

基于“免疫-炎症”环节探究小柴胡汤“异病同治” 系统性红斑狼疮和肾小球肾炎的作用机制

常梦丽,郭非非,唐仕欢*,杨洪军

中国中医科学院中药研究所,北京 100700

摘要:以自身免疫性疾病系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus,SLE)和肾小球肾炎(glomerulonephritis,GN)为例,从“免疫-炎症”角度分析小柴胡汤“异病同治”的机理。基于 GEO 公共数据库搜索疾病样本数据并获得差异基因,利用 String 平台获得蛋白互作网络,基于 Cytoscape 3.8.0 筛选获得核心靶点,将核心靶点数据上传至中药药效预测平台构建疾病网络。基于中药药效预测平台并利用 z-Score 模型,对比临床治疗 SLE 与 GN 的上市西药与小柴胡汤对疾病网络的扰动情况。利用 Cytoscape 3.8.0 的 ClueGo 插件对小柴胡汤干预 SLE、GN 以及小柴胡汤干预二者的交集靶点进行 GO 分析和 KEGG 分析。结果得到 SLE 疾病 95 个核心差异基因和 GN 疾病 112 个核心差异基因,通过中药药效预测平台的分析得到小柴胡汤干预 SLE 的潜在靶点 82 个,小柴胡汤干预 GN 的潜在靶点 77 个,二者的交集靶点 38 个。GO 分析和 KEGG 分析结果显示,小柴胡汤异病同治的机理可能是通过参与 I 型干扰素信号通路、病毒过程的负调控、对 γ -干扰素的应答、B 细胞增殖调节等免疫炎症相关的生物过程介导胞质 DNA 感应通路、NOD 样受体信号通路、丙型肝炎等信号通路来实现。综上,小柴胡汤可通过参与免疫和炎症相关的通路治疗 SLE 与 GN,可为小柴胡汤干预 SLE 和 GN 的进一步研究提供参考,有助于准确定位小柴胡汤异病同治的干预环节,为其精准应用提供依据。

关键词:小柴胡汤;红斑狼疮;肾小球肾炎;异病同治;中药药效预测平台

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)5-0874-13

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.5.017

Study on mechanisms of Xiaochaihu Decoction in treating systemic lupus erythematosus and glomerulonephritis with same-link method based on “immune-inflammation”

CHANG Meng-li, GUO Fei-fei, TANG Shi-huan*, YANG Hong-jun

Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: This paper takes autoimmune disease such as systemic lupus erythematosus and glomerulonephritis as an example, for the purpose of analyzing the mechanism of Xiaochaihu Decoction treating different diseases with same method from an “immune-inflammation” point of view. The differential genes about SLE and GN were obtained from GEO database, then the protein-protein interaction network map was constructed by String database and the core targets were obtained based on Cytoscape 3.8.0, then the core target data were uploaded to the traditional Chinese medicine (TCM) efficacy prediction platform for the purpose of constructing the disease network. The disturbance scores of disease network of marketed western medicine for clinical treatment of SLE and GN and Xiaochaihu Decoction was compared based on the TCM efficacy prediction platform and z-Score model. GO analysis and KEGG analysis were performed on the targets of Xiaochaihu Decoction treating SLE, GN, and targets which is shared between them by using the ClueGo in Cytoscape 3.8.0. The 95 core targets about SLE and 112 core targets about GN, 82 targets of Xiaochaihu Decoction treating SLE, 77 targets of Xiaochaihu Decoction treating GN and 38 core targets which is shared between Xiaochaihu Decoction treating SLE and GN were obtained according to the above con-

收稿日期:2021-05-20 接受日期:2021-11-22

基金项目:山东省重点研发计划(2017CXGC1301);国家重点研发计划(2018YFC1704101);国家重大新药创制专项(2019ZX09201005, 2019ZX09721001-005-002)

*通信作者 E-mail:tshuan800@126.com

ditions. According the GO and KEGG analysis, the mechanism of Xiaochaihu Decoction treating different diseases with same method may be achieved by participating in type I interferon signaling pathway, negative regulation of viral processes, response to interferon-gamma, regulation of B cell proliferation and other immune inflammation-related biological processes and mediating cytosolic DNA sensing pathway, NOD-like receptor signaling pathway, hepatitis C and other signaling pathways. It is concluded that Xiaochaihu Decoction can treat SLE and GN through pathways related to immune process and inflammatory response, a reference for further study of Xiaochaihu Decoction treating SLE and GN is provided from this article, and can be helpful in accurately locate the disease process of Xiaochaihu Decoction treating different diseases with same method.

Key words: Xiaochaihu Decoction; systemic lupus erythematosus; glomerulonephritis; treating different diseases with same method; traditional Chinese medicine efficacy prediction platform

辨证论治是中医诊疗的特色和精髓,异病同治是中医辨证论治方法的具体体现。运用现代科技手段揭示异病同治的生物学基础及其作用原理是中医现代化研究中的关键之一,也是进一步阐述辨证论治这一科学内涵的重要部分。小柴胡汤出自《伤寒杂病论》,由柴胡、黄芩、人参、半夏、生姜、甘草、大枣等七味药组成,具有和解少阳的功效。中医临床随证加减可广泛用于多种疾病的治疗,实现异病同治,如2型糖尿病、肺癌、亚急性甲状腺炎及慢性乙型肝炎肝纤维化等^[1-4]。此外,对感染性疾病如细菌性肝脓肿及小儿呼吸道感染也具有较好的临床疗效^[5,6]。临床报道表明,对免疫系统疾病患者如系统性红斑狼疮和肾小球肾炎患者,小柴胡汤能显著改善其免疫指标,恢复正常免疫状态^[7,8]。现代药理证实,小柴胡汤可通过调节免疫、抗炎、调节内分泌、抗肝纤维化及抗肿瘤等多个途径作用于不同的疾病环节发挥药效作用^[9]。在这些作用环节中,小柴胡汤对免疫功能的调节和对炎症反应的干预可能是其共性基础^[1,10,11]。

通过前期的研究,课题组已构建了基于网络稳健性的中药药效预测平台(<http://47.92.232.154:100/>),该平台可以实现模拟单味药材、中药复方及药物靶点对疾病网络的干预,具体实现过程是通过删除疾病的网络节点来模拟药物对于疾病的扰动作用。删除同一个疾病网络不同的节点会导致网络结构发生不同的变化,网络的稳定性也不同,药物对于疾病的干预目的在于最大限度影响网络的稳定性和破坏网络的结构。通过比较药物干预前后网络拓扑特征的变化使用扰动率来评价药物对于疾病的干预作用。此外,通过构建随机的网络,模拟删除节点对于随机网络稳健性影响的总体分布(permutation test)来考察药物对于真实网络扰动处于总体分布的位置,并通过计算校正后的扰动率来客观评价药物对于真实网络的扰动强度^[12,13]。以新型冠状病毒

