

基于网络药理学探讨加味逍遥散治疗气滞痰阻型桥本氏甲状腺炎的作用机制

段姗姗¹, 王永恒^{1*}, 彭书旺¹, 熊武¹, 陆展辉²

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

摘要: 目的 采用网络药理学方法对加味逍遥散治疗气滞痰阻型桥本氏甲状腺炎(HT)作用机制进行研究。方法 通过TCMSP、TCMID、TCMIP数据库收集筛选加味逍遥散当归、茯苓、白芍、白术、柴胡、半夏、厚朴、紫苏叶8味中药的主要化学成分并通过PubChem数据库收集各化合物化学式结构。分别通过Swiss Target Prediction、GeneCards、TCMIP数据库收集中药、疾病、证型的靶点,通过Bioinformatics Gent韦恩图收集“中药-疾病-证型”交互靶点,并分别通过STRING、WebGestalt数据库对交互靶点进行PPI、GO、KEGG富集分析。结果 加味逍遥散有效活性成分:当归2个,茯苓15个,白芍13个,白术7个,柴胡17个,半夏13个,厚朴2个,紫苏叶14个;“中药-疾病-证型”交互靶点共43个;PPI结果显示,IL-6、VEGFA、AKT1、CASP3、TNF、HRAS、PTGS2等蛋白-蛋白相互作用关系最强;生物过程(BP)富集246个,细胞成分(CC)富集70个,分子功能(MF)富集12个类别、KEGG富集105条信号通路。结论 整合文献报道及网络药理学结果,加味逍遥散可能通过维持Th1/Th2平衡,调节炎症因子——白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、TNF- β 表达,通过HIF信号通路介导血管内皮生长因子(VEGF)在甲状腺细胞中广泛表达,通过VEGF信号通路参与调控甲状腺组织中血管新生的生理病理过程,在气滞痰阻型HT中发挥作用,同时预测加味逍遥散可能在HT转化成甲状腺乳头状癌(PTC)中发挥作用。

关键词: 加味逍遥散; 气滞痰阻证; 桥本氏甲状腺炎; 网络药理学; 甲状腺乳头状癌; 白介素-6; 肿瘤坏死因子; 血管内皮生长因子

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2020)09-1771-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.09.016

Based on network pharmacology to explore mechanism of Jiawei Xiaoyao Powder in treatment of Hashimoto's thyroiditis of qi stagnation and phlegm stagnation

DUAN Shanshan¹, WANG Yongheng¹, PENG Shuwang¹, XIONG Wu¹, LU Zhanhui²

1. The first Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China

2. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To study the mechanism of Jiawei Xiaoyao Powder in the treatment of Hashimoto's thyroiditis (Hashimoto's thyroiditis, HT) with qi stagnation and phlegm stagnation. **Methods** The main chemical constituents of Jiawei Xiaoyao Powder *Angelica sinensis*, *Poria cocos*, *Paeonia lactiflora* Pall, *Atractylodes macrocephala*, *Bupleurum chinense*, *Pinellia ternata*, *Magnolia officinalis*, and Leaf of *Perilla frutescens* were collected by TCMSP, TCMID and TCMIP database, and the chemical formula structures of each compound were collected by PubChem database. The targets of traditional Chinese medicine, disease and syndrome type were collected by Swiss Target Prediction, GeneCards and TCMIP database respectively, and the interactive targets of "traditional Chinese medicine-disease-syndrome type" were collected by Bioinformatics Gent Wayne diagram, and the interactive targets were analyzed by PPI, GO and KEGG enrichment analysis through STRING and WebGestalt database respectively, so as to

收稿日期: 2020-01-14

基金项目: 湖南省卫生计生委科研计划课题项目(B20180739);湖南省大学生研究性学习和创新型试验计划(2018425);湖南中医药大学大学生创新型项目(201970)

第一作者: 段姗姗(1990—),女,硕士,医师,研究方向为甲状腺疾病的中西医结合治疗。E-mail: 1229398154@qq.com.

*通信作者: 王永恒(1966—),男,硕士,主任医师,研究方向为胃肠道肿瘤、甲状腺疾病的中西医结合治疗。E-mail: 313701480@qq.com.

clarify the mechanism of Jiawei Xiaoyao Powder in the treatment of HT with qi stagnation and phlegm stagnation. **Results** The active components of Jiawei Xiaoyao Powder were *Angelica sinensis* (2), *Poria cocos* (15), *Paeonia lactiflora* Pall (13), *Atractylodes macrocephala* (7), *Bupleurum chinense* (17), *Pinellia ternata* (13), *Magnolia officinalis* (2), Leaf of *Perilla frutescens* (14), 43 "traditional Chinese medicine-disease-syndrome" interaction targets, PPI results showed that IL6, VEGFA, AKT1, CASP3, TNF, HRAS, PTGS2 and other protein-protein interactions were the strongest. BP enriches 246 biological processes, CC enriches 70 cellular components, MF enriches 12 molecular functional classes, and KEGG enriches 105 signal pathways. **Conclusion** Jiawei Xiaoyao Powder may play a role in the pathogenesis of HT by maintaining the balance of Th1/Th2, regulating the expression of inflammatory factors (IL6, TNF- α , TNF- β), mediating the expression of VEGF molecules in thyroid cells through HIF signal pathway, and regulating the physiological and pathological process of angiogenesis in thyroid tissue through VEGF signal pathway. At the same time, it is predicted that Jiawei Xiaoyao Powder may play a role in the transformation of HT into PTC, which provides a direction for the follow-up study of the prognosis and treatment of HT complicated with PTC.

