

基于网络药理学联合加权基因共表达网络分析探究雷公藤治疗系统性红斑狼疮的免疫作用机制

孟祥文¹, 贾晓益¹, 陆志远¹, 程芷洛¹, 谭亚楠¹, 张敏^{2*}

1. 安徽中医药大学 药学院, 安徽 合肥 230012

2. 中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院) 风湿免疫科, 安徽 合肥 230001

摘要: 目的 运用网络药理学联合加权基因共表达网络分析(WGCNA)探究雷公藤治疗系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)的潜在作用机制。方法 利用TCMSP数据库检索雷公藤的主要活性成分,并挖掘活性成分相关靶点,通过GEO平台下载SLE相关基因芯片GSE65391,使用R软件limma包进行差异分析,并运用WGCNA筛选出的模块基因作为疾病靶点基因。R软件Venn Diagram包进行交集分析并可视化。利用ADEX平台对交集靶点基因的表达情况进行Meta分析。采用R软件clusterProfiler包对交集靶点基因进行基因本体论(GO)功能富集和京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析。采用Cytoscape软件进行“药物-活性成分-共同靶点”网络的构建与分析。将交集靶点基因上传至STRING数据库,把结果数据导入至Cytoscape软件构建蛋白相互作用(PPI)网络并筛选核心靶点基因。表达量分析、PPI分析、诊断效能分析被用于展示核心靶点基因的作用与临床价值。采用PyMOL软件对核心活性成分与核心靶点基因进行分子对接验证。利用R软件并通过CIBERSORT算法对样本的免疫细胞分布进行计算。结果 共筛选出有效活性成分50个,成分相关靶点690个,WGCNA关联模块基因1215个;KEGG通路分析,主要涉及Toll样受体等信号通路;筛选出山柰酚、雷公藤甲素、triptofordin B1、异落叶松脂素4个核心成分和SIRT1核心靶点基因。分子对接结果显示,山柰酚和雷公藤甲素与SIRT1具有稳定的结合能力。免疫浸润分析结果显示,SIRT1主要通过抑制中性粒细胞发挥抗SLE作用。结论 雷公藤可能从抗炎、调节免疫细胞功能等多方面发挥对SLE的治疗作用,为雷公藤治疗SLE提供了研究思路 and 理论支撑。

关键词: 雷公藤; 系统性红斑狼疮; 生物信息学; 分子对接; 山柰酚; 雷公藤甲素; 免疫浸润; 抗炎; 调节免疫

中图分类号: R976 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2022)10-2215-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.10.007

Explore the immune mechanism of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. in treatment of systemic lupus erythematosus based on network pharmacology combined with WGCNA

MENG Xiang-wen¹, JIA Xiao-yi¹, LU Zhi-yuan¹, CHENG Zhi-luo¹, TAN Ya-nan¹, ZHANG Min²

1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China

2. Department of Rheumatology & Immunology, the First Affiliated Hospital of USTC (Anhui Provincial Hospital), Hefei 230001, China

Abstract: Objective To explore the effect and potential mechanism of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. in treatment of systemic lupus erythematosus (SLE) by network pharmacology combined with WGCNA. **Methods** The TCMSP database was used to retrieve the main active ingredients of *Tripterygium wilfordii* Hook. f., and the active ingredient-related targets were mined through the database. The gene chip GSE65391 related to SLE was downloaded from the GEO platform, and the limma package of R software was used for differential analysis, and the module genes selected by WGCNA were used as disease target genes. R software Venn Diagram package for intersection analysis visualization. ADEX platform was used to perform Meta-analysis on the expression of intersection target genes. R software clusterProfiler package was used to perform gene ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto encyclopedia

收稿日期: 2022-05-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82074090); 中国博士后科学基金资助项目(2020M682051); 安徽省自然科学基金资助项目(1808085MH298); 安徽省博士后科研活动资助项目(2021A480)

作者简介: 孟祥文, 硕士研究生, 研究方向为系统性红斑狼疮等免疫相关疾病。E-mail: mengxiangwen_ydx@163.com

*通信作者: 张敏, 副主任医师, 硕士生导师, 研究方向为系统性红斑狼疮临床与基础研究。E-mail: doczhangmin@ustc.edu.cn

of genes and genomes (KEGG) signaling pathway enrichment analysis for intersection target genes. Cytoscape software was used to construct and analyze the “drug-active ingredient-common target” network. The intersection target genes were uploaded to STRING database, and the result data were imported into Cytoscape software to construct protein interaction network (PPI) and screen the core target genes. Expression analysis, protein interaction analysis, and diagnostic efficiency analysis were used to demonstrate the role and clinical value of core target genes. PyMOL software was used to verify the molecular docking between core active components and core target genes. R software and CIBERSORT algorithm were used to calculate the distribution of immune cells. **Results** A total of 50 active components, 690 component-related targets, and 1 215 WGCNA association module genes were screened out. KEGG pathway analysis mainly involved Toll-like receptors and other signaling pathways. Four core components including kaempferol, triptolide, triptofordin B1, isocolonin, and SIRT1 core target genes were screened. The molecular docking results showed that kaempferol and reagin had stable binding ability to SIRT1. The results of immune infiltration analysis showed that SIRT1 exerted anti-SLE effect mainly by inhibiting neutrophils. **Conclusion** In this study, we found that *Tripterygium wilfordii* Hook. f. may exert its therapeutic effects on SLE from various aspects such as anti-inflammation and regulation of immune cell function, which provides research ideas and theoretical support for the treatment of SLE with *Tripterygium wilfordii* Hook. f..

Key words: *Tripterygium wilfordii* Hook. f.; systemic lupus erythematosus; bioinformatics; molecular docking; kaempferol; triptolide; immune infiltration; anti-inflammatory; immune regulation

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是一种以慢性炎症和免疫异常为特征的复杂自身免疫性疾病, 累及多个器官, 临床表现多样, 如淋巴细胞减少、肾损伤、胸膜炎、脑膜炎、角膜炎及胃肠道症状等^[1-2]。目前临床常用的治疗西医药物为糖皮质激素和免疫抑制剂, 但往往带来较为严重的不良反应^[3-4]。现代中医学认为 SLE 属于热毒炽盛证^[5], 而大多数传统中医药具有低毒高效的特点, 不良反应较轻, 这也为其在治疗 SLE 的临床应用中带来新思路。雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 是卫矛科雷公藤植物的根、叶及花, 性凉, 具有消炎、解毒的功效。研究表明, 雷公藤具有明确的抗炎作用, 雷公藤制剂也具有免疫抑制、抗炎、抗肿瘤等多种生物活性, 对于治疗 SLE 具有很大的潜能^[6-8]。本研究采用网络药理学联合加权基因共表达网络分析 (WGCNA) 方法探讨雷公藤作用于 SLE 的相关分子机制, 为治疗 SLE 提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 雷公藤活性成分及靶点的筛选

