

# 基于 WGCNA 联合网络药理学探究防己地黄汤治疗类风湿关节炎的作用机制

王金<sup>1,2,3</sup>, 孟祥文<sup>1,2,3</sup>, 陈丝梦<sup>1,2,3</sup>, 程芷洛<sup>1,2,3</sup>, 庆兆<sup>1\*</sup>, 贾晓益<sup>1,2,3\*</sup>

1. 安徽中医药大学 药学院, 安徽 合肥 230012

2. 安徽省中药复方重点实验室, 安徽 合肥 230012

3. 安徽省中药研究与开发重点实验室, 安徽 合肥 230012

**摘要:** **目的** 利用网络药理学和加权基因共表达网络分析 (WGCNA) 方法探讨防己地黄汤治疗类风湿关节炎的分子机制。**方法** 利用 TCMSP、SwissTargetPrediction、HERB 数据平台及相关文献检索防己地黄汤的主要活性成分及其相关靶点, 通过 R 软件 limma 包对 GEO 平台类风湿关节炎数据集 GSE110169 进行差异分析。基于 WGCNA 筛选与疾病相关的基因模块。利用 R 软件 VennDiagram 包进行交集靶点分析。通过 Cytoscape 的 cytoHubba 插件筛选核心靶点基因。采用 Cytoscape 软件进行“药物-活性成分-靶点-疾病”网络构建与分析。clusterProfiler 包对交集靶点基因进行基因本体论 (GO) 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。通过 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; 并运用 CIBERSOTR 进行核心靶点基因的免疫浸润分析。**结果** 共筛选出有效活性成分 129 个, 相关靶点 1 280 个, 基因芯片差异基因 2 091 个; 筛选出 3 个与疾病相关的基因模块; 获得药物与疾病共同靶点 139 个; KEGG 通路分析显示, 主要富集在 T 细胞受体信号通路、NOD 样受体信号通路、Toll 样受体信号通路等; 筛选出汉黄芩素和槲皮素 2 个核心成分及肿瘤蛋白 53 (TP53) 和胱氨酸蛋白酶 3 (CASP3) 2 个核心靶点基因。分子对接显示, 核心成分与核心靶点之间均具有稳定的结合能力; 免疫浸润分析表明, 核心靶点基因与多数免疫细胞关系密切。**结论** 防己地黄汤可能从抗炎、调节免疫细胞功能等多方面发挥对类风湿关节炎的治疗作用。

**关键词:** 防己地黄汤; 类风湿关节炎; 加权基因共表达网络分析; 网络药理学; 汉黄芩素; 槲皮素; 肿瘤蛋白 53; 胱氨酸蛋白酶 3

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)04-0776-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.04.005

## Mechanism of action of Fangji Dihuang Decoction in treatment of rheumatoid arthritis based on WGCNA combined with network pharmacology

WANG Jin<sup>1,2,3</sup>, MENG Xiang-wen<sup>1,2,3</sup>, CHEN Si-meng<sup>1,2,3</sup>, CHENG Zhi-luo<sup>1,2,3</sup>, QING Zhao<sup>1</sup>, JIA Xiao-yi<sup>1,2,3</sup>

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

2. Anhui Province Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula, Hefei 230012, China

3. Anhui Province Key Laboratory of Research & Development of Chinese Medicine, Hefei 230012, China

**Abstract: Objective** To investigate the molecular mechanism of Fangji Dihuang Decoction in treatment of rheumatoid arthritis based on network pharmacology and WGCNA. **Methods** The main active ingredients of Fangji Dihuang Decoction and their related targets were retrieved using TCMSP, SwissTargetPrediction, and HERB data platforms. And the difference analysis of GEO platform rheumatoid arthritis dataset GSE110169 was performed by R software limma package. Screening of gene modules associated with diseases based on WGCNA. Intersectional target analysis was performed using the R software VennDiagram package. Core target genes were screened by CytoHubba plugin of Cytoscape. Cytoscape software was used to construct and analyze the “drug-active component-target-disease” network. clusterProfiler package was used for GO and KEGG pathway enrichment analysis of intersectional target genes. Molecular docking of the core active ingredient with the core target genes was verified by PyMOL software, and immuno-

收稿日期: 2022-12-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82074090)

作者简介: 王金, 女, 硕士研究生, 研究方向为类风湿关节炎等免疫相关疾病。E-mail: wangjin\_0215@163.com

\*通信作者: 贾晓益, 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为自身免疫性疾病、中药抗炎免疫药理。E-mail: jiaxy@ahtcm.edu.cn

庆兆, 男, 讲师, 研究方向为中药资源。E-mail: qingzhao630@ahtcm.edu.cn

infiltration analysis of the core target genes was performed by CIBERSOTR. **Results** A total of 129 active ingredients, 1 280 related targets, and 2 091 differential genes on gene chips were screened, 3 disease-related gene modules were screened, and 139 common targets between drugs and diseases were obtained. KEGG pathway analysis showed that they were mainly enriched in T cell receptor signaling pathway, NOD-like receptor signaling pathway, and Toll-like receptor signaling pathway. Two core components of wogonin and quercetin and two core target genes of tumor protein 53 (TP53) and cystine protease 3 (CASP3) were screened. Molecular docking showed that both core components and core targets had stable binding ability. Immune infiltration analysis showed that the core target genes were closely related to most immune cells. **Conclusion** Fangji Dihuang Decoction may exert therapeutic effects on rheumatoid arthritis in various aspects, including anti-inflammation and regulation of immune cell function.

**Key words:** Fangji Dihuang Decoction; rheumatoid arthritis; WGCNA; network pharmacology; wogonin; quercetin; TP53; CASP3

类风湿关节炎是一类常见的以侵蚀性关节炎为主要临床表现的慢性、系统性自身免疫病，基本病理表现为滑膜炎、血管翳形成，并逐渐出现关节软骨和骨破坏，最终引起关节畸形和功能丧失<sup>[1-2]</sup>。目前临床治疗类风湿关节炎的药物主要有非甾体抗炎药、甾体抗炎药、改善病情抗风湿药、生物制剂等，但长期应用易引起不良反应<sup>[3-4]</sup>。中医理论指导下利用中药治疗类风湿关节炎具有独特优势<sup>[5]</sup>。防己地黄汤出自《金匱要略》，由防己、桂枝、防风、甘草、生地黄 5 味药组成，是滋阴凉血、祛风通络常用方剂，现用于治疗风湿性关节炎、类风湿关节炎、癰病、癲癇等证属阴虚热伏者<sup>[6-7]</sup>。防己地黄汤可以改善类风湿关节炎的症状，降低软骨破坏标志物的水平，具有理想的治疗效果<sup>[8]</sup>。本研究采用网络药理学联合加权基因共表达网络分析 (WGCNA) 方法预测防己地黄汤治疗类风湿关节炎的靶点及可能的作用机制，为临床提供理论依据。

## 1 方法

### 1.1 药物成分和成分靶点的收集

分别以防己地黄汤中的防风、防己、甘草、桂枝为关键词，设置口服生物利用度 (OB)  $\geq 30\%$ ，类药性 (DL)  $\geq 0.18$  作为筛选条件，在 TCMSP 进行检索获取其活性成分。生地黄的活性成分通过文献检索获得<sup>[9-13]</sup>。通过本草组鉴 (HERB) 和 SwissTargetPrediction 预测其成分的靶点。

### 1.2 差异分析

从 GEO 数据库下载 GSE110169 数据集基因表达谱，其中 77 例正常样本，84 例患病样本，利用 limma R 包进行两组之间差异分析，校正后  $P$  值  $< 0.05$  和  $|\log_2FC| > 0.3$  的视为差异基因，差异基因中  $\log_2FC < -0.3$  为下调基因， $\log_2FC > 0.3$  为上调基因。差异分析结果通过 R 包 ggplot2 绘制的火山图展示。

