

## 基于网络药理学探讨芍药甘草汤治疗类风湿关节炎的作用机制

石 璐, 孙文燕\*

北京中医药大学中药学院 北京 102488

**摘 要:** **目的** 采用网络药理学方法, 对芍药甘草汤治疗类风湿关节炎的作用机制进行研究。**方法** 通过中药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP) 对芍药甘草汤进行活性成分的收集和筛选, 在 Swiss Target Prediction 和 TCMSP 数据库中查找活性成分对应的人类靶蛋白; 在 Drugbank 和 Therapeutic Target Database 数据库中获得类风湿关节炎的疾病靶点; 构建韦恩图, 得到芍药甘草汤治疗类风湿关节炎的关键靶点, 依据 STRING 数据库得到关键蛋白的蛋白互作网络; 采用 DAVID 数据库对关键靶点进行基因本体论 (GO) 和通路富集分析, 使用 Image GP 平台制作富集结果气泡图; 相关结果采用 Cytoscape 3.7.2 进行可视化研究及网络拓扑结构分析。**结果** 筛选得到芍药甘草汤中 102 种活性成分, 对应 310 个潜在靶点, 其中涉及类风湿关节炎靶点 68 个。药物-成分-关键靶点-信号通路网络图显示山柰酚、槲皮素、柚皮素、芒柄花黄素、异鼠李素等是芍药甘草汤治疗类风湿关节炎的关键成分, 前列腺素内环氧化物合成酶 2、一氧化氮合酶 2、丝裂原活化蛋白激酶 14、过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ 、白细胞介素-6、肿瘤坏死因子、白细胞介素-1 $\beta$  等是该方治疗类风湿关节炎的关键靶点。GO 富集分析显示与生物过程相关的条目 28 个, 与细胞组成相关的条目 2 个, 与分子功能相关的条目 13 个。通路富集分析显示与 40 条通路相关, 涉及肿瘤坏死因子信号通路、破骨细胞分化、T 细胞受体信号通路、MAPK 信号通路、类固醇激素生物合成、Toll 样受体信号通路等。**结论** 从网络药理学角度阐明了芍药甘草汤多成分、多靶点、多途径的整体调节特点, 初步揭示了芍药甘草汤治疗类风湿关节炎的物质基础和作用机制, 为后续研究提供思路与依据。

**关键词:** 芍药甘草汤; 类风湿关节炎; 网络药理学; 靶点; 信号通路

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)24-6246-12

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.24.014

## Mechanism of Shaoyao Gancan Decoction in treatment of rheumatoid arthritis based on network pharmacology

SHI Lu, SUN Wen-yan

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

**Abstract:** **Objective** To study the mechanism of Shaoyao Gancan Decoction in the treatment of rheumatoid arthritis (RA) based on network pharmacology. **Methods** The active components of Shaoyao Gancan Decoction were obtained from traditional Chinese medicine systems pharmacology (TCMSP) database, and human target proteins corresponding to active components were searched in Swiss Target Prediction and TCMSP database. The targets of RA were collected through Therapeutic Target Database and Drugbank database. The key targets of Shaoyao Gancan Decoction to treat RA were screened by building the Venn diagram. And the key protein interaction (PPI) network model was constructed by STRING database. The gene ontology (GO) and pathway enrichment analysis were performed by DAVID database. All of the correlative results were visualized by Cytoscape 3.7.2, and the network feature analysis was made by Network Analyzer. **Results** A total of 102 compounds were obtained from Shaoyao Gancan Decoction, with 310 corresponding targets, and 68 common targets of Shaoyao Gancan Decoction-RA were obtained. Herb-compound-target-pathway network showed that kaempferol, quercetin, formononetin, naringenin, isorhamnetin were the key compounds of Shaoyao Gancan Decoction in the treatment of RA, and PTGS2, NOS2, MAPK14, PPARG, IL-6, TNF, and IL-1 $\beta$  were the key targets. GO entries included 28 biological process entries, two cellular component entries, and 13 molecular function entries. There were 40 pathways involving TNF signaling pathway, osteoclast differentiation, T cell receptor signaling pathway, MAPK signaling pathway, steroid

收稿日期: 2020-06-01

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (“973” 计划) 课题 (2009CB522803); 北京中医药大学科研发展基金 (2020072120047)

作者简介: 石 璐, 在读硕士, 从事中药抗炎与免疫药理研究。Tel: 18801377520 E-mail: lushi1112@163.com

\*通信作者 孙文燕, 博士, 副教授, 从事中药抗炎与免疫药理、中药毒理研究。Tel: (010)53912122 E-mail: sunwy@bucm.edu.cn

hormone biosynthesis and toll-like receptor signaling pathway. **Conclusion** The results of this study verify the multi-component, multi-target and multi-pathway regulation characteristics of Shaoyao Gancao Decoction, preliminarily predict material basis and mechanism of Shaoyao Gancao Decoction in the treatment of RA, which provides reference for further research.

**Key words:** Shaoyao Gancao Decoction; rheumatoid arthritis; network pharmacology; target; signaling pathway

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性、进行性的自身免疫性疾病, 以滑膜异常增殖、血管翳生成、软骨及骨破坏为病理特征, 患者关节畸形和功能丧失, 可并发肺部疾病、心血管疾病、恶性肿瘤、抑郁症等<sup>[1]</sup>。该病发病率、致残率高, 全球发病率为 0.5%~1%, 中国发病率为 0.42%<sup>[2]</sup>。目前治疗 RA 的药物主要包括改善病情类抗风湿药、糖皮质激素、非甾体类抗炎药和新型生物制剂等, 这些药物存在不同程度的不良反应, 且生物制剂价格昂贵, 患者难以长期坚持治疗。

RA 属中医“痹证”的范畴, 其病因病机主要为体质虚弱、正气不足、营卫不固, 导致外感六淫而发病<sup>[3]</sup>。中医药治疗痹证历史悠久, 积累了许多行之有效的方药。芍药甘草汤首见于《伤寒论》, 为治疗伤寒脉浮、自汗出、小便数、心烦、微恶寒、脚挛急所设。方中白芍酸苦性寒, 具有养血敛阴、柔肝止痛等功效, 可除血痹, 通顺血脉; 甘草甘平, 健脾益气补中、缓急止痛; 二药相合酸甘化阴, 滋阴养血, 缓急止痛, 临床上多应用于神经-肌肉系统、关节炎等疾病的治疗<sup>[4]</sup>。动物实验和临床研究已证实芍药甘草汤具有治疗 RA 的作用, 但其具体作用机制尚不清楚<sup>[5-6]</sup>。

网络药理学是建立在网络数据库检索、高通量组学数据分析及计算机虚拟计算基础上的生物信息网络构建及网络拓扑结构分析策略和技术<sup>[7-8]</sup>。其从整体角度出发, 通过展示药物、靶点、疾病之间的相互关系以系统地阐明药物作用机制, 与中医药多成分、多靶点的作用特点及辨证论治、系统调控的思想相吻合, 为中药复方研究提供了新的思路。目前已被广泛应用于中药潜在活性成分和作用靶点的预测以及其作用机制的探索。本研究利用网络药理学的方法, 探索芍药甘草汤治疗 RA 的主要物质基础及作用机制, 为药物开发和临床应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 芍药甘草汤活性成分的收集与筛选

通过中药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP, <http://tcmspw.com/tcmsp.php>), 以芍药、甘

草为关键词, 收集芍药甘草汤全方 2 味中药所含化学成分。TCMSP 数据库包含了 499 味草药及其化学成分, 并针对每个化合物提供了较全面的人体吸收、分布、代谢性质评价数据, 靶标及其疾病信息。良好的口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) 和类药性 (drug-likeness, DL) 是化合物发展成为药物的重要前提, 以  $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$  作为限定条件对所收集到的化合物进行筛选, 得到芍药甘草汤的活性化合物。

### 1.2 芍药甘草汤“化合物-靶点蛋白”网络的构建

通过 Pubchem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取芍药甘草汤有效活性化合物的 SMILE 号, 依次导入 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/index.php>) 进行靶点预测, 选择预测靶点中可能性  $\geq 0.5$  的靶点蛋白作为成分作用的靶点。同时利用 TCMSP 数据库获取每个活性化合物对应的靶点信息。两者合并、去重, 通过 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 对靶点蛋白名称进行标准化, 选择物种为 “homo sapiens”, 获得蛋白的基因名称和 Uniprot 编号。将成分和靶点导入 Cytoscape 3.7.2 软件, 构建成分-靶点网络, 使得成分与靶点关系达到可视化, 并对其网络拓扑结构分析。