肺炎为范例,该平台已实现常用经典名方治疗新型冠状病毒肺炎的潜在作用分析,为新型冠状病毒肺炎的有效药物筛选提供了可靠参考^[14]。

基于前期基础,为探究小柴胡汤治疗疾病的作用机制及具体环节,本研究以免疫系统疾病系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)和肾小球肾炎(glomerulonephritis, GN)为范例,基于基因表达综合(gene expression omnibus, GEO)数据库获取SLE和GN疾病相关的差异基因构建疾病网络,运用中药药效预测分析平台分析小柴胡汤对两种疾病的干预情况,并通过与上市西药对疾病网络的干预对比来验证疾病模型的可靠性,随后进行GO分析和KEGG分析,从“免疫-炎症”的角度揭示小柴胡汤异病同治的机理。

1 方法

1.1 SLE与GN的疾病网络构建

以疾病英文名即“systemic lupus erythematosus”与“glomerulonephritis”为关键词在GEO(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)公共数据库搜集SLE与GN疾病患者的基因表达谱数据,筛选条件如下:物种为人、每个ID须包含健康对照组、每组样本数均 ≥ 3 、取材部位一致,不包含小RNA的数据等。基于GEO2R工具在线分析得到差异基因,设置筛选条件为 $\log_2 FC \geq 1$ 或 ≤ -1 (差异表达上调或下调2倍以上)且 $P < 0.01$,最终将出现在2个以上GSE数据集中的基因作为所得差异基因的结果。将筛选得到的差异基因导入String(<https://www.string-db.org>)平台构建差异基因可能的相互作用关系图,并将此作用关系图导入Cytoscape 3.8.0进行拓扑分析,以2倍degree中位数为条件筛选得到核心Hub网络,以“degree”“closeness”和“betweenness”中位数为卡值筛选得到核心靶点,以此作为核心疾病基因上传至中药药效预测平台构建疾病网络。

1.2 基于中药药效预测平台的药物扰动评分

基于中药药效预测平台 (<http://47.92.232.154:100/>) 进行小柴胡汤对 SLE 与 GN 疾病网络的扰动。具体操作如下:选择输入药材进行靶标预测,输入小柴胡汤药材拼音名;选择要干预的疾病网络即 SLE 与 GN 疾病网络;设定疾病网络中蛋白质相互作用的卡值为 0.5,设定分析参数 p . adjust 为 0.5、富集比为 3;点击提交。

1.3 方法学验证

基于文献报道搜集临床常用的用于治疗 SLE 与 GN 的上市西药,通过 ChEMBL 数据库 (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>) 获得上市西药的成分信息^[15],并搜集药物的靶点,基于中药药效预测平台进行上市西药对疾病网络的扰动。具体操作如下:选择输入药物自定义靶标,输入每个西药的前 250 个靶点,选择自定义网络,手动输入节点,输入自定义网络名称以及自定义网络中的节点即最终得到的疾病关键靶点;设定疾病网络中蛋白质相互作用的卡值为 0.5;设定分析参数 p . adjust 为 0.5、富集比为 3;点击提交。利用 z-Score 模型将小柴胡汤对疾病的扰动评分进行校正,模拟与上市西药的药效对比。

1.4 GO 功能富集分析与 KEGG 通路分析

利用 metascape (<http://metascape.org/gp/index.html>) 进行疾病网络基因的生物学过程 (biological process, BP) 分析并将疾病网络可视化,利用 Cy-

toscape 3.8.0 中的 ClueGO 插件,通过输入小柴胡汤干预 SLE 与 GN 疾病的潜在靶点及共同靶点,设置物种为“homo sapiens”,阈值 $P \leq 0.05$,进行 GO 分析和 KEGG 分析。

2 结果

2.1 SLE 与 GN 疾病网络可视化

基于 GEO 公共数据库,按照上述步骤搜集、分析并筛选,最终到 SLE 患者的皮肤 4 个样本数据集 GSE148810、GSE109248、GSE95474、GSE81071,GN 患者肾脏的 12 个疾病样本数据集 GSE116626、GSE115857、GSE133288、GSE108112、GSE108109、GSE104066、GSE113342、GSE93798、GSE32591、GSE35488、GSE35487、GSE104948。通过差异基因分析并选择在至少 2 个研究 ID 内出现的基因,最终得到 SLE 相关的 714 个差异基因、GN 相关的 1 293 个差异基因。通过蛋白互作分析及筛选得到 SLE 核心网络的 95 个差异基因和 GN 核心网络的 112 个差异基因,以此作为最终的疾病网络基因上传至中药药效预测平台用于后续分析。利用 metascape 进行疾病基因的 GO 富集分析,发现 SLE 疾病网络主要集中在先天性免疫应答的调节、适应性免疫应答、I 型干扰素信号通路、淋巴细胞活化、白细胞迁移、B 细胞增殖、参与免疫应答的白细胞活化、STAT 级联、B 细胞增殖等生物学功能 (见图 1);GN 疾病网络主要集中在免疫效应过程的调节、细菌和病毒的应答、细胞因子的生成、白细胞的迁移和分化、细