Key words: Jiawei Xiaoyao Powder; syndrome of stagnation of qi and phlegm; Hashimoto's thyroiditis; network pharmacology; thyroid papillary carcinoma; interleukin-6; tumor necrosis factor; vascular endothelial growth factor

桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis, HT)是自身免疫性甲状腺疾病(AIDS),女性发病率高,具有淋巴细胞浸润的病理学特征,尤其以T细胞浸润和滤泡破坏为主,临床可见甲状腺结节或肿大,甲状腺自身抗体水平明显上升,伴有或不伴有甲亢,HT与甲状腺癌存在密切关系,被认为是甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)的癌前病变^[1]。目前西医治疗上常规给予左旋甲状腺素维持有效甲状腺激素水平^[2]、手术、免疫疗法等,但存在副作用大、易复发、手术后遗症等问题,均无法改善自身免疫对甲状腺的持续损伤,目前尚无针对HT病因的西药^[3],只有当病情发展到甲减^[4],增加甲状腺素,续终身用药。近年来中医药治疗HT显示出独特优势,在中医学中属于“瘰病”范畴,中医学认为本病的产生与患者的情志状况,身体体质以及饮食水土失宜有关。其病位定于肝、脾,病机为情志不畅,致肝失条达,肝郁气滞,气滞则津停血瘀;或是脾虚湿盛生痰,痰气阻滞,血脉运行不畅,脉络不通,致气滞、痰凝、血瘀互结壅滞于颈前部而发病。肝郁脾虚、气滞痰阻为其主要辨证特点,辨证分型为气滞痰阻型、阴虚火旺型、脾肾阳虚型,以气滞痰阻型最常见^[5],当以疏肝行气,健脾化痰之逍遥散加半夏厚朴汤加减^[6],肝郁气滞为其复合病机中关键病机,故以逍遥散为主方,配以半夏厚朴汤行气化痰,组成加味逍遥散,由当归、茯苓、白芍、白术、柴胡、半夏、厚朴、紫苏叶组成,大量研究发现加味逍遥散治疗气滞痰阻型HT具有较好的疗效^[7-9],但其分子作用机制尚不明确,本研究旨在从生物信息学角度深入挖掘加味逍遥散治疗气滞痰阻型HT的作用机制。

1 材料与方法

1.1 加味逍遥散有效成分收集及初筛

利用中药系统药理数据库和分析平台(TCMSP)^[10](<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)、中草药分子机理分析的中药综合数据库(TCMID)^[11]、中药整合药理学平台(TCMIP)^[12],收集加味逍遥散中当归、茯苓、白芍、白术、柴胡、半夏、厚朴、紫苏叶8味中药的主要化学成分。根据人体对药物吸收、分布、代谢及毒性的药动学参数^[13],以口服生物利用度^[14](Oral Bioavailability, OB)≥30%,化合物类药性^[15](Drug Likeness, DL)≥0.18为筛选条件^[16],初步筛选出加味逍遥散有效活性成分。

1.2 有效成分靶点基因预测及“中药-疾病-证型”交互靶点

通过有机小分子生物活性数据库(PubChem)^[17](<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)收集各有效活性成分,以2D、3D结构保存为SDF格式。将有效活性成分导入整合靶点预测网站服务器(Swiss Target Prediction)^[18](<http://www.swisstargetprediction.ch/>)数据库预测有效活性成分相关靶点,剔除无化学结构、靶点有效活性成分,获得中药靶点。

通过Pubmed中“MeSH”检索功能检索“Hashimoto Disease (MeSH)”,收集所有检索词。将“桥本氏甲状腺炎”的所有检索词纳入人类基因数据库(GeneCards)(<https://www.genecards.org/>)数据库中,高级检索获得疾病靶点。

通过TCMIP(<http://www.tcmip.cn/TCMIP/index.php/Home/>)数据库中整合药理学分析工具中证型相关分子挖掘选项,采用“反向筛选-以方测证”方法,以“气滞痰阻证”“气滞痰阻咽喉证”为证,反

向筛选证型靶点。

通过 Bioinformatics Gent (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 中 Van de Peer Lab 在线工具取交集获得“加味逍遥散”∩“桥本氏甲状腺炎”∩(“气滞痰阻证”∪“气滞痰阻咽喉证”)的“中药-疾病-证型”交互靶点,并绘制韦恩图。

1.3 交互靶点蛋白互作(protein protein interaction, PPI)网络构建

通过 String^[19] (<https://string-db.org/>) 数据库,将所得到的交互靶点导入,选择 Multiple Protein, 限定物种为 Homo sapiens, 设定最低要求互动分数为中度可信度 0.400^[20], 得到 PPI 网络相关信息。

将导出的 PPI 相关信息中 Node1、Node2、Combined score 值导入 Cytoscape 软件,使 PPI 网络相关信息网络图可视化,并利用 Network analyzer 计算 Degree 值,并进行可视化。

