

• 数据挖掘与循证医学 •

基于单细胞转录组探讨新型冠状病毒感染后慢性疲劳综合征与炎症反应、氧化应激、细胞凋亡之间分子机制及其潜在干预中药预测

黎祖鸣¹, 封杰妮¹, 陈雪如¹, 卢月², 黄涛亮², 李际强², 杨荣源^{2,3,4}, 陈剑坤^{2*}, 刘云涛^{2,3,4*}

1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广东 广州 510405

2. 广州中医药大学第二附属医院(广东省中医院), 广东 广州 510120

3. 中医证候全国重点实验室, 广东 广州 510120

4. 广东省中医急症研究重点实验室, 广东 广州 510120

摘要: **目的** 通过分析新型冠状病毒感染后(简称“新冠后”)慢性疲劳综合征(chronic fatigue syndrome, CFS)患者与正常受试者的单细胞转录组数据,探讨新冠后 CFS 与炎症反应、氧化应激和细胞凋亡之间的分子机制,并预测调控关键基因的潜在中药,为治疗新冠后 CFS 提供理论支持。**方法** 使用 R 语言 4.2.1 中的“Seurat”包处理新冠后 CFS 患者与正常受试者的外周血单细胞测序数据,“CellChat”包进行细胞通讯分析,“scMetabolism”包评估细胞代谢特征,综合 5 种算法(AddModuleScore、AUCell、UCell、singscore 和 ssGSEA)计算新冠后 CFS 患者与正常受试者中 5 种免疫细胞炎症反应、氧化应激和细胞凋亡评分,并比较两者间的差异。使用“scCODE”包鉴定各类免疫细胞在正常受试者与新冠后 CFS 患者之间的差异表达(differential expression, DE)基因。Upset 图分析得到新冠后 CFS 炎症反应相关基因(inflammatory response related genes, IRGs)、氧化应激相关基因(oxidative stress related genes, OSRGs)和细胞凋亡相关基因(apoptosis related genes, ARGs)。使用“ClusterProfiler”包分别对 IRGs、OSRGs、ARGs 进行基因本体生物学过程(gene ontology biological process, GOBP)富集分析。基于 STRING 数据库及 Cytoscape 软件构建“IRGs-OSRGs-ARGs”分子交互复杂网络,使用 cytoHubba 插件筛选关键基因。利用 COREMINE 数据库预测调控关键基因的中药,并通过古今医案云平台统计中药的性味归经、药物功效分类。**结果** 共鉴定出 5 种免疫细胞,分别为 B 细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、NK 细胞和单核细胞。相比于正常受试者,新冠后 CFS 患者的细胞通讯更为丰富且强度更大,两者之间并无明显差异的细胞代谢特征。新冠后 CFS 患者中各类免疫细胞的炎症反应、氧化应激和细胞凋亡评分普遍高于正常受试者。共得到 33 个 IRGs、17 个 OSRGs 和 54 个 ARGs。“IRGs-OSRGs-ARGs”分子交互网络显示,IRGs、OSRGs 和 ARGs 之间存在密切联系,最后鉴定出 8 个关键基因。干预中药药性以寒为主,温、平次之;药味以苦、辛、甘为主;归经以肝、脾、肺为主;功效分类以补虚药(甘草、人参等)、清热药(黄芩、鱼腥草等)、活血化瘀药(郁金、丹参等)为主。**结论** 新冠后 CFS 患者存在异常的炎症反应、氧化应激和细胞凋亡状态,且三者之间密切关联。8 个关键基因(TNF、BCL2、CTNNA1、CXCL8、IFNG、HIF1A、MCL1、CYCS)可能是新冠后 CFS 的潜在治疗靶标。临床治疗新冠后 CFS 应注重补虚药、清热药及活血化瘀等药物的配伍使用。

关键词: 新型冠状病毒感染;慢性疲劳综合征;单细胞转录组;炎症反应;氧化应激;细胞凋亡;甘草;人参;黄芩;鱼腥草;郁金;丹参

中图分类号: R285

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)11-3774-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.11.020

收稿日期: 2024-01-10

基金项目: 国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目(ZYYCXTD-D-202203);国家中医药管理局项目(2023ZYLCYJ02-21);广东省重点领域研发计划项目(2023B1111020003);广东省中医院重点实验室专项(JZ2020ZZ01, YN2023JZ02, KF2023JZ06);广州市科技局市校联合资助项目—广州市中西医结合防治新发突发传染病重点实验室(202201020382);中华中医药学会临床研究项目(2023DEPLHGG-06);广东省中医院朝阳人才科研专项资助(ZY2022KY10, ZY2022YL04)

作者简介: 黎祖鸣, 本科, 从事中医药防治呼吸系统疾病研究。E-mail: gzylizuming@126.com

***通信作者:** 刘云涛, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 从事中医药防治感染性疾病的临床与基础研究。E-mail: lyt12600@126.com
陈剑坤, 硕士, 副主任医师, 从事中医药防治呼吸系统疾病的临床与基础研究。E-mail: chenjiankunductor@126.com

Exploration on molecular mechanisms between chronic fatigue syndrome after COVID-19 and inflammatory response, oxidative stress and apoptosis based on single cell transcriptome and prediction of potential intervention in traditional Chinese medicine

LI Zuming¹, FENG Jieni¹, CHEN Xueru¹, LU Yue², HUANG Taoliang², LI Jiqiang², YANG Rongyuan^{2, 3, 4}, CHEN Jiankun², LIU Yuntao^{2, 3, 4}

1. The Second Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

2. The Second Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine (Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine), Guangzhou 510120, China

3. National Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Syndrome, Guangzhou 510120, China

4. Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Emergency Research, Guangzhou 510120, China

Abstract: Objective To explore the molecular mechanism between chronic fatigue syndrome (CFS) after coronavirus disease 2019 (COVID-19) and inflammatory response, oxidative stress, apoptosis by analyzing the single cell transcriptome data of patients with CFS after COVID-19 and normal subjects, and predict potential traditional Chinese medicines that regulate key genes, providing theoretical support for the treatment of CFS after COVID-19. **Methods** The “Seurat” package in R language 4.2.1 was used to process peripheral blood single cell sequencing data of CFS after COVID-19 patients and normal subjects; the “CellChat” package was used to analyze cell communication; and the “scMetabolism” package was used to evaluate cell metabolic characteristics. Five algorithms (AddModuleScore, AUCell, UCell, singscore and ssGSEA) were synthesized to calculate the inflammatory response, oxidative stress, apoptosis scores of five immune cells in CFS after COVID-19 patients and normal subjects, and the differences between them were compared. The “scCODE” package was used to identify differentially expressed (DE) genes between normal subjects and CFS after COVID-19 patients in various types of immune cells. Upset plot analysis showed that inflammatory response related genes (IRGs), oxidative stress related genes (OSRGs) and apoptosis related genes (ARGs) were involved in CFS after COVID-19. “ClusterProfiler” package was used to perform gene ontology biological process (GOBP) enrichment analysis on IRGs, OSRGs and ARGs respectively. STRING database and Cytoscape software were used to construct “IRGs-OSRGs-ARGs” molecular interaction complex network diagram. The cytoHubba plug-in was used to screen for key genes. COREMINE database was used to predict traditional Chinese medicine regulating key genes, and *qi*, flavours, meridian affinity, and drug efficacy classification were counted through the cloud platform of ancient and modern medical records. **Results** Five types of immune cells were identified, including B cells, CD4⁺T cells, CD8⁺T cells, NK cells, and monocytes. Cell-to-cell communication was richer and more intense in CFS after COVID-19 patients than in normal subjects, and there were no significant differences in cellular metabolic characteristics between the two groups. The scores of inflammatory response, oxidative stress, apoptosis of immune cells in CFS after COVID-19 patients were generally higher than those in normal subjects. A total of 33 IRGs, 17 OSRGs and 54 ARGs were obtained. “IRGs-OSRGs-ARGs” molecular interaction network showed that IRGs, OSRGs and ARGs were closely related, and finally eight key genes were identified. The *qi* of the intervention traditional Chinese medicines is primarily cold, followed by warm and neutral. The flavors were mainly bitter, pungent and sweet. Liver, spleen, and lung channels were the main channels. The main efficacy categories were deficiency tonifying drugs [Gancao (*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*), Renshen (*Ginseng Radix et Rhizoma*), etc.], heat-clearing drugs [Huangqin (*Scutellariae Radix*), Yuxingcao (*Houttuyniae Herba*), etc.], blood-activating and stasis-removing drugs [Yujin (*Curcuma Radix*), Danshen (*Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*), etc.]. **Conclusion** CFS after COVID-19 patients had abnormal inflammatory response, oxidative stress, apoptosis and the three were closely related. A total of eight key genes (*TNF*, *BCL2*, *CTNBN1*, *CXCL8*, *IFNG*, *HIF1A*, *MCL1*, *CYCS*) may be potential therapeutic targets for CFS after COVID-19. In clinical treatment of CFS after COVID-19, attention should be paid to the compatibility of tonifying drugs, heat-clearing drugs and blood-activating and stasis-removing drugs.