通过中药系统药理学数据库与分析平台^[9] (TCMSP) 寻找雷公藤的化学成分, 根据口服利用度 (OB) $\geq 30\%$ 且类药性 (DL) ≥ 0.18 为筛选条件对雷公藤的活性成分初步筛选, 利用本草组鉴 (HERB) 平台^[10]和 SwissTargetPrediction^[11]进行活性成分靶点预测。SwissTargetPrediction 平台中选择分数大于 0.1 的靶点作为有效靶点, 两数据库获取结果的并集作为雷公藤的总靶点。

1.2 基因芯片及差异分析

通过 GEO 平台^[12]下载基因芯片 GSE65391, 利

用 R 软件包 limma^[13]进行差异分析, 以“校正后的 $P < 0.05$ 且 $|\log FC| \geq 0.5$ ”为筛选条件获取差异表达基因。利用 Venn Diagram 包绘制雷公藤靶点基因与 SLE 差异基因的韦恩图。

1.3 WGCNA

利用 WGCNA R 包构建共表达网络, 利用 pickSoft Threshold 函数估算软阈值, 然后根据软阈值构造相关矩阵, 进一步计算拓扑重叠矩阵 (TOM)。最后利用 hclust 函数进行层次聚类并根据拓扑重叠异度 (1-TOM) 对基因进行分组, 使用 dynamic tree cut 算法来确定基因模块。Module membership (MM) 是基于基因的表达水平, 通过计算模块中基因与模块特征基因的相关性的高低来确定模块中的关键基因。MM 值高说明模块中的基因有较高的关联性。以相关性的绝对值大于 0.3 作为筛选致病模块基因的条件。

1.4 Meta 分析

基于 ADEx 数据库, 利用 20 个 SLE 相关数据集, 对交集靶点基因在 SLE 中的表达情况进行 Meta 分析。

1.5 相关性分析

通过 Pearson 检验, 分析交集靶点之间的相关性, 并绘制相关性热图。

1.6 “药物-成分-靶点”网络的构建

依据药物的靶点基因和疾病差异基因建立“药物-成分-靶点”网络文件, 并编辑属性文件, 导入 Cytoscape 3.8.2 软件中^[14], 构建“药物-成分-靶点”可视化网络。网络图的节点 (node) 分别为药物、成分、靶点。各节点之间的相互关系以边

(edge)表示。利用 CytoNCA 插件对网络图进行分析,得到雷公藤候选成分中改善 SLE 的主要药效成分。

1.7 基因本体论 (GO) 功能富集和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析

利用 R 软件 ClusterProfiler 包^[15]对共同靶点基因进行 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析。GO 分析主要包括生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cell component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF)。筛选 $P < 0.05$ 的条目,利用 ggplot2 包绘制柱状图与气泡图。

1.8 蛋白相互作用 (PPI) 网络的构建

将交集靶点基因导入 STRING 11.5 平台^[16]隐藏离散的靶点,构建 PPI 网络,再将 PPI 网络导入 Cytoscape 中可视化,并通过 cytoHubba 插件^[17]筛选核心靶点基因。核心靶点网络构建方法相同。

1.9 表达量与诊断分析

提取核心靶点基因表达量,分析在正常样本和 SLE 患者之间的差异,并通过 ROC 展示核心靶点基因的诊断效能。

1.10 分子对接

选择“药物-成分-靶点”网络中的主要活性成分与核心靶点基因进行分子对接。从 TCMSP 平台下载主要活性成分的 mol2 格式文件,再利用 ChemBio3D Ultra 14.0 转化为 3D 结构。从 PDB 数据库下载核心靶点基因的 PDB 格式文件,运用 PyMOL 2.4.1 软件对蛋白质进行去水等操作,利用 AutoDock Vina 1.1.2 软件^[18]进行对接。

1.11 免疫浸润分析

利用 R 软件通过 CIBERSORT 算法对样本的免疫细胞分布进行计算,得出数据集中每一个样本的免疫细胞比例分数。通过堆叠柱状图展示样本中免疫细胞分布情况,利用箱线图展示正常样本和 SLE 患者间免疫细胞差异,运用相关性气泡图展示核心靶点基因与免疫细胞的相关性。

2 结果

2.1 流程图

本研究的分析流程图见图 1。

2.2 雷公藤活性成分及其靶点的筛选

在 TCMSP 数据库中以 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 为条件共筛选出 50 个雷公藤活性成分,见表 1。通过 SwissTargetPrediction、HERB 数据库检索这些活性成分的相关靶点,合并去重后共得到了 690 个相关靶标。

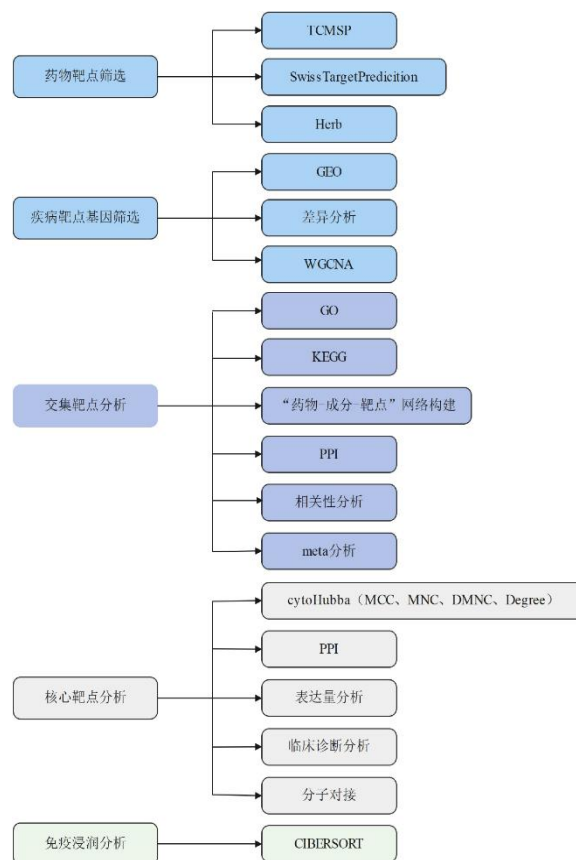


图 1 流程图

Fig. 1 Flow chart

2.3 疾病靶点基因差异分析与 WGCNA 分析

利用 R 软件的 limma 包进行数据集的差异分析,共得到 1 338 个差异基因,其中上调基因 532 个,下调基因 806 个,结果用火山图展示(图 2A)。在 WGCNA 分析中,使用软阈值 8 和最小模块值为 30 来定义邻接矩阵(图 2B),图 2C 展示了通过基因邻接系数层次聚类构建的基因树状图,通过模块基因与性状关联分析,发现 4 个与发病密切相关的模块基因 (MEblue、MEgrey、MEturquoise、MEbrown) 共 1 215 个基因(图 2D)。