采用 Cytoscape 中 APP 功能 CytoHubba 的 Degree、Betweenness、Closeness 算法,进行亚网络拓扑分析,自设定取 3 种亚网络拓扑分析中前 10 位基因,将 3 种算法筛选出的基因取交集,整合出共同靶点关键基因。

1.4 交互靶点 GO 和 KEGG 富集分析

利用 WebGestalt^[21] (<http://www.webgestalt.org/>)

#) 数据库,将交互靶点进行 GO 与 KEGG 通路富集分析。初步设定基本参数,物种为“Homo sapiens”,采用“ORA”(Over-Representation Analysis) 算法分析,选用“Functional Database”子数据库,进行 GO 和 KEGG 富集分析。进阶参数设定中,设定“Significance Level” $P < 0.05$,余为默认设置。收集 BP、CC、MF、KEGG 富集分析数据,进行“Weighted set cover”分析,并绘制火山图。

利用 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>) 数据库同时对亚网络拓扑分析的关键基因进行 KEGG 富集分析,结合 P 值及文献对富集分析结果绘制“靶点-通路”弦图,进一步聚焦关键靶点参与疾病调控的机制。

2 结果

2.1 加味逍遥散有效活性成分筛选

通过 TCMSP^[10]、TCMID^[11]、TCMIP^[12] 数据库,收集加味逍遥散中当归、茯苓、白芍、白术、柴胡、半夏、厚朴、紫苏叶 8 味中药的主要化学成分,初步筛选后获得加味逍遥散有效活性成分,当归 2 个,茯苓 15 个,白芍 13 个,白术 7 个,柴胡 17 个,半夏 13 个,厚朴 2 个,紫苏叶 14 个,基本信息如表 1。

表 1 加味逍遥散有效成分及其基本信息

Table 1 Active ingredients and basic information of Jiawei Xiaoyao Powder

药材	有效成分中文名称	OB/%	DL	药材	有效成分中文名称	OB/%	DL
当归 1	豆甾醇	43.83	0.76	柴胡 2	皂苷 C	30.5	0.63
当归 2	β -谷固醇	36.91	0.75	柴胡 3	曲克芦丁	31.6	0.28
茯苓 1	(2R)-2-[(3S,5R,10S,13R,14R,16R,17R)-3,16-二羟基-4,4,10,13,14-五甲基-2,3,5,6,12,15,16,17-八氢-1H-环戊[a]菲基-17-基]-6-甲基庚基-5-烯酸	30.93	0.81	柴胡 4	3,5,6,7-四甲氧基-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)色酮	31.97	0.59
茯苓 2	梯烯酸	38.71	0.80	柴胡 5	黄芩苷	40.12	0.75
茯苓 3	7,9(11)-脱氢巴戊酸	35.11	0.81	柴胡 6	山柰酚	41.88	0.24
茯苓 4	塞维妥醇	37.96	0.77	柴胡 7	乙酸亚油酯	42.10	0.20
茯苓 5	(2R)-2-[(3S,5R,10S,13R,14R,16R,17R)-3,16-二羟基-4,4,10,13,14-五甲基-2,3,5,6,12,15,16,17-八氢-1H-环戊[a]菲基-17-基]-5-异丙基-己-5-烯酸	31.07	0.82	柴胡 8	α -菠萝甾醇	42.98	0.76
茯苓 6	麦角甾-7,22E-二烯-3 β -ol	43.51	0.72	柴胡 9	豆甾醇	43.83	0.76
茯苓 7	麦角固醇过氧化物	40.36	0.81	柴胡 10	(+)-异苹果酸	46.06	0.66
茯苓 8	(2R)-2-[(5R,10S,13R,14R,16R,17R)-16-羟基-3-酮-4,4,10,13,14-五甲基-1,2,5,6,12,15,16,17-八氢环戊[a]菲基-17-基]-5-异丙基-己-5-烯酸	38.26	0.82	柴胡 11	槲皮素	46.43	0.28
茯苓 9	3 β -羟基-24-亚甲基-8-羊毛烯-21-油酸	38.7	0.81	柴胡 12	龙胆素 A	47.72	0.53
茯苓 10	茯苓酸	33.63	0.81	柴胡 13	八环素	47.82	0.28
茯苓 11	茯苓酸 A	30.61	0.76	柴胡 14	茵陈黄酮	48.96	0.41
茯苓 12	茯苓酸 B	30.52	0.75	柴胡 15	异鼠李素	49.6	0.31
茯苓 13	茯苓酸 C	38.15	0.75	柴胡 16	古巴比林	57.13	0.64
茯苓 14	蛇床子素	36.91	0.75	柴胡 17	森福兰	79.91	0.23
茯苓 15	脱氢表皮酸	44.17	0.83	半夏 1	24-乙基胆甾醇-4-烯-3-酮	36.08	0.76
				半夏 2	卡维丁	35.64	0.81
				半夏 3	黄芩素	33.52	0.21
				半夏 4	黄芩苷	40.12	0.75
				半夏 5	β -谷固醇	36.91	0.75
				半夏 6	豆甾醇	43.83	0.76

