

《普济方》治疗类风湿关节炎方剂用药规律分析及核心药对作用机制研究

史元元¹, 徐茜茜², 胡珊珊¹, 陈迹^{1*}

1. 新疆医科大学第一附属医院 药学部, 新疆 乌鲁木齐 830054

2. 东南大学附属中大医院 药学部, 江苏 南京 210009

摘要: **目的** 通过数据挖掘《普济方》中治疗类风湿关节炎(RA)相关方剂用药规律及组方特点, 并利用网络药理学分析核心药对抗RA的作用机制。**方法** 检索《中华医典》电子图书系统搜集《普济方》中治疗RA的方剂, 并利用Excel软件统计中药性味、归经、功效等, 使用R语言对频数、中药关联规则及聚类规律进行分析。基于数据挖掘结果得到核心药对, 利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)、Pharmmapper、STRING等数据库, R语言、Cytoscape软件构建“药对-成分-靶点-疾病”和蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络, 对核心药对抗RA靶点进行功能富集分析。**结果** 《普济方》中共搜集出601首治疗RA的方剂, 321味中药。频次≥40高频中药(肉桂、防风、附子、当归、甘草、川芎、羌活等)以温性、辛味为主, 多归脾、肾经, 功效主要以补虚、解表、温里最为常见。高频中药关联规则得到17组药对组合(“独活-防风”置信度最高为核心药对), 系统聚类得到4组类聚方。利用各数据库获取“独活-防风”活性成分24个、306个靶点以及RA相关靶点3964个, 产生交集靶点173个。网络分析结果表明当归内酯、亚麻油酸乙酯、当归醇、谷甾醇等可能是抗RA的主要活性成分, 关键靶点包括ALB、HSP90AA1、MMP9、EGFR等, 可能通过调控Ras信号通路、PI3K-Akt信号通路、FoxO信号通路和MAPK信号通路等发挥抗RA作用。**结论** 《普济方》抗RA方剂中药多为温辛、归脾肾及补虚之类, 网络药理学结果显示核心药对“独活-防风”可能通过调控多靶点、多通路发挥治疗作用。

关键词: 类风湿关节炎; 普济方; 数据挖掘; 核心药对; 网络药理学; 独活-防风; 当归内酯; 亚麻油酸乙酯; 当归醇

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2024)10-2277-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.10.007

Analysis of prescription rules and mechanism of action of core drug pairs in *Puji Fang* for rheumatoid arthritis

SHI Yuanyuan¹, XU Xixi², HU Shanshan¹, CHEN Ji¹

1. Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

2. Department of Pharmacy, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China

Abstract: **Objective** Through data mining, the medication rules and prescription characteristics of relevant prescriptions for the treatment of rheumatoid arthritis (RA) in *Puji Fang* were analyzed, and the mechanism of action of core drugs against RA was analyzed by network pharmacology. **Methods** The prescriptions for RA in *Puji Fang* were collected by searching the electronic book system of *Chinese Medical Dictionary*, and Excel software was used to calculate the properties, tastes, meridian-tropism and efficacy. The frequency, association rules and clustering rules of traditional Chinese medicine were analyzed by R language. Based on the data mining results, the core drug pair was obtained, and the Chinese Medicine System Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), Pharmmapper, String and other databases were used to construct the "drug-component-target-disease" and protein-protein interaction (PPI) network using R language and Cytoscape software. Functional enrichment analysis of core drugs against RA targets was performed. **Results** A total of 601 prescriptions for RA and 321 Chinese herbs were collected in *Puji Fang*. High frequency Chinese herbs (*Cinnamomi Cortex*, *Saposhnikovia Radix*, *Aconiti Lateralis Radix Praeparata*, *Angelicae Sinensis Radix*, *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, *Chuanxiong Rhizoma*, *Notopterygii Rhizoma et Radix*, etc.) with frequency ≥ 40 were mainly warm and spicy, and mostly affected the spleen and kidney meridians. The main effects were supplementing deficiency, relieving

收稿日期: 2024-05-16

基金项目: 南京药学会-常州四药医院药学科研基金项目(2022YX005)

第一作者: 史元元(1995—), 女, 初级药师, 研究方向为中药数据挖掘及网络药理学。E-mail: syyl5899139534@163.com

*通信作者: 陈迹, 男, 主任药师, 研究方向为医院药学。E-mail: chenji700318@163.com

external symptoms and warming the interior. Seventeen groups of drug pairs were obtained by high-frequency Chinese medicine association rules (with the highest confidence of "*Angelicae Pubescentis Radix-Saposhnikovia Radix*" as the core drug pair), and four groups of cluster prescriptions were obtained by systematic clustering. A total of 24 active ingredients, 306 targets and 3 964 RA-related targets were obtained from each database, and 173 intersection targets were generated. Network analysis results showed that angelicone, mandenol, angelol D, sitosterol, etc. may be the main active ingredients of anti-RA, and the key targets were ALB, HSP90AA1, MMP9, EGFR, etc. It may play a role in anti-RA by regulating Ras signaling pathway, P13K-Akt signaling pathway, FoXO signaling pathway and MAPK signaling pathway. **Conclusion** The traditional Chinese medicines in *Puji Fang* for RA are mainly used for warming and xin, regulating spleen and kidney and tonifying deficiency. The results of network pharmacology show that the core drugs may play a therapeutic role in "*Angelicae Pubescentis Radix-Saposhnikovia Radix*" by regulating multiple targets and pathways.