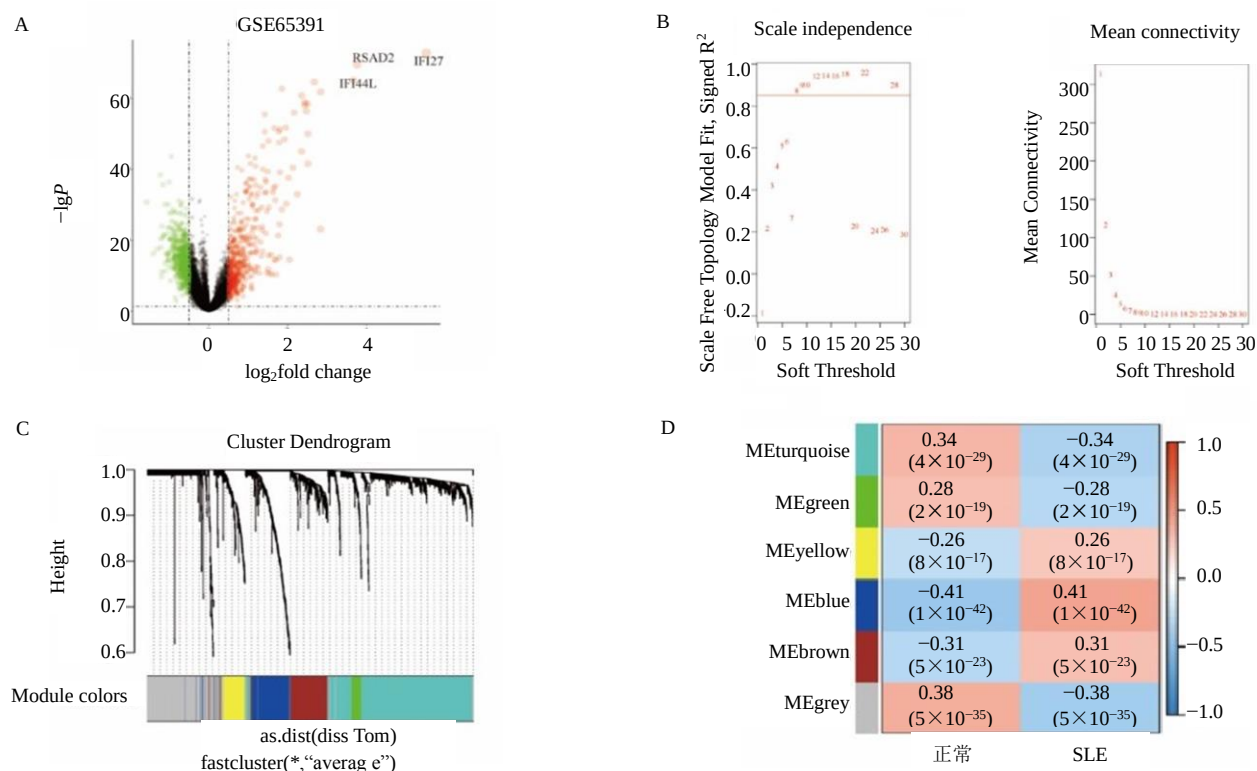
2.4 交集靶点 Meta 分析与相关性分析

将 690 个药物靶点和 1 215 个模块基因导入 R 软件中,利用 VennDiagram 包进行交集分析,获得交集靶点基因 48 个,即雷公藤治疗 SLE 的潜在作用靶点(图 3A)。为探究交集靶点基因是否稳定表达,基于 20 个 SLE 相关的 GEO 数据集,对交集靶点基因在 SLE 的表达情况进行 Meta 分析(图 3B)。结果显示,48 个交集靶点基因在多个 SLE 数据集中均较稳定的上调或下调表达。图 3C 展示了 48 个靶点基因的相关性。

表 1 雷公藤活性成分

Table 1 Active components of *Tripterygium wilfordii*

编号	Mol ID	活性成分	OB/%	DL
LGT1	MOL000211	mairin	55.38	0.78
LGT2	MOL000296	hederagenin	36.91	0.75
LGT3	MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75
LGT4	MOL000422	kaempferol	41.88	0.24
LGT5	MOL000449	stigmaesterol	43.83	0.76
LGT6	MOL002058	40957-99-1	57.20	0.62
LGT7	MOL003182	(+)-medioresinol di-O-beta-D-glucopyranoside_qt	60.69	0.62
LGT8	MOL003184	81827-74-9	45.42	0.53
LGT9	MOL003185	(1R,4aR,10aS)-5-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-7-isopropyl-8-methoxy-1,4a-dimethyl-4,9,10,10a-tetrahydro-3H-phenanthren-2-one	48.84	0.38
LGT10	MOL003187	triptolide	51.29	0.68
LGT11	MOL003188	tripchlorolide	78.72	0.72
LGT12	MOL003189	wilforlide A	35.66	0.72
LGT13	MOL003192	triptonide	67.66	0.70
LGT14	MOL003196	tryptophenolide	48.50	0.44
LGT15	MOL003198	5 alpha-benzoyl-4 alpha-hydroxy-1 beta, 8 alpha-dinicotinoyl-dihydro-agarofuran	35.26	0.72
LGT16	MOL003199	5,8-dihydroxy-7-(4-hydroxy-5-methyl-coumarin-3)-coumarin	61.85	0.54
LGT17	MOL003206	canin	77.41	0.33
LGT18	MOL003208	celafurine	72.94	0.44
LGT19	MOL003209	celalocinnine	83.47	0.59
LGT20	MOL003210	celapanine	30.18	0.82
LGT21	MOL003211	celaxanthin	47.37	0.58
LGT22	MOL003217	isoxanthohumol	56.81	0.39
LGT23	MOL003222	salazinic acid	36.34	0.76
LGT24	MOL003224	triptololnide	56.4	0.67
LGT25	MOL003225	hypodiolide A	76.13	0.49
LGT26	MOL003229	triptinin B	34.73	0.32
LGT27	MOL003231	triptoditerpenic acid B	40.02	0.36
LGT28	MOL003232	triptofordin B1	39.55	0.84
LGT29	MOL003233	triptofordin B2	107.71	0.76
LGT30	MOL003234	triptofordin C2	30.16	0.76
LGT31	MOL003235	triptofordin D1	32.00	0.75
LGT32	MOL003236	triptofordin D2	30.38	0.69
LGT33	MOL003238	triptofordin F1	33.91	0.6
LGT34	MOL003239	triptofordin F2	33.62	0.67
LGT35	MOL003241	triptofordin F4	31.37	0.67
LGT36	MOL003242	triptofordinine A2	30.78	0.47
LGT37	MOL003245	triptonoditerpenic acid	42.56	0.39
LGT38	MOL003248	triptonoterpene	48.57	0.28
LGT39	MOL003266	21-hydroxy-30-norhopan-22-one	34.11	0.77
LGT40	MOL003267	wilformine	46.32	0.20
LGT41	MOL003278	salaspermic acid	32.19	0.63
LGT42	MOL003279	99694-86-7	75.23	0.66
LGT43	MOL003280	triptolide	49.51	0.49
LGT44	MOL003283	(2R,3R,4S)-4-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-7-methoxy-2,3-dimethylol-tetralin-6-ol (isolaricresinol)	66.51	0.39
LGT45	MOL004443	zhebeiresinol	58.72	0.19
LGT46	MOL005828	nobiletin	61.67	0.52
LGT47	MOL007415	[(2S)-2-[[[(2S)-2-(benzoylamino)-3-phenylpropanoyl]amino]-3-phenylpropyl] acetate	58.02	0.52
LGT48	MOL007535	(5S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-[(1R,4R)-4-ethyl-1,5-dimethylhexyl]-10,13-dimethyl-2,4,5,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-3,6-dione	33.12	0.79
LGT49	MOL009386	3,3'-bis-(3,4-dihydro-4-hydroxy-6-methoxy)-2H-1-benzopyran	52.11	0.54
LGT50	MOL011169	peroxyergosterol	44.39	0.82