Key words: coronavirus disease 2019; chronic fatigue syndrome; single cell transcriptome; inflammatory response; oxidative stress; apoptosis; *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; *Ginseng Radix et Rhizoma*; *Scutellariae Radix*; *Houttuyniae Herba*; *Curcuma Radix*; *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*

越来越多的证据表明新型冠状病毒感染 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 可导致肺部

和广泛肺外器官系统的后遗症, 包括心血管、神经和心理健康、代谢障碍、肾脏和消化系统疾病等^[1],

被称为 COVID-19 后综合征 (post-COVID-19 syndrome, PCS)。疲劳、呼吸困难和认知障碍是典型的 PCS 症状, 其中最主要的是疲劳无力^[2]。这种疲劳自 COVID-19 发病起持续数月, 并伴有劳后不适和认知功能障碍, 是典型的慢性疲劳综合征 (chronic fatigue syndrome, CFS) 症状^[3]。目前研究表明, 新型冠状病毒感染后 (简称“新冠后”) CFS 与炎症状态、氧化应激、细胞凋亡等密切相关^[3-6], 但其潜在分子机制尚不清楚。阐明新冠后 CFS 的潜在病理机制有助于提高新冠后 CFS 管理水平和改善治疗手段。此外, 由于目前尚缺乏治疗 PCS 的特效药物, 治疗上主要以对症及康复治疗为主, PCS 的治疗是全球医学界所面临的 1 项热点及难点问题^[7]。在疫情防控中, 中西医结合、中西药并用方案已为全球抗疫贡献了中国力量, 中医药在 COVID-19 患者的康复中依然具有独特的优势。“既病防变”“瘥后防复”是中医在疫病防控方面的关键环节, 中医药扶正祛邪兼顾, 对治疗 COVID-19 恢复期后遗症具有独特优势^[8-9]。因此, 研究中医药对 COVID-19 恢复期促康复措施, 发挥传统中医药在后疫情时代的优势具有重要意义。

单细胞转录组测序 (single cell RNA sequencing, scRNA-seq) 是在单细胞水平对转录组进行测序的新技术, 用于研究单个细胞内的基因表达情况, 有助于揭示疾病发生和进展所涉及的复杂异质机制^[10]。因此, 本研究通过分析新冠后 CFS 患者和正常受试者的外周血单细胞转录组数据, 深入探讨新冠后疲劳与炎症反应、氧化应激和细胞凋亡之间的潜在分子机制, 并预测关键基因的潜在调控中药, 为新冠后 CFS 的临床管理和中医药治疗提供理论支持。

1 资料与方法

1.1 数据来源与预处理

在 Arrayexpress (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) 数据库中检索 PCS 相关数据集, 最后从 E-MTAB-10129^[11]数据集中得到 6 个新冠后 CFS 患者 (LC) 和 6 个健康受试者 (CT) 的外周血单细胞测序数据。6 个 LC 样品是感染新型冠状病毒患者出现初始症状康复后 2~3 个月的外周血单细胞测序样品, 且根据 Su 等^[11]提供的数据信息显示, 该 6 个患者除了有疲劳症状外, 无其他新冠后遗症记录。纳入研究样本的基本信息见表 1。使用 R 语言 4.2.1 中的“Seurat”^[12]包对单细胞测序数据进行处理, 保留线粒体基因含量低于 10% 的细胞, 并且

表 1 纳入研究样本的基本信息

Table 1 Basic information of samples in included study

组别	ID	性别	年龄/岁	基础疾病
LC	LC1	男	57	高血压
LC	LC2	女	82	哮喘、癌症、慢性阻塞性肺病
LC	LC3	男	23	/
LC	LC4	男	69	癌症
LC	LC5	女	49	/
LC	LC6	女	49	/
CT	CT1	女	35	/
CT	CT2	男	79	/
CT	CT3	男	28	/
CT	CT4	女	52	/
CT	CT5	女	36	/
CT	CT6	男	39	/

每个细胞检测到的基因 < 2 500 个。使用“Harmony”包消除 12 个样本的批次效应。使用“FindNeighbors”和“FindClusters”函数构建细胞簇, 并使用均匀流形逼近和投影图 (uniform manifold approximation and projection, UMAP) 对其进行可视化。通过“singleR”包及人工校正的方式对细胞簇进行注释。

1.2 细胞通讯和细胞代谢分析

使用“CellChat”^[13]包分别在 CT 组和 LC 组中进行细胞通讯分析, CellChatDB.huma 作为配体-受体相互作用参考数据库。 $P < 0.05$ 被认为对细胞-细胞相互作用具有统计学意义。计算簇中平均受体表达水平和相互作用簇中平均配体表达水平, 使用点图来说明配体-受体相互作用的平均值之间的差异。同时, 在单细胞水平上使用“scMetabolism”包^[14]评估细胞的代谢特征。“scMetabolism”包可在单细胞水平量化代谢, 该包以常规单细胞矩阵文件为基础, 采用 VISION 算法对每个细胞进行评分, 从而得到细胞在每条代谢通路中的活性得分^[14]。

1.3 免疫细胞炎症反应、氧化应激和细胞凋亡评分

从标志性基因集 (Hallmark gene set) 数据库中的“HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE”基因集得到 200 个炎症反应相关基因。从京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 中的“KEGG_APOPTOSIS”基因集、标志性基因集 (Hallmark gene set) 数据库中的“HALLMARK_APOPTOSIS”基因集和 Reactome 生物通路知识库中的“REACTOME_APOPTOSIS”基

因集中共得到 359 个细胞凋亡相关基因。在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 数据集中分别以 “oxidative stress” 为关键词检索得到氧化应激相关基因, 以相关性评分 (relevance score) 大于 20 作为筛选标准, 最后得到 158 个氧化应激相关基因。综合 5 种算法 (“Seurat”^[12]包的 AddModuleScore 函数、AUCell^[15]、UCell^[16]、singscore^[17]和 ssGSEA^[18]), 评估 CT 组和 LC 组中免疫细胞炎症反应、氧化应激、细胞凋亡评分, 并比较两组间的差异。

1.4 不同细胞类型的差异表达基因

使用 Zou 等^[19]提供的 “scCODEv1.0.0.0” 包鉴定 5 种免疫细胞在正常受试者和新冠后 CFS 患者之间的差异表达 (differential expression, DE) 基因。使用 “scCODE” 包通过一系列测试方法检查所选 DE 基因的准确性, 提高单细胞 DE 基因分析的可靠性^[19-20]。因此, 通过校正后的 $P < 0.05$ 和 $\log_2FC > 0.585$ 的筛选标准, 获得新冠后 CFS 患者中 5 种免疫细胞的上调基因, 且至少通过 3 种测试方法分析 DE 基因。

1.5 新冠后 CFS 炎症反应、氧化应激和细胞凋亡相关基因的鉴定及功能富集分析

将 LC 组中 5 种免疫细胞的上调基因与炎症反应、氧化应激、细胞凋亡相关基因取交集, 分别得到新冠后 CFS 炎症反应相关基因 (inflammatory response related genes, IRGs)、氧化应激相关基因 (oxidative stress related genes, OSRGs) 和细胞凋亡相关基因 (apoptosis related genes, ARGs)。为了探讨 IRGs、OSRGs 和 ARGs 参与的生物过程, 使用 “ClusterProfiler” 包分别对 IRGs、OSRGs、ARGs 进行基因本体论生物过程 (gene ontology biological process, GOBP) 富集分析。

1.6 “炎症反应-氧化应激-细胞凋亡” 分子交互网络的构建及关键基因的鉴定

将 IRGs、OSRGs、ARGs 导入 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>), 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 以置信度 0.40 为筛选标准, 使用 Cytoscape (version: 3.7.1, <https://cytoscape.org>) 软件进行可视化。使用 cytoHubba 插件筛选关键 “炎症反应-氧化应激-细胞凋亡” 相关基因, 分别按连接度 (degree)、紧密中心性 (closeness)、边缘渗透组件 (edge percolated component, EPC) 和最大团中心性 (maximum clique centrality, MCC) 对 PPI 网络中的基因进行排序, 排名前 10 的重叠基因被确定为关键基因。进一步分析关键基因在免疫细胞中的表达情况。

1.7 干预中药的预测分析

将关键基因提交至 COREMINE 数据库 (<https://www.coremine.com/>) 中, 以 $P < 0.01$ 为筛选标准寻找其潜在干预中药。随后, 将筛选得到的关键基因对应的中药输入古今医案云平台 (<https://www.yiankb.com/>), 再分别加入分析池中进行中药性味归经的频数统计, 最后参照《中药学》的中药分类目录对药物功效类别进行统计分析。

2 结果

2.1 正常受试者和新冠后 CFS 患者的单细胞图谱

质量控制后, 最终选择 19 025 个细胞用于后续分析。通过 UMAP 算法对细胞进行聚类得到 15 个细胞簇。进一步通过 “singleR” 包及人工注释将 15 个细胞簇分为 5 种细胞类型: B 细胞、CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞和单核细胞, 见图 1。