### 1.3 WGCNA

WGCNA 是一种能够发现具有较高生物学意义

的共表达基因模块并探索基因网络与疾病之间关系的算法。在样本分组并进行基因差异分析的基础上进行 WGCNA，纳入所有差异基因。使用 R 语言中的 hclust 函数进行系统聚类分析，以排除孤立点样本，再进行 WGCNA 分析。药物靶点基因与 WGCNA 获得基因取交集并通过韦恩图可视化。

### 1.4 富集分析

采用 R 包 clusterProfiler 对交集基因进行基因本体论 (GO) 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析，选择  $P < 0.05$  的结果，以  $P$  值进行排序，选择前 15 条的富集条目利用 R 包 ggplot2 对结果进行可视化。

### 1.5 蛋白相互作用 (PPI) 网络及核心靶点筛选

在 STRING 数据库进行 PPI 网络的分析，选择 “multiple proteins”，种属设置 “homo sapiens” 并输入交集基因进行分析。将结果导入 Cytoscape 软件，使用其中的 cytoHubba 插件分析 PPI 网络，并通过插件中度 (degree) 值排序筛选出药物作用于疾病的核心靶点基因。提取 GSE110169 表达谱中核心靶点基因在样本中的表达量，并通过箱线图展示。

### 1.6 “药物 - 活性成分 - 共同靶点 - 疾病” 网络的构建

通过药物、共同靶点、共同靶点相应成分和疾病数据构建网络文件，将其导入 Cytoscape 建立 “药物 - 活性成分 - 共同靶点 - 疾病” 网络。利用插件 CytoNCA 确定防己地黄汤治疗类风湿关节炎的核心成分。

### 1.7 分子对接

从 TCMSP 获取核心成分的药效分子结构文件，并通过 ChemBio3D Ultra 转化为 3D 结构文件，从 PDB 数据库获取中核心蛋白的结构文件。将药物结构文件和蛋白结构文件转化为 pdbqt 格式后，使用分子对接模拟软件 AutoDock 模拟运算分子和靶点对接，通过 PyMOL 软件进行对接结果可视化。

## 1.8 免疫浸润

CIBERSORT 算法可以分析 22 种免疫细胞在样本中的浸润情况, 利用 CIBERSORT 算法分析类风湿关节炎中免疫细胞的浸润情况和核心靶点基因与免疫细胞的关系。

## 2 结果

### 2.1 防己地黄汤活性成分和成分靶点的获取

如表 1 所示, 防己地黄汤共收集到 129 个活性成分。共收集到 1 280 个防己地黄汤活性成分的作用靶点。

表 1 防己地黄汤活性成分  
Table 1 Active ingredients of Fangji Dihuang Decoction

| Mol 编号    | 有效成分                                                                                                        | OB/%  | DL   | 来源 |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|------|----|
| MOL000011 | (2R,3R)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-5-methoxy-2-methylol-2,3-dihydropyrano [5,6-h][1,4]benzodioxin-9-one | 68.83 | 0.66 | 防风 |
| MOL011730 | 11-hydroxy-sec-o-beta-d-glucosylhamaudol_qt                                                                 | 50.24 | 0.27 |    |
| MOL011732 | anomalin                                                                                                    | 59.65 | 0.66 |    |
| MOL011737 | divaricatacid                                                                                               | 87.00 | 0.32 |    |
| MOL011740 | divaricatol                                                                                                 | 31.65 | 0.38 |    |
| MOL001941 | ammidin                                                                                                     | 34.55 | 0.22 |    |
| MOL011747 | ledebouriellol                                                                                              | 32.05 | 0.51 |    |
| MOL011749 | phelloptorin                                                                                                | 43.39 | 0.28 |    |
| MOL011753 | 5-O-methylvisamminol                                                                                        | 37.99 | 0.25 |    |
| MOL002644 | phellopterin                                                                                                | 40.19 | 0.28 |    |
| MOL000359 | sitosterol                                                                                                  | 36.91 | 0.75 |    |
| MOL000173 | wogonin                                                                                                     | 30.68 | 0.23 |    |
| MOL000358 | beta-sitosterol                                                                                             | 36.91 | 0.75 |    |
| MOL001494 | mandenol                                                                                                    | 42.00 | 0.19 |    |
| MOL001942 | isoimperatorin                                                                                              | 45.46 | 0.23 |    |
| MOL003588 | prangenidin                                                                                                 | 36.31 | 0.22 |    |
| MOL007514 | methyl icoso-11,14-dienoate                                                                                 | 39.67 | 0.23 |    |
| MOL013077 | decursin                                                                                                    | 39.27 | 0.38 |    |
| MOL002341 | hesperetin                                                                                                  | 70.31 | 0.27 |    |
| MOL002333 | tetraneurin A                                                                                               | 35.40 | 0.31 |    |
| MOL000358 | beta-sitosterol                                                                                             | 36.91 | 0.75 |    |
| MOL001736 | (-)-taxifolin                                                                                               | 60.51 | 0.27 | 桂枝 |
| MOL000358 | beta-sitosterol                                                                                             | 36.91 | 0.75 |    |
| MOL000359 | sitosterol                                                                                                  | 36.91 | 0.75 |    |
| MOL000492 | (+)-catechin                                                                                                | 54.83 | 0.24 |    |
| MOL000073 | ent-epicatechin                                                                                             | 48.96 | 0.24 |    |
| MOL004576 | taxifolin                                                                                                   | 57.84 | 0.27 |    |
| MOL011169 | peroxyergosterol                                                                                            | 44.39 | 0.82 |    |
| MOL004806 | euchrenone                                                                                                  | 30.29 | 0.57 | 甘草 |
| MOL004864 | 5,7-dihydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)chromone                                            | 30.49 | 0.41 |    |
| MOL004985 | icos-5-enoic acid                                                                                           | 30.70 | 0.20 |    |
| MOL004996 | gadelaidic acid                                                                                             | 30.70 | 0.20 |    |
| MOL004805 | (2S)-2-[4-hydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl)phenyl]-8,8-dimethyl-2,3-dihydropyrano [2,3-f] chromen-4-one        | 31.79 | 0.72 |    |
| MOL004814 | isotrifoliol                                                                                                | 31.94 | 0.42 |    |
| MOL004833 | phaseolinisoflavan                                                                                          | 32.01 | 0.45 |    |
| MOL004988 | kanzonol F                                                                                                  | 32.47 | 0.89 |    |
| MOL001792 | DFV                                                                                                         | 32.76 | 0.18 |    |
| MOL004860 | licorice glycoside E                                                                                        | 32.89 | 0.27 |    |
| MOL004882 | licocoumarone                                                                                               | 33.21 | 0.36 |    |
| MOL004905 | 3,22-dihydroxy-11-oxo-delta(12)-oleanene-27-alpha-methoxycarbonyl-29-oic acid                               | 34.32 | 0.55 |    |
| MOL004935 | sigmoidin-B                                                                                                 | 34.88 | 0.41 |    |
| MOL004978 | 2-[(3R)-8,8-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyrano[6,5-f]chromen-3-yl]-5-methoxyphenol                              | 36.21 | 0.52 |    |
| MOL004945 | (2S)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)chroman-4-one                                      | 36.57 | 0.32 |    |