续表1

药材	有效成分中文名称	OB/%	DL	药材	有效成分中文名称	OB/%	DL
白芍1	苯甲酰芍药苷	31.27	0.75	半夏7	刚丹酸	30.7	0.20
白芍2	谷甾醇	36.91	0.75	半夏8	针叶树素	31.11	0.32
白芍3	β -谷固醇	36.91	0.75	半夏9	10,13-二十碳二烯	39.99	0.2
白芍4	山柰酚	41.88	0.24	半夏10	12,13-环氧-9-羟基壬二	42.15	0.24
白芍5	3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,14 <i>S</i>)-3,17-二羟基-4,4,8,10,14-五甲基-2,3,5,6,7,9-六氢-1 <i>H</i> -环戊[<i>a</i>]菲-15,16-二酮	43.56	0.53		酰基-7,10-二烯酸		
白芍6	乳酸菌素	49.12	0.8	半夏11	(3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-3-(苄基)-6-(4-羟基苄基)哌嗪-2,5-酮	46.89	0.27
白芍7	芍药苷	53.87	0.79	半夏12	环烯醇	38.69	0.78
白芍8	(+)-儿茶素	54.83	0.24	半夏13	β - <i>D</i> -核呋喃糖苷,黄嘌呤-9	44.72	0.21
白芍9	迈林	55.38	0.78	厚朴1	桉树油	60.62	0.32
白芍10	11 α ,12 α -环氧-3 β -23-二羟基-30-去甲油酸-20-烯-28,12 β -内酯	64.77	0.38	厚朴2	新橙皮苷	57.44	0.27
白芍11	白芍苷	66.64	0.33	紫苏叶1	刚丹酸	30.7	0.2
白芍12	芍药苷	68.18	0.4	紫苏叶2	上烯	33.55	0.42
白芍13	芍药苷元	87.59	0.37	紫苏叶3	木犀草素	36.16	0.25
白术1	12-千里香酰-2 <i>E</i> ,8 <i>E</i> ,10 <i>E</i> -白术三醇	62.4	0.22	紫苏叶4	β -谷固醇	36.91	0.75
白术2	14-乙酰基-12-千里香酰-2 <i>E</i> ,8 <i>E</i> ,10 <i>E</i> -白术三醇	60.31	0.31	紫苏叶5	多孔司特-5-en-3 β -ol	36.91	0.75
白术3	14-乙酰基-12-千里香酰-2 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> ,10 <i>E</i> -白术三醇	63.37	0.3	紫苏叶6	β -胡萝卜素	37.18	0.58
白术4	α -糊精	39.51	0.76	紫苏叶7	CLR	37.87	0.68
白术5	(3 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>R</i>)-10,13-二甲基-17-[(2 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-5-丙-2-酰十六烷基-2-基]2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-十二氢-1 <i>H</i> -环戊基[<i>a</i>]菲-3-醇	36.23	0.78	紫苏叶8	icosa-11,14-二烯酸甲酯	39.67	0.23
白术6	3 β -乙酰氧基苍术酮	54.07	0.22	紫苏叶9	优庚基- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖甙	40.52	0.23
白术7	8 β -乙氧基白术内酯III	35.95	0.21	紫苏叶10	ZINC03860434	43.59	0.35
柴胡1	矮牵牛花色素	30.05	0.31	紫苏叶11	LAX	44.11	0.2
				紫苏叶12	亚麻酸乙酯	46.1	0.2
				紫苏叶13	花青素	47.42	0.76
				紫苏叶14	(+)-儿茶素	54.83	0.24

2.2 中药有效活性成分靶点预测与“中药-疾病-证型”交互靶点筛选

通过 Swiss Target Prediction 数据库对候选化合物相关靶点进行预测,剔除无化学结构及无靶点化合物,并整合重复靶点,获得加味逍遥散中当归、茯苓、白芍、白术、柴胡、半夏、厚朴、紫苏叶8味中药共637个中药靶点。

通过 GeneCards 数据库数据,收集得到“桥本氏甲状腺炎”靶点,共得到681个疾病靶点。

通过 TCMIP 数据库,收集得到气滞痰阻证中“气滞痰阻证”“气滞痰阻咽喉证”靶点,共得到1198个气滞痰阻证证型靶点。

采用 Bioinformatics Gent 中 Van de Peer Lab 在

线工具取交集获得“加味逍遥散”“桥本氏甲状腺炎”“气滞痰阻证”“气滞痰阻咽喉证”的“中药-疾病-证型”交互靶点共43个(表2),并绘制韦恩图(图1)。

2.3 “中药-疾病-证型”交互靶点 PPI 网络构建

利用 String 数据库及 Cytoscape 软件对交互靶点进行蛋白互作网络分析,并除去与交互网络无联系的靶点,得出 PPI 网络图(图2),根据 Network analyzer 分析中 Degree 值设定节点大小, Degree 值越大,节点越大,其中 $1 \leq \text{Degree} < 9$ 为粉红色; $10 \leq \text{Degree} < 19$ 为紫色; $20 \leq \text{Degree}$ 为红色,结果见表3。

对 PPI 网络进行亚网络拓扑分析,整合 Degree、Betweenness、Closeness 算法的拓扑网络图见图3,

表2 “中药-疾病-证型”交互靶点

Table 2 Interactive targets of "Traditional Chinese Medicine - disease - syndrome"