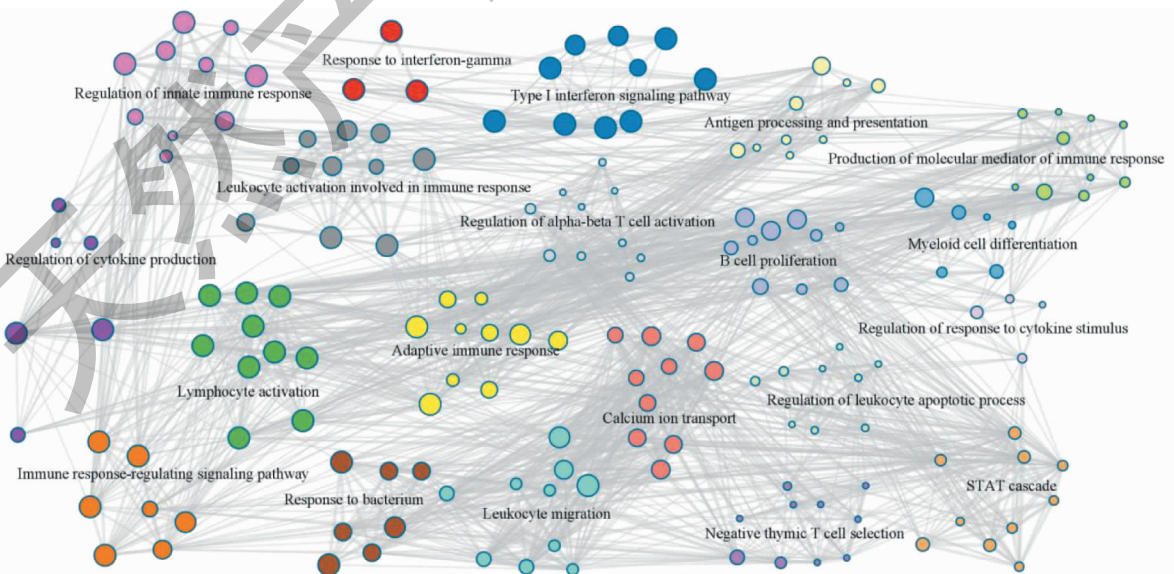


图 1 SLE 疾病网络中的节点参与的生物学功能

Fig. 1 Biological functions of node participating in the SLE disease network

胞因子-细胞因子受体相互作用、ERK1 和 ERK2 级联反应、细胞死亡的正调节等生物学功能(见图 2);且二者疾病网络生物学功能均富集在对细菌的反

应、白细胞迁移、对 γ -干扰素的反应、细胞因子生成的调节等条目。

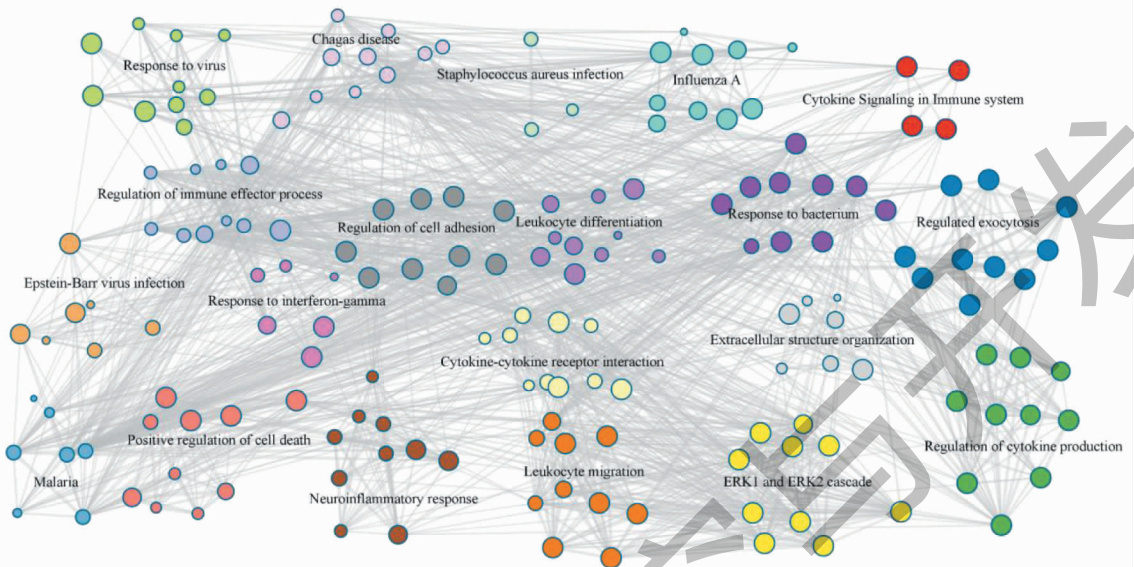


图 2 GN 疾病网络中的节点参与的生物学功能

Fig. 2 Biological functions of node participating in the GN disease network

2.2 上市西药与小柴胡汤对疾病网络的扰动评分

通过文献检索发现,临床用于治疗 SLE 的常用药物按照药理作用主要分为 3 类,分别是激素类、免疫抑制剂及抗疟药类^[16-18],本文选择抗疟药氯喹,激素类药物氢化可的松、可的松、泼尼松、泼尼松龙、甲泼尼龙、曲安奈德、倍他米松、地塞米松等,免疫抑制剂环磷酰胺、来氟米特、甲氨蝶呤、他克莫司、硫唑嘌呤等。临床用于治疗 GN 的常用药物按照药理作用主要分为 6 类,分别抗病毒药类、激素类、免疫抑制剂类、利尿剂、降血压药类、抗凝药类^[19,20]。本文选择抗病毒药利巴韦林、青霉素 G,激素类药物泼尼松、泼尼松龙、甲基泼尼松、地塞米松,免疫抑制剂环磷酰胺、他克莫司、硫唑嘌呤、苯丁酸氮芥,利尿剂甲苯唑啉磺胺、氯噻酮,降血压药缬沙坦,抗凝药类华法林、阿司匹林等。基于中药药效预测平台进行上市西药对 SLE、GN 疾病网络的扰动评分并按照扰动打分值进行排序(见表 1、2)。小柴胡汤中,大枣和甘草作为佐使药,其主要作用为调和药性,且基于平台算法,考虑到大枣和甘草会影响小柴胡汤对疾病网络的扰动评分,并不能真实反映小柴胡汤中君药、臣药对疾病网络的扰动情况,因此本文只分析小柴胡汤中除甘草、大枣外的药材即柴胡、黄芩、人参、半夏、生姜、药对(柴胡、黄芩)和组方(柴胡、黄芩、半

夏、人参、生姜)对疾病网络的扰动情况,且阳性药的设置也可为小柴胡汤中的各个药材对疾病网络的扰动评分提供参考和对照。

z 值(z -Score)又称标准分数(standard score),用公式表示为: $z = (x - \mu) / \sigma$ (x 为某实测值, μ 为平均数, σ 为标准差)。可将两组或多组数据转化为无单位的 z -Score 分值,使得数据标准统一化,将不同量级的数据转化为统一量度的 z -Score 分值进行比较。 z 值代表实测值和总体平均值之间的距离,以标准差为单位计算,大于平均数的实测值会得到一个正数的 z 值,小于平均数的实测值会得到一个负数的 z 值。