Key words: rheumatoid arthritis; *Puji Fang*; data mining; core drug pairs; network pharmacology; *Angelicae Pubescentis Radix-Saposhnikovia Radix*; angelicone; mandenol; angelol D

类风湿关节炎(RA)是一种多系统、慢性炎症性自身免疫性疾病,致病原因尚不明确。它的主要病理特征是关节滑膜细胞增生、多种炎症细胞浸润,导致关节破坏、畸形和功能障碍,还会累及全身多个器官,如心脏、肾脏、眼和皮肤等^[1-2]。全球患病率为0.5%~1.0%,且女性的发病率高于男性^[3]。RA在中医学中属于“痹症”的范畴,因其临床表现与古籍中记载的“鹤膝风”“顽痹”“历节”和“白虎历节”等疾病类似,以风、寒、湿、热、痰、瘀痹阻经络气血为基本病机^[4]。RA的治疗方法主要基于药物和手术,但由于该疾病临床表现的复杂性和异质性,化学药目前仍无能够治愈RA的特效药^[5]。而中医在治疗“痹症”中积累了大量经典的方剂,用于缓解RA病程进展,提高患者生活质量,并由于低毒性在减少药物不良反应方面具有重大意义。

《普济方》是我国现存篇幅最大的古代方剂书籍,由明代朱橚、滕硕、刘醇所著^[6]。本研究基于数据挖掘和网络药理学等方法对《普济方》中治疗RA的方剂用药规律及核心药物的作用机制进行预测,为临床治疗RA发现新的方剂组合提供参考。

1 资料与方法

1.1 数据来源

1.1.1 方剂来源 以“痹”“历节”“顽痹”“尪痹”“鹤膝风”为关键词,从第五版《中华医典》电子图书系统中搜集《普济方》有关RA的方剂并导出。

1.1.2 纳入与排除标准 纳入标准:功效主治中包括“痹”“历节”“顽痹”“尪痹”“鹤膝风”字样;给药途径为内服,包括散剂、汤剂、丸剂等剂型;有明确的药物组成。排除标准:主治中包含上述关键词,但与治疗RA无关者;药物功效、组成相同的异名方,只纳入1次;理论论述未附方药者;只含一味药的单方。

1.1.3 数据整理和录入 参考《中国药典》《中华本草(2020年版)》及《中药学》对方剂中药名称进行规范化处理,将“桂心”统一为“肉桂”“蜀椒”统一为“花椒”“巨胜”统一为“黑芝麻”“御米壳”统一为“罌粟壳”等。由2名研究人员将符合纳入标准方剂录入Microsoft Excel中,内容主要包括方剂名称、药物组成、性味归经、功能主治、剂型等信息。

1.1.4 统计分析及用药规律挖掘 使用Microsoft Excel计算方剂中药频次、四气五味、归经及功效。关联规则基于R语言(4.2.1)arules包中的Apriori函数,使用Apriori算法对方剂中药进行关联规则分析,设置支持度 $\geq 4\%$,置信度 $\geq 50\%$ 。基于gower算法对方剂药物的二分类变量进行距离校正。使用hclust函数根据相异性指数对药物进行分层分类。使用plot函数对结果进行可视化。

1.2 核心药对网络药理学机制研究

1.2.1 构建药对-成分-靶点-疾病网络 将“1.1.4”项中用药规律分析结果得到的核心药对(独活-防风),通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>, Version 2.3)搜集活性成分,筛选标准:口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 、类药性(DL) ≥ 0.18 。利用靶点虚拟筛选服务器 PharmMapper(<http://www.lilabecust.cn/pharmmapper/index.html>)对活性成分潜在生物活性靶点进行预测(z' -score >0.9)^[7]。以“Rheumatoid arthritis”为检索词在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 和 Therapeutic Target Database (<https://db.idrblab.org/ttd/>)数据库中检索RA相应靶点。使用 Uniprot 蛋白数据库中 Uniprot Knowledgebase (<https://www.uniprot.org>)将检索得到的靶点校正为标准基因名称。利用 Venny 2.1(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)在线工

具取交集获取活性成分与疾病共有靶点。使用Cytoscape(3.7.2)构建药物-成分-靶点-疾病网络图。

1.2.2 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络分析 将药物与疾病共有靶点上传到在线蛋白互作STRING(<https://string-db.org/>)数据库中,置信度>0.4为阈值,构建PPI网络图。

1.2.3 基因本体(GO)注释及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 采用R语言中cluster Profiler软件包对药物与疾病共有靶点进行GO和KEGG功能富集分析,设定阈值 $P<0.05$,预测核心组方活性成分抗RA过程中基因参与的生物学过程和相关信号通路。

2 结果

2.1 中药频次分析

从《普济方》中搜集出治疗RA的方剂601首,涉及321味中药,累计频数4 679次。使用频次统计见表1。使用频次最多的前15味中药为肉桂(204,频率4.38%)、防风(201,频率4.30%)、附子(157,频率3.36%)、当归(146,频率3.12%)、甘草(142,频率3.03%)、川芎(133,频率2.84%)、牛膝(115,频率2.46%)、麻黄(105,频率2.24%)、羌活(104,频率2.22%)、人参(101,频率2.16%)、茯苓(96,频率2.05%)、白术(93,频率1.99%)、天麻(93,频率1.99%)、独活(76,频率1.62%)、细辛(75,频率1.60%),见图1。

2.2 中药四气、五味、归经及功效统计分析

对频次 ≥ 40 的高频中药进行四气、五味、归经及功效统计分析。图2显示治疗RA的高频中药四气以温性(34.72%)为主,平(21.88%)、微温(19.87%)次之;五味分布情况主要以辛(37.74%)为主,其次是甘(33.77%)和苦(17.46%),微苦、酸、

表1 中药使用频次统计

Table 1 Frequency interval statistics of traditional Chinese medicine (TCM) usage