A-基因芯片 GSE65391 差异分析火山图 B-不同软阈值对应的 R^2 和不同软阈值对应的基因邻接系数 C-通过基因邻接系数层次聚类构建的基因树状图 D-共表达基因模块与 SLE 临床特征的关系

A - Volcano plot of GSE65391 differential analysis B - R^2 corresponding to different soft thresholds and the gene adjacency coefficients corresponding to different soft thresholds C - Gene dendrogram obtained by average linkage hierarchical clustering D - Relationship between co-expressed gene modules and clinical features of SLE

图 2 靶点基因差异分析与 WGCNA 分析

Fig. 2 Difference analysis and WGCNA analysis of key target

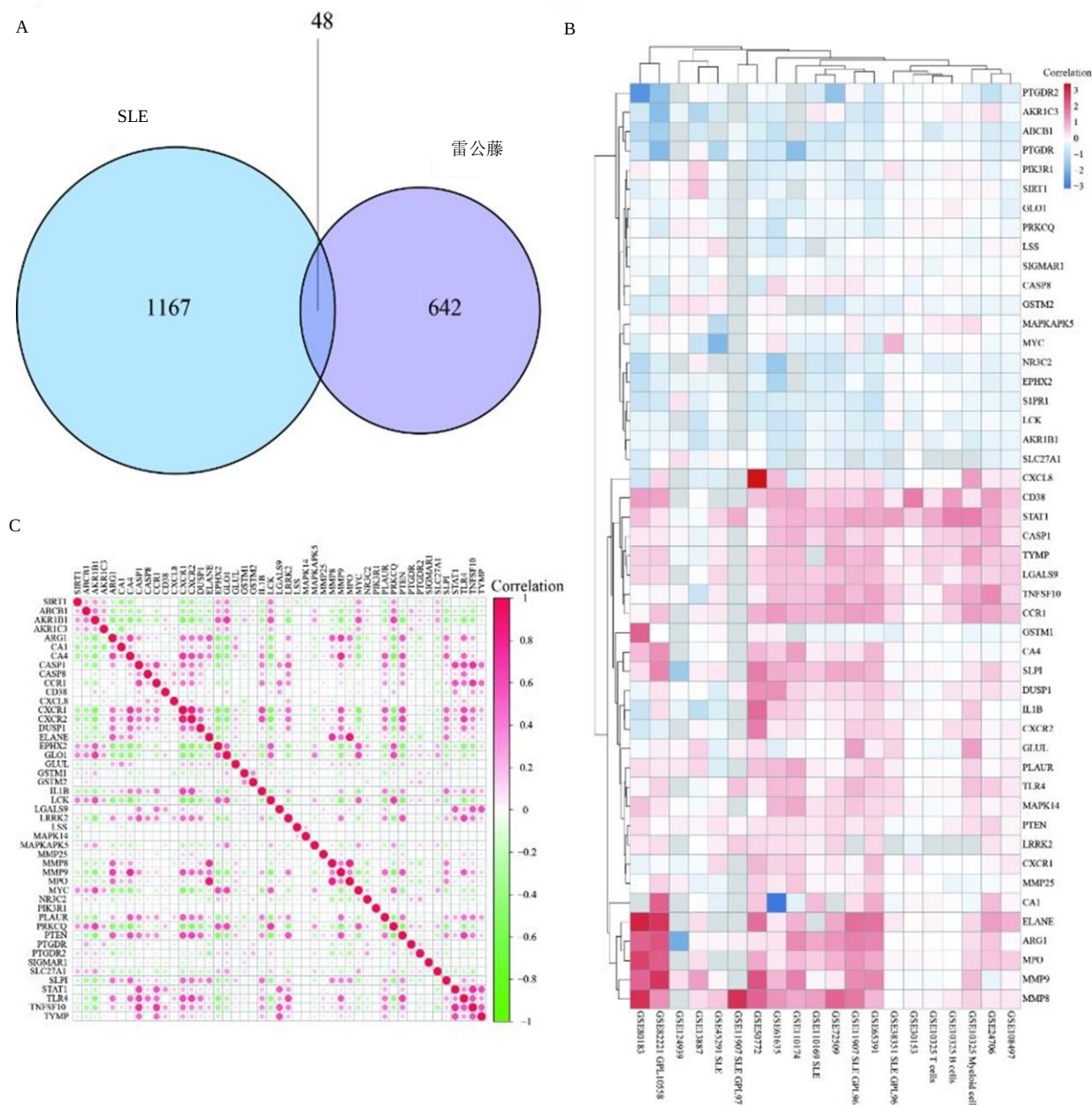
2.5 富集分析

将 48 个基因导入 R 软件, 利用 clusterProfiler 包进行 GO 和 KEGG 富集分析, 根据 $P < 0.05$ 分别筛选出 1 245 个 BP 条目、45 个 CC 条目和 136 个 MF 条目。前 30 个 GO 条目见图 4。BP 主要富集在中性粒细胞活化 (neutrophil activation)、脂多糖反应 (response to lipopolysaccharide)、非生物刺激反应 (cellular response to abiotic stimulus)、环境刺激反应 (cellular response to environmental stimulus)、细菌源性反应 (response to molecule of bacterial origin) 等; CC 主要富集在质膜外侧 (external side of plasma membrane)、囊泡腔 (vesicle lumen)、分泌颗粒膜 (secretory granule membrane)、分泌颗粒腔 (secretory granule lumen)、细胞质囊泡腔 (cytoplasmic vesicle lumen); MF 主要富集在细胞因子受体结合 (cytokine receptor binding)、磷酸酯水解酶活性 (phosphoric ester hydrolase activity)、内肽酶活性 (endopeptidase activity)、磷酸酶活性

(phosphatase activity)、肽结合 (peptide binding)。同样根据 $P < 0.05$ 筛选出 91 条 KEGG 富集条目, 前 10 通路的气泡图见图 4。这些通路主要富集在脂质和动脉粥样硬化 (lipid and atherosclerosis)、Toll 样受体信号通路 (Toll-like receptor signaling pathway)、乙型肝炎 (hepatitis B)、甲型流感 (influenza A)、人类巨细胞病毒感染 (human cytomegalovirus infection)、沙门氏菌感染 (salmonella infection) 等。