续表 1

| Mol 编号    | 有效成分                                                                                      | OB/%  | DL   | 来源 |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------|------|----|
| MOL000359 | sitosterol                                                                                | 36.91 | 0.75 | 甘草 |
| MOL004917 | glycyroside                                                                               | 37.25 | 0.79 |    |
| MOL004957 | HMO                                                                                       | 38.37 | 0.21 |    |
| MOL004991 | 7-acetoxy-2-methylisoflavone                                                              | 38.92 | 0.26 |    |
| MOL004884 | licoisoflavone B                                                                          | 38.93 | 0.55 |    |
| MOL004989 | 6-prenylated eriodictyol                                                                  | 39.22 | 0.41 |    |
| MOL004815 | (E)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-(2,2-dimethylchromen-6-yl)prop-2-en-1-one                   | 39.62 | 0.35 |    |
| MOL004980 | inflatoumarin A                                                                           | 39.71 | 0.33 |    |
| MOL000497 | licochalcone a                                                                            | 40.79 | 0.29 |    |
| MOL004924 | (-)-medicocarpin                                                                          | 40.99 | 0.95 |    |
| MOL005013 | 18 $\alpha$ -hydroxyglycyrrhetic acid                                                     | 41.16 | 0.71 |    |
| MOL005008 | glycyrrhiza flavonol A                                                                    | 41.28 | 0.60 |    |
| MOL004883 | licoisoflavone                                                                            | 41.61 | 0.42 |    |
| MOL000422 | kaempferol                                                                                | 41.88 | 0.24 |    |
| MOL003896 | 7-methoxy-2-methyl isoflavone                                                             | 42.56 | 0.20 |    |
| MOL004915 | eurycarpin A                                                                              | 43.28 | 0.37 |    |
| MOL004966 | 3'-hydroxy-4'-O-methylglabridin                                                           | 43.71 | 0.57 |    |
| MOL004866 | 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-6-(3-methylbut-2-enyl)chromone                      | 44.15 | 0.41 |    |
| MOL004948 | isoglycyrol                                                                               | 44.70 | 0.84 |    |
| MOL004828 | glepidotin A                                                                              | 44.72 | 0.35 |    |
| MOL004949 | isolicoflavonol                                                                           | 45.17 | 0.42 |    |
| MOL004811 | glyasperin C                                                                              | 45.56 | 0.40 |    |
| MOL004974 | 3'-methoxyglabridin                                                                       | 46.16 | 0.57 |    |
| MOL004911 | glabrene                                                                                  | 46.27 | 0.44 |    |
| MOL004898 | (E)-3-[3,4-dihydroxy-5-(3-methylbut-2-enyl)phenyl]-1-(2,4-dihydroxyphenyl)prop-2-en-1-one | 46.27 | 0.31 |    |
| MOL000098 | quercetin                                                                                 | 46.43 | 0.28 |    |
| MOL004961 | quercetin der.                                                                            | 46.45 | 0.33 |    |
| MOL000417 | calycosin                                                                                 | 47.75 | 0.24 |    |
| MOL004913 | 1,3-dihydroxy-9-methoxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone                                    | 48.14 | 0.43 |    |
| MOL004827 | semilicoisoflavone B                                                                      | 48.78 | 0.55 |    |
| MOL004857 | gancaonin B                                                                               | 48.79 | 0.45 |    |
| MOL002565 | medicarpin                                                                                | 49.22 | 0.34 |    |
| MOL004848 | licochalcone G                                                                            | 49.25 | 0.32 |    |
| MOL000354 | isorhamnetin                                                                              | 49.60 | 0.31 |    |
| MOL005016 | odoratin                                                                                  | 49.95 | 0.30 |    |
| MOL005001 | gancaonin H                                                                               | 50.10 | 0.78 |    |
| MOL004820 | kazonols W                                                                                | 50.48 | 0.52 |    |
| MOL000239 | jaranol                                                                                   | 50.83 | 0.29 |    |
| MOL004856 | gancaonin A                                                                               | 51.08 | 0.40 |    |
| MOL003656 | lupiwighteone                                                                             | 51.64 | 0.37 |    |
| MOL004885 | licoisoflavanone                                                                          | 52.47 | 0.54 |    |
| MOL004912 | glabrone                                                                                  | 52.51 | 0.50 |    |
| MOL004879 | glycyrin                                                                                  | 52.61 | 0.47 |    |
| MOL004910 | glabranin                                                                                 | 52.90 | 0.31 |    |
| MOL004908 | glabridin                                                                                 | 53.25 | 0.47 |    |
| MOL004993 | 8-prenylated eriodictyol                                                                  | 53.79 | 0.40 |    |
| MOL005020 | dehydroglyasperins C                                                                      | 53.82 | 0.37 |    |
| MOL005018 | xambioona                                                                                 | 54.85 | 0.87 |    |
| MOL000211 | mairin                                                                                    | 55.38 | 0.78 |    |
| MOL005012 | licoagroisoflavone                                                                        | 57.28 | 0.49 |    |
| MOL004838 | 8-(6-hydroxy-2-benzofuranyl)-2,2-dimethyl-5-chromenol                                     | 58.44 | 0.38 |    |
| MOL005003 | licoagrocarpin                                                                            | 58.81 | 0.58 |    |
| MOL004328 | naringenin                                                                                | 59.29 | 0.21 |    |

续表 1

| Mol 编号    | 有效成分                                                                                                 | OB/%  | DL   | 来源  |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|------|-----|
| MOL004849 | 3-(2,4-dihydroxyphenyl)-8-(1,1-dimethylprop-2-enyl)-7-hydroxy-5-methoxy-coumarin                     | 59.62 | 0.43 | 甘草  |
| MOL004824 | (2S)-6-(2,4-dihydroxyphenyl)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-4-methoxy-2,3-dihydrofuro [3,2-g]chromen-7-one | 60.25 | 0.63 |     |
| MOL005000 | gancaonin G                                                                                          | 60.44 | 0.39 | 生地黄 |
| MOL004907 | glyzaglabrin                                                                                         | 61.07 | 0.35 |     |
| MOL004835 | glypallichalcone                                                                                     | 61.60 | 0.19 |     |
| MOL004914 | 1,3-dihydroxy-8,9-dimethoxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone                                           | 62.90 | 0.53 |     |
| MOL004855 | licoricone                                                                                           | 63.58 | 0.47 |     |
| MOL004829 | glepidotin B                                                                                         | 64.46 | 0.34 |     |
| MOL004808 | glyasperin B                                                                                         | 65.22 | 0.44 |     |
| MOL004903 | liquiritin                                                                                           | 65.69 | 0.74 |     |
| MOL004863 | 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-8-(3-methylbut-2-enyl)chromone                                 | 66.37 | 0.41 |     |
| MOL000392 | formononetin                                                                                         | 69.67 | 0.21 |     |
| MOL004959 | 1-methoxyphaseollidin                                                                                | 69.98 | 0.64 |     |
| MOL004941 | (2R)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one                                                      | 71.12 | 0.18 |     |
| MOL005007 | glyasperins M                                                                                        | 72.67 | 0.59 |     |
| MOL000500 | vestitol                                                                                             | 74.66 | 0.21 |     |
| MOL001484 | inermine                                                                                             | 75.18 | 0.54 |     |
| MOL004810 | glyasperin F                                                                                         | 75.84 | 0.54 |     |
| MOL004841 | licochalcone B                                                                                       | 76.76 | 0.19 |     |
| MOL005017 | phaseol                                                                                              | 78.77 | 0.58 |     |
| MOL004891 | shinpterocarpin                                                                                      | 80.30 | 0.73 |     |
| MOL004904 | licopyranocoumarin                                                                                   | 80.36 | 0.65 |     |
| MOL004990 | 7,2',4'-trihydroxy-5-methoxy-3-aryl coumarin                                                         | 83.71 | 0.27 |     |
| MOL002311 | glycyrol                                                                                             | 90.78 | 0.67 |     |
| MOL000449 | stigmasterol                                                                                         |       |      |     |
| MOL002819 | catalpol                                                                                             |       |      |     |
| MOL000732 | stachyose                                                                                            |       |      |     |
| MOL003333 | acteoside                                                                                            |       |      |     |
| MOL003732 | rehmaglutin D                                                                                        |       |      |     |
| MOL003721 | rehmaglutin B                                                                                        |       |      |     |
| MOL003731 | rehmaglutin A                                                                                        |       |      |     |
| MOL006212 | FERULIC ACID METHYL ESTER                                                                            |       |      |     |
| MOL001987 | $\beta$ -sitosterol                                                                                  |       |      |     |

## 2.2 差异分析

通过 R 包 limma 进行 GSE110169 的差异分析,共得到 2 091 个差异基因,结果用火山图展示(图 1A),其中上调基因 1 099 个,下调基因 992 个, $|\log_2FC|>1$  的基因名在图中进行了展示。