频次(F)区间	中药味数	累计频次	占比/%
$F \geq 40$	28	2 532	54.11
$30 \leq F < 40$	12	404	8.63
$20 \leq F < 30$	22	545	11.65
$10 \leq F < 20$	38	544	11.63
$F < 10$	221	654	13.98

淡较少;归经共涉及脾、肾、肝、心、肺、胃、膀胱、胆、心包、大肠和三焦11种,其中脾经占比最高为21.71%。

高频中药功效共涉及9类,以补虚药为主,占比26.3%,涉及药物当归、甘草、人参和白术等;解表药和温里药次之,分别占21.17%和16.47%,其中解表药主要有防风、麻黄和细辛等,温里药主要有肉桂、附子和干姜等;其他具体结果见表2。

2.3 中药关联规则分析

利用Apriori算法,计算高频药物间出现频率、置信度、支持度和提升度,置信度为前项出现的条件下后项出现的概率,支持度为前项和后项同时出现的概率,提升度是置信度和后项支持度的比值,该值 >1 时说明前项对后项有正向作用,反之为负向^[8]。当置信度 $\geq 50\%$ 、支持度 $\geq 4\%$ 及提升度 >1 时,得到17个药物组合,见表3。置信度最高的组合为“独活-防风”,最低的是{川芎,肉桂}-当归;支持度最高的组合是茯苓-肉桂,最低的是{人参,肉桂}-防风;提升度最高的组合是杜仲-牛膝,最低的是细辛-肉桂。

选取支持度 $>4\%$ 的药对数据绘制药物共线网络图,节点颜色深浅代表中药的度值(degree),节点

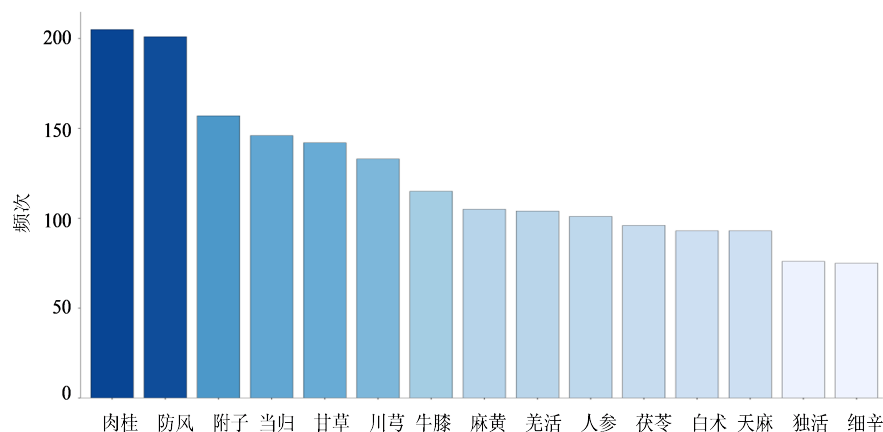


图1 频次前15味中药

Fig. 1 Top 15 frequencies of traditional Chinese medicine (TCM)

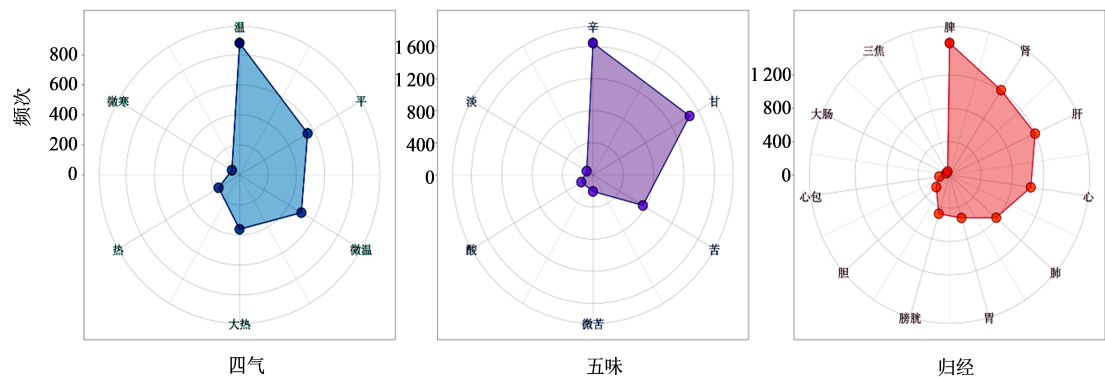


图2 高频中药四气、五味及归经雷达图

Fig. 2 Radar map of four properties, five tastes and meridian-tropism of high frequency TCM

表2 高频中药功效统计

Table 2 High frequency TCM efficacy statistics				
序号	功效	频次	占比/%	代表中药
1	补虚	666	26.30	当归、甘草、人参
2	解表	536	21.17	防风、麻黄、细辛
3	温里	417	16.47	肉桂、干姜、附子
4	活血化瘀	248	9.79	川芎、牛膝
5	祛风湿	235	9.28	草乌、天雄、秦艽
6	利水渗湿	161	6.36	茯苓、萆薢
7	理气	93	3.67	木香、陈皮
8	平肝息风	93	3.67	天麻
9	化痰止咳平喘	83	3.28	白附子

大小代表频次,线段粗细代表药对频次(weight),线段越粗代表线段连接的2个中药在越多的方剂中出现。如图3显示,度值较高的前10味中药:防风(18)、肉桂(17)、附子(13)、当归(13)、甘草(11)、川芎(11)、人参(9)、牛膝(8)、麻黄(6)和羌活(6)。

2.4 聚类分析

基于 gower 算法对高频中药进行聚类分析,结果见图4,得到4个聚类方。I(四君子汤):甘草、白术、人参和茯苓;II:牛膝、羌活、麻黄、天麻、萆薢、杜仲、干姜、天雄、秦艽等;III:肉桂、附子;IV:防风、当归、川芎。

