005	PIK3CG	87.000	0.496	0.008
CHRM2	79.000	0.444	0.003	PIK3R1	111.000	0.487	0.013
CRH	45.000	0.439	0.004	PIK3R5	31.000	0.432	0.001
CRP	43.000	0.431	0.001	PLG	46.000	0.435	0.002
CTNNA1	57.000	0.457	0.007	PPARA	31.000	0.436	0.006
CXCR4	109.000	0.476	0.009	PPARG	49.000	0.453	0.004
CYP2E1	46.000	0.403	0.008	PPBP	87.000	0.447	0.006
DRD2	69.000	0.429	0.003	PPP2CA	45.000	0.441	0.005
DRD3	61.000	0.419	0.001	PPP2CB	40.000	0.436	0.004
DRD4	63.000	0.422	0.002	PPP2R1A	45.000	0.440	0.006
EDN1	94.000	0.490	0.009	PRKCA	64.000	0.472	0.011
EGF	111.000	0.503	0.017	PRKCB	46.000	0.460	0.006
EGFR	103.000	0.502	0.017	PRKCD	33.000	0.438	0.002
ESR1	53.000	0.475	0.007	PRKCG	37.000	0.446	0.005
F2	87.000	0.474	0.010	PTGER3	64.000	0.420	0.001
FGF2	72.000	0.458	0.004	PTGER4	34.000	0.414	0.001
FGFR2	28.000	0.418	0.001	PTGS2	68.000	0.484	0.010
FOXP3	35.000	0.426	0.001	PTK2B	32.000	0.427	0.002
FSHR	33.000	0.402	0.001	RAC1	62.000	0.447	0.007
GGT1	32.000	0.401	0.009	RAC2	30.000	0.402	0.001
GHRH	34.000	0.419	0.001	RPS6KB1	33.000	0.431	0.001
GNA15	58.000	0.441	0.002	SAA1	103.000	0.458	0.004
GNAS	52.000	0.435	0.004	SERPINE1	64.000	0.456	0.003
GNAT3	67.000	0.425	0.002	SIRT1	33.000	0.435	0.001
GNG13	155.000	0.502	0.046	SOD2	30.000	0.414	0.007
GPER	69.000	0.438	0.003	SPP1	37.000	0.426	0.001
GRM5	55.000	0.430	0.003	SRC	111.000	0.512	0.032
GRM7	64.000	0.420	0.001	STAT5A	49.000	0.451	0.002
HDAC1	29.000	0.394	0.001	SYK	46.000	0.427	0.004
HGF	60.000	0.456	0.002	TAC1	56.000	0.438	0.002
HIF1A	48.000	0.468	0.004	TIMP1	46.000	0.420	0.001
HMOX1	31.000	0.445	0.001	TLR2	46.000	0.419	0.001
HPGDS	60.000	0.447	0.026	TLR4	65.000	0.454	0.004
HSP90AA1	54.000	0.452	0.005	TNF	115.000	0.491	0.014
HTR1A	64.000	0.421	0.001	TP53	113.000	0.512	0.041
HTR2A	54.000	0.435	0.004	UTS2R	47.000	0.417	0.001
HTR2B	50.000	0.421	0.001	VCAM1	60.000	0.446	0.006
HTR2C	56.000	0.426	0.001	WNT5A	31.000	0.426	0.004
IGF1	98.000	0.488	0.014				

B 细胞受体信号通路、VEGF 信号通路、T 细胞受体信号通路、白细胞跨内皮迁移、趋化因子信号通路、FcγR 介导的吞噬作用、破骨细胞分化、天然杀伤细胞介导细胞毒性、细胞因子-细胞因子受体相互作用、血管平滑肌收缩、TGF-β 信号传导途径、凝血与补体级联反应信号通路，进而缓解 RA 病程中的主要病理学改变 (图 4)。

讨论

为了开展全基因组表达谱芯片检测和网络药

理学分析的整合研究，本研究首先采用 AIA 大鼠模型，对比分析了乌头汤和白虎加桂枝汤对 RA 的作用和机制。研究发现，乌头汤和白虎加桂枝汤给药处理后，均可显著降低 AIA 大鼠发病率，改善关节红肿、畸形等症状，二者作用相似，但对 AIA 大鼠疼痛的缓解作用和特点略有不同。乌头汤能在最短时间内发挥降低机械痛敏、冷痛敏和热辐射痛敏的药效作用，而白虎桂枝汤对热辐射痛敏干预效果虽较慢，但作用稳定而持久。