## 2.3 WGCNA 分析

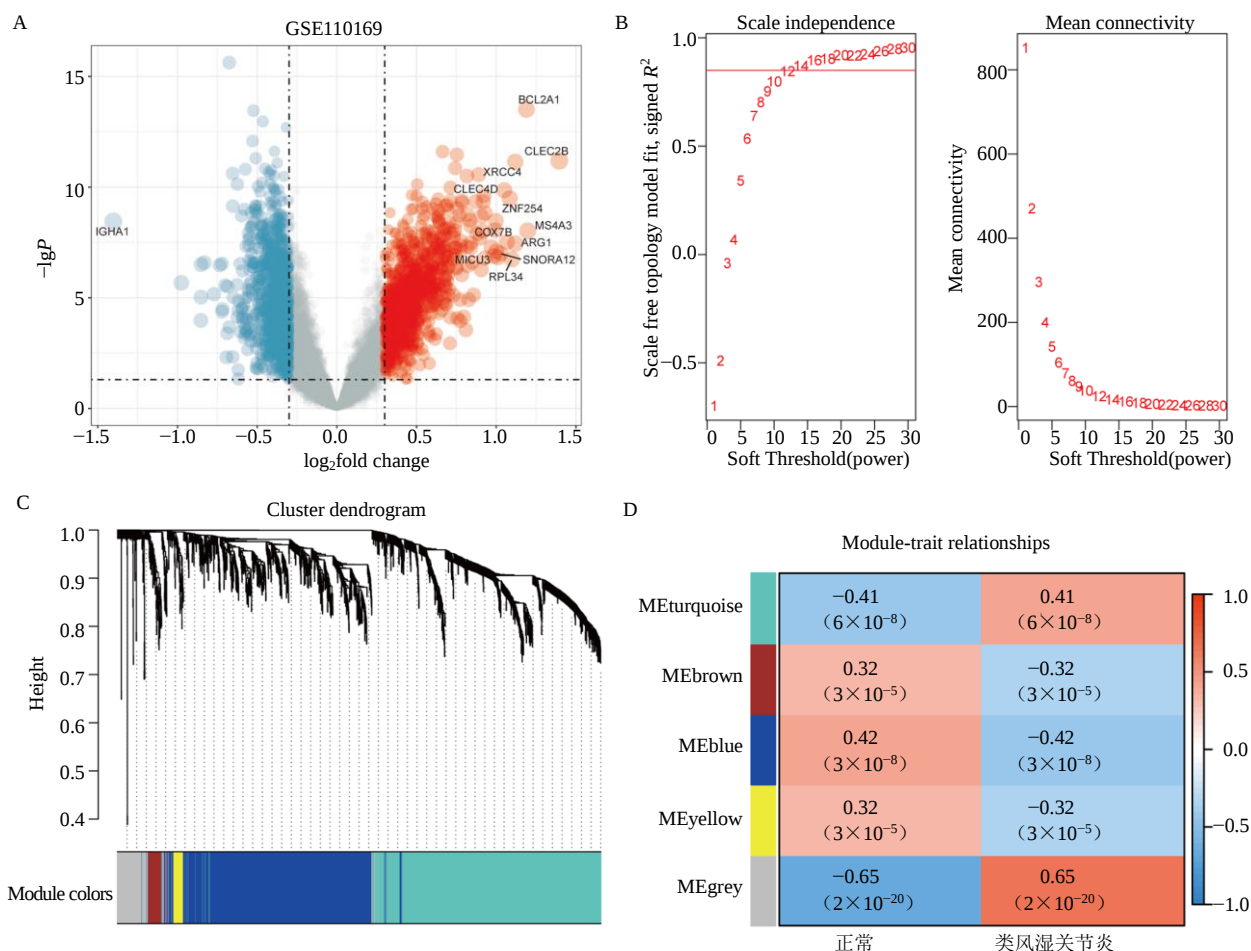
在 WGCNA 分析中,使用软阈值 14 和最小模块值为 30 来定义邻接矩阵(图 1B),基因邻接系数层次聚类构建的基因树状图见图 1C,通过模块基因与疾病的发生关联,以  $R>0.4$  为筛选条件,发现 3 个与类风湿关节炎发生密切相关的基因模块(MEgrey、MEblue、MEturquoise)共 1 988 个基因(图 1D)。

## 2.4 交集分析

药物靶点基因与 WGCNA 筛选后模块基因共得到 139 个交集靶点基因。这些靶点基因是防己地黄汤治疗类风湿关节炎的潜在作用靶点,见图 2。为进一步明确 139 个靶点基因的相关联系,本研究进行了 139 个交集靶点基因的相关性分析。

## 2.5 PPI 网络 and 核心靶点基因筛选

将 139 个互作靶点导入 STRING 网络平台,PPI 网络有 121 个节点,628 条边,下载网络文件导入 Cytoscape 进行可视化调整,见图 3。将 degree 值排序前 2 名的靶点基因肿瘤蛋白 53 (TP53)、半胱氨酸蛋白酶 3 (CASP3) 作为核心靶点基因。相比于正常样本,TP53 在类风湿关节炎患者中呈现低表达



A-差异基因火山图 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-共表达基因模块与类风湿关节炎临床特征的关系

A-differential gene volcano map B- $R^2$  corresponding to different soft thresholds and gene adjacency coefficients corresponding to different soft thresholds C-gene tree map constructed by hierarchical clustering of gene adjacency coefficient D-relationship between co-expressed gene modules and clinical features of rheumatoid arthritis

图 1 差异分析和 WGCNA 分析  
Fig. 1 Difference analysis and WGCNA analysis

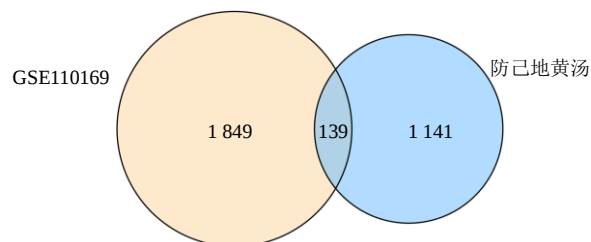


图 2 靶点基因交集分析  
Fig. 2 Target gene intersection analysis

( $P < 0.0001$ ), CASP3 在类风湿关节炎中呈现高表达趋势 ( $P < 0.0001$ ), 见图 4。

## 2.6 “药物-活性成分-共同靶点-疾病”网络的构建

将药物、成分、靶点、疾病信息构成的网络文

件导入 Cytoscape, 构建网络图 (图 5)。网络图中三角形表示中药, 菱形表示活性成分, 椭圆形表示交集靶点基因, V 形表示疾病。为确定防己地黄汤治疗类风湿关节炎的核心成分, 运用 CytoNCA 插件进行 degree 值排序。结果发现, 排序最前的活性成分为汉黄芩素 (degree: 36) 和槲皮素 (degree: 29)。这提示汉黄芩素和槲皮素可能是防己地黄汤治疗类风湿关节炎过程中发挥作用的核心成分。

## 2.7 富集分析

运用 clusterProfiler 包进行 139 个交集靶点基因的 GO 和 KEGG 富集分析, 以  $P < 0.05$  为条件共得到 1 623 个 GO 条目, 其中, 生物过程 (BP) 条目 1 398 个、细胞过程 (CC) 条目 77 个、分子功能