### 1.3 疾病靶点的获取

以 “rheumatoid arthritis” 为关键词, 在 Drugbank 数据库 (<https://www.drugbank.ca/>) 和 Therapeutic Target Database (TTD) 数据库 (<http://db.idrblab.net/ttd/>) 中进行检索。合并两个数据库所获得的数据, 删除重复且无效的基因, 将最后筛选出的靶点基因全称输入 Uniprot 数据库中获取基因名称和 Uniprot 编号。

### 1.4 关键靶点筛选及蛋白互作网络的构建

利用 Venny 2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 在线工具绘制芍药甘草汤活性成分靶点和 RA 靶点的韦恩图, 存在交集的共同靶点可能是芍药甘草汤治疗 RA 的关键靶点。将关键靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 构建蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein

interaction, PPI) 网络模型, 蛋白种属设置为“homo sapiens”, 最低相互作用阈值设为中等“medium confidence”(0.4), 获得蛋白相互作用关系。将结果进一步导入 Cytoscape 3.7.2 软件进行拓扑学分析并构建 PPI 网络。

### 1.5 基因本体论 (GO) 和通路富集分析

通过 DAVID 6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 的 GO 分析, 对关键靶点进行生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF) 和细胞组成 (cellular component, CC) 3 个模块的分析, 保留  $P < 0.01$  且错误发现率 (false discovery rate, FDR)  $< 0.05$  的结果, 并进行

可视化处理; 基于京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 和 BioCarta 对关键靶点进行通路分析以确定关键靶点富集通路, 保留  $P < 0.01$  且 FDR  $< 0.01$  的结果, 使用 Image GP 平台以气泡图的形式呈现富集结果。

## 2 结果

### 2.1 芍药甘草汤活性成分的筛选结果

通过检索 TCMSP, 得到与芍药有关的化学成分 85 个, 与甘草相关的化学成分 280 个。以  $OB \geq 30\%$  和  $DL \geq 0.18$  为条件筛选得到芍药有效成分 13 个, 甘草有效成分 92 个, 去重后共得到 102 个活性成分, 具体信息见表 1。

表 1 芍药甘草汤的活性成分

Table 1 Active compounds in Shaoyao Gancao Decoction

| 分子编号      | 化合物名称                                                                                                                       | OB/%  | DL   | 来源    |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|------|-------|
| MOL001910 | 11 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -epoxy-3 $\beta$ -23-dihydroxy-30-norolean-20-en-28,12 $\beta$ -olide                              | 64.77 | 0.38 | 白芍    |
| MOL001918 | paeoniflorigenone                                                                                                           | 87.59 | 0.37 | 白芍    |
| MOL001919 | (3S,5R,8R,9R,10S,14S)-3,17-dihydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-2,3,5,6,7,9-hexahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-15,16-dione | 43.56 | 0.53 | 白芍    |
| MOL001921 | lactiflorin                                                                                                                 | 49.12 | 0.80 | 白芍    |
| MOL001924 | paeoniflorin                                                                                                                | 53.87 | 0.79 | 白芍    |
| MOL001925 | paeoniflorin_qt                                                                                                             | 68.18 | 0.40 | 白芍    |
| MOL001928 | albiflorin_qt                                                                                                               | 66.64 | 0.33 | 白芍    |
| MOL001930 | benzoyl paeoniflorin                                                                                                        | 31.27 | 0.75 | 白芍    |
| MOL000358 | $\beta$ -sitosterol                                                                                                         | 36.91 | 0.75 | 白芍    |
| MOL000492 | (+)-catechin                                                                                                                | 54.83 | 0.24 | 白芍    |
| MOL000211 | mairin                                                                                                                      | 55.38 | 0.78 | 白芍、甘草 |
| MOL000359 | sitosterol                                                                                                                  | 36.91 | 0.75 | 白芍、甘草 |
| MOL000422 | kaempferol                                                                                                                  | 41.88 | 0.24 | 白芍、甘草 |
| MOL001484 | inermine                                                                                                                    | 75.18 | 0.54 | 甘草    |
| MOL001792 | liquiritigenin                                                                                                              | 32.76 | 0.18 | 甘草    |
| MOL002311 | glycyrol                                                                                                                    | 90.78 | 0.67 | 甘草    |
| MOL000239 | jaranol                                                                                                                     | 50.83 | 0.29 | 甘草    |
| MOL002565 | medicarpin                                                                                                                  | 49.22 | 0.34 | 甘草    |
| MOL000354 | isorhamnetin                                                                                                                | 49.60 | 0.31 | 甘草    |
| MOL003656 | lupiwighteone                                                                                                               | 51.64 | 0.37 | 甘草    |
| MOL003896 | 7-methoxy-2-methyl isoflavone                                                                                               | 42.56 | 0.20 | 甘草    |
| MOL000392 | formononetin                                                                                                                | 69.67 | 0.21 | 甘草    |
| MOL000417 | calycosin                                                                                                                   | 47.75 | 0.24 | 甘草    |
| MOL004328 | naringenin                                                                                                                  | 59.29 | 0.21 | 甘草    |
| 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 | 甘草    |
| MOL004806 | euchrenone                                                                                                                  | 30.29 | 0.57 | 甘草    |
| MOL004808 | glyasperin B                                                                                                                | 65.22 | 0.44 | 甘草    |
| MOL004810 | glyasperin F                                                                                                                | 75.84 | 0.54 | 甘草    |
| MOL004811 | glyasperin C                                                                                                                | 45.56 | 0.40 | 甘草    |
| MOL004814 | isotrifoliol                                                                                                                | 31.94 | 0.42 | 甘草    |
| MOL004815 | (E)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-(2,2-dimethylchromen-6-yl)prop-2-en-1-one                                                     | 39.62 | 0.35 | 甘草    |
| MOL004820 | kanzonols W                                                                                                                 | 50.48 | 0.52 | 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 | 甘草    |
| MOL004827 | semilicoisoflavone B                                                                                                        | 48.78 | 0.55 | 甘草    |
| MOL004828 | glepidotin A                                                                                                                | 44.72 | 0.35 | 甘草    |
| MOL004829 | glepidotin B                                                                                                                | 64.46 | 0.34 | 甘草    |
| MOL004833 | phaseolinisoflavan                                                                                                          | 32.01 | 0.45 | 甘草    |
| MOL004835 | glypallichalcone                                                                                                            | 61.60 | 0.19 | 甘草    |
| MOL004838 | 8-(6-hydroxy-2-benzofuranyl)-2,2-dimethyl-5-chromenol                                                                       | 58.44 | 0.38 | 甘草    |
| MOL004841 | licochalcone B                                                                                                              | 76.76 | 0.19 | 甘草    |
| MOL004848 | licochalcone G                                                                                                              | 49.25 | 0.32 | 甘草    |