以上市西药对疾病网络的扰动评分值为总体,小柴胡汤对疾病网络的扰动评分为实测值,通过计算 z -Score 值进行比对。正数代表小柴胡汤对疾病网络的扰动优于上市西药,负数表示上市西药对疾病网络的扰动优于小柴胡汤。将小柴胡汤干预疾病网络的数据按照扰动评分进行排序(见表 3、4)。结果显示,黄芩、柴胡、生姜单味药材对 SLE 疾病网络的扰动评分优于上市西药,组方(柴胡、黄芩、半夏、人参、生姜)对 SLE 疾病网络的扰动略差于上市西药,黄芩、生姜、人参、柴胡、药对(柴胡、黄芩)、组方(柴胡、黄芩、半夏、人参、生姜)、半夏对 GN 疾病网

络的扰动均优于上市西药,综合分析结果说明小柴胡汤具有异病同治 SLE 与 GN 的作用。

2.3 GO 分析和 KEGG 分析

将小柴胡汤干预 SLE 疾病网络的 82 个潜在靶

点,小柴胡汤干预 GN 疾病网络的 77 个潜在靶点分别导入 Cytoscape 3.8.0 中的 ClueGO 插件进行 GO 分析和 KEGG 分析,只保留满足 $P < 0.05$ 的条目,结果如图 3、4、5、6 所示,相同颜色代表同类的生物

表 1 上市西药对 SLE 疾病网络的扰动评分

Table 1 Disturbance score of marketed western medicine on SLE network model

药物 Drug	中文名 Chinese name	英文名 English name	扰动评分 Disturbance score	
抗疟药 Antimalarial drug	氯喹	Chloroquine	6.70	
激素 Hormone	氢化可的松	Hydrocortisone	17.96	
	可的松	Cortisone	4.39	
	泼尼松	Prednisone	21.13	
	泼尼松龙	Prednisolone	10.80	
	甲泼尼龙	Methylprednisolone	3.28	
	曲安奈德	Triamcinolone acetomide	13.25	
	倍他米松	Betamethasone	4.92	
	地塞米松	Dexamethasone	21.19	
	免疫抑制剂 Immunosuppressant	环磷酰胺	Cyclophosphamide	2.67
		来氟米特	Leflunomide	5.10
甲氨蝶呤		Methotrexate	1.91	
他克莫司		Tacrolimus	9.52	
硫唑嘌呤		Azathioprine	2.35	

表 2 上市西药对 GN 疾病网络的扰动评分

Table 2 Disturbance score of marketed western medicine on GN network model

药物 Drug	中文名 Chinese name	英文名 English name	扰动评分 Disturbance score
抗病毒药 Antiviral drug	利巴韦林	Ribavirin	2.8
	青霉素 G	Benzylpenicillin	8.1
激素 Hormone	泼尼松	Prednisone	1.7
	泼尼松龙	Prednisolone	7.15
	甲基泼尼松	Methylprednisolone	6.6
	地塞米松	Dexamethasone	2.09
	免疫抑制剂 Immunosuppressant	环磷酰胺	Cyclophosphamide
他克莫司		Tacrolimus	6.58
硫唑嘌呤		Azathioprine	9.97
苯丁酸氮芥		Chlorambucil	5.87
利尿剂 Diuretic	甲苯噻唑磺胺	Metolazone	11.29
	氯噻酮	Chlorthalidone	1.69
降血压药 Antihypertensive drug	缬沙坦	Valsartan	3.71
抗凝剂 Anticoagulant	华法林	Warfarin	0.32
	阿司匹林	Aspirin	4.89

表3 小柴胡汤对 SLE 疾病网络的扰动评分并经 z-Score 规范化

Table 3 Normalized disturbance score based on z-Score of Xiaochaihu Decoction on SLE network model

中药 Traditional Chinese medicine	扰动评分 Disturbance score	z-Score	平均连接度 Average degree	平均最短路径 Average shortest path length	连接度中心性 Degree centrality	紧密度中心性 Closeness centrality
生姜	12.01	0.4 600 261	-0.99	4.33	-2.21	-4.48
黄芩	10.79	0.2 771 719	-0.26	4.35	-1.6	-4.58
柴胡	9.2	0.0 388 619	-1.04	1.84	-1.92	-4.4
半夏	8.82	-0.018 093	-0.52	1.6	-2.01	-4.68
柴胡、黄芩	7.05	-0.283 381	1.08	1.27	-2.45	-4.41
人参	6.9	-0.305 863	0.54	0.92	-1.93	-4.6
柴胡、黄芩、半夏、人参、生姜	5.95	-0.4 483	2.05	0.44	-3.12	-4.44

表4 小柴胡汤对 GN 疾病网络的扰动评分并经 z-Score 规范化

Table 4 Normalized disturbance score based on z-Score of Xiaochaihu Decoction on GN network model

中药 Traditional Chinese medicine	扰动评分 Disturbance score	z-Score	平均连接度 Average degree	平均最短路径 Average shortest path length	连接度中心性 Degree centrality	紧密度中心性 Closeness centrality
黄芩	15.75	3.4 157	-2.77	6.18	-2.11	-4.69
生姜	12.29	2.2 935	-0.87	4.57	-1.82	-5.04
人参	12.2	2.2 643	-0.5	4.83	-1.84	-5.03
柴胡	12.18	2.2 578	-0.84	4.15	-2.2	-5
柴胡、黄芩	11.65	2.0 859	-0.45	4.69	-1.49	-5.02
柴胡、黄芩 半夏、人参 生姜	7.74	0.8 178	1.45	2.73	-1.42	-5.05
半夏	7.28	0.6 686	1.39	1.89	-1.86	-4.92

过程和信号通路,显著性最高的结果用彩色颜色字体注释,以上图中只显示具有显著性意义的结果,小柴胡汤干预 SLE 与 GN 的靶点交集 Venn 图如图 7 所示。

GO 分析结果显示小柴胡汤治疗 SLE 的作用机制可能与淋巴细胞增殖 (lymphocyte proliferation)、适应性免疫应答的调节 (regulation of adaptive immune response)、细胞因子生物合成过程 (cytokine biosynthetic process)、白细胞增殖调节 (regulation of leukocyte proliferation)、细胞因子受体活性 (cytokine receptor activity)、I 型干扰素信号通路 (type I interferon signaling pathway)、病毒应答 (response to virus)、先天性免疫应答 (innate immune response) 等生物过程相关,参与的主要信号通路主要是原发性免疫缺陷 (primary immunodeficiency)、EB 病毒感染 (Epstein-Barr virus infection)、Toll 样受体信号通路 (toll-like receptor signaling pathway)、Th1 和 Th2 细胞分化 (Th1 and Th2 cell differentiation)、NF- κ B 信

号通路 (NF-kappa B signaling pathway)、JAK-STAT 信号通路 (JAK-STAT signaling pathway)、B 细胞受体信号通路 (B cell receptor signaling pathway) 等与免疫系统及炎症反应相关的信号通路。