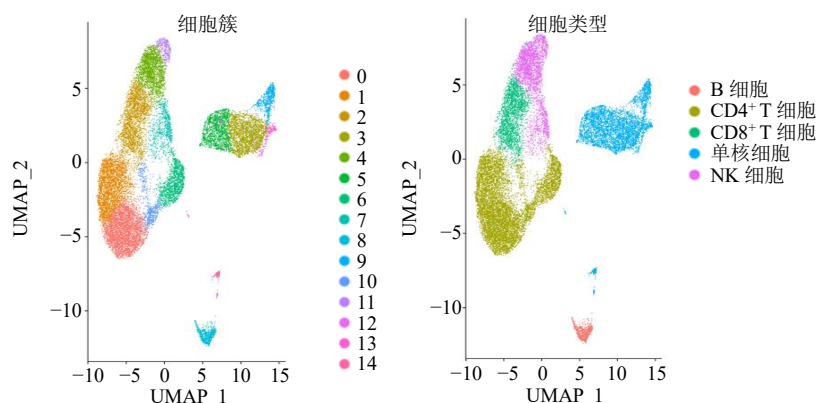


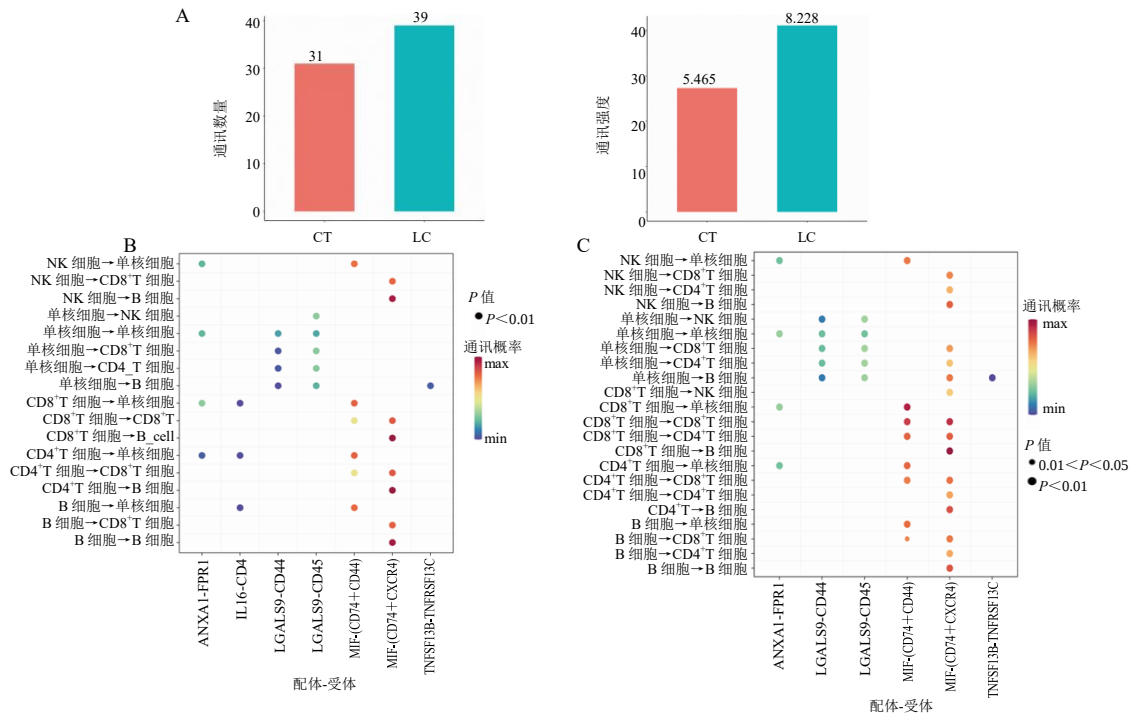
图 1 新冠后 CFS 患者和正常受试者之间所有细胞数据完成细胞群注释后细胞分布的 UMAP 散点图

Fig. 1 UMAP scatter plot of cell distribution after cell population annotation of all cell data between CFS after COVID-19 patients and normal subjects

2.2 细胞通讯及细胞代谢分析

细胞通讯结果显示,相比于 CT 组, LC 组的细胞通讯更为丰富,且强度更大,见图 2。在 LC 组中,免疫细胞通过 MIF-(CD74 + CD44)、MIF-(CD74 +

CXCR4)、LGALS9-CD44/CD45 等配体-受体复合体进行细胞通讯的频率和强度显著提高。细胞代谢结果显示,CT 组和 LC 组之间并无明显差异的细胞代谢特征,见图 3。



A-左图展示了 CT 组与 LC 组之间细胞通讯数量的差异,右图展示了 CT 组与 LC 组之间细胞通讯强度的差异; B-CT 组中的细胞通讯分析; C-LC 组中的细胞通讯分析。

A-left figure shows the difference in the number of cell-to-cell communication between the CT group and LC group, and right figure shows the difference in the strength of cell communication between the CT group and LC group; B-cell-to-cell communication analysis in CT group; C-cell-to-cell communication analysis in LC group.

图 2 细胞通讯分析

Fig. 2 Analysis of cell-to-cell communication

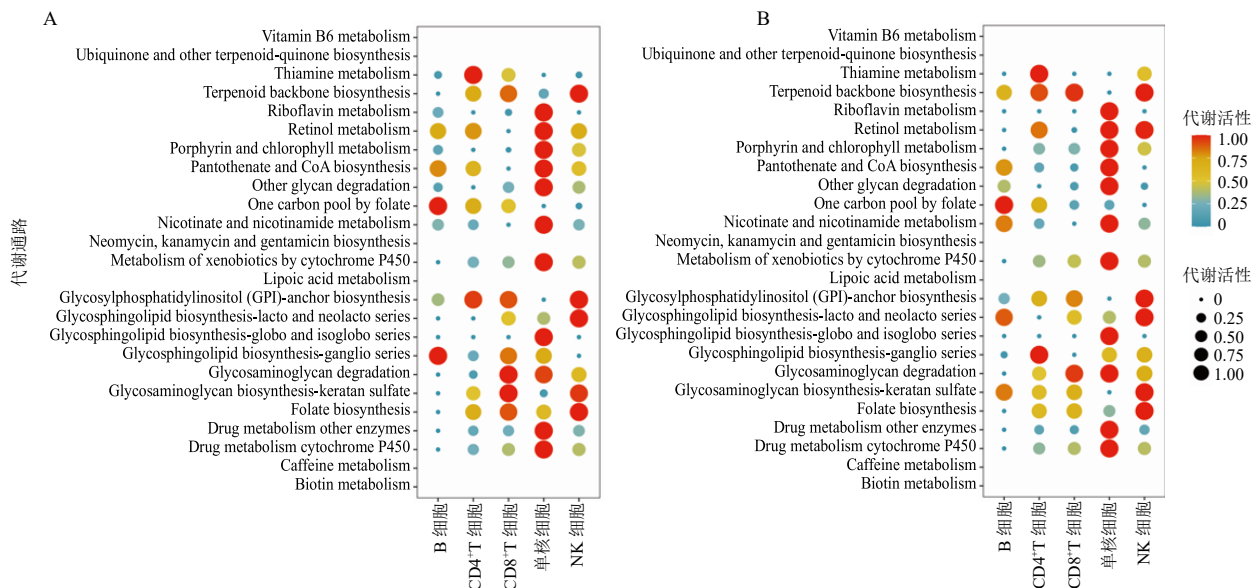


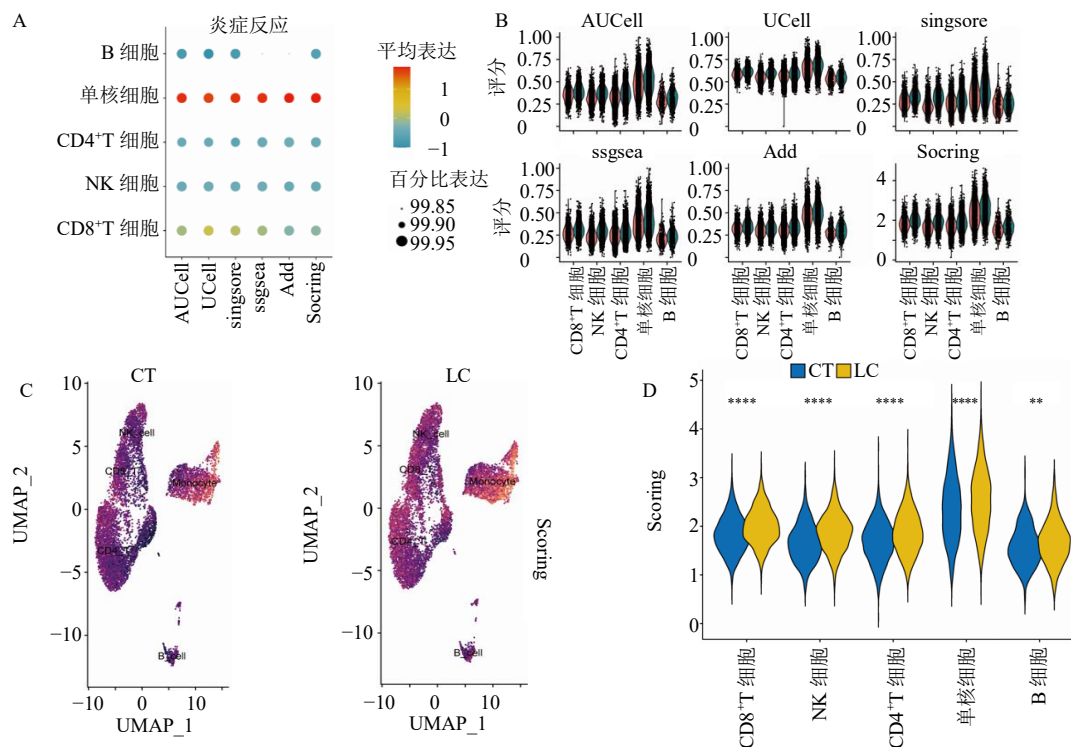
图 3 CT 组 (A) 和 LC 组 (B) 中的细胞代谢分析

Fig. 3 Cellular metabolic analysis in CT group (A) and LC group (B)

2.3 各类免疫细胞炎症反应、氧化应激、细胞凋亡评分

综合 5 种算法, 计算了 CT 组和 LC 组中免疫细胞炎症反应、氧化应激、细胞凋亡评分并对其进行比较。结果显示, LC 组中 5 种免疫细胞的炎症反应评

分均高于 CT 组, 见图 4。LC 组中 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、NK 细胞和单核细胞的氧化应激评分均高于 CT 组, 见图 5。LC 组中 5 种免疫细胞的细胞凋亡评分均高于 CT 组, 见图 6。



气泡图 (A) 和小提琴图 (B) 展示 5 种算法评估各类免疫细胞的炎症反应水平; UMAP 图 (C) 和小提琴图 (D) 比较 CT 组与 LC 组之间的炎症反应水平; Soering 表示 5 种算法评分总和; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ **** $P < 0.0001$, 下同。

Bubble plot (A) and violin plot (B) show the inflammatory response levels of five algorithms for evaluating various immune cells; UMAP plot (C) and violin plot (D) compare the inflammatory response levels between CT group and LC group; Soering: sum of five algorithm scores; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ **** $P < 0.0001$, same as below.