2.5 “独活-防风”核心药对作用机制研究

根据数据挖掘关联规则分析结果,将置信度排名第1的药对“独活-防风”作为核心药对,利用网络药理学方法研究其抗RA的作用机制。

2.5.1 构建药对-成分-靶点-疾病网络 从TCMSP数据库中,独活共筛选得到9个活性成分,防风共得到18个活性成分,其中欧前胡素、异欧前胡素和β-谷甾醇是独活和防风共有的成分,药对活性成分信息见表4。

表3 高频中药17条关联规则分析

Table 3 Analysis of 17 association rules of high-frequency TCM					
前项	后项	同现频次	置信度/%	支持度/%	提升度
{独活}	{防风}	50	65.79	8.32	1.97
{秦艽}	{肉桂}	28	65.12	4.66	1.91
{白芍}	{甘草}	39	61.90	6.49	2.62
{杜仲}	{牛膝}	29	61.70	4.83	3.22
{细辛}	{防风}	44	58.67	7.32	1.75
{秦艽}	{防风}	25	58.14	4.16	1.74
{川芎,肉桂}	{防风}	32	57.14	5.32	1.71
{当归,甘草}	{防风}	26	56.52	4.33	1.69
{当归,附子}	{肉桂}	25	55.56	4.16	1.63
{防风,人参}	{肉桂}	25	54.35	4.16	1.59
{白芍}	{当归}	34	53.97	5.66	2.22
{白芍}	{防风}	34	53.97	5.66	1.61
{茯苓}	{肉桂}	51	53.13	8.49	1.56
{人参,肉桂}	{防风}	25	51.02	4.15	1.53
{萆薢}	{牛膝}	33	50.77	5.49	2.65
{细辛}	{肉桂}	38	50.67	6.32	1.49
{川芎,肉桂}	{当归}	28	50.00	4.66	2.06

利用 Pharmapper 预测“独活-防风”药对24个活性成分的靶点,共筛选得到306个靶点。从GeneCards和Therapeutic Target Database数据库共得到3964个RA靶点。利用Venny 2.1在线工具对成分与疾病靶点求交集,得到173个共有靶点。Cytoscape软件构建药对-成分-靶点-疾病网络(图5),并利用Network Analyzer对网络“度”值计算。该网络共涉及201个节点,911条边。其中度值排名前5的化合物分别是当归内酯(度值41)、亚麻油酸乙酯(度值37)、5-O甲基维斯阿米醇(度值36)、当归醇(度值36)、谷甾醇(度值33)。

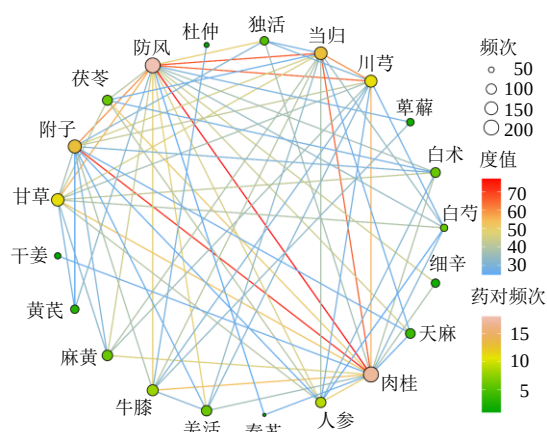


图3 共线网络图

Fig. 3 Collinear network diagram

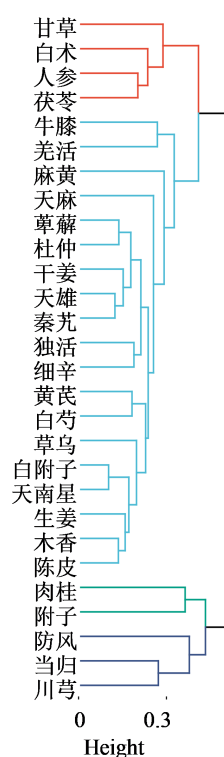


图4 高频中药系统聚类树

Fig. 4 Clustering tree of high frequency TCM system

2.5.2 PPI网络构建及关键基因筛选 将疾病与药对成分173个共同靶点导入STRING数据库中进行PPI网络构建,去除不相互作用的游离蛋白,利用Cytoscape进行可视化分析,见图6。在PPI网络中,共有169种蛋白和1901条边参与相互作用,其中节点颜色越红、越大,表明该节点度值越高,参与的生物学功能越多、越重要。利用插件Cytohubba MCC算法筛选出PPI网络中关键基因^[9],分别是白蛋白(ALB)、鼠肉瘤病毒癌基因(HRAS)、热休克蛋白90 kDa α (HSP90AA1)、基质金属蛋白酶9(MMP9)、细胞凋亡相关半胱氨酸肽酶(CASP3)、胰岛素样生

长因子1(IGF1)、BCL样1(BCL2L1)、膜联蛋白A5(ANXA5)、表皮生长因子受体(EGFR)和酪氨酸蛋白激酶(SRC)。

2.5.3 GO和KEGG分析 利用R语言对“独活-防风”与RA的173个共同靶点进行GO和KEGG分析,选择 $P < 0.05$ 的结果。GO功能富集得到生物过程(BP)2158条,分子生物功能(MF)194条,细胞成分(CC)75条。如图7所示,BP主要包括肽基酪氨酸磷酸化(peptidyl-tyrosine phosphorylation),肽基酪氨酸修饰(neutrophil degranulation),嗜中性粒细胞脱颗粒(neutrophil degranulation),参与免疫应答中性粒细胞的激活(neutrophil activation involved in immune response),细胞对化学应激的反应(cellular response to chemical stress)等;MF主要包括核受体活性(nuclear receptor activity),配体活化转录因子活性(ligand-activated transcription factor activity),内肽酶活性(endopeptidase activity),丝氨酸型肽酶活性(serine-type peptidase activity)等;CC主要包括囊泡腔(vesicle lumen),分泌颗粒腔(secretory granule lumen),细胞质囊泡腔(cytoplasmic vesicle lumen),膜筏(membrane raft)等。