小柴胡汤治疗 GN 的作用机制可能与模式识别受体信号通路 (pattern recognition receptor signaling pathway)、白细胞介导的免疫调节 (regulation of leukocyte mediated immunity)、神经炎症反应 (neuroinflammatory response)、病毒应答 (response to virus)、胶质细胞生成 (glial cell development)、细胞因子分泌负调控 (negative regulation of cytokine secretion)、ERK1 和 ERK2 级联调控 (positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade) 等为代表的生物过程相关,其中以模式识别受体信号通路、白细胞介导的免疫调节等为例的免疫和炎症反应相关的生物过程占比最高;参与的信号通路主要包括甲型流感 (influenza A)、TNF 信号通路 (TNF signaling pathway)、胞质 DNA 感应通路 (cytosolic DNA-sensing pathway)、军

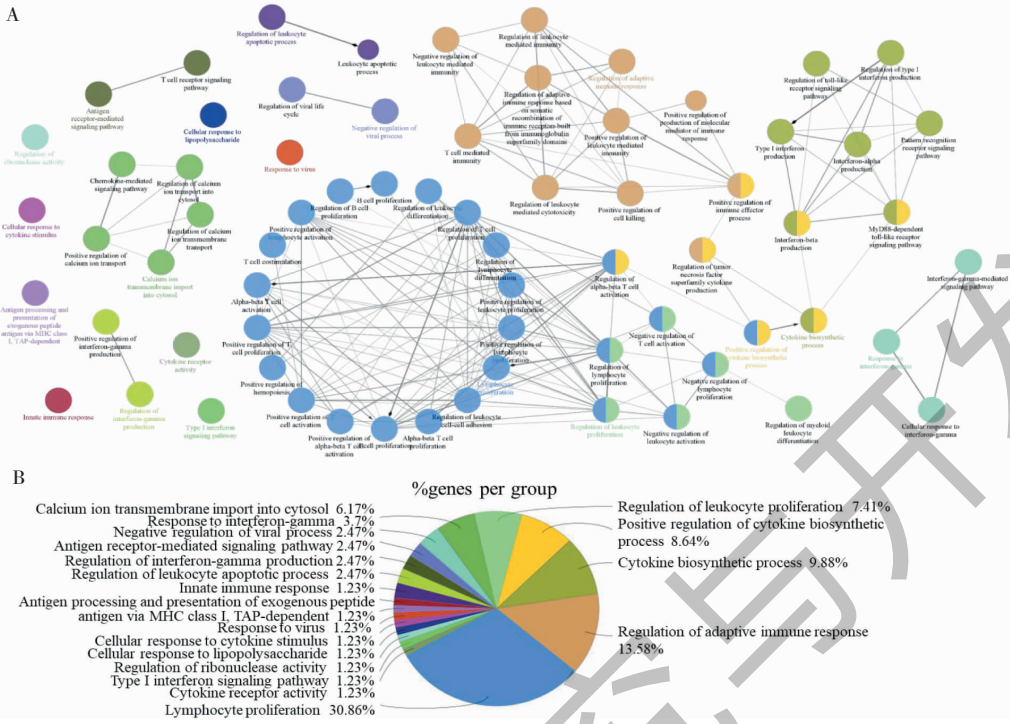


图3 小柴胡汤干预 SLE 疾病网络的潜在靶点的 GO 分析

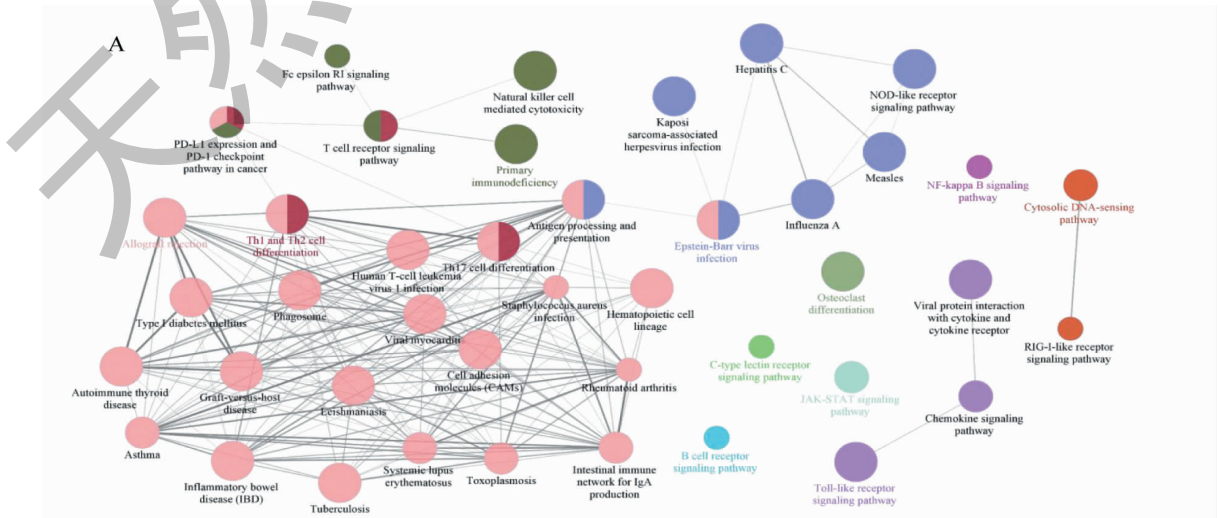
Fig. 3 Go analysis of potential targets of Xiaochaihu Decoction in SLE

注: A 代表 GO 分析的各个生物学过程, 相同颜色的代表相同的生物学过程; B 代表各个类生物学过程所占比例。Note: A represents the various biological processes analyzed by GO, and the same biological processes are in the same color; B represents proportion of each same category.