靶点	靶点	靶点	靶点	靶点	靶点	靶点	靶点	靶点
XDH	CTSB	TRPV1	AHCY	IL2	VDR	IL6	ESR2	ADA
NOS2	TNF	LGALS3	CNR1	CA2	PIK3CA	SHBG	EDNRA	ITGAL
HSD11B2	F2	ABL1	ABCB1	AKT1	PPARG	SNCA	CYP3A4	PNP
CYP2D6	PTGS2	CASR	FAAH	AR	CASP3	ACPI	HRAS	
PRKCB	ESR1	TYR	MGMT	PRKCA	VEGFA	ACHE	IGFBP3	

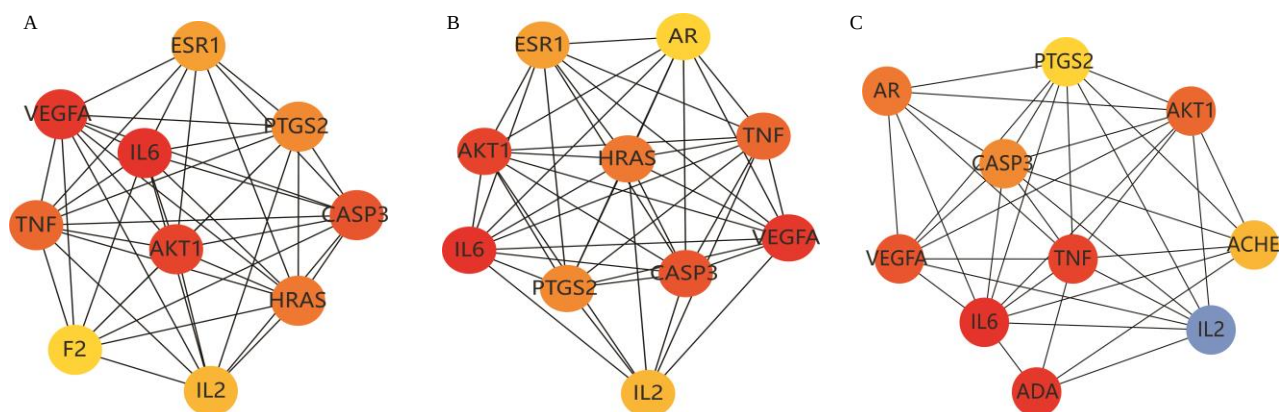


图3 Degree (A)、Betweenness (B)、Closeness (C)算法亚网络拓扑图

Fig. 3 Sub network topology of degree (A), betweenness (B) and closeness (C) algorithm

合、氧化还原酶活性、蛋白激酶C结合、有机酸结合、细胞外基质结合、辅因子结合等分析功能。根据“Ratio”“P Value”“FDR”值绘制火山图。

KEGG 富集结果,共富集 105 条信号通路,Weighted set cover 分析出 10 条最相关信号通路,根据“P Value”升序排列,主要为肿瘤途径、AGE-RAGE 信号通路、VEGF 信号通路、MicroRNA 信号通路、EGFR 酪氨酸激酶信号通路、巨细胞病毒感染通路、HIF-1 信号通路、蛋白聚糖肿瘤通路等信号通路。根据“Ratio”“P Value”“FDR”值绘制火山图(图4)。

13 个关键基因 DAVID 数据库富集分析于 28 个主要 KEGG 信号通路,结合共同靶点 KEGG 结果及

HT 文献报道结果,对主要 8 条相关通路绘制“靶点-通路”弦图,结果见图 5。

3 讨论

HT 与遗传因素、心理因素、社会因素、生物化学因素等多因素有关,其发病机制与免疫、内分泌、细胞增殖分化等有关。HT 是自身免疫性甲状腺疾病,是临床常见的甲状腺炎症,患者以甲状腺肿大、获得性甲减为主要临床表现^[22]。目前尚无针对 HT 病因的西药^[3],只有当病情发展到甲减,增加甲状腺素,终身用药^[4]。中医学治疗 HT 具有独特的优势,气滞痰阻证是 HT 最常见证型,当以疏肝行气,健脾化痰之加味逍遥散治疗,本研究以气滞痰阻型 HT 为研究对象,加味逍遥散由当归、茯苓、白芍、白