基于上述实验研究结果，课题组又开展了转录

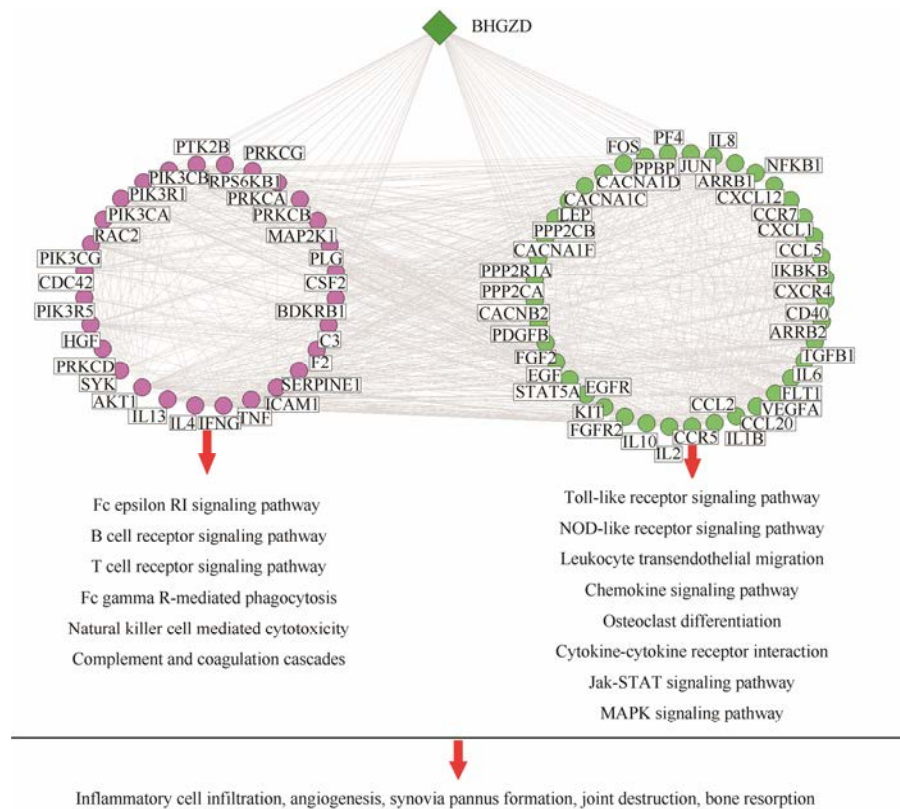


Figure 4 Interaction network of BHGZD key targets and RA-related genes, and its involved pathway and major pathological changes during RA progression. The square node refers to the herbal formula BHGZD and the round node refers to the key network targets

组学数据挖掘, 分别获得 RA 发生相关基因及乌头汤和白虎加桂枝汤抗 RA 药效相关效应基因集。进而整合网络药理学分析, 分别建立“两首方剂抗 RA 效应基因-RA 相关基因”相互作用网络, 通过网络拓扑特征计算和功能挖掘, 发现乌头汤和白虎加桂枝汤抗 RA 的关键候选靶标均参与 RA 进展相关的“炎症-免疫”通路, 如 Toll 样受体信号通路、T 细胞受体信号通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用、趋化因子信号通路、B 细胞受体信号通路等。这些通路在 RA 炎症、滑膜血管翳形成、炎性细胞浸润、血管生成、关节破坏和疼痛中发挥重要作用^[34]。此外, 乌头汤抗 RA 的关键候选靶标还参与机体产热、产能及激素调节通路, 如发热正调控、脂肪细胞因子信号传导通路、GnRH 信号传导通路、对 ATP 的反应、磷脂酰肌醇-3-激酶活性的正调控、脂质激酶活性的正调控、脂肪酸衍生物转运。研究表明, 这些通路直接或间接地与 RA 发展相关: 脂肪细胞因子通过调节其他代谢或炎性因子在 RA 中发挥作用^[35]; GnRH 具有促炎作用^[36]; RA 巨噬细胞线粒体过度消耗氧气, 产生过多 ATP, 最终导致组织破坏酶的过度产生, 使 RA 病症加重^[37]; 磷脂酰肌醇-3-激酶通过激活促凋亡蛋白和半胱天冬酶级联诱导细胞凋亡^[38]; 脂质激酶在免

疫细胞的迁移和激活以及免疫调节中发挥作用^[39, 40]; 消退素 E1 通过前列腺素 E2 的自分泌, 抑制核因子 κ B 受体活化因子 (RANKL) 配体诱导的活化 T 细胞核因子 (NFATc1) 和原癌基因 (c-fos) 的表达, 以及白细胞介素-17 (IL-17) 诱导的 RANKL 的表达, 从而抑制破骨细胞生成和骨吸收^[41]。