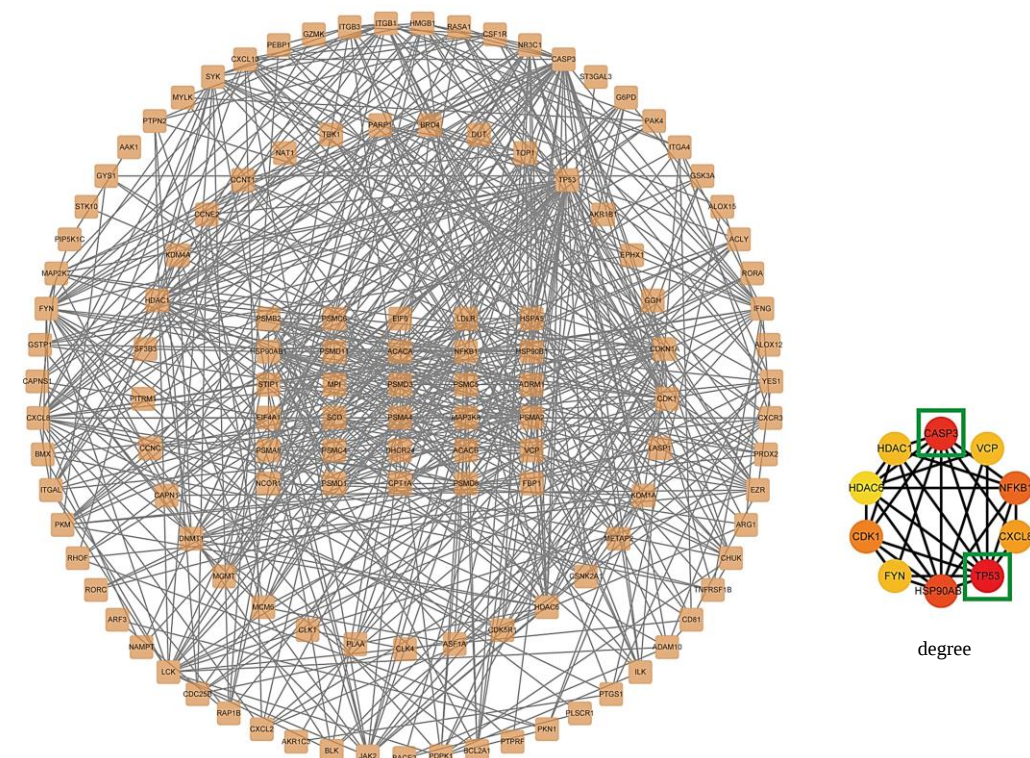


图 3 核心靶点 PPI 网络  
Fig. 3 Core target PPI network

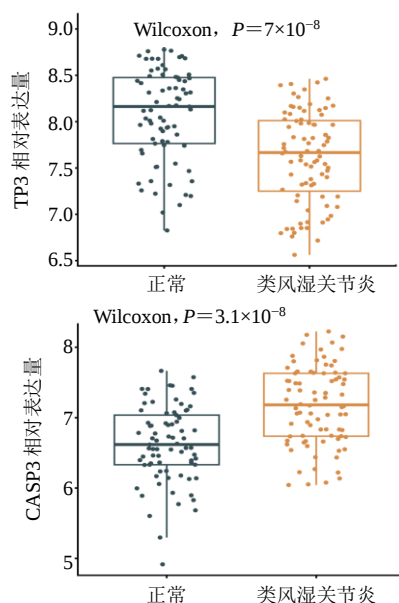


图 4 TP3、CASP3 在正常样本和类风湿关节炎样本中的表达差异  
Fig. 4 Expression difference of TP3 and CASP3 in normal samples and rheumatoid arthritis samples

(MF) 条目 148 个。BP 主要富集在小分子代谢过程调控、肿瘤坏死因子反应、先天免疫反应的调节、肿瘤坏死因子介导信号和先天免疫反应激活等；CC

主要富集在蛋白酶体复合体、内肽酶复合物、肽酶复合物，蛋白酶体调节颗粒、蛋白酶体附属复合体等；MF 主要富集在蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、非跨膜蛋白酪氨酸激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性、内肽酶活性、细胞周期蛋白依赖性蛋白调节活性等。根据  $P < 0.05$  筛选出 31 条 KEGG 通路，这些通路主要富集在 T 细胞受体信号通路、NOD 样受体信号通路、Toll 样受体信号通路等，见图 6。

## 2.8 分子对接

通过分子对接验证核心靶点与核心成分的结合。将 2 个核心成分：汉黄芩素、槲皮素和 2 个核心靶点：TP53、CAPS3 进行分子对接，结合能  $< -5$  kJ/mol 认为具有结合能力。结果显示，汉黄芩素与 TP53 和 CAPS3 的对接能分别为  $-28.1$ 、 $-27.6$  kJ/mol。槲皮素与 TP53 和 CAPS3 的对接能分别为  $-28.0$ 、 $-27.5$  kJ/mol。对接模拟可视化见图 7。

## 2.9 免疫浸润

22 种免疫细胞在每个样本中的评分浸润分数堆叠柱状图见图 8。正常样本和类风湿关节炎患者的免疫细胞差异见图 9。结果显示，B cells naive、T cells CD8、T cells CD4 memory resting、T cells regulatory (Tregs)、T cells gamma delta、mast cells

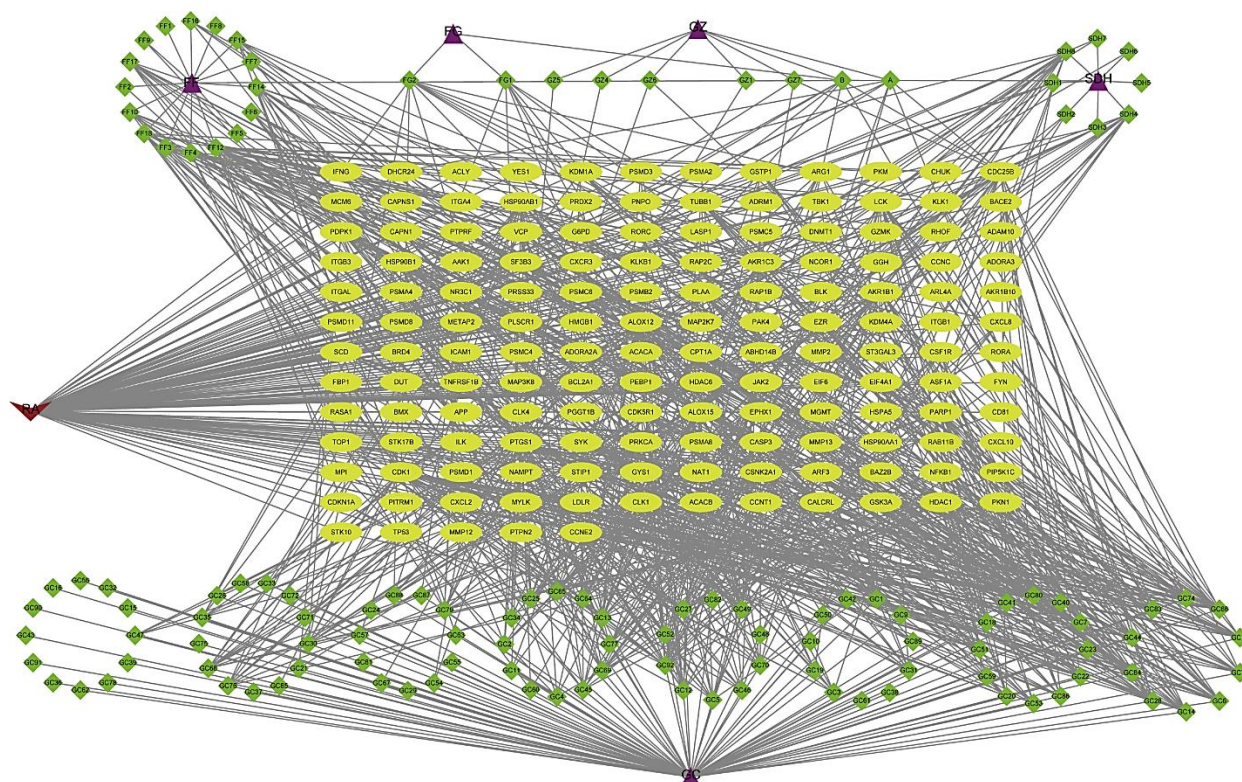


图 5 “药物 - 成分 - 靶点 - 疾病”网络图

Fig. 5 Network diagram of “drug - ingredient - target - disease”