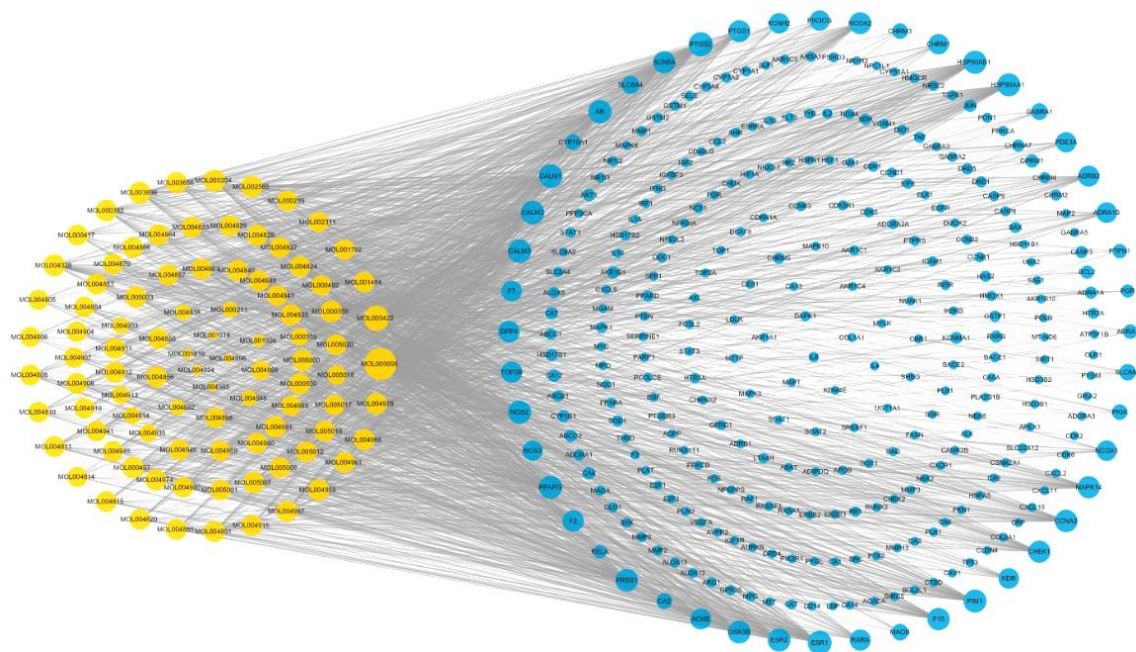
续表 1

| 分子编号      | 化合物名称                                                                                     | 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 |
| MOL004855 | licoricone                                                                                | 63.58 | 0.47 | 甘草 |
| MOL004856 | gancaonin A                                                                               | 51.08 | 0.40 | 甘草 |
| MOL004857 | gancaonin B                                                                               | 48.79 | 0.45 | 甘草 |
| MOL004860 | licorice glycoside E                                                                      | 32.89 | 0.27 | 甘草 |
| MOL004863 | 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-8-(3-methylbut-2-enyl)chromone                      | 66.37 | 0.41 | 甘草 |
| MOL004864 | 5,7-dihydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)chromone                          | 30.49 | 0.41 | 甘草 |
| MOL004866 | 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-6-(3-methylbut-2-enyl)chromone                      | 44.15 | 0.41 | 甘草 |
| MOL004879 | glycyrin                                                                                  | 52.61 | 0.47 | 甘草 |
| MOL004882 | licocoumarone                                                                             | 33.21 | 0.36 | 甘草 |
| MOL004883 | licoisoflavone                                                                            | 41.61 | 0.42 | 甘草 |
| MOL004884 | licoisoflavone B                                                                          | 38.93 | 0.55 | 甘草 |
| MOL004885 | licoisoflavanone                                                                          | 52.47 | 0.54 | 甘草 |
| MOL004891 | shinpterocarpin                                                                           | 80.30 | 0.73 | 甘草 |
| 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 | 甘草 |
| MOL004903 | liquiritin                                                                                | 65.69 | 0.74 | 甘草 |
| MOL004904 | licopyranocoumarin                                                                        | 80.36 | 0.65 | 甘草 |
| MOL004905 | 3,22-dihydroxy-11-oxo-delta(12)-oleanene-27- $\alpha$ -methoxycarbonyl-29-oic acid        | 34.32 | 0.55 | 甘草 |
| MOL004907 | glyzaglabrin                                                                              | 61.07 | 0.35 | 甘草 |
| MOL004908 | glabridin                                                                                 | 53.25 | 0.47 | 甘草 |
| MOL004910 | glabranin                                                                                 | 52.90 | 0.31 | 甘草 |
| MOL004911 | glabrene                                                                                  | 46.27 | 0.44 | 甘草 |
| MOL004912 | glabrone                                                                                  | 52.51 | 0.50 | 甘草 |
| MOL004913 | 1,3-dihydroxy-9-methoxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone                                    | 48.14 | 0.43 | 甘草 |
| MOL004914 | 1,3-dihydroxy-8,9-dimethoxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone                                | 62.90 | 0.53 | 甘草 |
| MOL004915 | eurycarpin A                                                                              | 43.28 | 0.37 | 甘草 |
| MOL004917 | glycyroside                                                                               | 37.25 | 0.79 | 甘草 |
| MOL004924 | (-)-medicocarpin                                                                          | 40.99 | 0.95 | 甘草 |
| MOL004935 | sigmoidin-B                                                                               | 34.88 | 0.41 | 甘草 |
| MOL004941 | (2R)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one                                           | 71.12 | 0.18 | 甘草 |
| MOL004945 | (2S)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)chroman-4-one                    | 36.57 | 0.32 | 甘草 |
| MOL004948 | isoglycyrol                                                                               | 44.70 | 0.84 | 甘草 |
| MOL004949 | isolicoflavanol                                                                           | 45.17 | 0.42 | 甘草 |
| MOL004957 | 4'-hydroxy-7-methoxy-isoflavone                                                           | 38.37 | 0.21 | 甘草 |
| MOL004959 | 1-methoxyphaseollidin                                                                     | 69.98 | 0.64 | 甘草 |
| MOL004961 | quercetin der.                                                                            | 46.45 | 0.33 | 甘草 |
| MOL004966 | 3'-hydroxy-4'-O-methylglabridin                                                           | 43.71 | 0.57 | 甘草 |
| MOL00497  | licochalcone A                                                                            | 40.79 | 0.29 | 甘草 |
| MOL004974 | 3'-methoxyglabridin                                                                       | 46.16 | 0.57 | 甘草 |
| MOL004978 | 2-[(3R)-8,8-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyrano[6,5-f]chromen-3-yl]-5-methoxyphenol            | 36.21 | 0.52 | 甘草 |
| MOL004980 | inflacoumarin A                                                                           | 39.71 | 0.33 | 甘草 |
| MOL004985 | icos-5-enoic acid                                                                         | 30.70 | 0.20 | 甘草 |
| MOL004988 | kanzonol F                                                                                | 32.47 | 0.89 | 甘草 |
| MOL004989 | 6-prenylated eriodictyol                                                                  | 39.22 | 0.41 | 甘草 |
| MOL004990 | 7,2',4'-trihydroxy-5-methoxy-3-aryl coumarin                                              | 83.71 | 0.27 | 甘草 |
| MOL004991 | 7-acetoxy-2-methylisoflavone                                                              | 38.92 | 0.26 | 甘草 |
| MOL004993 | 8-prenylated eriodictyol                                                                  | 53.79 | 0.40 | 甘草 |
| MOL004996 | gadelaidic acid                                                                           | 30.70 | 0.20 | 甘草 |
| MOL005000 | vestitol                                                                                  | 74.66 | 0.21 | 甘草 |
| MOL005000 | gancaonin G                                                                               | 60.44 | 0.39 | 甘草 |
| MOL005001 | gancaonin H                                                                               | 50.10 | 0.78 | 甘草 |
| MOL005003 | licoagrocarpin                                                                            | 58.81 | 0.58 | 甘草 |
| MOL005007 | glyasperins M                                                                             | 72.67 | 0.59 | 甘草 |
| MOL005008 | glycyrrhiza flavonol A                                                                    | 41.28 | 0.60 | 甘草 |
| MOL005012 | licoagroisoflavone                                                                        | 57.28 | 0.49 | 甘草 |
| MOL005013 | 18 $\alpha$ -hydroxyglycyrrhetic acid                                                     | 41.16 | 0.71 | 甘草 |
| MOL005016 | odoratin                                                                                  | 49.95 | 0.30 | 甘草 |
| MOL005017 | phaseol                                                                                   | 78.77 | 0.58 | 甘草 |
| MOL005018 | xambioona                                                                                 | 54.85 | 0.87 | 甘草 |
| MOL005020 | dehydroglyasperins C                                                                      | 53.82 | 0.37 | 甘草 |
| MOL000098 | quercetin                                                                                 | 46.43 | 0.28 | 甘草 |

## 2.2 芍药甘草汤“化合物-靶点蛋白”网络的构建

在上述 102 个化合物中,通过 Swiss Target Prediction 数据库查找出人类潜在靶点 108 个,通过

TCMSP 数据库查找出人类潜在靶点 244 个,删除重复靶点,共得到 310 个靶点。将成分和靶点导入 Cytoscape 3.7.2 软件,构建成分-靶点网络,见图 1。



左侧圆节点为有效化学成分,右侧圆节点为靶点,节点的大小与节点的度值呈正比例关系;边表示化学成分与靶点间关系  
Circle node on the left is the effective chemical composition; Circle node on the right is the target; Size of the node is proportional to the degree of the node;  
Edge represents the relationship between the chemical composition and the target