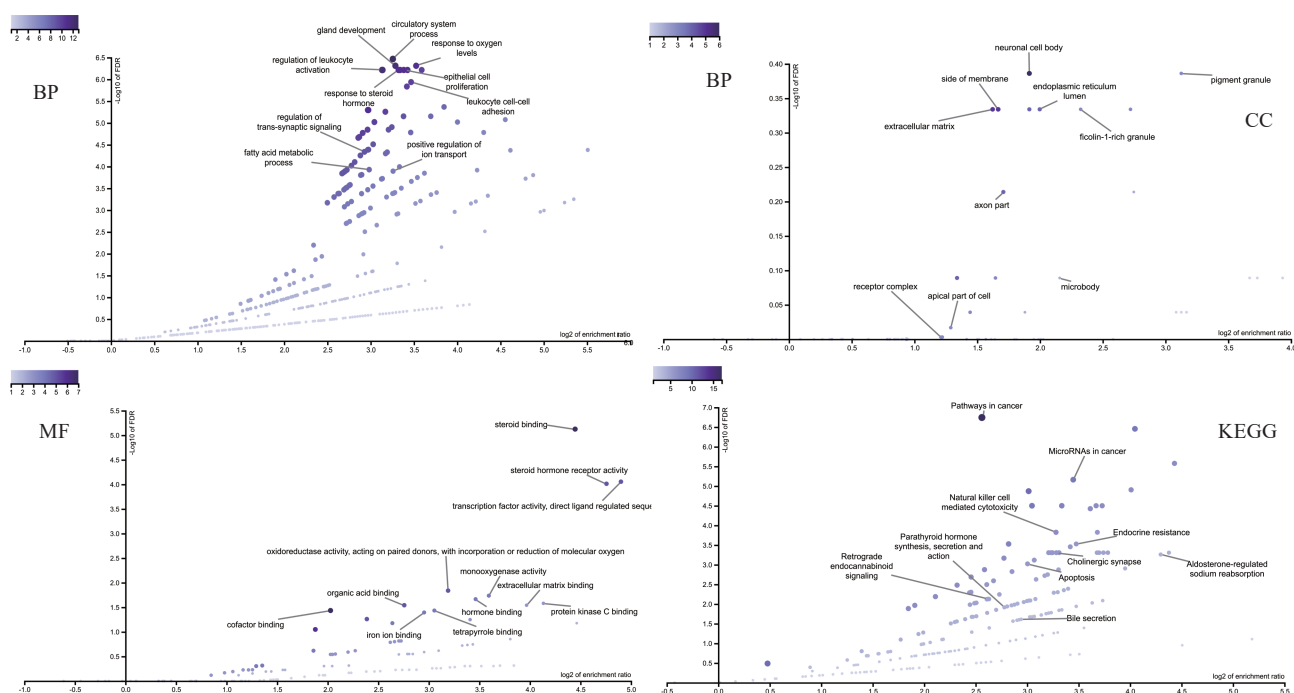


图4 GO-KEGG 富集分析结果

Fig. 4 Enrichment analysis results of GO-KEGG

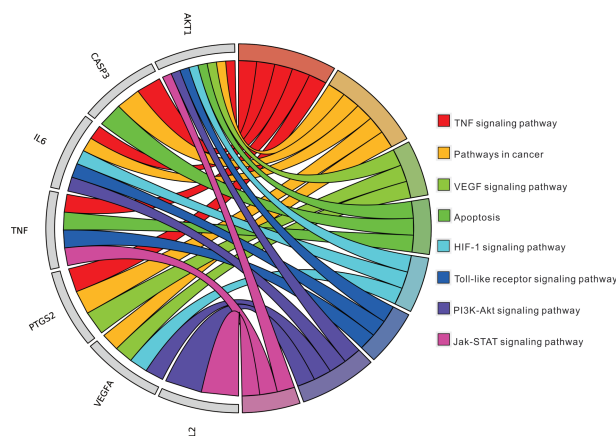


图5 “靶点-通路”弦图

Fig. 5 "target-pathway" chord diagram

术、柴胡、半夏、厚朴、紫苏叶8味中药组成,具有治疗气滞痰阻的作用。运用网络药理学的方法来探讨加味逍遥散治疗气滞痰阻型HT的分子机制,发现其多靶点、多途径、多通路的特点。

本研究整合多个中药-活性化合物数据库,收集加味逍遥散化合物并根据OB、DL值进行初筛后,获得其中药有效成分,根据有效成分的化学结构对中药的靶点进行算法预测分析,共得到加味逍遥散中8味中药637个靶点。同时整合GeneCards疾病数据库、TCMIP证型数据库,获得681个HT疾病靶点,1198个气滞痰阻证证型靶点。以气滞痰阻型HT为特色,构建“中药-疾病-证型”韦恩图得出气滞痰阻型HT共有83个,其中有43个与加味逍遥散交互,为加味逍遥散治疗气滞痰阻型HT的靶点,基于PPI结果分析IL6、VEGFA、AKT1、CASP3、TNF、HRAS、PTGS2等在其中发挥着重要作用,是加味逍遥散治疗气滞痰阻型HT的关键靶点。GO、KEGG富集分析结果显示,加味逍遥散主要在胞体区、轴突区、细胞外基质等多组分,通过VEGF、miRNA、HIF-1信号通路、肿瘤途径等多通路,参与类固醇结合、氧化还原酶活性、蛋白激酶结合等分子功能,调控循环系统过程、突触信号转导、脂肪酸代谢等多生物过程在气滞痰阻型HT中发挥治疗作用。

CD4⁺ T生成的细胞因子可分为Th1和Th2两种亚型,Th1/Th2细胞平衡是免疫细胞分泌细胞因子进行自我调节的重要条件,失衡可导致免疫介导的疾病^[23],Th1细胞可介导细胞免疫、巨噬细胞活化、迟发性超敏反应及细胞毒性T细胞;而Th2细胞可介导体液免疫、B细胞活化及IgE的生成。HT可介导Th1型细胞免疫,即Th1型细胞因子上调,Th2型细胞因子也可上调,但相对Th1上调较慢,能引起甲状腺细胞结构破坏功能改变,IL-6等通过诱发并加