2.6 “药物-活性成分-靶点”和 PPI 网络构建

用 Cytoscape 软件处理得到雷公藤“药物-成分-靶点”相互作用关系网络 (图 5A)。其中共包括 72 个节点, 125 条边, 靶基因节点 48 个, 活性成分节点 23 个。利用 CytoNCA 插件进行度值分析发现雷公藤中度值大于 6 的活性成分为山柰酚 (kaempferol, degree=18)、雷公藤甲素 (triptolide, degree=9)、triptofordin B1 (degree=9)、异落叶松脂素[(2R,3R,4S)-4-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-7-



A-雷公藤靶点与 SLE 靶点基因韦恩图 B-共同靶点基因表达量的 Meta 分析热图 C-共同靶点基因表达量的相关性热图
A - Venn diagram between *Tripterygium wilfordii* Hook. f. and SLE targets B - Heatmap of Meta-analysis of common target gene expression C - Correlation heatmap of common target gene expression

图 3 交集靶点 Meta 分析与相关性分析
Fig. 3 Common target Meta-analysis and correlation analysis

methoxy-2,3-dimethylol-tetralin-6-ol 或 isolariciresinol, degree=9]、南蛇藤 β -呋喃甲酸胺 (celafurine, degree=7)、异黄腐酚 (isoxanthohumol, degree=7)、雷公藤内酯酮 (triptonide, degree=7)、过氧麦角甾醇 (peroxyergosterol, degree=7)。将 48 个互作靶点导入 STRING 网络平台, PPI 网络有 71 个节点, 206 条边, 下载网络文件导入 Cytoscape 进行可视化调整, PPI 网络和 cytoHubba 4 种算法的可视化

见图 5B。

2.7 核心靶点基因筛选与分析

将 4 种算法获取到的前 10 靶点基因的交集作为核心靶点基因, 得到了核心靶点基因 SIRT1 (图 6A)。将 SIRT1 导入 STRING 网络平台, PPI 网络有 11 个节点, 41 条边, 下载网络文件导入 Cytoscape 进行可视化调整 (图 6B)。通过 R 软件提取 SIRT1 基因表达量数据, SIRT1 在正常和 SLE 中的表达情

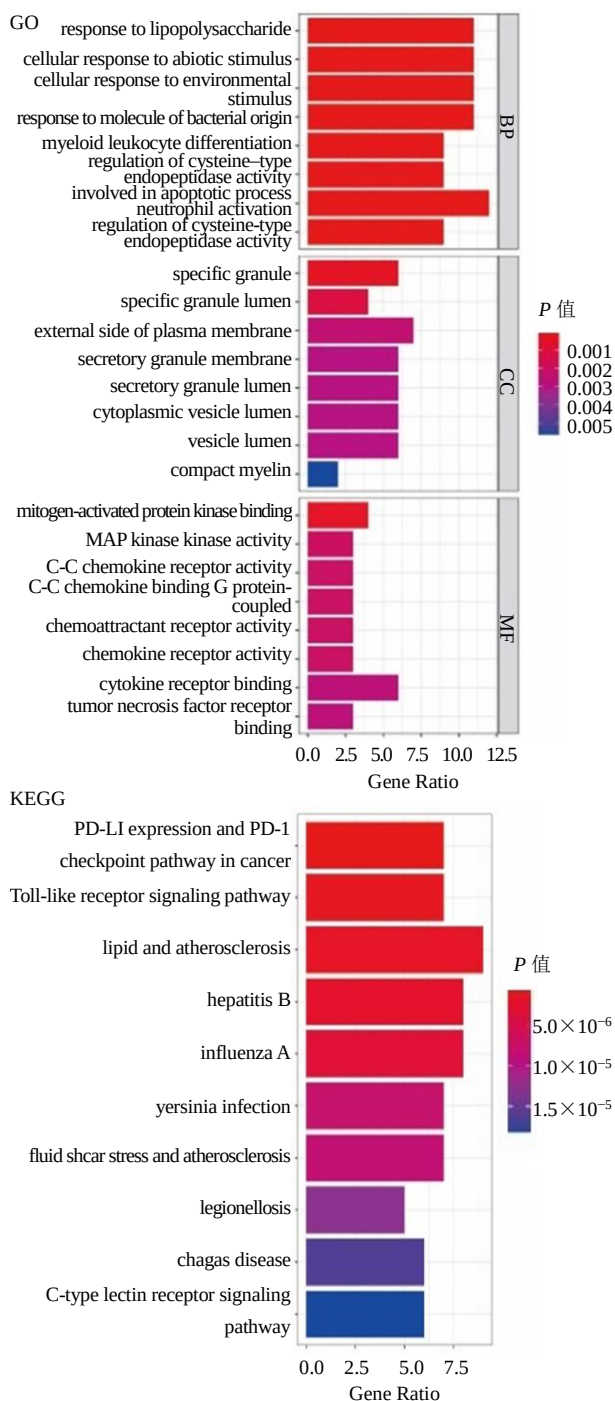


图 4 GO 和 KEGG 富集分析

Fig. 4 GO and KEGG enrichment analysis

况见图 6C, SIRT1 诊断 ROC 的曲线下面积达到 0.758 (图 6D), 提示 SIRT1 可能作为疾病诊断的潜在指标。综上, SIRT1 在是雷公藤治疗 SLE 的核心靶点, 相对于正常样本在 SLE 中呈低表达, 具有一定的临床诊断价值。

2.8 分子对接

将雷公藤筛选得到的核心靶点与其所对应的

关键蛋白使用 AutoDock Vina 软件进行分子对接验证, 以直观的方式展示了关键成分的最佳构型和核心靶点之间的相互作用。其中 SIRT1 蛋白与山柰酚、雷公藤甲素、triptofordin B1、异落叶松脂素的对接结合能均小于 -5 kJ/mol, 结合能分别为 -37.2 kJ/mol、 -25.5 kJ/mol、 -25.52 kJ/mol 和 -24.27 kJ/mol, 对接模拟可视化见图 7。雷公藤中的主要活性成分与核心靶点的高结合亲和力表明, 雷公藤可能是通过调节以上相关靶标发挥治疗 SLE 的作用。

2.9 免疫浸润分析

利用表达量数据, 通过 CIBERSORT 算法进行 SLE 免疫微环境分析, 绘制了正常样本和患者 22 种免疫细胞比例分布图 (图 8A)。正常样本和 SLE 患者的 22 种免疫细胞差异情况见图 8C, 结果显示 B cells naive、T cells CD8、T cells CD4 naive、T cells CD4 memory resting、T cells CD4 memory activated、Tregs、T cells gamma delta、NK cells resting、macrophages M0、dendritic cells activated、mast cells activated、neutrophils 在患病前后的数量变化具有显著差异, 提示 SLE 的发生于发展可能与这些免疫细胞失调有关。提取 SLE 患者表达数据, 并根据 SIRT1 表达进行高低分组, 结果发现 SIRT1 的高低表达与 T cells CD8、T cells CD4 memory resting、Tregs、NK cells resting、monocytes、macrophages M0、mast cells resting、mast cells activated、neutrophils 的细胞数量显著相关 (图 8D), 其中趋势最为明显为 T cells CD4 memory resting 和 neutrophils。在对 SIRT1 与免疫细胞的相关性分析发现, 与 SIRT1 最相关的免疫细胞是 neutrophils (图 8B)。这表明 SIRT1 可能通过下调 neutrophils 数量进而缓解 SLE 的进程。