图 1 芍药甘草汤“化合物-靶点蛋白”网络

Fig. 1 “Compound-target” network of Shaoyao Gancao Decoction

该网络由 403 个节点(93 个化合物和 310 个靶点)和 2 198 条边组成。有 9 个化合物未找到相关的靶点,故构建的成分-靶点网络中只显示 93 个化合物。经网络拓扑结构分析,每个化合物的平均度值为 22.4,高于该均值的化合物有 31 个。其中甘草中槲皮素(MOL000098)的节点度最高,作用于 218 个药物靶点,降序依次为白芍和甘草中的山柰酚(MOL000422)对应靶点 99 个,甘草中的柚皮素(MOL004328)、7-甲氧基-2-甲基异黄酮(MOL003896)对应靶点 44 个,甘草中的异鼠李素(MOL000354)对应靶点 42 个。每个靶点的平均度值为 6.7,高于该均值的靶点有 44 个,其中节点度最高的为前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2),靶向 83 个化合物,降序依次为雌激素受体(estrogen receptor, ESR1)靶向 78 个、钙调蛋白(calmodulin, CALM)靶向 71 个、雄激素受体(androgen receptor, AR)靶向 67 个、一氧化氮合酶 2 (nitric oxide synthase, NOS2)靶向 67 个化合物。表 2 仅列出化

表 2 芍药甘草汤“化合物-靶点蛋白”网络拓扑学参数

Table 2 Topology parameters of “compound-target” network in Shaoyao Gancao Decoction

| 分子编号      | 度值  | 类别 | 名称       | 度值 | 类别 |
|-----------|-----|----|----------|----|----|
| MOL000098 | 218 | 成分 | PTGS2    | 83 | 靶点 |
| MOL000422 | 99  | 成分 | ESR1     | 78 | 靶点 |
| MOL004328 | 44  | 成分 | CALM3    | 71 | 靶点 |
| MOL003896 | 44  | 成分 | CALM2    | 71 | 靶点 |
| MOL000354 | 42  | 成分 | CALM1    | 71 | 靶点 |
| MOL000392 | 39  | 成分 | AR       | 67 | 靶点 |
| MOL000358 | 38  | 成分 | NOS2     | 65 | 靶点 |
| MOL002565 | 36  | 成分 | HSP90AB1 | 64 | 靶点 |
| MOL000497 | 33  | 成分 | HSP90AA1 | 64 | 靶点 |
| MOL005003 | 31  | 成分 | PIM1     | 62 | 靶点 |
| MOL000500 | 31  | 成分 | PPARG    | 62 | 靶点 |
| MOL004978 | 31  | 成分 | ESR2     | 60 | 靶点 |
| MOL004959 | 31  | 成分 | GSK3B    | 58 | 靶点 |
| MOL004891 | 31  | 成分 | PRSS1    | 54 | 靶点 |
| MOL004974 | 30  | 成分 | CCNA2    | 53 | 靶点 |
| MOL004966 | 29  | 成分 | F10      | 52 | 靶点 |
| MOL004835 | 28  | 成分 | MAPK14   | 47 | 靶点 |
| MOL004828 | 28  | 成分 | CHEK1    | 46 | 靶点 |
| MOL005007 | 27  | 成分 | NCOA2    | 45 | 靶点 |
| MOL004991 | 27  | 成分 | SCN5A    | 44 | 靶点 |

合物与靶点度值最高的前 20 项,表明了芍药甘草汤多成分、多靶点的特性。

### 2.3 疾病靶点的获取、关键靶点的筛选和 PPI 网络的构建

从 Drugbank 数据库和 TTD 数据库检索到 RA 相关靶点 260 个。将芍药甘草汤的 310 个靶点与 RA 的 260 个相关靶点导入 Venny 2.1.0 软件,获得 68 个共同靶点,即为芍药甘草汤治疗 RA 的关键靶点,见图 2。将 68 个关键靶点导入 STRING 数据库中,

获得结果后导入 Cytoscape 中构建 PPI 网络图,见图 3。该网络包括 66 个节点和 575 条边(其中 2 个靶点不连接其他蛋白,故不在 PPI 中显示)。经网络拓扑学分析,各节点的平均自由度为 17.42,平均介数为 0.014,平均接近中心性为 0.54,平均最短路径长度的均值为 1.90。自由度、介数、接近中心性数均高于均值、平均最短路径长度低于均值的靶点有 16 个,见表 3,这些靶点与其他靶点关联密切,可能治疗 RA 中占据重要地位。

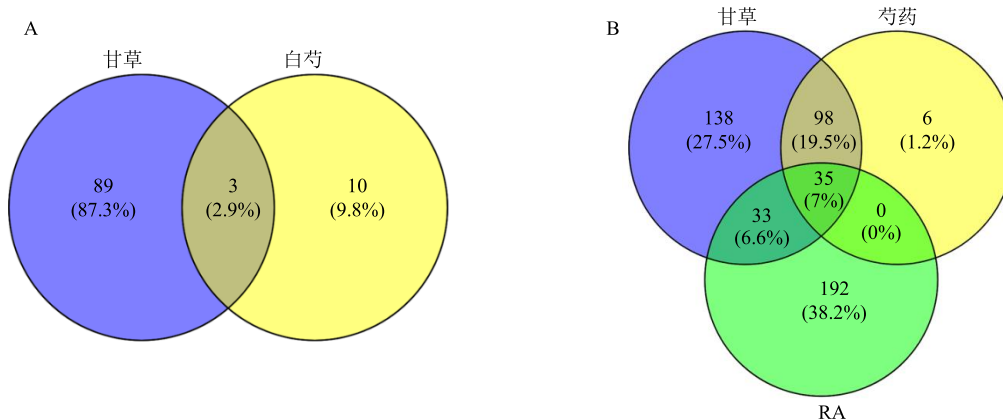
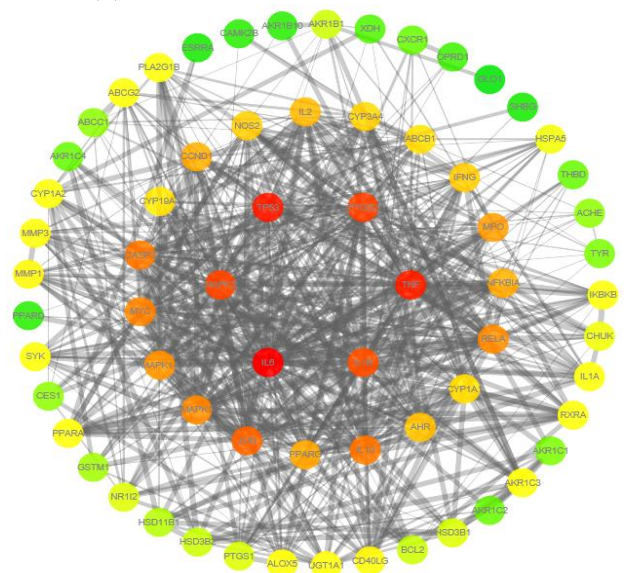


图 2 芍药甘草汤的活性成分 (A)、芍药甘草汤与类风湿关节炎的共同靶点 (B) 韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of active compounds in Shaoyao Gancao Decoction (A), common target of Shaoyao Gancao Decoction and RA (B)



节点颜色表示度值大小,节点颜色由绿至红对应度值越大,边的粗细与蛋白之间的结合分值呈正相关关系

The color of the node indicates the size of the degree value; The greater the degree value corresponding to the node color from green to red; The thickness of the edge and the combine score value between the protein have a positive correlation

图 3 关键靶点 PPI 网络

Fig. 3 PPI network of key targets

### 2.4 GO 富集分析结果

将 68 个关键靶点通过 DAVID 数据库进行 GO 富集分析,得到 43 个富集条目 ( $P < 0.01$ ,  $FDR < 0.05$ ),见图 4。其中 BP 分析获得 28 个条目,涉及 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控、氧化还原过程、药物反应、凋亡过程、炎症反应等。CC 分析中富集条目 2 个,为胞质和细胞外间隙。MF 分析中获得条目 13 个,涉及酶结合、转录因子结合、氧化还原酶活性等。提示芍药甘草汤在治疗 RA 过程中通过参与调控多种生物学过程而发挥作用。