重局部炎症反应促进HT的发生、发展^[24],从而出现甲状腺功能减退症,桥本氏甲状腺炎是细胞免疫和体液免疫相互作用的结果,外在表现为淋巴细胞亚群的失衡和细胞因子变异^[25]。Papanas等^[26]研究发现HT患者中IL-6水平升高,TNF- α 水平升高,两者具有显著相关性。本研究中IL-6属Th2型细胞因子,TNF家族中TNF- α 、TNF- β 属Th1型细胞因子,两者在本研究中相互作用较明显,因此可以初步推断出加味逍遥散可能通过下调IL-6细胞因子,及下调TNF家族细胞因子,并维持Th1/Th2细胞因子平衡,减轻炎症反应,从而治疗气滞痰阻型HT。

血管内皮生长因子A(VEGFA)是PDGF/VEGF生长因子家族成员,在缺氧条件下受生长因子、细胞因子、促性腺激素、一氧化氮、低血糖和致癌突变等调节^[27],从而诱导血管内皮细胞增殖、迁移、分化,抑制细胞凋亡,参与血管新生的生理病理过程。Jebrael等^[28]研究发现,HT疾病中广泛表达VEGF细胞因子,可能是HT血管新生及疾病转归的预测分子。VEGF信号通路在血管新生中发挥着重要作用,在炎症相关因子(如IL-6)和肿瘤生长相关因子(如TNF- α 、TNF- β)刺激作用下释放VEGF,从而促进脑、肿瘤、甲状腺、肾、肺等组织器官中血管内皮细胞的增殖、迁移、分化。HIF信号通路是机体缺氧的适应性通路,研究发现^[29],炎症反应可激活HIF-1 α 、HIF- β ,上调下游VEGF分子表达介导VEGF信号通路,并反馈促进炎症因子如IL-6、TNF- α 的产生。同时结合本项研究PPI、GO、KEGG结果可得出,加味逍遥散可能通过维持Th1/Th2平衡,调节炎症因子(IL6、TNF- α 、TNF- β)表达,通过HIF信号通路介导VEGF在甲状腺细胞中广泛表达,通过VEGF信号通路参与调控甲状腺组织中血管新生的生理病理过程,从而在气滞痰阻型HT中发挥作用。

1995年Dailey等^[30]最早提出HT与PTC之间关系之后,流行病学研究证实,HT患者PTC发病率明显升高,同时分子层次也存在相关性^[31]。PTC合并HT的发病率呈迅速增长趋势,已经引起医学研究者的高度重视,PTC-HT的相关研究已成为内分泌领域的热点^[32],研究发现^[33]HT是PTC的癌前病变,与癌基因突变与重排、免疫、内分泌等机制综合作用有关,PTC与血清促甲状腺激素(TSH)水平有关,即HT引起甲状腺机能减退,从而导致TSH水平的升高,升高的TSH刺激甲状腺滤泡细胞增生,从而促进了PTC的发展^[34]。张艳等最新研究发现^[35]HT是PTC发病的危险因素之一,与TSH水平升高和淋

巴结数量有关,也与本研究KEGG富集分析与肿瘤通路结果一致,加味逍遥散可能通过降低淋巴结数目,调节炎症因子来维持Th1/Th2平衡,推测可能加味逍遥散能在HT转化成PTC中发挥作用,为后续研究HT合并PTC的预后及治疗提供了方向。

本研究从生物信息学角度对加味逍遥散治疗气滞痰阻证HT的作用机制进行探讨,初步得出加味逍遥散能通过多途径、多分子、多通路治疗气滞痰阻型HT,且提示HT与PTC存在药物治疗的相关性,为后续进一步研究加味逍遥散治疗HT提供了理论依据。本研究尚处于理论上预测探讨加味逍遥散治疗气滞痰阻型HT作用机制的阶段,下一步将以临床研究和实验研究进行相关验证工作,以明确网络药理学研究结果的可靠性。