3 讨论

本研究结合生物信息学与药物网络分析的方法, 探讨具有作用多靶点、多通路的复杂中药雷公藤与 SLE 的关系^[19]。基于“药物-成分-靶点”网络, 发现雷公藤抗 SLE 的主要活性成分为山柰酚、雷公藤甲素、triptofordin B1 和异落叶松脂素。山柰酚是许多蔬菜和水果中发现的天然黄酮类化合物。流行病学研究已经描述了山柰酚摄入量可以降低肺、胃、胰腺和卵巢癌等癌症的风险。使用山柰酚对预防和治疗炎症性疾病如系统性红斑狼疮, 类风湿关节炎和强直性脊柱炎有治疗效果^[20]。雷公藤甲素已被广泛报道用于治疗多种炎症性疾病, 如系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、牛皮癣等, 其抗炎安全

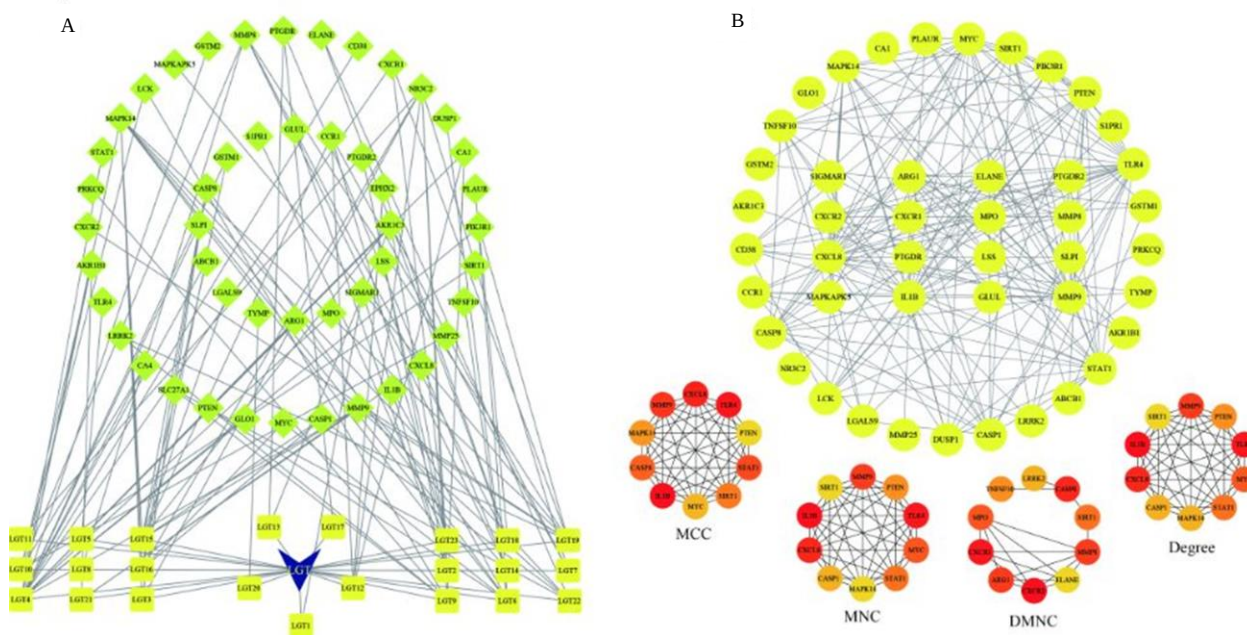
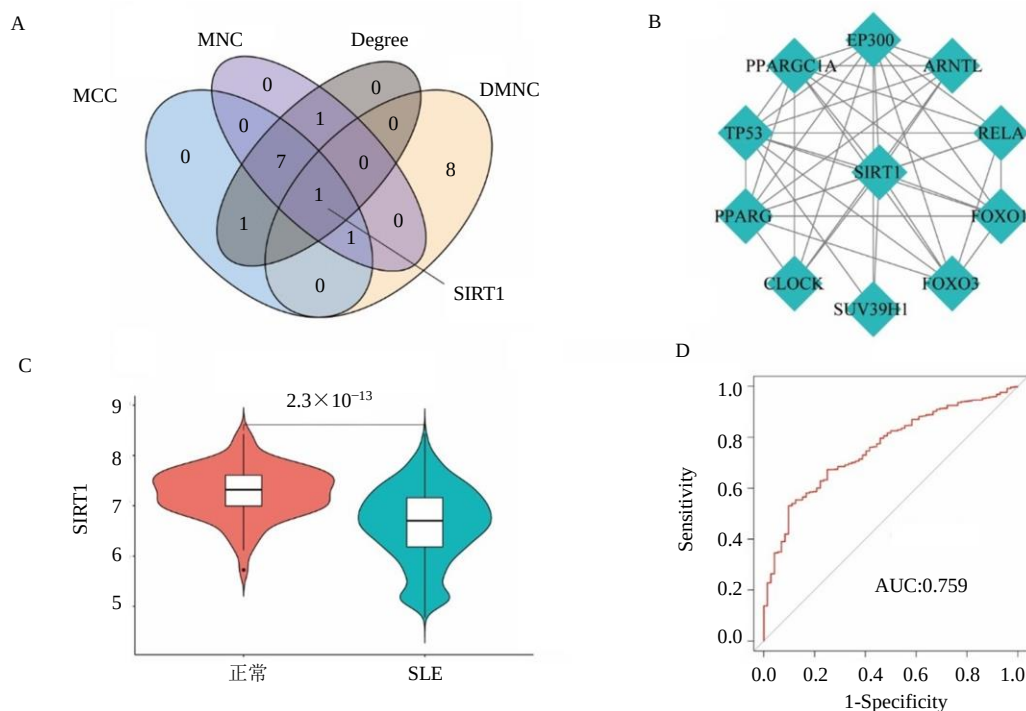


图 5 “药物-活性成分-靶点”网络 (A) 和 PPI 网络 (B) 构建
Fig. 5 Network of “drug-active ingredient-target” (A) and PPI network (B)



A-4 种算法靶点基因交集韦恩图 B-SIRT1 的 PPI 网络 C-SIRT1 在正常和 SLE 中的表达差异小提琴图 D-SIRT1 的诊断 ROC
A - Venn diagram of target genes intersection of the four algorithms B - PPI network of SIRT1 C - Violin plot of differential expression of SIRT1 in normal and SLE D - Diagnostic ROC for SIRT1