图 4 炎症反应评分比较

Fig. 4 Comparison of inflammatory response scores

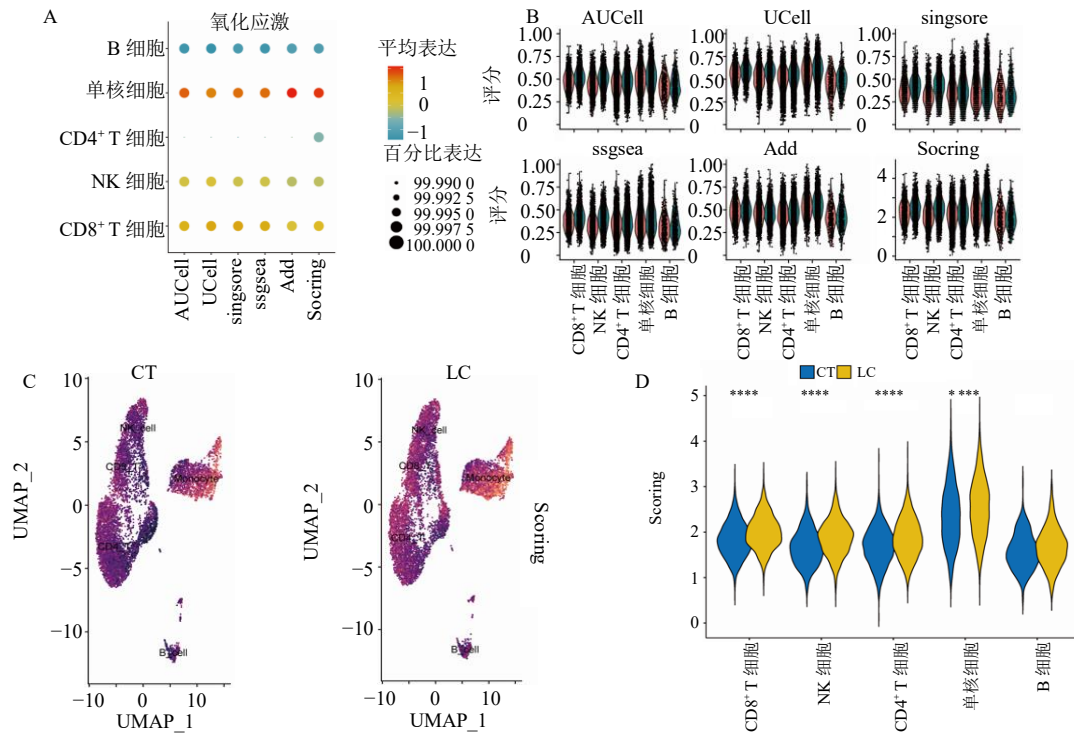
2.4 IRGs、OSRGs、ARGs 的鉴定及功能富集分析

获得了 LC 组中 5 种免疫细胞的上调基因, 其中 B 细胞 13 个、CD4⁺T 细胞 281 个、CD8⁺T 细胞 511 个、NK 细胞 819 个、单核细胞 247 个。将上述 5 种免疫细胞的上调基因分别与炎症反应、氧化应激、细胞凋亡相关基因取交集, 并取交集之和, 最后得到新冠后 CFS 的 IRGs 33 个、OSRGs 17 个、ARGs 54 个, 交集情况用 Upset 图展示, 见图 7。GOBP 富集分析结果显示, IRGs 主要富集在响应于脂多糖、防御反应的正调节、淋巴细胞增殖、单核细胞增殖、白细胞间黏附、Janus 激酶-信号转导和转录激活因子 (Janus kinase-signal transducers and activators of transcription, JAK-STAT) 受体信号通路、趋化因子介导的信号通路、适应性免疫应答的调节、趋化因子反应等生物过程; OSRGs 主要富集在细胞化学应激反应、响应于氧

化应激、氧化应激细胞反应、细胞外刺激反应、响应于低氧、响应放射线、氧化应激引起的细胞死亡、对肿瘤坏死因子的反应、温度刺激反应等生物过程; ARGs 主要富集在凋亡信号通路调控、外源性凋亡信号通路、坏死性下垂过程、程序性坏死细胞死亡、凋亡过程中半胱氨酸型内肽酶活性的调节、氧化应激引起的细胞死亡、坏死性细胞死亡、氧化应激诱导细胞死亡的调节、内源性凋亡信号通路、神经元凋亡过程等生物过程, 见图 8。

2.5 “炎症反应-氧化应激-细胞凋亡”分子交互网络的构建

通过 STRING 数据库及 Cytoscape 软件, 构建“炎症反应-氧化应激-细胞凋亡 (IRGs-OSRGs-ARGs)”分子交互复杂网络, 由图 9 可见, IRGs、OSRGs、ARGs 之间存在密切联系。

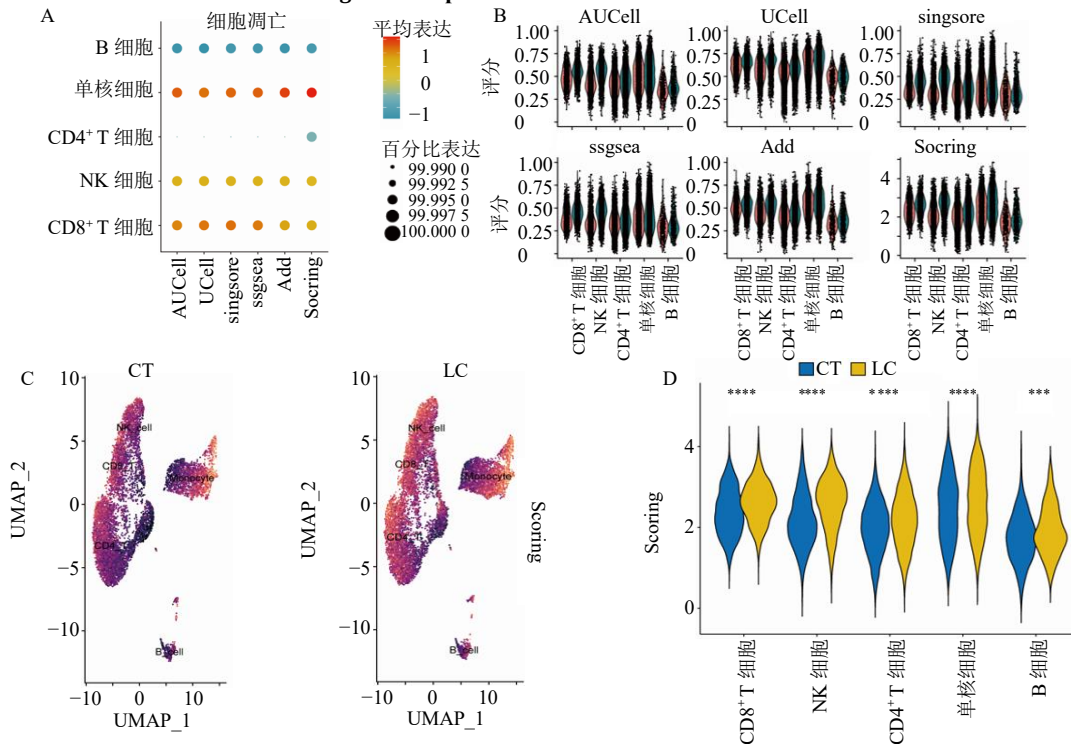


气泡图 (A) 和小提琴图 (B) 展示 5 种算法评估各类免疫细胞的氧化应激水平; UMP 图 (C) 和小提琴图 (D) 比较 CT 组与 LC 组之间的氧化应激水平。

Bubble plot (A) and violin plot (B) show five algorithms to assess oxidative stress levels of various immune cells; UMP plot (C) and violin plot (D) compare oxidative stress levels between CT group and LC group.

图 5 氧化应激评分比较

Fig. 5 Comparison of oxidative stress scores



气泡图 (A) 和小提琴图 (B) 展示 5 种算法评估各类免疫细胞的细胞凋亡水平; UMP 图 (C) 和小提琴图 (D) 比较 CT 组与 LC 组之间的细胞凋亡水平。

Bubble plot (A) and violin plot (B) show the apoptosis levels of various immune cells assessed by five algorithms; UMP plot (C) and violin plot (D) compare the apoptosis levels between CT group and LC group.