参考文献

- [1] Ragusa F, Fallahi P, Elia G, et al. Hashimoto's thyroiditis: Epidemiology, pathogenesis, clinic and therapy [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2019, 33(6): 101367.
- [2] 于红俊, 李建秀, 左敏敏, 等. 用硒酵母联合左旋甲状腺素治疗淋巴细胞性甲状腺炎的效果分析 [J]. 当代医药论丛, 2016, 14(10): 79-80.
- [3] 韩 静, 刘守尧, 夏仲元. 中医药干预桥本氏甲状腺炎作用机制的实验研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(9): 4207-4209.
- [4] 李 霞. 桥本氏甲状腺炎的中医治疗效果 [J]. 科技风, 2019(33): 198.
- [5] 董 旭, 王义安, 刘晓艳. 中医调治桥本氏甲状腺炎研究概况 [J]. 吉林中医药, 2017, 37(6): 642-645.
- [6] 盖宇婷, 高天舒. 论桥本甲状腺炎与肝脾关系 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(5): 150-151.
- [7] 韩 静, 刘守尧. 桥本氏甲状腺炎中西医结合治疗研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(11): 5327-5330.
- [8] 潘善余. 中西医结合治疗桥本氏甲状腺炎40例观察 [J]. 浙江中医杂志, 2016, 51(10): 721.
- [9] 范尧夫, 刘克冕, 张会峰, 等. 中西医结合治疗桥本甲状腺炎甲状腺功能减退的Meta分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(3): 221-224.
- [10] 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.
- [11] Huang L, Xie D, Yu Y, et al. TCMID 2.0: a comprehensive resource for TCM [J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(D1): D1117-D1120.
- [12] Xu H Y, Zhang Y Q, Liu Z M, et al. ETCM: an encyclopaedia of traditional Chinese medicine [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1): D976-D982.
- [13] Morcos P N, Yu L, Bogman K, et al. Absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) of the ALK inhibitor alectinib: results from an absolute bioavailability and mass balance study in healthy subjects [J]. Xenobiotica, 2017, 47(3): 217-229.
- [14] Tian S, Li Y, Wang J, et al. ADME evaluation in drug discovery. 9. Prediction of oral bioavailability in humans based on molecular properties and structural fingerprints [J]. Mol Pharm, 2011, 8(3): 841-51.
- [15] Tian S, Wang J, Li Y, et al. Drug-likeness analysis of traditional Chinese medicines: prediction of drug-likeness using machine learning approaches [J]. Mol Pharm, 2012, 9(10): 2875-86.
- [16] Gibaldi M, Levy G. Pharmacokinetics in clinical practice. 2. Applications [J]. JAMA, 1976, 235(18): 1987-1992.
- [17] Kim S, Chen J, Cheng T, et al. PubChem 2019 update: improved access to chemical data [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1): D1102-D1109.
- [18] Gfeller D, Michielin O, Zoete V. Shaping the interaction landscape of bioactive molecules [J]. Bioinformatics, 2013, 29(23): 3073-3079.
- [19] von Mering C, Jensen L J, Snel B, et al. STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(Database issue): D433-437.
- [20] Szklarczyk D, Gable A L, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1): D607-D613.
- [21] Wang J, Vasaikar S, Shi Z, et al. WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(W1): W130-W137.
- [22] Girardi F M, Barra M B, Zettler C G. Papillary thyroid carcinoma: does the association with Hashimoto's thyroiditis affect the clinicopathological characteristics of the disease? [J]. Braz J Otorhinolaryngol, 2015, 81(3): 283-287.
- [23] Ganesh B B, Bhattacharya P, Gopisetty A, et al. Role of cytokines in the pathogenesis and suppression of thyroid autoimmunity [J]. J Interferon Cytokine Res, 2011, 31(10): 721-31.
- [24] 黄园园, 刘亚楠, 于世鹏. CD4⁺T淋巴细胞相关细胞因子与桥本氏甲状腺炎发病机制的研究进展 [J]. 中华诊断学电子杂志, 2019, 7(3): 214-216.
- [25] Tokić S, Štefanić M, Karner I, et al. Altered expression of CTLA-4, CD28, VDR, and CD45 mRNA in T cells of patients with Hashimoto's thyroiditis - a pilot study [J].

- Endokrynol Pol, 2017, 68(3): 274-828.
- [26] Papanas N, Papazoglou D, Papatheodorou K, et al. Thyroxine replacement dose in patients with Hashimoto disease: a potential role for interleukin-6 [J]. *Cytokine*, 2006, 35(3-4): 166-170.
- [27] Shan B, Gerez J, Haedo M, et al. RSUME is implicated in HIF-1-induced VEGF-A production in pituitary tumour cells [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2012, 19(1): 13-27.
- [28] Jebreel A, England J, Bedford K, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors expression and microvascular density in benign and malignant thyroid diseases [J]. *Int J Exp Pathol*, 2007, 88(4): 271-277.
- [29] Elson D A, Ryan H E, Snow J W, et al. Coordinate up-regulation of hypoxia inducible factor (HIF)-1 α and HIF-1 target genes during multi-stage epidermal carcinogenesis and wound healing [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(21): 6189-6195.
- [30] Dailey M E, Lindsay S, Skahen R. Relation of thyroid neoplasms to Hashimoto disease of the thyroid gland [J]. *AMA Arch Surg*, 1955, 70(2): 291-297.
- [31] Kim K W, Park Y J, Kim E H, et al. Elevated risk of papillary thyroid cancer in Korean patients with Hashimoto's thyroiditis [J]. *Head Neck*, 2011, 33(5): 691-695.
- [32] 凌煜玮, 赵 菁, 韩 婧, 等. 桥本甲状腺炎对甲状腺微小乳头状癌的影响及相关因素分析 [J]. *新医学*, 2018, 49(7): 511-516.
- [33] Dong S, Xie X J, Xia Q, et al. Indicators of multifocality in papillary thyroid carcinoma concurrent with Hashimoto's thyroiditis [J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9(8): 1786-1795.
- [34] 李 建, 樊 华, 贺晓斌, 等. 甲状腺乳头状癌合并桥本甲状腺炎患者的临床特征和预后分析 [J]. *癌症进展*, 2018, 16(10): 1242-1244, 1317.
- [35] 张 艳, 王文栋, 兰霞斌, 等. 甲状腺乳头状癌伴发桥本甲状腺炎的临床研究 [J]. *中国癌症杂志*, 2019, 29(12): 948-954.