### 2.5 通路富集分析结果

通路富集分析发现,68 个关键靶点显著富集在 40 条通路上 ( $P < 0.01$ ,  $FDR < 0.01$ ),见表 4、图 5。涉及肿瘤坏死因子信号通路 (TNF signaling pathway)、破骨细胞分化 (osteoclast differentiation)、T 细胞受体信号通路 (T cell receptor signaling pathway)、丝裂原活化蛋白激酶信号通路 (MAPK signaling pathway)、类固醇激素生物合成 (steroid hormone biosynthesis)、Toll 样受体信号通路 (Toll-like receptor signaling pathway) 等,提示芍药甘草汤通过作用于多条通路来发挥治疗 RA 的作用。

表 3 芍药甘草汤治疗 RA 的关键靶点拓扑学参数

Table 3 Topology parameters of key targets in treatment of RA with Shaoyao Gancao Decoction

| 基因           | 全称                                   | 自由度 | 平均最短路径长度  | 介数        | 接近中心性     |
|--------------|--------------------------------------|-----|-----------|-----------|-----------|
| IL-6         | interleukin-6                        | 44  | 1.338 462 | 0.103 213 | 0.747 126 |
| TP53         | cellular tumor antigen p53           | 41  | 1.400 000 | 0.072 594 | 0.714 286 |
| TNF          | tumor necrosis factor                | 40  | 1.430 769 | 0.047 761 | 0.698 925 |
| PTGS2        | prostaglandin G/H synthase 2         | 37  | 1.430 769 | 0.050 438 | 0.698 925 |
| MAPK3        | mitogen-activated protein kinase 3   | 36  | 1.492 308 | 0.055 497 | 0.670 103 |
| IL-1 $\beta$ | interleukin-1 $\beta$                | 35  | 1.476 923 | 0.040 510 | 0.677 083 |
| JUN          | transcription factor AP-1            | 33  | 1.538 462 | 0.015 630 | 0.650 000 |
| CASP3        | caspase-3                            | 31  | 1.569 231 | 0.016 651 | 0.637 255 |
| RELA         | transcription factor p65             | 29  | 1.630 769 | 0.014 815 | 0.613 208 |
| MPO          | myeloperoxidase                      | 28  | 1.692 308 | 0.024 396 | 0.590 909 |
| CCND1        | G <sub>1</sub> /S-specific cyclin-D1 | 26  | 1.661 538 | 0.022 186 | 0.601 852 |
| AHR          | aryl hydrocarbon receptor            | 23  | 1.676 923 | 0.019 615 | 0.596 330 |
| CYP3A4       | cytochrome P450 3A4                  | 22  | 1.692 308 | 0.033 552 | 0.590 909 |
| ABCB1        | P-glycoprotein 1                     | 21  | 1.692 308 | 0.020 752 | 0.590 909 |
| CYP19A1      | cytochrome P450 19A1                 | 20  | 1.707 692 | 0.047 781 | 0.585 586 |
| CYP11A1      | cytochrome P450 11A1                 | 20  | 1.723 077 | 0.024 022 | 0.580 357 |

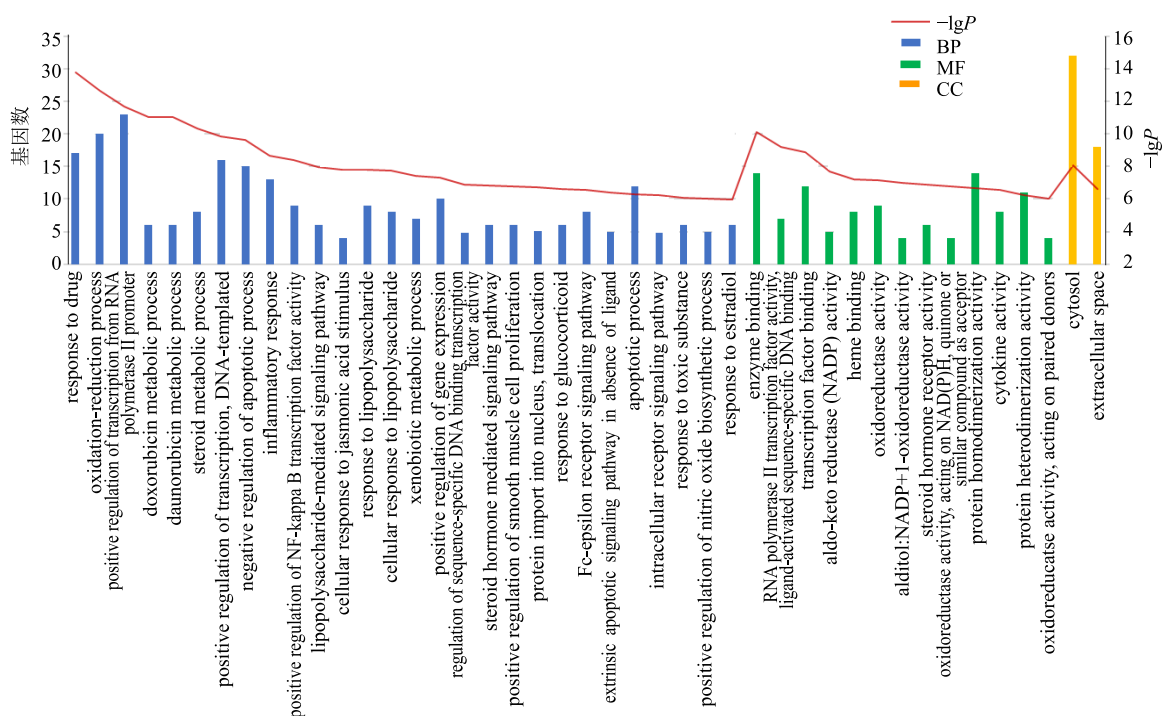


图 4 关键靶点的 GO 条目

Fig. 4 GO entries of key targets

表 4 芍药甘草汤治疗 RA 关键靶点参与的通路富集信息

Table 4 Pathway enrichment information involving key targets in treatment of RA with Shaoyao Gancao Decoction

| ID       | 通路                                        | 基因数 | P 值                    | FDR                    |
|----------|-------------------------------------------|-----|------------------------|------------------------|
| hsa05200 | pathways in cancer                        | 19  | $6.86 \times 10^{-9}$  | $8.49 \times 10^{-6}$  |
| hsa05142 | chagas disease (American trypanosomiasis) | 15  | $2.70 \times 10^{-13}$ | $3.35 \times 10^{-10}$ |
| hsa05145 | toxoplasmosis                             | 15  | $5.99 \times 10^{-13}$ | $7.42 \times 10^{-10}$ |
| hsa05152 | tuberculosis                              | 15  | $4.15 \times 10^{-10}$ | $5.14 \times 10^{-7}$  |
| hsa04668 | TNF signaling pathway                     | 14  | $8.15 \times 10^{-12}$ | $1.01 \times 10^{-8}$  |
| hsa04380 | osteoclast differentiation                | 14  | $1.11 \times 10^{-10}$ | $1.37 \times 10^{-7}$  |
| hsa05161 | hepatitis B                               | 14  | $4.00 \times 10^{-10}$ | $4.96 \times 10^{-7}$  |
| hsa05140 | leishmaniasis                             | 13  | $9.80 \times 10^{-13}$ | $1.21 \times 10^{-9}$  |
| hsa04660 | T cell receptor signaling pathway         | 13  | $6.57 \times 10^{-11}$ | $8.14 \times 10^{-8}$  |
| hsa04010 | MAPK signaling pathway                    | 13  | $2.37 \times 10^{-6}$  | $2.93 \times 10^{-3}$  |
| hsa00140 | steroid hormone biosynthesis              | 12  | $2.49 \times 10^{-12}$ | $3.08 \times 10^{-9}$  |