图 6 细胞凋亡评分比较

Fig. 6 Comparison of apoptosis scores

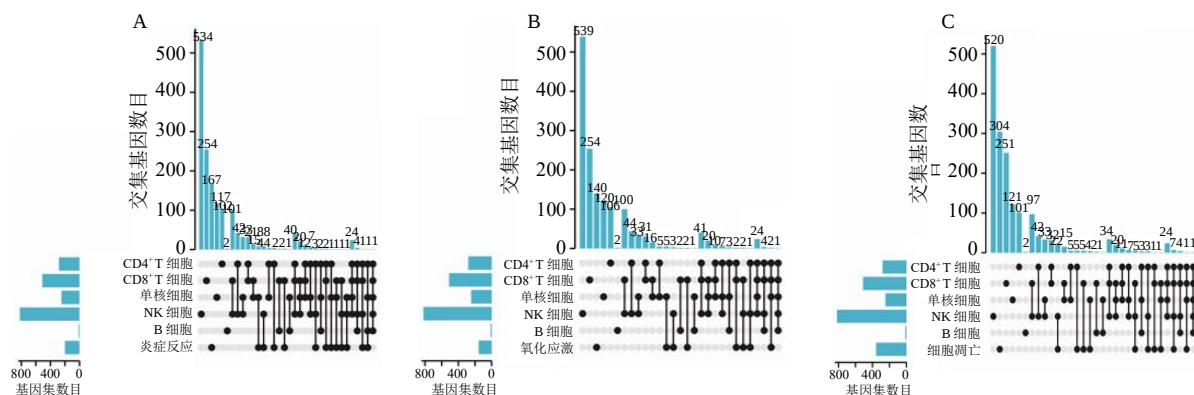


图 7 5 种免疫细胞上调基因与新冠后 CFS 炎症反应相关基因 (A)、氧化应激相关基因 (B) 和细胞凋亡相关基因 (C) 交集情况

Fig. 7 Intersection of cell up-regulated genes in five immune cells with CFS after COVID-19 inflammatory response related genes (IRGs, A), oxidative stress related genes (OSRGs, B) and apoptosis related genes (ARGs, C)

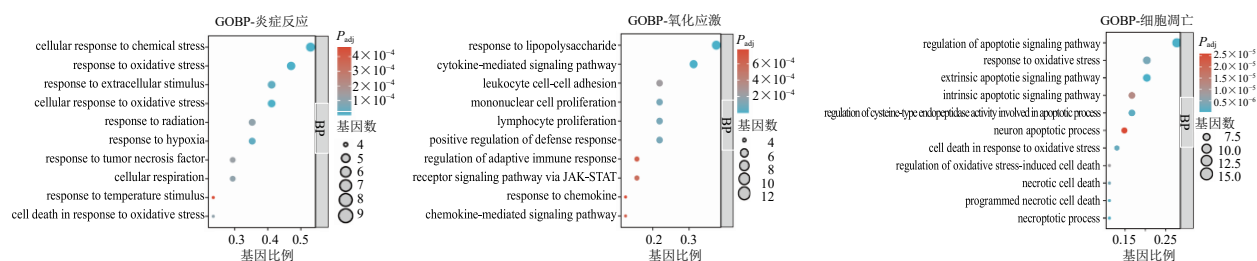
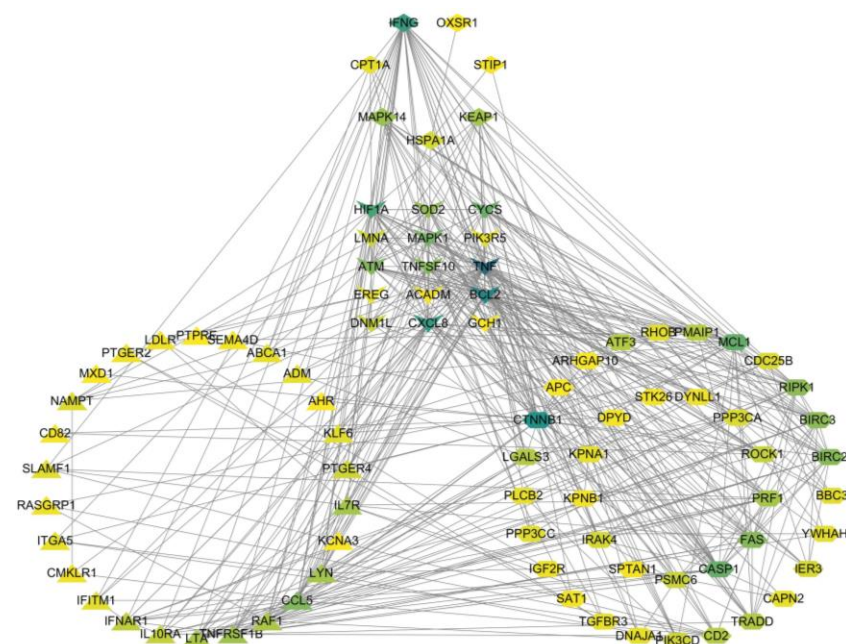


图 8 GOBP 富集分析

Fig. 8 GOBP enrichment analysis



菱形为 OSRGs, 三角形为 IRGs, 六边形为 ARGs, V 型为多表型分子; 颜色越深, 连接度越大。

Diamonds are OSRGs, triangles are IRGs, hexagons are ARGs, and V forms are polyphenotypic molecule; darker the color, the greater the connectivity.

图 9 “炎症反应-氧化应激-细胞凋亡”分子交互网络

Fig. 9 “IRGs-OSRGs-ARGs” molecular interaction network

2.6 关键基因的鉴定及表达分析

在“IRGs-OSRGs-ARGs”分子交互复杂网络中分别将 degree、closeness、EPC 和 MCC 排名前 10 的基因取交集，最后得到 8 个关键基因，包括肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, *TNF*)、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, *BCL2*)、连环蛋白 $\beta 1$ (catenin beta 1, *CTNNB1*)、C-X-C 基序趋化因子配体 8 (C-X-C motif chemokine ligand 8, *CXCL8*)、 γ 干扰素 (interferon gamma, *IFNG*)、缺氧诱导因子 1 α 亚单位 (hypoxia inducible factor 1 subunit alpha, *HIF1A*)、髓样细胞白血病-1 (myeloid cell leukemia-1, *MCL1*)、细胞色素 C (cytochrome C, *CYCS*)，见图 10。进一步分析了 8 个关键基因在免疫细胞中的表

达情况，如 *CXCL8*、*MCL1* 和 *HIF1A* 在单核细胞中的表达水平较高，见图 11。

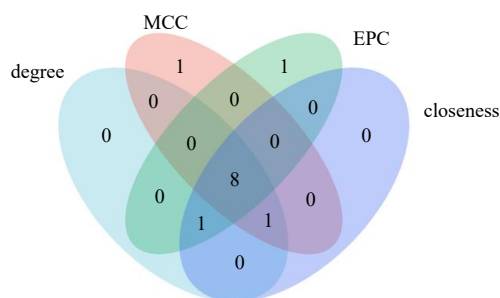


图 10 关键基因的鉴定

Fig. 10 Identification of key genes

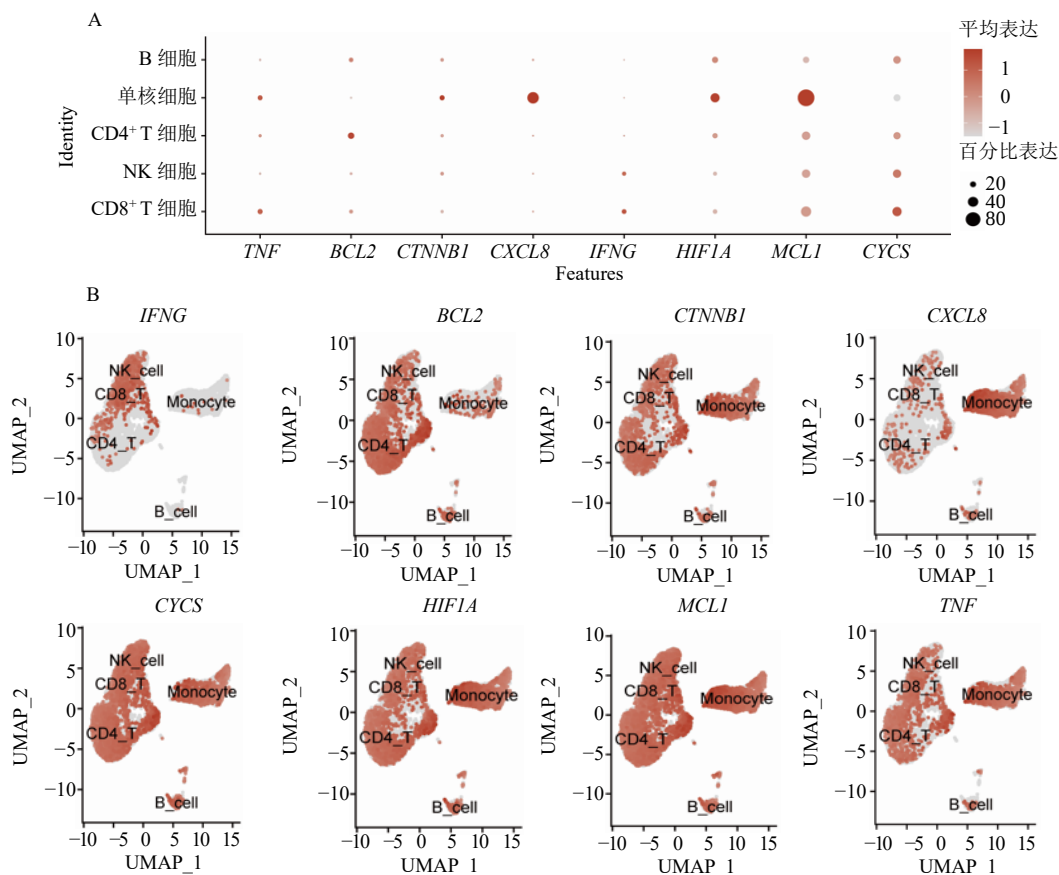


图 11 气泡图 (A) 和 UMP 图 (B) 展示关键基因在免疫细胞中的表达情况

Fig. 11 Bubble plot (A) and UMP plot (B) show distribution of key gene expression in immune cells

2.7 中药预测分析

共筛选出 126 味中药，出现频次 195 次，并构建“基因-中药”调控网络图，见图 12。统计结果显示，四气以寒性为主，温、平次之（图 13-A）；五味以苦、辛、甘为主（图 13-B）；归经以肝、脾、肺为

主（图 13-C）。功效分类以补虚药、清热药、活血化瘀药为主（图 13-D）。在“基因-中药”调控网络图中，甘草、人参、冬虫夏草、灵芝等补虚药的连接度较高，黄芩、三白草、鱼腥草、半枝莲、冬凌草、赤芍、苦参等清热药连接度较高，郁金、丹参、姜