团菌病 (Legionellosis)、NF-κB 信号通路 (NF-kappa B signaling pathway)、HIF-1 信号通路 (HIF-1 signaling pathway) 等。

小柴胡汤异病同治 SLE 与 GN 共有 38 个交集靶点, 按照上述步骤对这 38 个靶点进行 GO 分析和 KEGG 通路富集分析, 结果如图 8、9 所示, 交集靶点见图 10 交集靶点的生物过程和 KEGG 通路交集见表 5。GO 分析结果显示小柴胡汤异病同治的作用

机制可能与细胞因子生物合成过程的正调控 (positive regulation of cytokine biosynthetic process)、α-干扰素生成的正调控 (positive regulation of interferon-alpha production)、髓样白细胞分化调节 (regulation of myeloid leukocyte differentiation)、神经炎症反应 (neuroinflammatory response)、细胞因子受体活性 (cytokine receptor activity) 等生物过程相关, 所参与的信号通路主要是胞质 DNA 感应通路 (cytosolic



续图 4 (Continued Fig. 4)

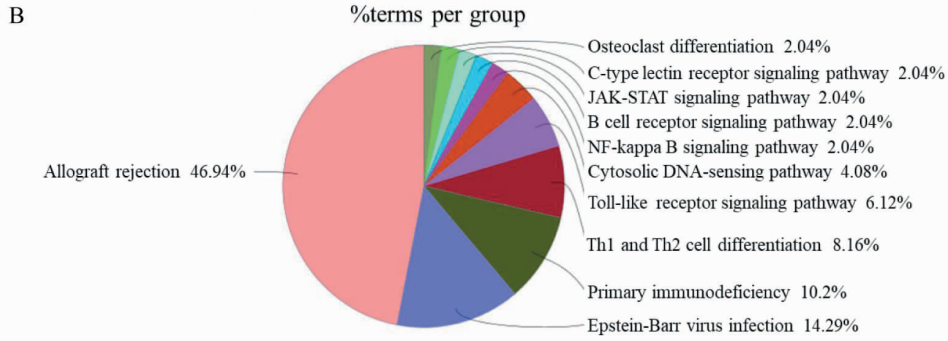


图4 小柴胡汤干预 SLE 潜在靶点的 KEGG 分析

Fig. 4 KEGG analysis of potential targets of Xiaochaihu Decoction in SLE

注:A 代表 KEGG 分析的各个通路,相同颜色的代表相同的通路大类;B 代表各个类通路所占比例。Note: A represents the various signaling pathways analyzed by KEGG, and the same signaling pathways are in the same color; B represents proportion of each same category.

DNA-sensing pathway)、人类对结核病的免疫反应 (human immune response to tuberculosis)、NOD 样受体信号通路 (NOD-like receptor signaling pathway)、

STAT3 信号通路的调节回路 (regulatory circuits of the STAT3 signaling pathway)、IL-3 信号通路 (IL-3 signaling pathway) 等。

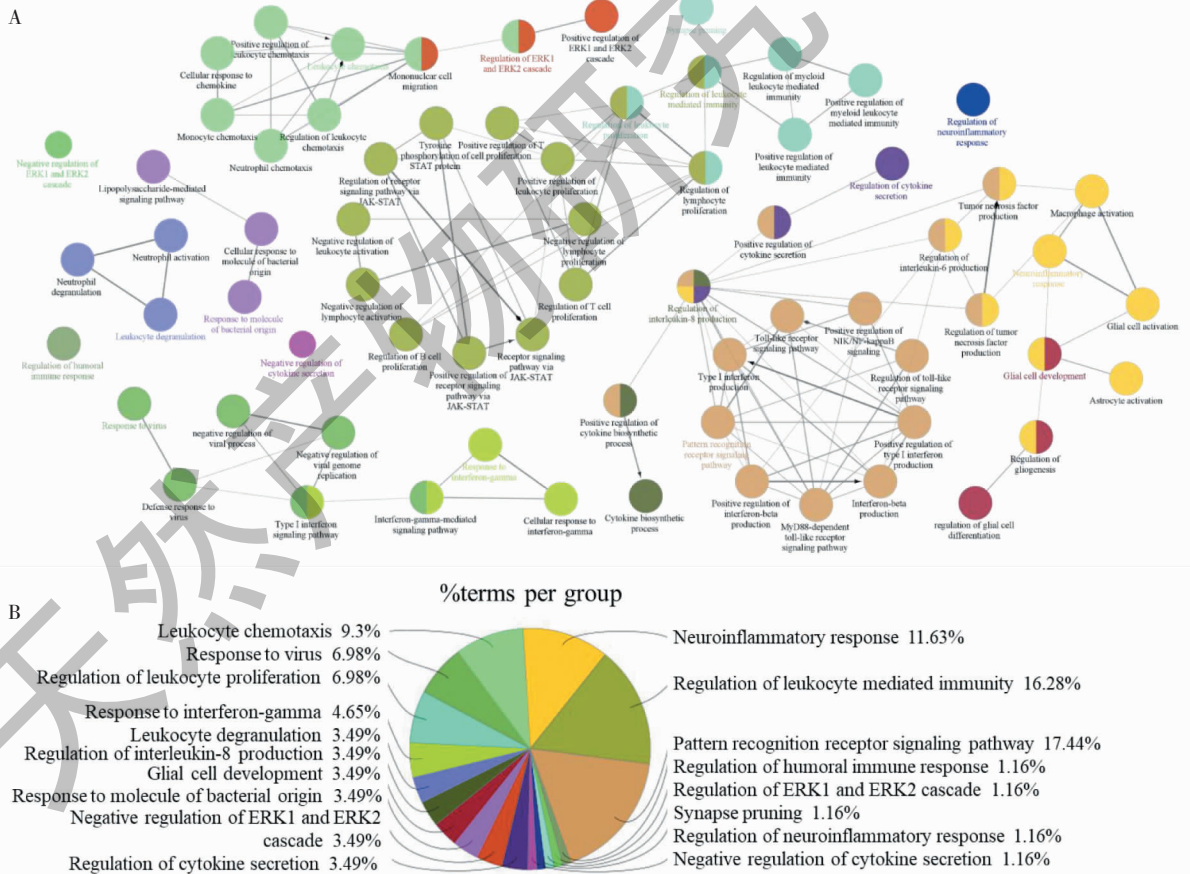


图5 小柴胡汤干预 GN 疾病网络的潜在靶点的 GO 分析

Fig. 5 GO analysis of Xiaochaihu Decoction in treatment of GN

注:A 代表 GO 分析的各个生物学过程,相同颜色的代表相同的生物学过程;B 代表各个类生物学过程所占比例。Note: A represents the various biological processes analyzed by GO, and the same biological processes are in the same color; B represents proportion of each same category.