续表 4

| ID                    | 通路                                                                                      | 基因数 | P 值                    | FDR                   |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----|------------------------|-----------------------|
| hsa05133              | pertussis                                                                               | 12  | $4.76 \times 10^{-11}$ | $5.89 \times 10^{-8}$ |
| hsa05164              | influenza A                                                                             | 12  | $3.89 \times 10^{-7}$  | $4.82 \times 10^{-4}$ |
| hsa05222              | small cell lung cancer                                                                  | 11  | $3.63 \times 10^{-9}$  | $4.49 \times 10^{-6}$ |
| hsa04620              | Toll-like receptor signaling pathway                                                    | 11  | $3.18 \times 10^{-8}$  | $3.94 \times 10^{-5}$ |
| hsa05160              | hepatitis C                                                                             | 11  | $2.78 \times 10^{-7}$  | $3.45 \times 10^{-4}$ |
| hsa05168              | herpes simplex infection                                                                | 11  | $5.22 \times 10^{-6}$  | $6.47 \times 10^{-3}$ |
| hsa04621              | NOD-like receptor signaling pathway                                                     | 10  | $1.36 \times 10^{-9}$  | $1.68 \times 10^{-6}$ |
| h_il1rPathway         | signal transduction through IL-1 $\beta$                                                | 10  | $3.25 \times 10^{-8}$  | $3.96 \times 10^{-5}$ |
| hsa05132              | salmonella infection                                                                    | 10  | $4.86 \times 10^{-8}$  | $6.02 \times 10^{-5}$ |
| hsa04064              | NF-kappa B signaling pathway                                                            | 10  | $7.37 \times 10^{-8}$  | $9.13 \times 10^{-5}$ |
| h_keratinocytePathway | keratinocyte differentiation                                                            | 10  | $1.09 \times 10^{-6}$  | $1.32 \times 10^{-3}$ |
| hsa04722              | neurotrophin signaling pathway                                                          | 10  | $1.19 \times 10^{-6}$  | $1.47 \times 10^{-3}$ |
| hsa05169              | Epstein-Barr virus infection                                                            | 10  | $1.37 \times 10^{-6}$  | $1.69 \times 10^{-3}$ |
| h_PparaPathway        | mechanism of gene regulation by peroxisome proliferators via PPAR $\alpha$ ( $\alpha$ ) | 10  | $2.22 \times 10^{-6}$  | $2.70 \times 10^{-3}$ |
| hsa05162              | measles                                                                                 | 10  | $2.82 \times 10^{-6}$  | $3.49 \times 10^{-3}$ |
| hsa04932              | non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)                                               | 10  | $8.02 \times 10^{-6}$  | $9.94 \times 10^{-3}$ |
| hsa05321              | inflammatory bowel disease (IBD)                                                        | 9   | $9.27 \times 10^{-8}$  | $1.15 \times 10^{-4}$ |
| hsa05220              | chronic myeloid leukemia                                                                | 9   | $2.37 \times 10^{-7}$  | $2.93 \times 10^{-4}$ |
| hsa00980              | metabolism of xenobiotics by cytochrome P450                                            | 9   | $2.94 \times 10^{-7}$  | $3.64 \times 10^{-4}$ |
| hsa05215              | prostate cancer                                                                         | 9   | $1.13 \times 10^{-6}$  | $1.40 \times 10^{-3}$ |
| h_41BBPathway         | the 4-1BB-dependent immune response                                                     | 8   | $8.30 \times 10^{-8}$  | $1.01 \times 10^{-4}$ |
| hsa05221              | acute myeloid leukemia                                                                  | 8   | $6.27 \times 10^{-7}$  | $7.76 \times 10^{-4}$ |
| hsa05210              | colorectal cancer                                                                       | 8   | $1.27 \times 10^{-6}$  | $1.58 \times 10^{-3}$ |
| hsa04210              | apoptosis                                                                               | 8   | $1.27 \times 10^{-6}$  | $1.58 \times 10^{-3}$ |
| hsa05120              | epithelial cell signaling in helicobacter pylori infection                              | 8   | $2.17 \times 10^{-6}$  | $2.69 \times 10^{-3}$ |
| hsa04662              | B cell receptor signaling pathway                                                       | 8   | $2.66 \times 10^{-6}$  | $3.29 \times 10^{-3}$ |
| hsa05216              | thyroid cancer                                                                          | 7   | $1.87 \times 10^{-7}$  | $2.31 \times 10^{-4}$ |
| h_cdmacPathway        | cadmium induces DNA synthesis and proliferation in macrophages                          | 7   | $1.54 \times 10^{-6}$  | $1.87 \times 10^{-3}$ |
| hsa04913              | ovarian steroidogenesis                                                                 | 7   | $4.76 \times 10^{-6}$  | $5.90 \times 10^{-3}$ |

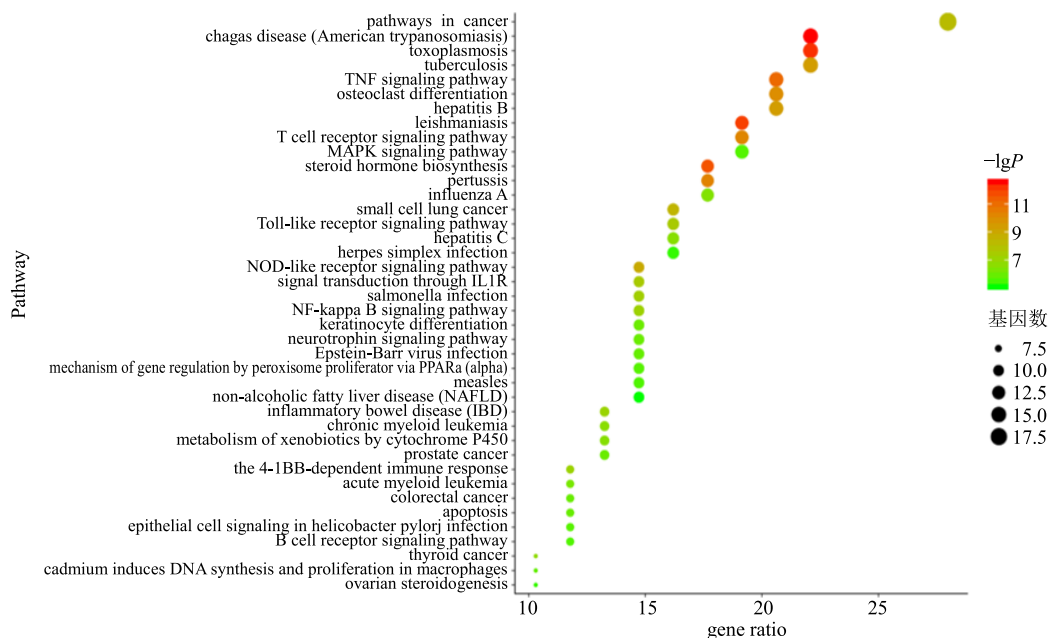


图 5 通路富集分析气泡图

Fig. 5 Bubble chart of pathway enrichment information

## 2.6 “药物-成分-靶点-通路”网络的构建

将药物、化合物、关键靶点和通路导入 Cytoscape 3.7.2 数据库中,构建“药物-成分-关键靶点-通路”网络,见图 6。该网络包括 198 个节点(2 个药物、88 个化合物、68 个靶点、40 条通路)和

1 030 条边。经网络拓扑学分析,化合物的平均度值为 6.8,高于该均值的化合物有 29 个;靶点的平均度值为 13.79,高于该均值的靶点有 20 个;通路的平均度值为 10.75,高于该均值的靶点有 17 个。结果见表 5。



**Fig. 6** “Herb-compound-target-pathway” network

何丽仙等<sup>[14]</sup>采用高效液相色谱法对芍药甘草汤合煎和分煎的提取物进行测定,发现芍药甘草汤合煎后无新成分产生,故在 TCMSP 数据库以芍药、甘