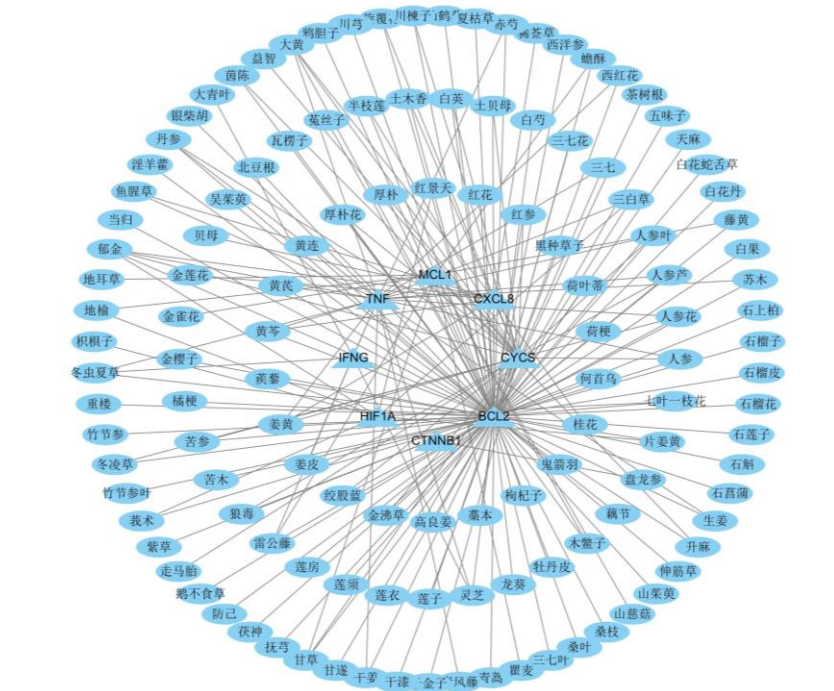


图 12 “基因-中药”调控网络

Fig. 12 “Gene-traditional Chinese medicines” regulatory network

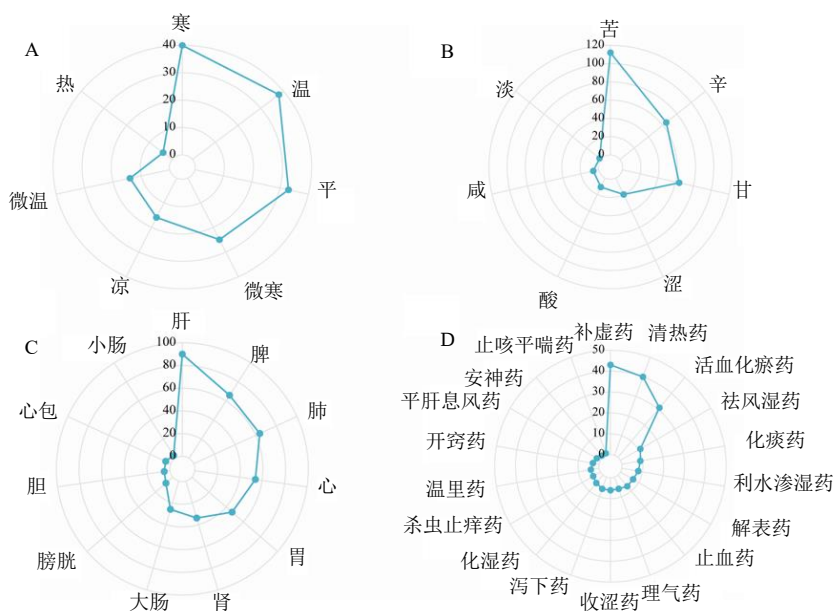


图 13 干预中药的四气 (A)、五味 (B)、归经 (C)、功效分类 (D) 统计分析

Fig. 13 Statistical analysis of four *qi* (A), five flavors (B), meridian affinity (C), efficacy classification (D) in intervention traditional Chinese medicines

黄、三七等活血化瘀药的连接度较高，以上中药可能是新冠后 CFS 潜在的干预中药。

3 讨论

PCS 已被证明是许多康复患者面临的一个严重

且挥之不去的问题。CFS 是常见的 PCS 之一，长期新冠患者的发病、进展和症状特征与 CFS 有相当大的重叠性^[21]，阐明新冠后 CFS 的潜在病理机制有助于提高新冠后 CFS 管理水平和改善治疗手段。本研

究通过分析新冠后 CFS 患者和健康受试者的单细胞转录组数据,发现异常的炎症反应、氧化应激、细胞凋亡水平可能是新冠后 CFS 的关键病理机制,并鉴定出多个 IRGs、OSRGs 和 ARGs,同时挖掘了“IRGs-OSRGs-ARGs”网络中的关键基因,为新冠后 CFS 的临床管理和治疗提供了新的思路。

本研究发现,相比于健康受试者,新冠后 CFS 患者外周血免疫细胞微环境的细胞通讯更为密切且强度更大,尤其是单核细胞和 T 细胞,这提示新冠后 CFS 与免疫细胞状态密切相关。研究表明,重度 COVID-19 会导致 T 细胞减少,从而引起过度炎症^[22-23]。这是因为 T 细胞在新冠感染后参与炎症消退。因此,随着 T 细胞的更新,未解决的过度炎症可能导致炎症升高,并导致长期 COVID-19, T 细胞数量减少已被证明与严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 持续脱落相关,这可能进一步延长 COVID-19 患者的慢性免疫激活^[24-25]。单核细胞是 COVID-19 病理生理学的关键细胞调节剂,在急性 COVID-19 感染期间,单核细胞失调与重度 COVID-19 相关的细胞因子风暴密切相关。Zhou 等^[26]发现,与非危重症患者和健康对照组相比,危重症 COVID-19 患者的 CD14、CD16 单核细胞水平明显升高。此外,COVID-19 康复者也显示出循环单核细胞升高,且表现出活化的单核细胞表型^[27]。本研究发现新冠后 CFS 患者外周血中免疫细胞之间通过 MIF-(CD74 + CD44)、MIF-(CD74 + CXCR4)、LGALS9-CD44/CD45 等配受体进行细胞通讯的频率和强度明显增加,尤其是单核细胞和 T 细胞。巨噬细胞迁移抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)是一种趋化因子样蛋白,是炎症反应的重要介质。MIF 可刺激炎症介质的产生进而触发和扩增细胞因子的产生,如 TNF- α 、IFNG、白细胞介素(interleukin, IL)等。MIF 还通过协调白细胞运输、抑制 p53 介导的炎症细胞凋亡来促进炎症,从而维持其存活期^[28]。半乳糖凝集素-9(galectin-9, LGALS9)是 β -半乳糖苷结合凝集素家族的成员,具有多种生物学功能,如化学吸引、细胞聚集和细胞凋亡^[29-30]。最近研究也证实了 LGALS9-CD44 轴在调节免疫应答中的关键作用^[31]。

新冠后 CFS 的机制可能是由于机体过度的抗炎反应。本研究发现新冠后 CFS 患者中 B 细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、NK 细胞和单核细胞的

炎症反应评分均高于正常受试者,各类免疫细胞可能处于一种慢性炎症激活状态。COVID-19 又称“全身炎症反应综合征”,即 SARS-CoV-2 感染后机体会激活一种持久的、平衡的、代偿性的抗炎反应状态,以抑制促炎反应并恢复免疫稳态^[5,32],炎症的整体状态、炎症介质的增加以及细胞介导的免疫激活可能导致 CFS 样状态,这种状态可能是新冠后 CFS 的诱因之一。多项研究表明^[33-34]COVID-19 康复后依然显示出全身促炎标志物(如 C 反应蛋白、IL-6、铁蛋白和 D-二聚体等)水平升高,未消退的炎症很可能是长期 COVID-19 的潜在病理生理机制,特别是炎症相关症状如肌痛、关节痛和疲劳^[35]。

氧化应激是许多急、慢性疾病以及正常衰老过程的重要病理特征,主要由自由基和抗氧化剂之间的不平衡引起的,最终导致自由基的增加。现有研究显示,CFS 患者的氧化应激标志物明显增加^[36],氧化应激水平升高与 CFS 症状严重程度相关^[37]。而且 CFS 中异常的氧化应激可能导致线粒体功能障碍、炎症通路和脑功能障碍^[38]。在 COVID-19 患者中,SARS-CoV-2 可导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生增加和抗氧化剂水平降低,导致氧化还原失衡并导致严重症状的发展^[39]。ROS 的产生可对肺组织造成氧化损伤,并引发炎症反应,导致大量肺功能障碍和氧交换受损^[40]。Tsilingiris 等^[41]发现感染 SARS-CoV-2 4 个月后非住院患者的血清丙二醛水平显著升高,表明感染 SARS-CoV-2 后仍存在全身性氧化还原失衡。本研究发现新冠后 CFS 患者中 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、NK 细胞和单核细胞的氧化应激评分水平均高于健康受试者,且 OSRGs 主要富集在细胞化学应激反应、响应于氧化应激、氧化应激细胞反应、氧化应激引起的细胞死亡等氧化应激相关生物过程。因此,氧化应激水平升高可能是新冠后 CFS 的重要病理原因之一。

细胞凋亡是常见的细胞死亡模式之一,参与多种生理和病理过程,包括胚胎发育、异常细胞的消除和全身稳态的维持^[42]。细胞凋亡失调如在错误的地点或时间出现或增强,会引发包括恶性肿瘤在内的许多疾病^[42]。免疫细胞增殖和凋亡的动态平衡是维持自身免疫系统稳定的重要条件,CFS 是一种长期身心疲劳导致的严重影响体力活动为突出表现的综合征,其发病机制与免疫细胞的增殖和凋亡失衡密切相关^[43]。目前研究表明,CFS 患者外周血淋巴细胞和中性粒细胞的凋亡率明显高于正常健康人,