图 6 核心靶点基因筛选与分析
Fig. 6 Core target gene screening and analysis

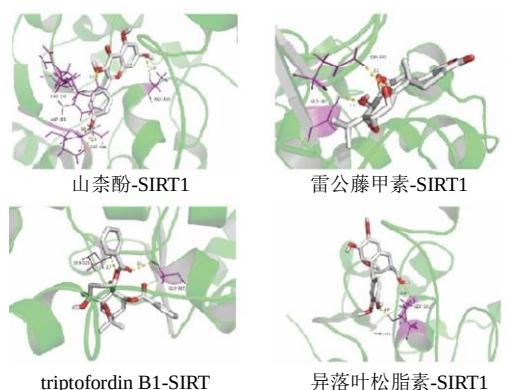


图 7 核心成分与核心靶点分子对接模式图

Fig. 7 Molecular docking diagram of core components and targets

性和有效性已经被许多研究证实。Zhao 等^[21]发现,雷公藤甲素可以通过介导 Treg 上调诱导 miR-125a-5p 从而改善狼疮。雷公藤甲素还可以通过抑制 JAK/STAT 信号通路激活缓解 SLE 模型小鼠炎症免疫反应^[22]。最近的研究表明,雷公藤甲素治疗 SLE 的机制可能与其调节 Tc 与 Th 细胞向 Tc1 和 Tc2 漂移,维持治疗不同阶段 Tc 与 Th 细胞相对稳态而影响免疫应答及炎症反应过程有关^[23]。triptofordin B1 和异落叶松脂素在 SLE 中的研究较少,这可能为 SLE 的药物治疗提供新思路。

通过 cytoHubba 插件中 MCC、MNC、DMNC、Degree 4 种算法得到雷公藤治疗 SLE 中最核心靶点 Sirtuin 1 (SIRT1)。SIRT1 是 Sirtuin 蛋白家族的一员,它的产生依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)的 II 型组蛋白脱乙酰酶和单 ADP 核糖基转移酶。SIRT1 广泛参与机体的各种生理和病理过程,包括代谢、衰老、转录、DNA 损伤和修复、凋亡、细胞周期调控、炎症和癌症^[24-25]。同时 SIRT1 可能是免疫系统中的一个重要调节元件,其功能的改变可能与 SLE 的发展有关^[26]。B 淋巴细胞过度活动是系统性狼疮红斑的主要特征,SIRT1 过表达可以促进 BAF3 细胞增殖,抑制细胞凋亡和上调促炎细胞因子^[27]。尿液中 SIRT1 的表达变化也与狼疮肾炎(LN)患者的疾病活动性密切相关^[28]。研究报道雷公藤中多种活性成分均对 SIRT1 有抑制作用,雷公藤内酯醇可通过激活 SIRT1/PGC-1α 和 SIRT1/NF-κB 信号通路改善血管性痴呆大鼠认知功能障碍^[29-30]。山奈酚也可通过激活 SIRT1 和抑制 PARP1 抑制过氧化氢诱导的视网膜色素上皮细胞炎症和凋亡^[31]。

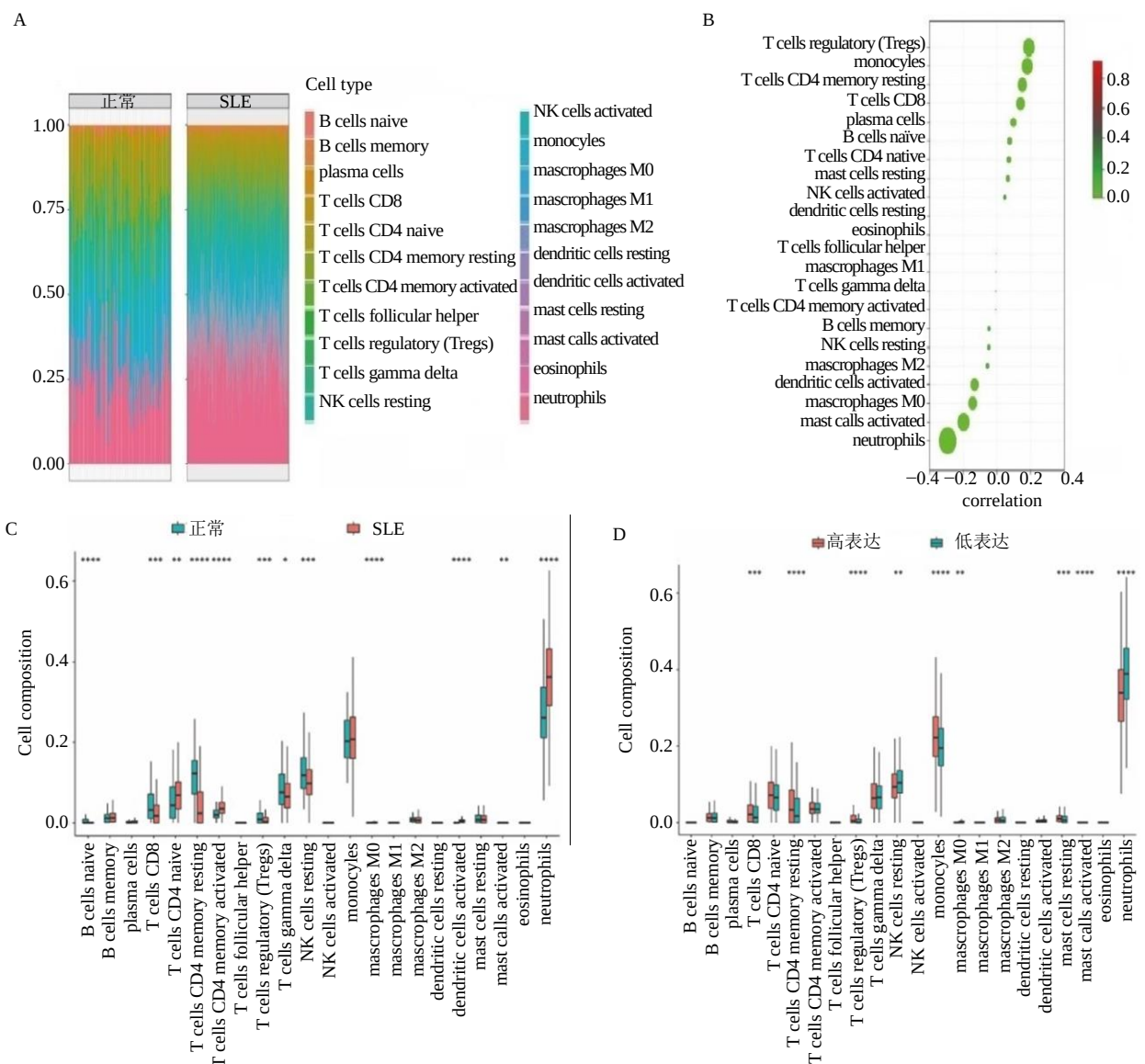
在对交集靶点通路分析的结果中,本研究发现了一个重要的通路:Toll 样受体信号通路。SLE 患者 B 细胞和 T 细胞对自身抗原的免疫耐受丧失是由 Toll 样受体(TLRs)以细胞内在方式控制的^[32]。研究发现,TLR7 激动剂咪喹莫特可以通过抑制辅助性 T 淋巴细胞的分化,阻止 MRL/lpr 小鼠 SLE 的进展^[33]。双氢青蒿素可以抑制狼疮小鼠脾细胞中 Toll 样受体 4 信号通路的活化^[34]。Toll 样受体信号通路是本研究富集到的主要通路,这提示雷公藤可能通过抑制 Toll 样受体信号通路来调节 B 细胞和 T 细胞的增殖与分化,发挥抗 SLE 的作用。