表 5 “药物-成分-靶点-通路”网络拓扑学参数

Table 5 Topology parameters of “herb-compound-target-pathway” network

| 名称                                                                                                        | 度值 | 类别 | 名称                                        | 度值 | 类别 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|----|-------------------------------------------|----|----|
| kaempferol                                                                                                | 62 | 成分 | PPARG                                     | 66 | 靶点 |
| quercetin                                                                                                 | 55 | 成分 | PTGS1                                     | 43 | 靶点 |
| naringenin                                                                                                | 16 | 成分 | RELA                                      | 41 | 靶点 |
| formononetin                                                                                              | 12 | 成分 | RXRA                                      | 34 | 靶点 |
| isorhamnetin                                                                                              | 12 | 成分 | JUN                                       | 30 | 靶点 |
| licochalcone A                                                                                            | 11 | 成分 | NFκBIA                                    | 29 | 靶点 |
| licoagrocarpin                                                                                            | 8  | 成分 | MAPK1                                     | 29 | 靶点 |
| 7-acetoxy-2-methylisoflavone                                                                              | 8  | 成分 | IκBKB                                     | 29 | 靶点 |
| 2-[(3 <i>R</i> )-8,8-dimethyl-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -pyrano[6,5- <i>f</i> ]chromen-3-yl]-5-methoxyphenol | 8  | 成分 | TNF                                       | 27 | 靶点 |
| 3'-methoxyglabridin                                                                                       | 8  | 成分 | MAPK3                                     | 27 | 靶点 |
| glabrone                                                                                                  | 8  | 成分 | CHUK                                      | 26 | 靶点 |
| shinpterocarpin                                                                                           | 8  | 成分 | ACHE                                      | 25 | 靶点 |
| glepidotin A                                                                                              | 8  | 成分 | IL-1β                                     | 18 | 靶点 |
| ( <i>E</i> )-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-(2,2-dimethylchromen-6-yl)prop-2-en-1-one                          | 8  | 成分 | BCL2                                      | 18 | 靶点 |
| glyasperin C                                                                                              | 8  | 成分 | IL-6                                      | 17 | 靶点 |
| 7-methoxy-2-methyl isoflavone                                                                             | 8  | 成分 | CASP3                                     | 17 | 靶点 |
| odoratin                                                                                                  | 7  | 成分 | TP53                                      | 15 | 靶点 |
| glyasperins M                                                                                             | 7  | 成分 | pathways in cancer                        | 19 | 通路 |
| quercetin der.                                                                                            | 7  | 成分 | tuberculosis                              | 15 | 通路 |
| 1-methoxyphaseollidin                                                                                     | 7  | 成分 | toxoplasmosis                             | 15 | 通路 |
| 4'-hydroxy-7-methoxy-isoflavone                                                                           | 7  | 成分 | chagas disease (American trypanosomiasis) | 15 | 通路 |
| glabrene                                                                                                  | 7  | 成分 | hepatitis B                               | 14 | 通路 |
| glabridin                                                                                                 | 7  | 成分 | osteoclast differentiation                | 14 | 通路 |
| licochalcone B                                                                                            | 7  | 成分 | TNF signaling pathway                     | 14 | 通路 |
| glypallichalcone                                                                                          | 7  | 成分 | MAPK signaling pathway                    | 13 | 通路 |
| phaseolinisoflavan                                                                                        | 7  | 成分 | T cell receptor signaling pathway         | 13 | 通路 |
| kanzonols W                                                                                               | 7  | 成分 | leishmaniasis                             | 13 | 通路 |
| vestitol                                                                                                  | 7  | 成分 | influenza A                               | 12 | 通路 |
| calycosin                                                                                                 | 7  | 成分 | pertussis                                 | 12 | 通路 |
| PTGS2                                                                                                     | 90 | 靶点 | steroid hormone biosynthesis              | 12 | 通路 |
| NOS2                                                                                                      | 75 | 靶点 | herpes simplex infection                  | 11 | 通路 |
| MAPK14                                                                                                    | 67 | 靶点 | hepatitis C                               | 11 | 通路 |
|                                                                                                           |    |    | Toll-like receptor signaling pathway      | 11 | 通路 |
|                                                                                                           |    |    | small cell lung cancer                    | 11 | 通路 |

草为关键词收集到的化学成分在一定程度上可代表芍药甘草汤全方所含化学成分。在“药物-成分-关键靶点-信号通路”网络中自由度较高的化学成分有山柰酚(kaempferol)、槲皮素(quercetin)、柚皮素(naringenin)、芒柄花黄素(formononetin)、异鼠李素(isorhamnetin)、甘草查耳酮 A(licochalcone A)等,这与芍药甘草汤化合物-靶点蛋白网络拓扑分析结果一致。山柰酚具有显著抗炎作用,可通过抑制丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)、磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphoinositide 3-kinases, PI3K)和 Janus 激酶/信号转导和转录激活(Janus kinase signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT)等信号通路的表达,减少炎症因子产生,从而有效抑制炎症的发生、发展<sup>[15-17]</sup>;可发挥雌性激素样作用,促进大鼠成骨细胞增殖和

分化,抑制骨吸收<sup>[18-19]</sup>;可抑制淋巴细胞的过度活化和增殖,对自身免疫性疾病有积极作用<sup>[20]</sup>。槲皮素可促进 RA 成纤维样滑膜细胞的凋亡<sup>[21]</sup>;沉默 Toll 样受体,抑制 p38 MAPK 蛋白表达,减少炎症因子表达<sup>[22-23]</sup>;还可抑制核因子-κB(nuclear factor-kappa-B, NF-κB)磷酸化,减弱 MMP 的产生、软骨细胞基质降解和细胞凋亡,从而有效改善 RA<sup>[24-25]</sup>。柚皮素、甘草查耳酮等成分均有抗炎、抗氧化、调节免疫作用,但关于其治疗 RA 的作用目前鲜见报道,可作为未来深入研究的方向。

结合网络拓扑学分析和相关文献报道,本研究预测 PTGS2、NOS2、MAPK14、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ(PPARG)、IL-6、TNF、IL-1β等为芍药甘草汤治疗 RA 的潜在关键作用靶点。TNF-α、IL-1β 和 IL-6 是典型的促炎因子,在 RA 的发生、发

展中发挥重要作用,目前针对 TNF- $\alpha$  的单克隆抗体如阿达木单抗、英夫利昔单抗,针对 IL-6 的单克隆抗体如托珠单抗和针对 IL-1 的抑制剂阿那白滞素已广泛应用于临床,成为治疗 RA 的强效药<sup>[26]</sup>。PTGS2 即环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2),是一种促炎症反应诱导酶,可介导花生四烯酸代谢产生前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2),进而刺激 MMPs 的产生,促进血管发生、软骨和骨的破坏,抑制 T 细胞凋亡<sup>[27]</sup>。在关节组织中,COX-2 蛋白的异常表达是 RA 的重要标志<sup>[28]</sup>。NOS2 在 RA 患者的滑膜和软骨中高表达,在炎症和免疫刺激下,可不依赖于 Ca<sup>2+</sup> 持续地催化产生一氧化氮,进而导致炎症、血管翳和关节破坏<sup>[29-30]</sup>。PPARG 激活后可有效抑制 RA 发作时的滑膜细胞增生、血管翳形成和单核细胞的渗出,同时可减少巨噬细胞生成 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  等细胞因子,在 RA 的治疗中具有重要的意义<sup>[31-32]</sup>。上述靶点在 RA 病程中均发挥着重要作用,通过药物干预这些靶点可治疗 RA。

通路富集分析结果表明,芍药甘草汤治疗 RA 的作用可能与干预 TNF 信号通路、破骨细胞分化、T 细胞受体信号通路、MAPK 信号通路、Toll 样受体信号通路等有关。TNF- $\alpha$  作为致病因子在 TNF 信号通路中参与正反馈调节,通过肿瘤坏死因子 1/2 型受体 (type 1 and type 2 tumor necrosis factor receptor, TNFR1/2) 调控细胞的增殖、分化和凋亡,还可激活下游 MAPKs 和 NF- $\kappa$ B 信号通路,进一步调控促炎因子如 IL-6、IL-1 $\beta$ 、MMP-1、MMP-3、COX-2 和抗凋亡蛋白的表达以发挥促炎作用<sup>[33-34]</sup>。本研究结果显示,芍药甘草汤中的活性成分可能通过作用于 PTGS2、半胱氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3, CASP3)、TNF、MAPK3、IL-6 等关键靶蛋白进一步对 TNF 信号通路进行调节,从而治疗 RA。MAPK 信号通路的激活可产生大量促炎性细胞因子和 MMP,促进滑膜细胞炎症反应;还可参与滑膜细胞增殖、破骨细胞分化等,导致滑膜增生和骨、软骨破坏。MAPK 信号通路参与了 RA 的关节炎症和组织破坏,与 RA 病理状态的维持及病情进展密切相关<sup>[35-36]</sup>。研究显示芍药甘草汤中的活性成分可能通过作用于肿瘤抑制蛋白基因 (tumor protein p53, Tp53)、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JUN)、MAPK1、CASP3、MAPK3、螺旋环螺旋结构域扩散激酶 (conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase, CHUK)、IL-1 $\beta$  等关键靶蛋白,靶向 MAPK