且抗凋亡关键基因 *BCL2* 表达显著增加^[44-45]。CFS 模型大鼠血清死亡受体 (death receptor, DR)、海马半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cysteine aspartate protease, Caspase-3) 表达水平明显升高, DR 可招募 Caspase 导致细胞凋亡增加, 进而导致免疫功能失调和炎症反应的发生^[46]。本研究发现, 新冠后 CFS 患者外周血免疫细胞的细胞凋亡水平平均高于正常受试者, *BCL2*、*MCL1*、*CTNNB1* 等细胞凋亡相关基因在新冠后 CFS 患者中异常表达。*BCL2* 和 *MCL1* 都是抗凋亡的 *BCL2* 家族蛋白, 具有抑制细胞凋亡的作用, 它们可通过调节线粒体膜通透性和细胞色素 C 的释放等机制, 影响细胞凋亡的过程^[47-48]。*CTNNB1* (编码 β -连环蛋白) 作为 Wnt 信号通路中的关键分子, 当 Wnt 信号通路被激活时, *CTNNB1* 的水平会增加, 进而与 *BCL2* 家族蛋白相互作用, 从而抑制促凋亡蛋白的活性^[49]。此外, 异常的 *CTNNB1* 表达水平可以导致细胞凋亡的增加, β -连环蛋白的突变或过度表达可以促进细胞增殖和肿瘤生长, 同时也可能导致细胞凋亡的抑制^[50]。Vijayakumar 等^[6]研究也发现, 与细胞凋亡和上皮损伤相关的蛋白质在 COVID-19 后患者气道明显升高。由此可知, PCS 患者可能存在异常的细胞凋亡水平, 细胞凋亡失调可能是新冠后 CFS 的重要病理机制之一。

迄今为止, COVID-19 已在全球感染了超过 7 亿人 (<https://covid19.who.int/>), 随着越来越多的患者从急性感染中康复, 处于康复期的患者比例正在逐渐增加, 据报道, 许多人在康复期间会发生 PCS, 如疲劳、呼吸困难和疼痛, PCS 是目前面临的一大难题。其中, 疲劳是最常见的症状^[51], 在一定程度上影响人们的正常生活和工作。中医药在治疗新冠后 CFS 具有独特优势, 不仅可以缓解相应的症状, 还可以改善临床指标, 恢复正气、清除余邪、防止“复燃”^[52]。本研究发现, 新冠后 CFS 患者存在异常的炎症反应、氧化应激和细胞凋亡状态, 鉴定出其中的关键基因, 并依据关键基因预测出潜在调控中药。结果显示, 中药药性以寒为主, 温、平次之; 药味以苦、辛、甘为主, 表明该类中药对关键基因可能具有重要作用。药物整体归经统计以肝、脾、肺为主, CFS 的病位主要在脾、肝, 肝郁脾虚是其常见的证型^[53], COVID-19 的病位主要在肺, PCS 患者多表现为邪去正虚、肺脾耗伤的病机格局^[8], 这提示临床治疗当注重肝、脾、肺 3 脏协调并治。药物功效分类统计以补虚药、清热

药、活血化瘀药为主, 这与 CFS 患者的中医证型不谋而合, 气虚、气滞、血虚、阴虚是 CFS 的主要证候要素^[53], 提示这 3 类中药在调控关键基因中具有重要作用。

PCS 的病因主要是邪气未尽且正气受损, 导致身体各脏腑功能失调, 出现一系列虚损症状。甘草、人参、冬虫夏草、灵芝等为补虚药的代表药物, 黄芩、三白草、鱼腥草、半枝莲、冬凌草、赤芍、苦参等为清热药的代表药物。补虚药配伍清热药, 补虚扶正与清热解毒兼顾, 使补而不助热, 清而不伤正。甘草关键成分甘草酮 A 可抑制核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 活化, 进而降低 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平, 发挥抗炎作用^[54-55]; 甘草酮 A 可激活核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 通路从而抑制氧化应激^[56]; 甘草酮 A 还可通过抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白/缺氧诱导因子-1 α (mammalian target of rapamycin/hypoxia-inducible factor-1 α , mTOR/HIF-1 α) 通路发挥对细胞的保护作用, 抑制细胞凋亡^[55]。甘草其他成分如甘草次酸、甘草苷也具有显著的抗炎活性^[57]。人参关键成分人参皂苷 R_{g2} 可通过调控 Ras 同源家族成员 A (ras homolog family member A, RhoA)/RhoA 相关蛋白激酶 (Rho-associated coiled-coil containing kinases, ROCK) 信号通路发挥抗炎、抗氧化及抗凋亡作用^[58]。黄芩主要成分黄芩苷可通过抑制磷脂酰肌醇-3 激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)/mTOR 信号通路改善炎症和氧化应激状态^[59]; 黄芩苷可通过 JAK/STAT 信号通路抑制细胞凋亡及炎症反应^[60]。汉黄芩苷可激活 Nrf2 通路进而提高抗氧化能力, 减轻氧化应激损伤^[61]。冬凌草甲素通过抑制 NF- κ B 信号通路活化发挥抗炎、抗氧化及抗凋亡作用^[62]。

疲劳和新冠后其他症状的潜在机制包括由于血管功能障碍和高凝导致的组织氧气供应异常, 高凝血和内皮功能障碍是新冠后的关键病理^[63]。活血化瘀药多辛、苦, 性多偏温, 功在通畅血行, 消散瘀血。现代药理学研究表明, 活血化瘀药具有改善血流动力学、扩张血管、抗凝血、抗血栓、改善微循环、降低毛细血管通透性等作用^[64]。郁金、丹参、姜黄、三七等为活血化瘀药的代表药物。郁金提取物可提高红细胞的变形能力, 减弱红细胞的聚集, 抑制血小板的聚集, 降低全血黏度, 达到活血化瘀

的功效^[65]。丹参中的多种成分均有抗凝血作用，丹参酮 II_A 是改善血液微循环预防脑血管疾病的潜在有效药物，隐丹参酮可以浓度相关方式抑制大鼠血小板聚集^[66]。丹参酮 II_A 通过抑制 *miR-155-5p* 表达，进而激活沉默信息调节因子 1-腺苷酸活化蛋白激酶 silent information regulator 1-AMP-activated protein kinase, SIRT1-AMPK) 通路，减轻炎症反应与氧化应激损伤，并减少细胞凋亡^[67]。

4 结论

本研究通过分析新冠后 CFS 患者与正常受试者的单细胞转录组数据，发现新冠后 CFS 患者存在异常的炎症反应、氧化应激和细胞凋亡水平，挖掘了相关的潜在关键基因，并预测关键基因的潜在调控中药，本研究结果将为后续深入研究新冠后 CFS 的潜在机制提供参考，为新冠后 CFS 的临床管理和中医药治疗提供理论支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bowe B, Xie Y, Al-Aly Z. Postacute sequelae of COVID-19 at 2 years [J]. *Nat Med*, 2023, 29(9): 2347-2357.
- [2] Nehme M, Chappuis F, Kaiser L, et al. The prevalence, severity, and impact of post-COVID persistent fatigue, post-exertional malaise, and chronic fatigue syndrome [J]. *J Gen Intern Med*, 2023, 38(3): 835-839.
- [3] 蔚昊燃, 于瑶, 蔚液光. 对新型冠状病毒感染后疲劳症状的相关研究 [J]. 中医临床研究, 2023, 15(8): 52-60.
- [4] Wood E, Hall K H, Tate W. Role of mitochondria, oxidative stress and the response to antioxidants in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: A possible approach to SARS-CoV-2 “long-haulers”? [J]. *Chronic Dis Transl Med*, 2021, 7(1): 14-26.
- [5] Pierce J D, Shen Q H, Cintron S A, et al. Post-COVID-19 syndrome [J]. *Nurs Res*, 2022, 71(2): 164-174.
- [6] Vijayakumar B, Boustani K, Ogger P P, et al. Immuno-proteomic profiling reveals aberrant immune cell regulation in the airways of individuals with ongoing post-COVID-19 respiratory disease [J]. *Immunity*, 2022, 55(3): 542-556.e5.
- [7] 赵玉斌, 肖颖, 崔淑华, 等. “新冠后状态”人群的中医综合康复研究策略 [J]. 中医杂志, 2022, 63(14): 1313-1318.
- [8] 史锁芳, 张晓娜, 王博寒. 中医药干预新型冠状病毒肺炎恢复期后遗症的研究进展 [J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(3): 473-476.
- [9] 卫博凯, 胡静. 基于中医传承辅助平台与网络药理学探析中药干预新型冠状病毒感染后遗症肺纤维化的作用机制 [J]. 中草药, 2024, 55(1): 190-204.
- [10] 蒋敏, 李慧莉, 庞盼盼, 等. 高通量单细胞转录组测序发展与展望 [J]. 生命科学, 2020, 32(12): 1280-1287.
- [11] Su Y P, Yuan D, Chen D G, et al. Multiple early factors anticipate post-acute COVID-19 sequelae [J]. *Cell*, 2022, 185(5): 881-895.e20.
- [12] Hao Y H, Hao S, Andersen-Nissen E, et al. Integrated analysis of multimodal single-cell data [J]. *Cell*, 2021, 184(13): 3573-3587.e29.
- [13] Jin S Q, Guerrero-Juarez C F, Zhang L H, et al. Inference and analysis of cell-cell communication using CellChat [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1088.
- [14] Wu Y C, Yang S X, Ma J Q, et al. Spatiotemporal immune landscape of colorectal cancer liver metastasis at single-cell level [J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(1): 134-153.
- [15] Aibar S, González-Blas C B, Moerman T, et al. SCENIC: Single-cell regulatory network inference and clustering [J]. *Nat Methods*, 2017, 14(11): 1083-1086.
- [16] Andreatta M, Carmona S J. UCell: Robust and scalable single-cell gene signature scoring [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2021, 19: 3796-3798.
- [17] Bhuva D D, Foroutan M, Xie Y, et al. Using singscore to predict mutation status in acute myeloid leukemia from transcriptomic signatures [J]. *F1000Res*, 2019, 8: 776.
- [18] Hänzelmann S, Castelo R, Guinney J. GSVA: Gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data [J]. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14: 7.
- [19] Zou J W, Deng F L, Wang M C, et al. scCODE: An R package for data-specific differentially expressed gene detection on single-cell RNA-sequencing data [J]. *Brief Bioinform*, 2022, 23(5): bbac180.
- [20] Sun H R, Kong X J, Wei K M, et al. Risk prediction model construction for post myocardial infarction heart failure by blood immune B cells [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1163350.
- [21] Sukocheva O A, Maksoud R, Beeraka N M, et al. Analysis of post COVID-19 condition and its overlap with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome [J]. *J Adv Res*, 2022, 40: 179-196.
- [22] Fathi N, Rezaei N. Lymphopenia in COVID-19: Therapeutic opportunities [J]. *Cell Biol Int*, 2020, 44(9): 1792-1797.
- [23] Tavakolpour S, Rakhshandehroo T, Wei E X, et al. Lymphopenia during the COVID-19 infection: What it shows and what can be learned [J]. *Immunol Lett*, 2020, 225: 31-32.
- [24] Hu F Y, Chen F J, Ou Z H, et al. A compromised specific humoral immune response against the SARS-CoV-2