KEGG通路富集分析共得到154条,表5列出了排名前10通路及参与基因。结果表明“独活-防风”活性成分可以通过调节多种通路参与抗RA的过程,主要有Ras信号通路(Ras signaling pathway)、PI3K-Akt信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、催乳素信号通路(Prolactin signaling pathway)、FoxO信号通路(FoxO signaling pathway)和MAPK信号通路(MAPK signaling pathway)等。MAPK是丝氨酸-苏氨酸激酶家族,是信号从细胞膜到细胞核传导的重要通路,是RA进展中重要的炎症因子信号转导通路,与MMP合成及促炎症因子关系密切,在RA关节炎和组织破坏中起关键作用。

3 讨论

中医学中并无RA这一病名,根据其临床症状描述,将RA归属于“痹症”“历节风”“鹤膝风”等病症范畴。对RA的记载最早可追溯到《黄帝内经》中《素问·痹论》篇,记载“风寒湿三气杂致,合而为痹”,初步探讨了痹症病因、证候、分类^[10-11]。中医治疗RA的方剂多遵循散寒除湿、健脾化湿、益气温经等法则,《普济方》中搜集了大量行之有效的方剂和疗法,如散、汤、药酒和膏等。本研究借助数据挖掘方法对《普济方》中抗RA的方剂进行规律分析,同时通过网络药理学方法探讨核心药对治疗RA的分

表4 “独活-防风”药对活性成分信息

Table 4 Information on active ingredients of "*Angelicae Pubescentis Radix*-*Saposhnikovia Radix*" drug pair

化合物ID	名称	OB/%	DL	来源
MOL001941	ammidin	34.55	0.22	独活、防风
MOL001942	isoimperatorin	45.46	0.23	独活、防风
MOL000358	β -sitosterol	36.91	0.75	独活、防风
MOL003608	<i>O</i> -acetylcolumbianetin	60.04	0.26	独活
MOL004777	angelol D	34.85	0.34	独活
MOL004778	[(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-2,3-dihydroxy-1-(7-methoxy-2-oxochromen-6-yl)-3-methylbutyl] (Z)-2-methylbut-2-enoate	46.03	0.34	独活
MOL004780	angelicone	30.99	0.19	独活
MOL004782	[(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-2,3-dihydroxy-1-(7-methoxy-2-oxochromen-6-yl)-3-methylbutyl]3-methylbutanoate	45.19	0.34	独活
MOL004792	nodakenin	57.12	0.69	独活
MOL011730	11-hydroxy-sec- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucosylhamaudol Qt	50.24	0.27	防风
MOL011732	anomalin	59.65	0.66	防风
MOL011737	divaricatacid	87.00	0.32	防风
MOL011740	divaricatol	31.65	0.38	防风
MOL011747	ledebouriellol	32.05	0.51	防风
MOL011749	phelloptorin	43.39	0.28	防风
MOL011753	5- <i>O</i> -methylvisaminol	37.99	0.25	防风
MOL002644	phellopterin	40.19	0.28	防风
MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	防风
MOL000173	wogonin	30.68	0.23	防风
MOL001494	mandenol	42.00	0.19	防风
MOL003588	prangenidin	36.31	0.22	防风
MOL007514	methyl icoso-11, 14-dienoate	39.67	0.23	防风
MOL013077	decursin	39.27	0.38	防风
MOL000011	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-5-methoxy-2-methylol-2,3-dihydropyrano[5,6- <i>H</i>][1,4]benzodioxin-9-one	68.83	0.66	防风

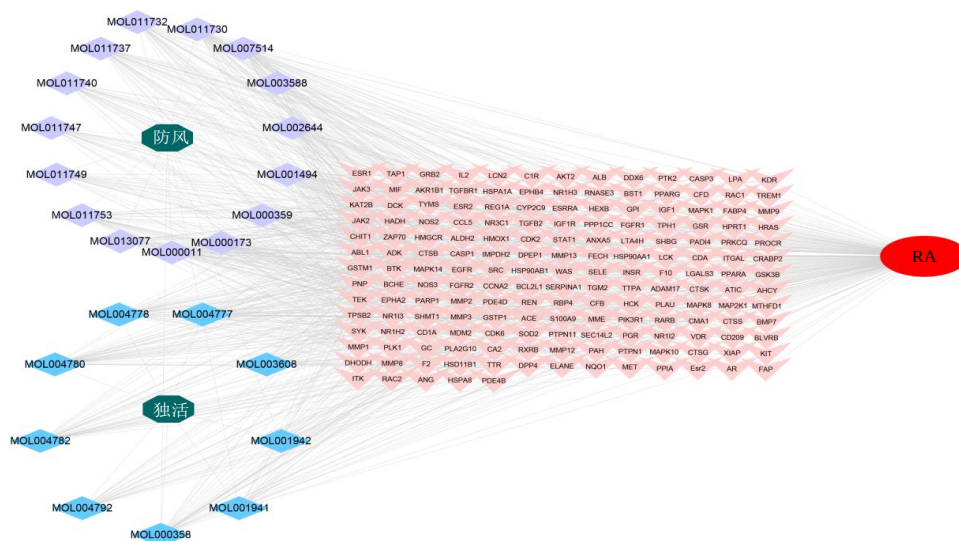


图5 药对-成分-靶点-疾病网络图

Fig. 5 Drug pair-component-target-disease network diagram

表5 “独活-防风”活性成分抗RA靶点通路

Table 5 Active ingredient of "*Angelicae Pubescentis Radix-Saposhnikovia Radix*" anti-RA target pathway