综上, 本研究采用 AIA 大鼠模型对比分析乌头汤和白虎加桂枝汤治疗 RA 的作用, 并利用全基因组表达芯片检测整合网络药理学分析方法, 对比分析二者抗 RA 机制的异同。与之前的同类研究^[42]相比, 本研究从系统的角度初步揭示了乌头汤和白虎加桂枝汤抗 RA 的作用和机制, 这将为后续通痹经方功效的生物学内涵阐述奠定基础, 同时也为下一步“病-证-方”结合研究提供借鉴。

References

- [1] Opava CH, Björk M. Towards evidence-based hand exercises in rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2015, 385: 396–398.
- [2] Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2002, 4: S265–S272.
- [3] Hu XM, Zong Y, Yu SS, et al. Research progress and trends

- in rheumatoid arthritis therapeutic drugs [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2017, 26: 36–43.
- [4] Guo Q, Wang Y, Xu D, et al. Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies [J]. *Bone Res*, 2018, 6: 15–29.
- [5] Albrecht K, Müllerladner U. Side effects and management of side effects of methotrexate in rheumatoid arthritis [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2010, 28: S95–S101.
- [6] Baschant U, Lane NE, Tuckermann J. The multiple facets of glucocorticoid action in rheumatoid arthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2012, 8: 645–655.
- [7] Li S. Advances in TCM symptomatology of rheumatoid arthritis [J]. *J Tradit Chin Med*, 2002, 22: 137–142.
- [8] Jing RY, Wang Y. Summarizing treatment of rheumatoid arthritis by classical formula [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med* (辽宁中医药大学学报), 2012, 14: 122–124.
- [9] Kong LY. Rheumatoid Arthritis (RA) TCM Diagnosis and Treatment Regime Research (类风湿关节炎的中医证治规律研究) [D]. Nanjing: Nanjing University Chinese Medicine (南京中医药大学), 2012.
- [10] Chen H, Ju SH, Wei JP, et al. Effect of Baihu Guizhi decoction on characteristic methylation genes expression of pyretic arthralgia rat model [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2017, 42: 332–340.
- [11] Zheng ZI, Yan TM, Chen WY, et al. Pharmacokinetic determination of ephedrine in Herba Ephedrae and Wu Tou Tang decoctions in rats using ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Xenobiotica*, 2012, 42: 775–783.
- [12] Zhao LQ. Application of Wutou soup in the treatment of arthralgia zheng by professor Wang [J]. *China J Chin Med* (中医学报), 2014, 29: 38–39.
- [13] Li Y. Wutou method treatment of yangxuhanning of knee osteoarthritis of random parallel control [J]. *J Pract Tradit Chin Intern Med* (实用中医内科杂志), 2013, 27: 99–101.
- [14] Huang Y, Li YH. Application of Zhongjing formula in treating rheumatoid arthritis [J]. *Tianjin J Tradit Chin Med* (天津中医药), 2007, 24: 303–305.
- [15] Ju SH, Chen H, Wei JP, et al. Comparative study on pharmacology of rats with rheumatoid arthritis treated by classical herbal formulae based on "yi-fang-bian-zheng" [J]. *Pharm Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2015, 31: 4–7.
- [16] Xu SJ, Li L, Zhang WS, et al. Comparative study of regulation of TLR/TRAF signaling pathway of classic prescriptions that deals with arthralgia syndrome based on relevant theory of prescription and syndrome [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2010, 35: 1025–1029.
- [17] Xu SJ, Dai Y, Li L, et al. Comparative study of regulation of T-cell subsets of classic prescriptions that deals with arthralgia syndrome based on relevant theory of prescription and syndrome [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2010, 35: 2030–2032.
- [18] Xu SJ, Li L, Zhang WS, et al. Comparative study on the pharmacodynamics of treating arthralgia based on theory of syndrome-association [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2009, 34: 3131–3134.
- [19] Batliwalla FM, Baechler EC, Xiao X, et al. Peripheral blood gene expression profiling in rheumatoid arthritis [J]. *Genes Immun*, 2005, 6: 388–397.
- [20] Pimentel-Santos FM, Ligeiro D, Matos M, et al. Whole blood transcriptional profiling in ankylosing spondylitis identifies novel candidate genes that might contribute to the inflammatory and tissue-destructive disease aspects [J]. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13: R57–R65.
- [21] Toonen EJM, Barrera P, Radstake TRDJ, et al. Gene expression profiling in rheumatoid arthritis: current concepts and future directions [J]. *Ann Rheum Dis*, 2008, 67: 1663–1669.
- [22] Zhang Y, Wang D, Tan S, et al. A systems biology-based investigation into the pharmacological mechanisms of Wu Tou Tang acting on rheumatoid arthritis by integrating network analysis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 548498.
- [23] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics [J]. *Nat Rev Genet*, 2001, 10: 57–63.
- [24] Li X. Network Pharmacology Based Studies on Integrative Anti-Myocardial Ischemia Effects of Qishen Yiqi Formula (基于网络药理学的芪参益气方抗心肌缺血整合作用研究) [D]. Hangzhou: Zhejiang University (浙江大学), 2014.
- [25] Mao X. Network Target Prediction and Investigations into Pharmacological Mechanisms of Wutou Decoction Acting on Rheumatoid Arthritis (乌头汤治疗类风湿性关节炎寒证的网络调节机制研究) [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences (中国中医科学院), 2017.
- [26] Guo Q, Mao X, Zhang Y, et al. Guizhi-Shaoyao-Zhimu decoction attenuates rheumatoid arthritis partially by reversing inflammation-immune system imbalance [J]. *J Transl Med*, 2016, 14: 165–181.
- [27] Brenner M, Meng HC, Yarlett NC, et al. The non-major histocompatibility complex quantitative trait locus Cia10 contains a major arthritis gene and regulates disease severity, pannus formation, and joint damage [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2005, 52: 322–332.