- receptor-binding domain is related to viral persistence and periodic shedding in the gastrointestinal tract [J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(11): 1119-1125.
- [25] Liu B, Han J Y, Cheng X H, *et al.* Reduced numbers of T cells and B cells correlates with persistent SARS-CoV-2 presence in non-severe COVID-19 patients [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 17718.
- [26] Zhou Y G, Fu B Q, Zheng X H, *et al.* Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients [J]. *Natl Sci Rev*, 2020, 7(6): 998-1002.
- [27] Park J, Dean L S, Jiyarom B, *et al.* Elevated circulating monocytes and monocyte activation in COVID-19 convalescent individuals [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1151780.
- [28] Schindler L, Dickerhof N, Hampton M B, *et al.* Post-translational regulation of macrophage migration inhibitory factor: Basis for functional fine-tuning [J]. *Redox Biol*, 2018, 15: 135-142.
- [29] Rabinovich G A, Toscano M A. Turning 'sweet' on immunity: Galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(5): 338-352.
- [30] Liu F T, Rabinovich G A. Galectins as modulators of tumour progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(1): 29-41.
- [31] Wu C, Thalhamer T, Franca R F, *et al.* Galectin-9-CD44 interaction enhances stability and function of adaptive regulatory T cells [J]. *Immunity*, 2014, 41(2): 270-282.
- [32] Sugimoto M A, Sousa L P, Pinho V, *et al.* Resolution of inflammation: What controls its onset? [J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 160.
- [33] Zhou M, Yin Z R, Xu J J, *et al.* Inflammatory profiles and clinical features of coronavirus 2019 survivors 3 months after discharge in Wuhan, China [J]. *J Infect Dis*, 2021, 224(9): 1473-1488.
- [34] Sollini M, Ciccarelli M, Cecconi M, *et al.* Vasculitis changes in COVID-19 survivors with persistent symptoms: An [¹⁸F]FDG-PET/CT study [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2021, 48(5): 1460-1466.
- [35] Komaroff A L, Bateman L. Will COVID-19 lead to myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome? [J]. *Front Med*, 2021, 7: 606824.
- [36] Jammes Y, Steinberg J G, Delliaux S. Chronic fatigue syndrome: Acute infection and history of physical activity affect resting levels and response to exercise of plasma oxidant/antioxidant status and heat shock proteins [J]. *J Intern Med*, 2012, 272(1): 74-84.
- [37] Maes M, Kubera M, Uytterhoeven M, *et al.* Increased plasma peroxides as a marker of oxidative stress in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS) [J]. *Med Sci Monit*, 2011, 17(4): SC11-SC15.
- [38] Morris G, Maes M. Oxidative and nitrosative stress and immune-inflammatory pathways in patients with myalgic encephalomyelitis (ME)/chronic fatigue syndrome (CFS) [J]. *Curr Neuropsychopharmacol*, 2014, 12(2): 168-185.
- [39] Potere N, Batticciotto A, Vecchié A, *et al.* The role of IL-6 and IL-6 blockade in COVID-19 [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2021, 17(6): 601-618.
- [40] Borges L, Gennari-Felipe M, Dias B B, *et al.* Melatonin, zinc, and vitamin C: Potential adjuvant treatment for COVID-19 patients [J]. *Front Nutr*, 2021, 8: 821824.
- [41] Tsilingiris D, Vallianou N G, Karampela I, *et al.* Laboratory findings and biomarkers in long COVID: What do we know so far? Insights into epidemiology, pathogenesis, therapeutic perspectives and challenges [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(13): 10458.
- [42] Bertheloot D, Latz E, Franklin B S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: An intricate game of cell death [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(5): 1106-1121.
- [43] 王明明. 逍遥散对慢性疲劳综合征小鼠肝细胞氧化应激损伤与凋亡的干预作用 [D]. 武汉: 湖北中医学院, 2008.
- [44] 赵建明, 刘艳峰, 孔筠, 等. 肝郁脾虚型慢性疲劳综合征患者焦虑抑郁状态及淋巴细胞凋亡的临床研究 [J]. 山西中医, 2004, 20(4): 48-50.
- [45] Kennedy G, Spence V, Underwood C, *et al.* Increased neutrophil apoptosis in chronic fatigue syndrome [J]. *J Clin Pathol*, 2004, 57(8): 891-893.
- [46] 水玲, 乌云格日乐, 卢俊, 等. 蒙医温针干预慢性疲劳综合征模型大鼠海马 Caspase-3 表达及血清死亡受体 DR、Fas 的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(5): 192-195.
- [47] Czabotar P E, Garcia-Saez A J. Mechanisms of BCL-2 family proteins in mitochondrial apoptosis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(10): 732-748.
- [48] Siddiqui W A, Ahad A, Ahsan H. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: An update [J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(3): 289-317.
- [49] Liu J Q, Xiao Q, Xiao J N, *et al.* Wnt/ β -catenin signalling: Function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 3.
- [50] Yu F Y, Yu C H, Li F F, *et al.* Wnt/ β -catenin signaling in cancers and targeted therapies [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 307.
- [51] Chen C, Hauptert S R, Zimmermann L, *et al.* Global prevalence of post-coronavirus disease 2019 (COVID-19)

- condition or long COVID: A meta-analysis and systematic review [J]. *J Infect Dis*, 2022, 226(9): 1593-1607.
- [52] 黄永恒, 谭惠璇, 邹凤娇, 等. 基于中医药理论及经典方药论新型冠状病毒肺炎康复期后遗症的治疗 [J]. 按摩与康复医学, 2022, 13(10): 5-9.
- [53] 夏明月, 崔向宁, 常慧, 等. 基于数据挖掘分析慢性疲劳综合征中医证候特征及用药规律 [J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49(11): 15-23.
- [54] Hu J, Liu J. Licochalcone A attenuates lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by inhibiting NF- κ B activation [J]. *Inflammation*, 2016, 39(2): 569-574.
- [55] 吴若霞, 田莎, 熊家青, 等. 甘草酮 A 通过调节 mTOR/HIF-1 α 途径对顺铂诱导的肾小管上皮细胞的保护作用机制 [J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(7): 1420-1424.
- [56] Lv H M, Xiao Q F, Zhou J F, *et al.* Licochalcone A upregulates Nrf2 antioxidant pathway and thereby alleviates acetaminophen-induced hepatotoxicity [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 147.
- [57] 宋紫腾, 卜睿臻, 韩彦琪, 等. 基于体外细胞模型的痹祺胶囊药效物质基础研究 [J]. 中草药, 2023, 54(23): 7673-7686.
- [58] 孟培培, 王蓓, 刘光, 等. 基于 RhoA/ROCK 信号通路探讨人参皂苷 Rg₂ 对曲妥珠单抗引起的大鼠心功能及心肌细胞损伤的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2023, 21(18): 3357-3361.
- [59] Ou Y, Zhang W J, Chen S P, *et al.* Baicalin improves podocyte injury in rats with diabetic nephropathy by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Open Med*, 2021, 16(1): 1286-1298.
- [60] Xu M, Li X Y, Song L C. Baicalin regulates macrophages polarization and alleviates myocardial ischaemia/reperfusion injury via inhibiting JAK/STAT pathway [J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1): 655-663.
- [61] 李冰冰, 于海波. 汉黄芩苷通过调节 Nrf2/HO-1 通路对大鼠心肌缺血再灌注(I/R)损伤的保护作用 [J]. 广东化工, 2021, 48(7): 37-40.
- [62] 雷艺, 杨军, 李华, 等. 冬凌草甲素对大鼠糖尿病心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制 [J]. 免疫学杂志, 2019, 35(10): 838-845.
- [63] Astin R, Banerjee A, Baker M R, *et al.* Long COVID: Mechanisms, risk factors and recovery [J]. *Exp Physiol*, 2023, 108(1): 12-27.
- [64] 陈希西, 韩嵩, 樊根豪, 等. 活血化瘀类中药现代药理学研究进展 [J]. 天津中医药, 2023, 40(2): 250-257.
- [65] 刘睿, 高丹丹, 崔涛, 等. 郁金及其近缘药材的研究进展及质量标志物 (Q-marker) 的预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 273-280.
- [66] 万新焕, 王瑜亮, 周长征, 等. 丹参化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(3): 788-798.
- [67] 张磊磊, 谢周良, 权晓强, 等. 丹参酮 II_A 通过 miR-155-5p 激活 SIRT1-AMPK 通路改善 H9c2 心肌细胞缺血/再灌注损伤 [J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(12): 2507-2512.

[责任编辑 潘明佳]