ID	信号通路	P值	geneID	数量
hsa04014	Ras	2.19×10^{-13}	EPHA2/MAP2K1/INSR/EGFR/PIK3R1/MAPK10/MAPK8/KDR/FGFR2/ABL1/TEK/RAC1/PLA2G10/IGF1/KIT/MAPK1/ZAP70/GRB2/FGFR1/PTPN11/HRAS/IGF1R/RAC2/AKT2/BCL2L1/MET	26
hsa04151	PI3K-Akt	4.46×10^{-13}	CDK2/HSP90AA1/EPHA2/CDK6/IL2/JAK3/MAP2K1/GSK3B/JAK2/INSR/EGFR/PIK3R1/KDR/FGFR2/TEK/RAC1/HSP90AB1/NOS3/IGF1/KIT/MAPK1/MDM2/GRB2/SYK/FGFR1/HRAS/IGF1R/PTK2/AKT2/BCL2L1/MET	31
hsa04917	Prolactin	2.21×10^{-12}	MAP2K1/STAT1/GSK3B/JAK2/ESR1/ESR2/PIK3R1/MAPK10/MAPK8/MAPK14/MAPK1/SRC/GRB2/HRAS/AKT2	15
hsa04068	FoxO	3.65×10^{-12}	CDK2/SOD2/TGFB2/MAP2K1/INSR/EGFR/PIK3R1/MAPK10/MAPK8/MAPK14/PLK1/IGF1/MAPK1/MDM2/GRB2/HRAS/IGF1R/AKT2/TGFB1	19
hsa04010	MAPK	3.56×10^{-11}	EPHA2/TGFB2/MAP2K1/INSR/EGFR/MAPK10/MAPK8/KDR/MAPK14/FGFR2/TEK/RAC1/HSPA8/IGF1/KIT/MAPK1/CASP3/GRB2/FGFR1/HRAS/HSPA1A/IGF1R/RAC2/AKT2/TGFB1/MET	26
hsa04933	AGE-RAGE in diabetic complications	4.43×10^{-11}	TGFB2/STAT1/JAK2/PIK3R1/MAPK10/MAPK8/MAPK14/RAC1/NOS3/MAPK1/MMP2/CASP3/HRAS/AKT2/TGFB1/SELE	16
hsa04915	Estrogen	8.68×10^{-11}	HSP90AA1/MAP2K1/ESR1/EGFR/ESR2/PGR/PIK3R1/MMP9/HSPA8/HSP90AB1/NOS3/MAPK1/SRC/MMP2/GRB2/HRAS/HSPA1A/AKT2	18
hsa05212	Pancreatic cancer	1.08×10^{-10}	CDK6/TGFB2/MAP2K1/STAT1/EGFR/PIK3R1/MAPK10/MAPK8/RAC1/MAPK1/RAC2/AKT2/TGFB1/BCL2L1	14
hsa04370	VEGF	7.37×10^{-10}	MAP2K1/PIK3R1/KDR/MAPK14/RAC1/NOS3/MAPK1/SRC/HRAS/PTK2/RAC2/AKT2	12
hsa04659	Th17 cell differentiation	1.4×10^{-10}	HSP90AA1/IL2/JAK3/STAT1/JAK2/LCK/MAPK10/MAPK8/MAPK14/HSP90AB1/MAPK1/ZAP70/RXR/RB/PRKCQ/TGFB1	15

到扶正祛邪的作用。脾、肾经药物使用频次最多，与RA病位主在肌肉筋骨有关，肾为先天之本，藏精而主骨，脾为后天之本，气血生化之源，主肌肉四肢^[21]。药物功效主以补虚、解表，其辛味具有发散解表、温肾壮阳、行气活血作用，而甘味具有调和脾胃、补益气血和缓急止痛作用，药物功效性味搭配使用达到充养正气、祛散表邪之效。

药物关联结果得到核心药对“独活-防风”，独活辛香走窜，能除伏风、胜湿气、通经止痛；防风升发疏散、通血脉祛风湿。《本经疏证》记载“独活散湿以化风，然时与防风合奏散风之功；防风祛风以行湿，然时与独活协为除湿之助^[22]。”独活善胜湿，防风善祛风，二者何用，功效显著。对高频药物进行聚类得到4类组合。第I类甘草、白术、人参和茯苓即四君子汤，用于脾胃气虚之症，《慎斋遗书》记载“人参补气治里虚，白术行中焦之湿，茯苓止泻补脾，甘草健脾中和^[23]。”气虚脾弱是RA发病的重要内因，因此治疗时选用益气健脾药物是必不可少的^[24]。第II类为牛膝、羌活、麻黄、天麻、萆薢、杜仲、干姜、天

雄、秦艽、独活、细辛、黄芪、白芍、草乌、白附子、天南星、生姜、木香、陈皮19种药物，该聚类方以祛风止痛、理气健脾、补气升阳为主要功效。第III类肉桂、附子，二者均为辛热温里药，附子长于入气分而散寒止痛，肉桂长于入血分而温经通络。第IV类防风、当归、川芎，此聚类方为防风芎归汤（去地黄、甘草）基础方，具有活血化瘀、消肿止痛、祛风除湿功效，调和人体阴阳、正气从而达到治疗RA作用。