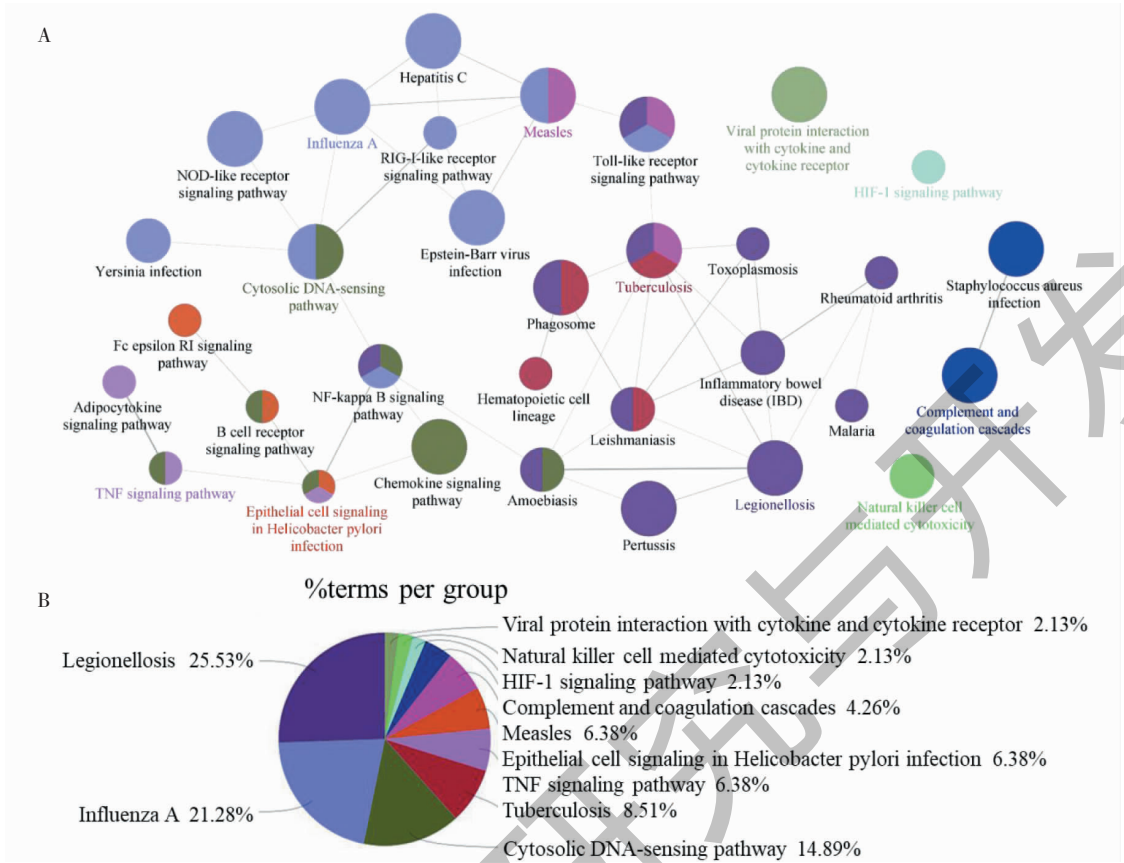


图 6 小柴胡汤干预 GN 潜在靶点的 KEGG 分析

Fig. 6 KEGG analysis of potential targets of Xiaochaihu Decoction in GN

注:A 代表 KEGG 分析的各个通路,相同颜色的代表相同的通路大类;B 代表各个类通路所占比例。Note: A represents the various signaling pathways analyzed by KEGG, and the same signaling pathways are in the same color;B represents proportion of each same category.

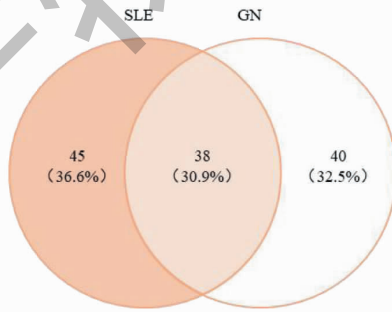


图 7 小柴胡汤干预 SLE 与 GN 疾病潜在靶点的交集 Venn 图

Fig. 7 The Venn diagram of Xiaochaihu Decoction in treating SLE and GN

3 讨论

SLE 和 GN 均为免疫系统异常导致的疾病,基于 GEO 数据库筛选发现 SLE 的靶器官众多:皮肤、肾脏、呼吸系统、心血管、神经系统和胃肠道等且致病因素复杂。二者的发病机制均涉及遗传、免疫系统的异常、炎症反应等^[19,21]。小柴胡汤干预 SLE 与 GN 及二者的交集靶点的 GO 分析和 KEGG 分析结

果与免疫炎症密切相关,如病毒过程的负调控、干扰素-β生成、对 γ-干扰素的反应、细胞对 γ-干扰素的反应、淋巴细胞增殖负调控、细胞因子生物合成过程的正调控、B 细胞增殖调节、I 型干扰素信号通路、干扰素 γ 介导的信号通路等生物过程,且可能是通过参与胞质 DNA 感应通路、NOD 样受体信号通路、B 细胞受体信号通路等信号通路介导的。