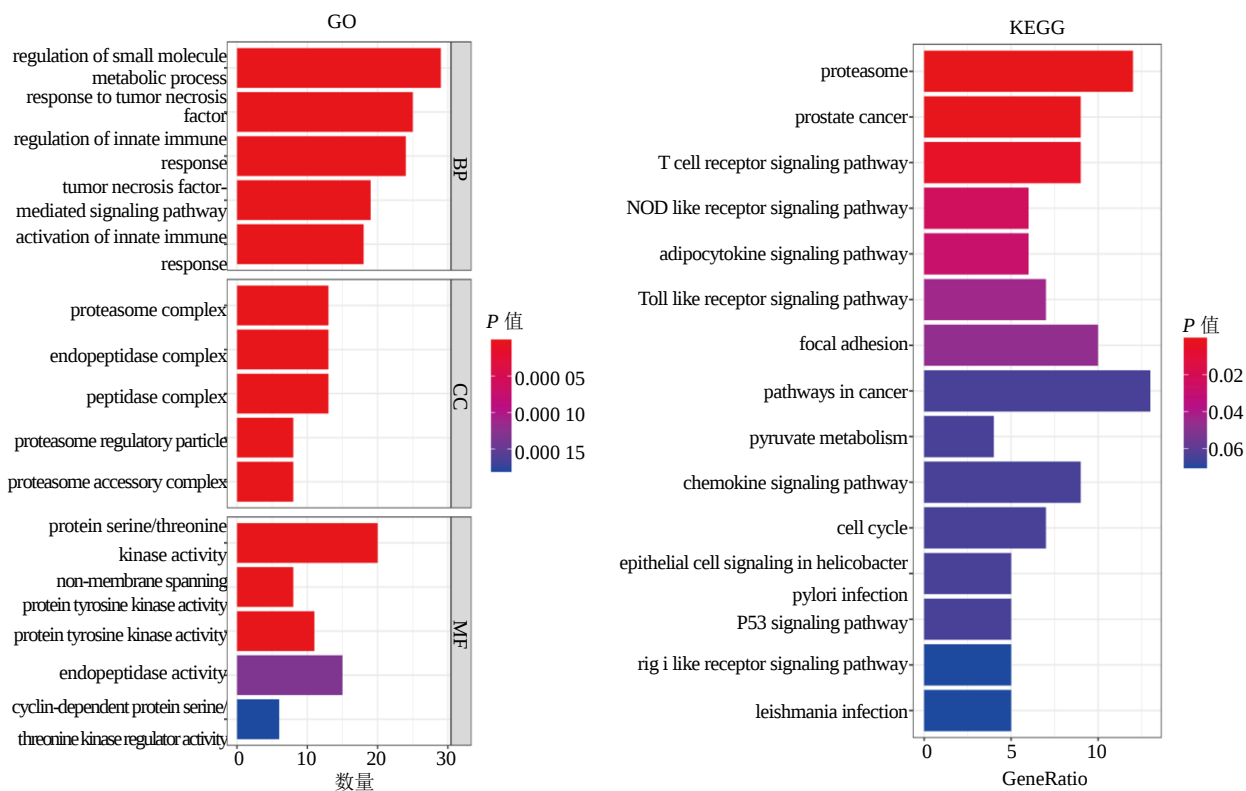


图 6 GO 和 KEGG 富集分析

Fig. 6 GO and KEGG enrichment analysis

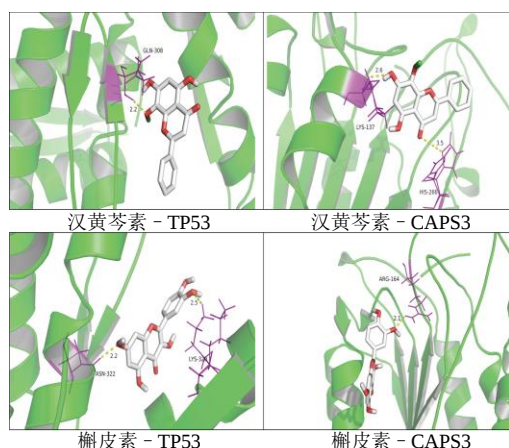


图 7 分子对接模型可视化

Fig. 7 Molecular docking model visualization

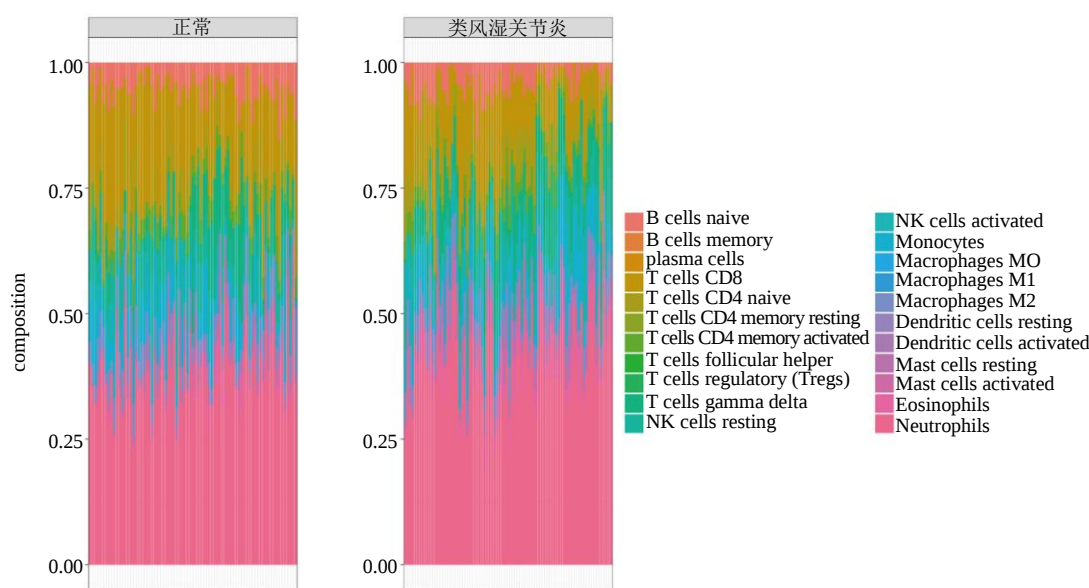


图 8 22 种免疫细胞在样本中的浸润分数堆叠柱状图

Fig. 8 Infiltration fraction of 22 kinds of immune cells in the sample is stacked

通过调控多种免疫细胞的浸润进而缓解类风湿关节炎的进程，见图 11。

### 3 讨论

本研究结合网络药理学和生物信息学的方法，探讨中药复方防己地黄汤与类风湿关节炎的关系。首先，在 GO 和 KEGG 富集分析发现 2 个重要通路，即 NOD 样受体（NLRs）信号通路和 Toll 样受体（TLRs）信号通路。NLRs 通过专门识别细胞病原体相关分子模式（PAMPs）或损伤相关分子模式（DAMPs），并触发 caspase-1、核因子- $\kappa$ B（NF- $\kappa$ B）、丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）等许多信号通路来参与类风湿关节炎的发病机制<sup>[14]</sup>。TLRs 参与类风

resting、eosinophils、neutrophils 在患病前后的数量变化具有显著差异，提示类风湿关节炎的发生与发展可能与这些免疫细胞失调相关。

在此基础上，进一步将类风湿关节炎患者数据再分组为 TP53 和 CASP3 的高、低表达组。结果发现，TP53 的高低表达与 T cells CD8、T cells CD4 memory resting、eosinophils 等免疫细胞浸润显著相关。CASP3 的高低表达与 T cells CD8、T cells gamma delta、eosinophils 等免疫细胞浸润显著相关，见图 10。在对 TP53 和 CASP3 与免疫细胞的相关性分析发现，与 TP53 最相关的免疫细胞是 eosinophil ( $r=-0.45$ ) 和 NK cells activated ( $r=-0.41$ )。与 CASP3 最相关的免疫细胞是 eosinophils ( $r=0.52$ ) 和 T cells gamma delta ( $r=0.41$ )。这表明 TP53 和 CASP3 可