3.2 “独活-防风”药对抗RA作用机制研究

中药具有多成分、多靶点、多途径的药理学特征，在治疗RA方面有不可替代的优势，如机体耐受性好、不良反应低等。“独活-防风”药对共获得24个治疗RA的活性成分，其中欧前胡素、异欧前胡素和β-谷甾醇、汉黄芩素、当归醇可能是治疗RA的关键成分。欧前胡素和β-谷甾醇联合使用能有效缓解胶原诱导类风湿关节炎大鼠模型关节炎的严重程度，机制与调控LTA、CD83和SREBF1水平密切相关^[25]。汉黄芩素剂量相关性改善氧化应激标志物和炎症细胞因子水平，通过靶向调控NF-κB/MAPK

信号通路发挥抗RA作用^[26]。通过Cytohubba获得药对调控的关键靶点ALB、HSP90AA1、MMP9、CASP3、EGFR等。ALB是反映营养状况和全身炎症的常规标志物,血清中ALB在宿主防御机制中起着抗氧化作用,而RA作为一种慢性炎症性自身免疫性疾病与炎症和营养状况相关^[27-28]。CASP3是细胞凋亡中重要的蛋白酶,在细胞凋亡程序中被激活诱导单核细胞和巨噬细胞、破骨细胞的凋亡^[29-30]。EGFR信号通路的激活是RA滑膜成纤维细胞增殖的主要原因,除此之外EGFR及其配体还可以在RA发病期间诱导滑膜成纤维细胞产生炎症细胞因子^[31]。

GO功能富集结果显示“独活-防风”药对治疗RA的靶点主要参与了肽基酪氨酸磷酸化、嗜中性粒细胞脱颗粒、中性粒细胞的激活与免疫反应、蛋白激酶B信号传导的正调控、炎症反应的调节。KEGG信号通路分析结果表明“独活-防风”通过调控多种通路抗RA过程,通路主要与内分泌系统、免疫系统、信号转导等相关。其中P13K-Akt信号通路、FoxO信号通路和MAPK信号通路可能是药对治疗RA的核心通路。P13K-Akt信号通路参与RA的多种病理过程,包括软骨破坏、骨侵蚀、滑膜炎以及滑膜血管的形成,该通路被激活后可调节滑膜成纤维细胞抗凋亡属性和炎症细胞因子的产生^[32]。FoxO信号通激活会诱导滑膜细胞分泌炎症因子,因此靶向抑制FoxO信号通路也是RA的重要治疗方案^[33]。

本研究利用数据挖掘方法探讨《普济方》中治疗RA的方剂的用药规律,发现中药主要以补虚解表为主,性味辛温,归脾肾经,这与现代各名家中医治疗RA方剂规律不谋而合,也为临床医师提供借鉴作用。相关关联规则得出核心药对“独活-防风”,利用网络药理学对核心药对可能的作用机制进行预测分析,为临床应用提供理论依据。聚类分析得到4个类聚方,但数据挖掘得到的方剂缺乏临床数据还需要临床验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Conforti A, di Cola I, Pavlych V, et al. Beyond the joints, the extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis [J]. *Autoimmun Rev*, 2021, 20(2): 102735.
- [2] Radu A F, Bungau S G. Management of rheumatoid arthritis: An overview [J]. *Cells*, 2021, 10(11): 2857.
- [3] Tang M S, Zeng Y, Peng W J, et al. Pharmacological aspects of natural quercetin in rheumatoid arthritis [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2022, 16: 2043-2053.
- [4] 李欣, 史淼, 滕剑波. 类风湿关节炎治疗及影像学疗效评估进展 [J]. *医学影像学杂志*, 2022, 32(5): 853-857.
- [5] Li X, Shi M, Teng J B. Progress in treatment and imaging evaluation of rheumatoid arthritis [J]. *J Med Imag*, 2022, 32(5): 853-857.
- [6] Li W J, Wang K X, Liu Y D, et al. A novel drug combination of mangiferin and cinnamic acid alleviates rheumatoid arthritis by inhibiting TLR4/NFκB/NLRP3 activation-induced pyroptosis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 912933.
- [7] 张庆, 姬文帅, 孔欣欣, 等. 基于关联规则和隐结构模型的《普济方》中治疗喘证方剂的用药规律分析 [J]. *中草药*, 2023, 54(15): 1517-1525.
- [8] Zhang Q, Ji W S, Kong X X, et al. Analysis on medication rules of prescription for asthmatic syndrome in Prescriptions for Universal Relief based on association rules and latent structure model [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(15): 1517-1525.
- [9] Shi Y Y, Li Y Q, Xie X, et al. Homotherapy for heteropathy active components and mechanisms of Qiang-Huo-Sheng-Shi decoction for treatment of rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. *Comput Biol Chem*, 2020, 89: 107397.
- [10] 张文晶. 中医药防治干眼的用药规律分析及高频药对的网络药理学研究 [D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2022.
- [11] Zhang W J. Analysis of the law of Chinese medicine in preventing and treating dry eye and network pharmacology study of high frequency drug pairs [D]. Lanzhou: Gansu University of Chinese Medicine, 2022.
- [12] Zhu W, Li Y H, Zhao J J, et al. The mechanism of triptolide in the treatment of connective tissue disease-related interstitial lung disease based on network pharmacology and molecular docking [J]. *Ann Med*, 2022, 54(1): 541-552.
- [13] 陈杰. 益气养阴通络方干预类风湿关节炎的回顾性分析及机制研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2022.
- [14] Chen J. Retrospective analysis and mechanism study on intervention of Yiqi Yangyin Tongluo recipe on rheumatoid arthritis [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2022.
- [15] 田代华整理. 黄帝内经素问 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [16] Tian D H. *Huangdi Neijing Suwen (Classic of Internal Medicine)* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005.
- [17] Liu X, Fu J, Yao X J, et al. Phenolic constituents isolated from the twigs of *Cinnamomum Cassia* and their potential neuroprotective effects [J]. *J Nat Prod*, 2018, 81(6): 1333-1342.
- [18] Tanapichatsakul C, Monggoot S, Gentekaki E, et al.