- [28] Mossiat C, Laroche D, Prati C, et al. Association between arthritis score at the onset of the disease and long-term locomotor outcome in adjuvant-induced arthritis in rats [J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17: 184–196.
- [29] Mancheno-Corvo P, Lopez-Santalla M, Menta R, et al. Intralymphatic administration of adipose mesenchymal stem cells reduces the severity of collagen-induced experimental arthritis [J]. *Front Immuno*, 2017, 8: 462–474.
- [30] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. *J Neurosci Meth*, 1994, 53: 55–63.
- [31] Wang C, Kong X, Zhu C, et al. Wu-tou decoction attenuates neuropathic pain *via* suppressing spinal astrocytic IL-1R1/ TRAF6/JNK signaling [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 92864–92879.
- [32] Zhang Y, Mao X, Guo Q, et al. Pathway of PPAR-gamma coactivators in thermogenesis: a pivotal traditional Chinese medicine-associated target for individualized treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 15885–15900.
- [33] Zhang Y, Bai M, Zhang B, et al. Uncovering pharmacological mechanisms of Wu-tou decoction acting on rheumatoid arthritis through systems approaches: drug-target prediction, network analysis and experimental validation [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 9463–9478.
- [34] Put S, Westhovens R, Lahoutte T, et al. Molecular imaging of rheumatoid arthritis: emerging markers, tools, and techniques [J]. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16: 208–222.
- [35] Bustos RC, Xibilléfriedmann DX, Gonzálezchristen J, et al. Peripheral blood leptin and resistin levels as clinical activity biomarkers in Mexican rheumatoid arthritis patients [J]. *Reumatologia Clin*, 2015, 12: 323–326.
- [36] Kåss A, Hollan I, Fagerland MW, et al. Rapid anti-inflammatory effects of gonadotropin-releasing hormone antagonism in rheumatoid arthritis patients with high gonadotropin levels in the AGRA trial [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0139439.
- [37] Zeisbrich M, Yanes RE, Zhang H, et al. Hypermetabolic macrophages in rheumatoid arthritis and coronary artery disease due to glycogen synthase kinase 3 β inactivation [J]. *Ann Rheum Dis*, 2018, 77: 1053–1062.
- [38] Schena M, Heller RA, Theriault TP, et al. Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics [J]. *Trends Biotechnol*, 1998, 16: 301–306.
- [39] Perry MWD, Björhall K, Bonn BK, et al. Design and synthesis of soluble and cell-permeable PI3K δ inhibitors for long-acting inhaled administration [J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 5057–5071.
- [40] Chaudhary A, Leite M, Kulasekara BR, et al. Human diversity in a cell surface receptor that inhibits autophagy [J]. *Curr Biol*, 2016, 26: 1791–1801.
- [41] Funaki Y, Hasegawa Y, Okazaki R, et al. Resolvin E1 inhibits osteoclastogenesis and bone resorption by suppressing IL-17-induced RANKL expression in osteoblasts and RANKL-induced osteoclast differentiation [J]. *Yonago Acta Med*, 2018, 61: 8–18.
- [42] Wu D, Gao Y, Xiang H, et al. Exploration into mechanism of antidepressant of Bupleuri radix based on network pharmacology [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 210–219.