湿关节炎的炎症和破坏过程，促进类风湿关节炎的发生和发展<sup>[15]</sup>。其次，通过构建“药物-成分-靶点-疾病”网络，发现汉黄芩素和槲皮素的活性排序最靠前，可能是防己地黄汤治疗类风湿关节炎的主要活性成分。汉黄芩素是黄芩根中含有的一种黄酮类化合物，通常用于治疗一些过敏性和炎症性疾病<sup>[16]</sup>。研究发现汉黄芩素可抑制氧化应激和炎症因子的侵袭，对类风湿关节炎有预防作用<sup>[17]</sup>。槲皮素是水果、蔬菜等植物性食物中最重要的酚类化合物之一，也是含量最多的生物类黄酮<sup>[18]</sup>。有研究显示，槲皮素在类风湿关节炎的实验模型中可以减少炎症并显示出保护肝脏的作用<sup>[19]</sup>。Yuan 等<sup>[20]</sup>发现，槲

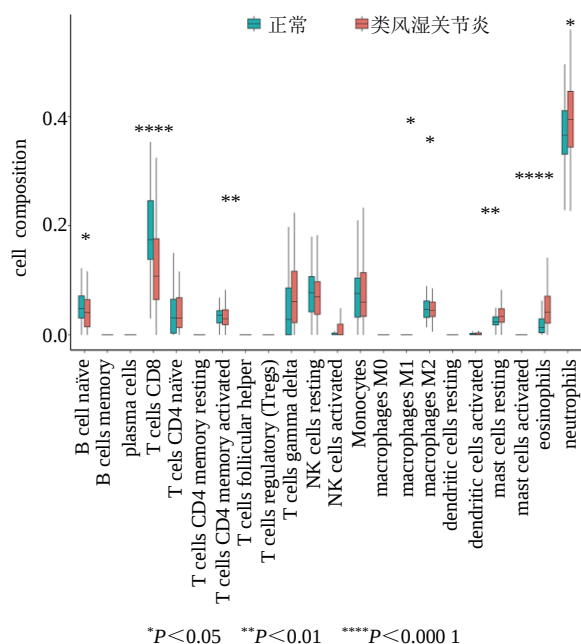


图 9 22 种免疫细胞在正常样本和类风湿关节炎患者中的浸润差异

Fig. 9 Infiltration difference of 22 types of immune cells in normal samples and rheumatoid arthritis patients

皮素可以通过抑制中性粒细胞活性来改善类风湿关节炎小鼠的炎症,说明槲皮素可能是一种潜在的靶向中性粒细胞治疗类风湿关节炎的药物。另有报道槲皮素可以通过抑制白细胞介素 (IL)- $\beta$  诱导的 NF- $\kappa$ B 的激活和 MAPKs 通路、p-38、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 和细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 的磷酸化来抑制 IL-1 $\beta$  诱导的类风湿性滑膜成纤维细胞中的增殖、基质金属蛋白酶 (MMP)-1、MMP-3、环氧化酶-2 (COX-2) 的表达和前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 的产生<sup>[21]</sup>。综上所述,这些研究结果表明,汉黄芩素和槲皮素可能有助于治疗包括类风湿关节炎在内的炎症性疾病。

通过 cytoHubba 插件对靶点基因进行 degree 值排序排序,degree 值越大表明靶点在 PPI 网络中关联度越强,故选取 degree 值排序前 2 位的靶点基因 CASP3 和 TP53 作为防己地黄汤治疗类风湿关节炎中最核心的靶点。CASP3 是半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶家族的一员,以其介导特定靶蛋白裂解的能力而闻名,通常被认为是其在细胞凋亡执行中的激活蛋白水解作用,以响应这种细胞死亡模式的特定外部或内在诱导物<sup>[22]</sup>。程序性死亡与类风湿关节炎的发病机制有关,有研究通过增加 CASP3 的表达这一现象证明完全弗氏佐剂诱导动物爪子中的细胞凋亡事件<sup>[23]</sup>。另有研究表明,CASP3 在类风湿关节

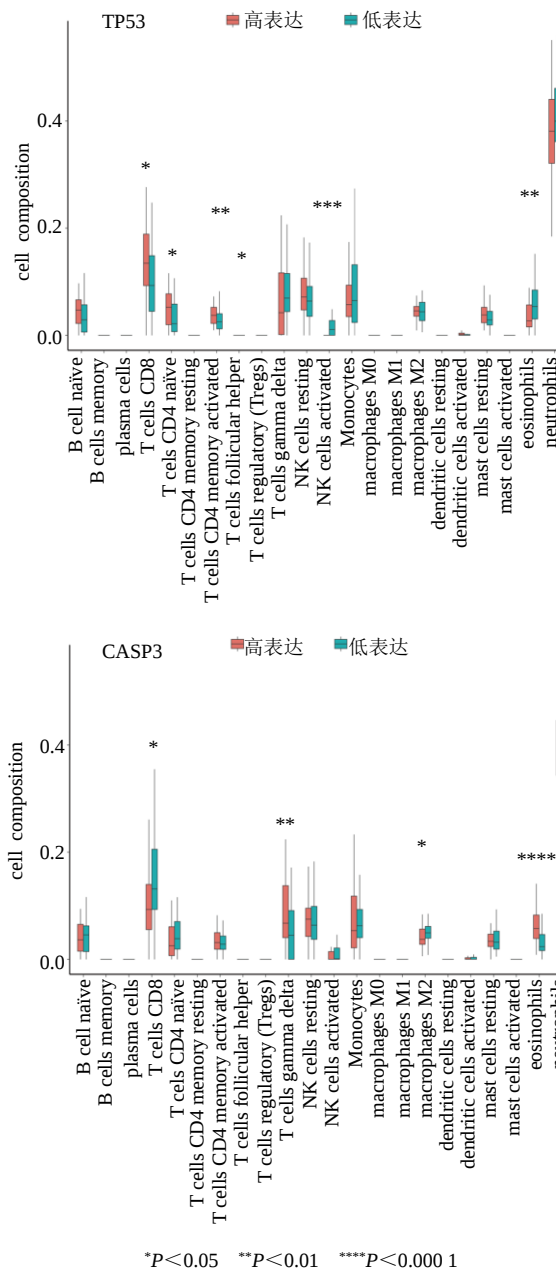


图 10 22 种免疫细胞在 TP53 和 CASP3 高、低表达组间的浸润差异

Fig. 10 Infiltration difference of 22 kinds of immune cells between high and low expression groups of TP53 and CASP3

炎患者的单核细胞和巨噬细胞中也显著增加<sup>[24]</sup>。

TP53 是一种转录因子,调控许多信号通路,如凋亡、细胞周期、DNA 修复和细胞应激反应。TP53 通过调控炎症信号通路、诱导细胞因子和基质金属蛋白酶表达参与炎症反应<sup>[25]</sup>。研究发现 TP53 在类风湿关节炎的滑膜来源的间充质干细胞中表达下调<sup>[26]</sup>,并且 TP53 显著减轻佐剂诱导的关节炎大鼠