- Antibacterial and antioxidant metabolites of *Diaporthe* spp. isolated from flowers of *Melodorum fruticosum* [J]. *Curr Microbiol*, 2018, 75(4): 476-483.
- [14] Sun L, Zong S B, Li J C, et al. The essential oil from the twigs of *Cinnamomum cassia* Presl alleviates pain and inflammation in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 194: 904-912.
- [15] 张兰坤, 盛蕾, 过伟峰, 等. "防风" 在中药组方配伍中的意义 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2016, 22(8): 1107-1108.
Zhang L K, Sheng L, Guo W F, et al. Significance of "Fangfeng" in compatibility of traditional Chinese medicine formulas [J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med*, 2016, 22(8): 1107-1108.
- [16] Matusiewicz M, Bączek K B, Kosieradzka I, et al. Effect of juice and extracts from *Saposhnikovia divaricata* root on the colon cancer cells caco-2 [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): 4526.
- [17] 蒋勇, 钟淑欣, 何升华, 等. 基于网络药理学探究防风中生物活性成分及对类风湿关节炎的作用机制 [J]. *中草药*, 2023, 54(17): 5601-5608.
Jiang Y, He S X, He S H, et al. Bioactive components in *Saposhnikovia divaricata* and its mechanism on rheumatoid arthritis based on network pharmacology [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(17): 5601-5608.
- [18] Xie Y F, Feng W W, Liu M C, et al. Investigation of efficacy enhancing and toxicity reducing mechanism of combination of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* and *Paeoniae Radix Alba* in adjuvant-induced arthritis rats by metabolomics [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 9864841.
- [19] Guo Q, Wang Y X, Xu D, et al. Rheumatoid arthritis: Pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies [J]. *Bone Res*, 2018, 6: 15.
- [20] Zhang Q, Duan H X, Li R L, et al. Inducing apoptosis and suppressing inflammatory reactions in synovial fibroblasts are two important ways for Guizhi-Shaoyao-Zhimu Decoction against rheumatoid arthritis [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 217-236.
- [21] 于双双. 朴勇洙教授治疗类风湿关节炎寒湿痹阻证的用药规律及网络药理学研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2022.
Yu S S. Professor Park Yongzhu's medication law and network pharmacology in the treatment of rheumatoid arthritis cold dampness obstruction syndrome [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine, 2022.
- [22] (清)邹澍. 本经疏证 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2015.
Zou S. *Benjing Shuzheng* [M]. Beijing: China Press of Chinese Medicine, 2015.
- [23] (明)周之干. 慎斋遗书 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016.
Zhou Z G. *Shenzhai Yishu* [M]. Beijing: China Press of Chinese Medicine, 2016.
- [24] 张勇, 吴雅楠. 四君子汤结合辨证用药治疗类风湿关节炎 92 例临床研究 [J]. *江苏中医药*, 2014, 46(7): 27-28.
Zhang Y, Wu Y N. Clinical study on 92 cases of rheumatoid arthritis treated by Sijunzi decoction combined with syndrome differentiation [J]. *Jiangsu J Tradit Chin Med*, 2014, 46(7): 27-28.
- [25] Guo Q Q, Li L, Zheng K, et al. Imperatorin and β -sitosterol have synergistic activities in alleviating collagen-induced arthritis [J]. *J Leukoc Biol*, 2020, 108(2): 509-517.
- [26] Huang Y T, Guo L B, Chitti R, et al. Wogonin ameliorate complete Freund's adjuvant induced rheumatoid arthritis via targeting NF- κ B/MAPK signaling pathway [J]. *Biofactors*, 2020, 46(2): 283-291.
- [27] Liu J X, Li A, Zhou L Y, et al. Significance of combined preoperative serum Alb and dNLR for diagnosis of pancreatic cancer [J]. *Future Oncol*, 2018, 14(3): 229-239.
- [28] Chen S S, Ying H J, Du J P, et al. The association between albumin-dNLR score and disease activity in patients with rheumatoid arthritis [J]. *J Clin Lab Anal*, 2019, 33(3): e22695.
- [29] Zhai Z Q, Yang F Y, Xu W C, et al. Attenuation of rheumatoid arthritis through the inhibition of tumor necrosis factor-induced caspase 3/gasdermin E-mediated pyroptosis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2022, 74(3): 427-440.
- [30] 钟厚成, 朱宇凡, 杨敏, 等. 高三尖杉酯碱通过上调 casp3 和 casp8 表达发挥对骨肉瘤细胞系的抑制作用 [J]. *生物骨科材料与临床研究*, 2022, 19(4): 8-15.
Zhong H C, Zhu Y F, Yang M, et al. Homoharringtonine inhibited osteosarcoma cell lines by up-regulating casp3 and casp8 expression [J]. *Orthop Biomech Mater Clin Study*, 2022, 19(4): 8-15.
- [31] Yuan F L, Li X, Lu W G, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) as a therapeutic target in rheumatoid arthritis [J]. *Clin Rheumatol*, 2013, 32(3): 289-292.
- [32] Aihaiti Y, Yong S C, Tuerhong X, et al. Therapeutic effects of naringin in rheumatoid arthritis: Network pharmacology and experimental validation [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 672054.
- [33] 奥·乌力吉, 高飞, 包书茵, 等. 中医药调控 MAPK 信号通路治疗类风湿关节炎的研究进展 [J]. *中医药信息*, 2022, 39(1): 75-79.
Ao W L J, Gao F, Bao S Y, et al. Research progress in RA treatment by TCM regulating MAPK signaling pathway [J]. *Inf Tradit Chin Med*, 2022, 39(1): 75-79.

[责任编辑 齐静雯]