信号通路调控相关炎症因子的表达,降低关节炎症反应,从而治疗 RA。Toll 样受体信号通路在固有免疫与获得性免疫中均发挥重要作用。该通路的活化能够诱导抗原提呈细胞的成熟和增殖,激活树突状细胞,参与 Th1/Th2 分化、调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs) 活化、B 细胞的发育分化等,实现免疫功能的调节,并利用髓样分化因子 (myeloid differentiation factor 88, My D88) 依赖和非依赖两种方式,激活 NF- $\kappa$ B 或 MAPK 信号通路,活化下游转录因子,进而上调 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  等炎症细胞因子的表达,介导炎症的发生<sup>[37-38]</sup>。本研究表明,芍药甘草汤中的活性成分可能通过作用于 JUN、NF- $\kappa$ B 抑制蛋白激酶 (IkappaB kinase beta, IkBKB)、核因子- $\kappa$ B 抑制蛋白- $\alpha$  (nuclear factor-kappa-B inhibitor- $\alpha$ , NFkBIA)、MAPK1、TNF、MAPK3、IL-6、CHUK 等关键靶蛋白,进而影响 Toll 样受体信号通路,发挥免疫调节功能。RA 的发生与发展与上述通路密切相关,通路富集结果也表明各通路中均有芍药甘草汤活性成分作用的关键靶点的存在,各通路在 RA 治疗中发挥着复杂的相互作用,提示这些通路可作为后续研究的方向。

综上所述,芍药甘草汤可能是通过作用于 PTGS2、NOS2、MAPK14、PPARG 等多个靶点,调节 TNF 信号通路、破骨细胞分化、MAPK 信号通路、Toll 样受体信号通路等通路,从而调控细胞凋亡、抑制炎症反应、调节免疫功能以治疗 RA。本研究表明,芍药甘草汤治疗 RA 呈现出多成分、多靶点、多通路协同作用优势,为进一步的实验研究和临床应用提供思路和参考依据。

#### 参考文献

- [1] 中华医学会风湿病学分会. 2018 中国类风湿关节炎诊疗指南 [J]. 中华内科杂志, 2018, 57(4): 242-251.
- [2] Jin S Y, Li M T, Fang Y F, et al. Chinese registry of rheumatoid arthritis (CREDIT): II. prevalence and risk factors of major comorbidities in Chinese patients with rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, 19(1): 251.
- [3] 卜祥伟, 张红红, 张建萍, 等. 类风湿关节炎的中医药研究进展 [J]. 环球中医药, 2019, 12(2): 297-303.
- [4] 陈秋颖, 陈永灿. 仲景方中药药与甘草配伍的涵义探讨 [J]. 湖北中医药大学学报, 2016, 18(2): 56-57.
- [5] 李 斌, 唐今扬, 周彩云, 等. 房定亚运用芍药甘草汤治疗风湿性疾病经验 [J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(11): 100-101.
- [6] 隋 峰, 李兰芳, 李 珊, 等. 转化理念指导下的芍药甘草汤抗炎止痛实验研究 [J]. 世界科学技术—中医药

- 现代化, 2011, 13(1): 197-201.
- [7] Hopkins A L. Network pharmacology [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(10): 1110-1111.
- [8] 何小娟, 李健, 陈昊, 等. 基于病证结合的中药网络药理学研究与新药研发策略 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(11): 1271-1273.
- [9] 谢小倩, 王亚乐, 罗沙沙, 等. 类风湿性关节炎发病机制研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(71): 109-111.
- [10] Haraoui B. Assessment and management of rheumatoid arthritis [J]. *J Rheumatol*, 2009, 82: 2-10.
- [11] 李从越, 隋峰, 霍海如, 等. TRPV1 通道蛋白介导的芍药甘草汤止痛配伍机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2013, 29(3): 2-5.
- [12] 刘文辉. 芍药甘草汤对小鼠免疫功能影响的实验研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2010.
- [13] 石学魁, 王雅贤, 张晓莉, 等. 芍药甘草汤免疫学研究 [J]. 牡丹江医学院学报, 2006, 27(2): 18-20.
- [14] 何丽仙, 黄忠京, 谭倪, 等. HPLC 研究芍药甘草汤合煎与分煎的化学成分变化 [J]. 云南师范大学学报: 自然科学版, 2009, 29(6): 32-35.
- [15] Devi K P, Malar D S, Nabavi S F, *et al.* Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine [J]. *Pharmacol Res*, 2015, 99: 1-10.
- [16] Huang C H, Jan R L, Kuo C H, *et al.* Natural flavone kaempferol suppresses chemokines expression in human monocyte THP-1 cells through MAPK pathways [J]. *J Food Sci*, 2010, 75(8): H254-H259.
- [17] Tang X L, Liu J X, Dong W, *et al.* Protective effect of kaempferol on LPS plus ATP-induced inflammatory response in cardiac fibroblasts [J]. *Inflammation*, 2015, 38(1): 94-101.
- [18] 王建华, 郑丽, 冀国荣, 等. 山柰酚对大鼠成骨细胞增殖与分化的影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(6): 997-999.
- [19] 丁淑琴, 杨风琴, 张玮, 等. 山柰酚治疗去卵巢大鼠骨质疏松的实验研究 [J]. 中国新药杂志, 2014, 23(24): 2925-2929.
- [20] 慕静静. 山柰酚对小鼠免疫功能的影响及对海仁酸致痢小鼠的免疫调节作用 [D]. 广州: 暨南大学, 2010.
- [21] 肖鹏. 槲皮素对人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡及其机制的研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2013.
- [22] Byun E B, Yang M S, Choi H G, *et al.* Quercetin negatively regulates TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide through Tollip expression [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2013, 431(4): 698-705.
- [23] 程丽艳, 屠凌岚, 史红. p38MAPK 对慢性前列腺炎疼痛的影响及槲皮素的干预作用 [J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(8): 984-988.
- [24] Kawaguchi K, Kaneko M, Miyake R, *et al.* Potent inhibitory effects of quercetin on inflammatory responses of collagen-induced arthritis in mice [J]. *Endocr Metab Immune*, 2019, 19(3): 308-315.
- [25] 王友庆, 陈士芳, 梅珏. 槲皮素通过抑制 NF- $\kappa$ B 减弱类风湿关节炎大鼠软骨细胞基质降解和细胞凋亡 [J]. 免疫学杂志, 2019, 35(6): 485-491.
- [26] 王静, 赵庆杰, 卓小斌, 等. 类风湿性关节炎的治疗药物研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2019, 37(6): 485-490.
- [27] Smith W L, DeWitt D L, Garavito R M. Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology [J]. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69: 145-182.
- [28] Kang R Y, Freire-Moar J, Sigal E, *et al.* Expression of cyclooxygenase-2 in human and an animal model of rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology*, 1996, 35(8): 711-718.
- [29] 孙世学, 李运曼. NO 在类风湿性关节炎中的作用及相关药物研究进展 [J]. 药学与临床研究, 2007, 15(3): 175-178.
- [30] Kroncke K D, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human disease [J]. *Clin Exp Immunol*, 1998, 113(2): 147-156.
- [31] Kawahito Y, Kondo M, Tsubouchi Y, *et al.* 15-deoxy- $\delta$ 12, 14-PGJ2 induces synovial cell apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats [J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(2): 189-197.
- [32] 陈彩娥. 过氧化物酶增殖体激活受体  $\gamma$  与类风湿性关节炎的关系 [J]. 医学综述, 2012, 18(6): 808-810.
- [33] Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes [J]. *Cell*, 2003, 114(2): 181-190.
- [34] 王洁, 卞莹莹, 张川, 等. 肿瘤坏死因子及其受体在类风湿性关节炎中的研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2017, 35(4): 289-293.
- [35] Thalhamer T, McGrath M A, Hammett M M. MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation [J]. *Rheumatology*, 2007, 47(4): 409-414.
- [36] Li N, Xu Q, Liu Q P, *et al.* Leonurine attenuates fibroblast-like synovial cell-mediated synovial inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology*, 2017, 56(8): 1417-1427.
- [37] 晋小荣, 朱苗苗, 高永翔, 等. Toll 样受体介导信号通路与类风湿关节炎关系的研究进展 [J]. 湖南中医杂志, 2017, 33(10): 193-195.
- [38] Pasare C. Toll pathway-dependent blockade of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cell-mediated suppression by dendritic cells [J]. *Science*, 2003, 299(5609): 1033-1036.