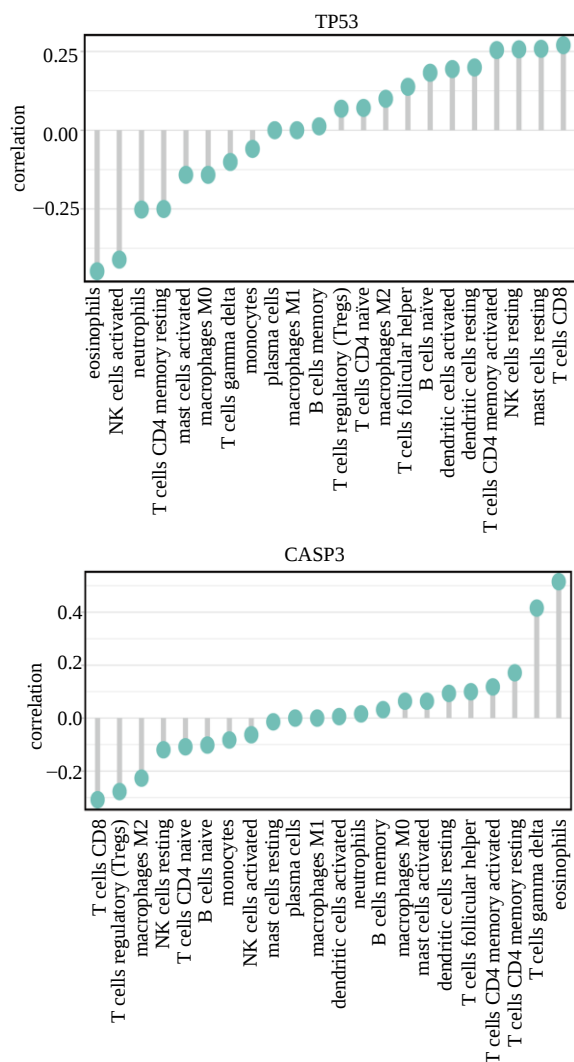


图 11 TP53 和 CASP3 与 22 种免疫细胞的相关性  
Fig. 11 Correlation between TP53 and CASP3 and 22 kinds of immune cells

滑膜炎情况和降低 IL-6 水平<sup>[27]</sup>。此外,突变体 TP53 可改变细胞凋亡、细胞周期、肿瘤发生并促进炎症反应<sup>[28]</sup>。这些均说明 CAPS3 和 P53 可能是类风湿关节炎发病机制的关键因子。免疫浸润结果发现,与 TP53 最相关的免疫细胞是 eosinophil 和 NK cells activated。与 CASP3 最相关的免疫细胞是 eosinophils 和 T cells gamma delta,说明 TP53 和 CASP3 也可通过调控类风湿关节炎进程中多种免疫细胞的浸润。此外,将 2 个核心靶点与 2 个核心成分通过分子对接来进行验证,发现核心靶点与核心成分之间是具有结合能力的。

综上,防己地黄汤通过多通路、多成分、多靶点来治疗类风湿关节炎,其中核心的通路、成分和

靶点分别为 NLRs 和 TLRs 信号通路、汉黄芩素和槲皮素、CASP3 和 TP53。这为防己地黄汤治疗类风湿关节炎的研究提供了新的思路与理论基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Nygaard G, Firestein G S. Restoring synovial homeostasis in rheumatoid arthritis by targeting fibroblast-like synoviocytes [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2020, 16(6): 316-333.
- [2] Guo Q, Wang Y, Xu D, et al. Rheumatoid arthritis: Pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies [J]. *Bone Res*, 2018, 6: 15.
- [3] Singh J A, Saag K G, Jr Bridges S L, et al. 2015 American college of rheumatology guideline for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2016, 68(1): 1-26.
- [4] 胡玉玺, 何驰宇, 高璇, 等. 风湿免疫疾病治疗药物的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2020, 35(9): 1930-1936.
- [5] 雷超, 张强, 王志飞, 等. 复方夏天无片治疗类风湿性关节炎的临床综合评价 [J]. *中草药*, 2022, 53(21): 6810-6819.
- [6] 沈博, 王新志. 王新志教授对《金匱要略》防己地黄汤主症新解和临床应用发挥 [J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(9): 2238-2240.
- [7] 赵天喜. 防己地黄汤联合甲氨蝶呤治疗早期活动性类风湿关节炎 40 例 [J]. *浙江中医杂志*, 2018, 53(6): 444-445.
- [8] 万彬彬, 胡刚明, 何浩. 防己地黄汤对类风湿关节炎患者疾病活动及早期软骨破坏标志物的影响 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2021, 30(25): 2808-2811.
- [9] 李小娟, 肖振卫. 基于网络药理学和分子对接探讨柴胡生地黄治疗特发性膜性肾病的作用机制 [J]. *中医临床研究*, 2022, 14(26): 1-5.
- [10] 冯卫生, 李孟, 郑晓珂, 等. 生地黄化学成分研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2014, 49(17): 1496-1502.
- [11] 田家屹, 马芳, 韩玲玉. 基于红外光谱的鲜地黄、生地黄和熟地黄成分差异分析 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2022, 42(10): 3203-3209.
- [12] 孟洋, 彭柏源, 毕志明, 等. 生地黄化学成分研究 [J]. *中药材*, 2005(4): 293-294.
- [13] 吴梦苑, 樊强强, 王梅, 等. 生地黄 HPLC 指纹图谱的建立及 10 种成分的含量测定 [J]. *西北药学杂志*, 2022, 37(4): 7-14.
- [14] Chen L, Cao S Q, Lin Z M, et al. NOD-like receptors in autoimmune diseases [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(11): 1742-1756.

- [15] Chen J Q, Szodoray P, Zeher M. Toll-Like receptor pathways in autoimmune diseases [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2016, 50(1): 1-17.
- [16] Ahmed Q U, Sarian M N, Mat So'ad S Z, *et al*. Methylation and acetylation enhanced the antidiabetic activity of some selected flavonoids: *In vitro*, molecular modelling and structure activity relationship-based study [J]. *Biomolecules*, 2018, 8(4): 149.
- [17] Huang Y, Guo L, Chitti R, *et al*. Wogonin ameliorate complete Freund's adjuvant induced rheumatoid arthritis via targeting NF-kappaB/MAPK signaling pathway [J]. *Biofactors*, 2020, 46(2): 283-291.
- [18] Basu A, Schell J, Scofield R H. Dietary fruits and arthritis [J]. *Food Funct*, 2018, 9(1): 70-77.
- [19] de Figueiredo Costa A C, de Sousa L M, Dos Santos Alves J M, *et al*. Anti-inflammatory and hepatoprotective effects of quercetin in an experimental model of rheumatoid arthritis [J]. *Inflammation*, 2021, 44(5): 2033-2043.
- [20] Yuan K, Zhu Q, Lu Q, *et al*. Quercetin alleviates rheumatoid arthritis by inhibiting neutrophil inflammatory activities [J]. *J Nutr Biochem*, 2020, 84: 108454.
- [21] Sung M S, Lee E G, Jeon H S, *et al*. Quercetin inhibits IL-1 $\beta$ -induced proliferation and production of MMPs, COX-2, and PGE2 by rheumatoid synovial fibroblast [J]. *Inflammation*, 2012, 35(4): 1585-1594.
- [22] Eskandari E, Eaves C J. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis [J]. *J Cell Biol*, 2022, 221(6): e202201159.
- [23] Fikry E M, Gad A M, Eid A H, *et al*. Caffeic acid and ellagic acid ameliorate adjuvant-induced arthritis in rats via targeting inflammatory signals, chitinase-3-like protein-1 and angiogenesis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 878-886.
- [24] Zhai Z, Yang F, Xu W, *et al*. Attenuation of rheumatoid arthritis through the inhibition of tumor necrosis factor-induced Caspase3/gasdermin E-mediated pyroptosis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2022, 74(3): 427-440.
- [25] Taghadosi M, Adib M, Jamshidi A, *et al*. The p53 status in rheumatoid arthritis with focus on fibroblast-like synoviocytes [J]. *Immunol Res*, 2021, 69(3): 225-238.
- [26] Hou J, Ouyang Y, Deng H, *et al*. Whole-genome expression analysis and signal pathway screening of synovium-derived mesenchymal stromal cells in rheumatoid arthritis [J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 1375031.
- [27] Zhang T, Li H, Shi J, *et al*. p53 predominantly regulates IL-6 production and suppresses synovial inflammation in fibroblast-like synoviocytes and adjuvant-induced arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2016, 18(1): 271.
- [28] Kumar N, Chugh H, Tomar R, *et al*. Exploring the interplay between autoimmunity and cancer to find the target therapeutic hotspots [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(4): 658-668.

[责任编辑 高源]