综上,雷公藤通过多成分、多靶点、多通路来治疗 SLE,其中核心的成分、靶点和通路分别为山奈酚和雷公藤甲素、SIRT1、Toll 样受体信号通路。为雷公藤治疗 SLE 的研究提供了新的思路与理论基础,但后续仍需进一步的实验验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kiriakidou M, Ching C L. Systemic lupus erythematosus [J]. *Ann Intern Med*, 2020, 172(11): ITC81-ITC96.
- [2] Fortuna G, Brennan M T. Systemic lupus erythematosus: Epidemiology, pathophysiology, manifestations, and management [J]. *Dent Clin North Am*, 2013, 57(4): 631-655.
- [3] Tunncliffe D J, Singh-Grewal D, Kim S, et al. Diagnosis, monitoring, and treatment of systemic lupus erythematosus: A systematic review of clinical practice guidelines [J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2015, 67(10): 1440-1452.
- [4] 何美莹, 陈新林, 李先涛. 基于复杂网络分析系统性红斑狼疮热毒炽盛证中医临床症方药规律 [J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(11): 2699-2703.
- [5] Wen J, Liu J, Wang X, et al. Triptolide promotes the apoptosis and attenuates the inflammation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis by down-regulating lncRNA ENST00000619282 [J]. *Phytother Res*, 2021, 35(8): 4334-4346.
- [6] Su Z, Sun H, Ao M, et al. Atomic force microscopy study of the anti-inflammatory effects of triptolide on rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *Microsc Microanal*, 2017, 23(5): 1002-1012.
- [7] Zhang H, Chen W. Interleukin 6 inhibition by triptolide prevents inflammation in a mouse model of ulcerative colitis [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(3): 2271-2276.
- [8] 王亚丹, 汪祺, 张建宝, 等. 雷公藤制剂的化学成分及



A-正常和 SLE 患者 22 种免疫细胞比例图 B-SIRT1 与 22 种免疫细胞相关性气泡图 C-正常和 SLE 患者 22 种免疫细胞差异箱线图 D-SIRT1 高低表达患者 22 种免疫细胞差异箱线图

A - Histogram of the ratio of 22 immune cell types in Normal and SLE patients B - Bubble diagram of the correlation between SIRT1 and 22 types of immune cells C - Box plot of 22 immune cell differences between normal and SLE patients D - Box plot of 22 immune cell differences in patients with high and low SIRT1 expression

图 8 免疫浸润分析

Fig. 8 Immune infiltration analysis

- 质量研究现状 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(16): 3368-3373.
- [9] Ru J, Li P, Wang J, *et al.* TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [10] Fang S, Dong L, Liu L, *et al.* HERB: A high-throughput experiment-and reference-guided database of traditional Chinese medicine [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D1197-D1206.
- [11] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: Updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W357- W364.
- [12] Edgar R, Domrachev M, Lash A E. Gene expression omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(1): 207-210.
- [13] Nagy A, Lanczky A, Menyhart O, *et al.* Validation of

- miRNA prognostic power in hepatocellular carcinoma using expression data of independent datasets [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 9227.
- [14] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [15] Yu G, Wang L G, Han Y, et al. clusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. *OMICS*, 2012, 16(5): 284-287.
- [16] Szklarczyk D, Morris J H, Cook H, et al. The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D362-D368.
- [17] Chin C H, Chen S H, Wu H H, et al. cytoHubba: Identifying hub objects and sub-networks from complex interactome [J]. *BMC Syst Biol*, 2014, 8 Suppl 4: S11.
- [18] Trott O, Olson A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *J Comput Chem*, 2010, 31(2): 455-461.
- [19] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [20] Lin F, Luo X, Tsun A, et al. Kaempferol enhances the suppressive function of Treg cells by inhibiting FOXP3 phosphorylation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 28(2): 859-865.
- [21] Zhao X, Tang X, Yan Q, et al. Triptolide ameliorates lupus via the induction of miR-125a-5p mediating Treg upregulation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 71: 14-21.
- [22] 汤艳华, 刘玲, 刘炬, 等. 雷公藤内酯醇调控 JAK/STAT 信号通路对系统性红斑狼疮模型小鼠炎症免疫的影响 [J]. *中药材*, 2021, 44(8): 1976-1980.
- [23] 刘玉芳, 何华琼, 丁演鹂, 等. 雷公藤甲素对系统性红斑狼疮 BALB/c-un 裸小鼠外周血 Tc 与 Th 细胞漂移的影响 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2019, 27(5): 1691-1695.
- [24] Chen J, Chen H, Pan L. SIRT1 and gynecological malignancies (Review) [J]. *Oncol Rep*, 2021, 45(4): 43.
- [25] Wang Z, Guo W, Yi F, et al. The regulatory effect of SIRT1 on extracellular microenvironment remodeling [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(1): 89-96.
- [26] Qiu Y, Zhou X, Liu Y, et al. The Role of Sirtuin-1 in immune response and systemic lupus erythematosus [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 632383.
- [27] Wang Q, Yan C, Xin M, et al. Sirtuin 1 (Sirt1) overexpression in BaF3 cells contributes to cell proliferation promotion, apoptosis resistance and pro-inflammatory cytokine production [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 1477-1482.
- [28] Olivares D, Perez-Hernandez J, Forner M J, et al. Urinary levels of sirtuin-1 associated with disease activity in lupus nephritis [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2018, 132(5): 569-579.
- [29] Yao P, Li Y, Yang Y, et al. Triptolide improves cognitive dysfunction in rats with vascular dementia by activating the SIRT1/PGC-1 α signaling pathway [J]. *Neurochem Res*, 2019, 44(8): 1977-1985.
- [30] 姚鹏, 陈勇, 徐国海. 雷公藤甲素对血管性痴呆大鼠认知功能的影响及对 SIRT1/NF- κ B 信号通路的作用 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(16): 3423-3428.
- [31] Al S N. Kaempferol protects against hydrogen peroxide-induced retinal pigment epithelium cell inflammation and apoptosis by activation of SIRT1 and inhibition of PARP1 [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2020, 36(7): 563-577.
- [32] Tsokos G C, Lo M S, Costa R P, et al. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2016, 12(12): 716-730.
- [33] Duan X, Shen C, Zhang X, et al. Toll-like receptor 7 agonist imiquimod prevents the progression of SLE in MRL/lpr mice via inhibiting the differentiation of T follicular helper cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 80: 106239.
- [34] Huang X, Xie Z, Liu F, et al. Dihydroartemisinin inhibits activation of the Toll-like receptor 4 signaling pathway and production of type I interferon in spleen cells from lupus-prone MRL/lpr mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 22(1): 266-272.

[责任编辑 高源]