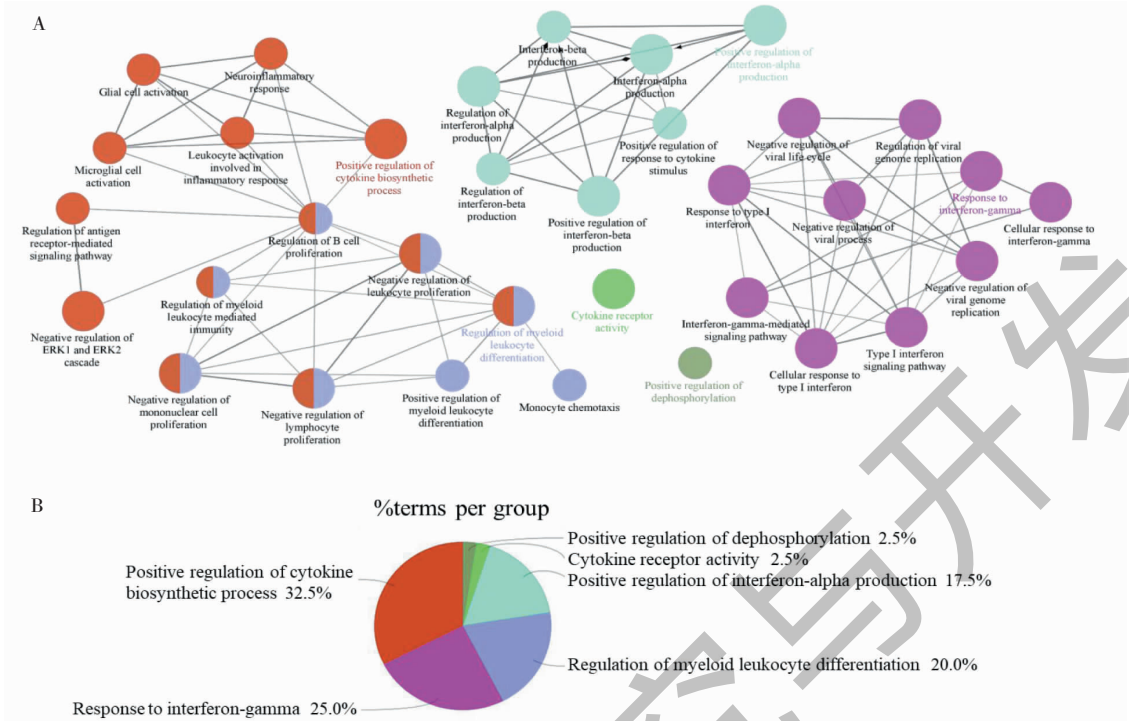


图 8 小柴胡汤异病同治 SLE 与 GN 交集靶点的 GO 分析

Fig. 8 GO analysis of targets of Xiaochaihu Decoction in treating SLE and GN

注:A 代表 GO 分析的各个生物学过程,相同颜色的代表相同的生物学过程;B 代表各个类生物学过程所占比例。Note: A represents the various biological processes analyzed by GO, and the same biological processes are in the same color; B represents proportion of each same category.

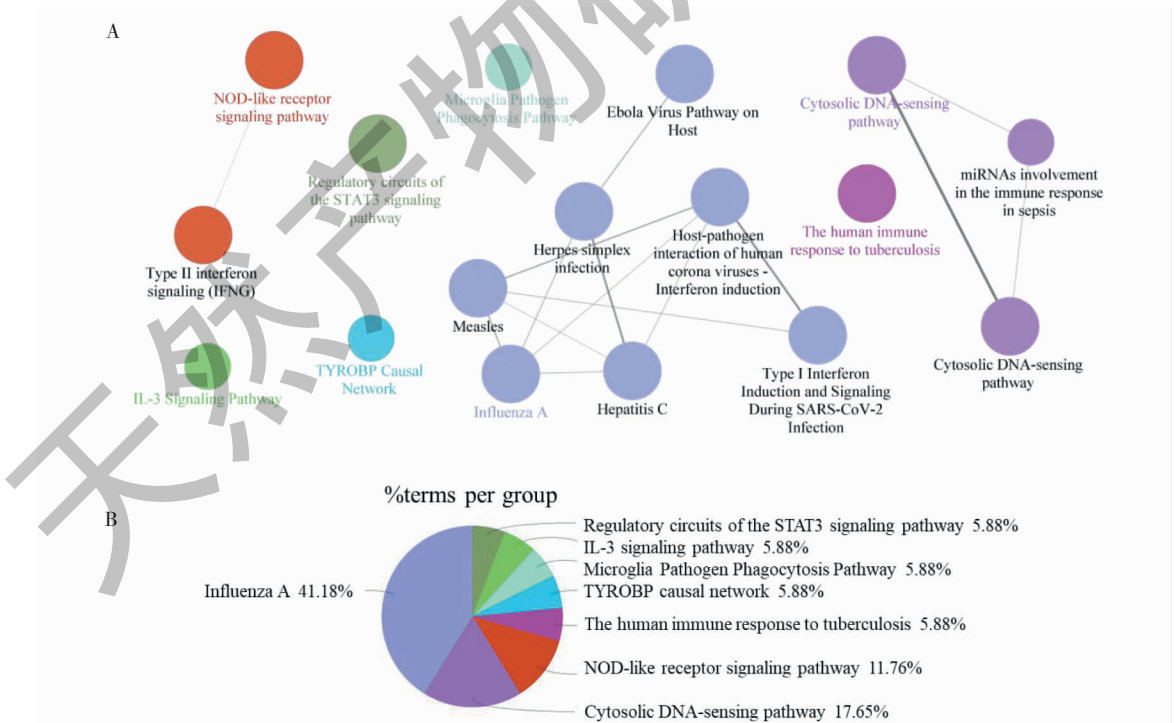


图 9 小柴胡汤异病同治 SLE 与 GN 交集靶点的 KEGG 分析

Fig. 9 The enriched pathways of targets of Xiaochaihu Decoction in treating SLE and GN

注:A 代表 KEGG 分析的各个通路,相同颜色的代表相同的通路大类;B 代表各个类通路所占比例。Note: A represents the various signaling pathways analyzed by KEGG, and the same signaling pathways are in the same color; B represents proportion of each same category.

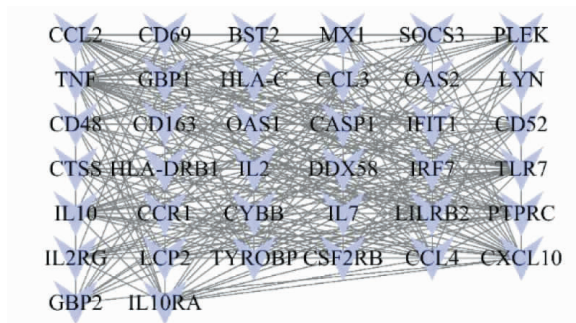


图 10 小柴胡汤干预 SLE 与 GN 的 38 个交集靶点

Fig. 10 The 38 targets that intersection in Xiaochaihu Decoction treating SLE and GN

表 5 SLE、GN、SLE 与 GN 交集靶点三者分析的生物过程和 KEGG 通路交集

Table 5 The intersection results of GO and KEGG pathways of Xiaochaihu Decoction in treating SLE, GN, SLE and GN

GO 生物过程分析 Gene ontology	KEGG 通路分析 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes analyze
Type I interferon signaling pathway	Cytosolic DNA-sensing pathway
Negative regulation of viral process	NOD-like receptor signaling pathway
Response to interferon-gamma	Hepatitis C
Cellular response to interferon-gamma	Measles
Interferon-gamma-mediated signaling pathway	Influenza A
Negative regulation of lymphocyte proliferation	
Interferon-beta production	
Positive regulation of cytokine biosynthetic process	
Regulation of B cell proliferation	

SLE 的 GO 分析和 KEGG 分析结果显示小柴胡汤可能通过参与淋巴细胞增殖、适应性免疫应答的调节、细胞因子生物合成过程等生物过程发挥治疗作用,而相关的信号通路包括同种异体移植排斥、EB 病毒感染、原发性免疫缺陷、Toll 样受体信号通路、Th1 和 Th2 细胞分化等。同种异体移植排斥会引起免疫系统的细胞免疫和体液免疫,主要免疫细胞是巨噬细胞,通过分泌炎症效应因子,增强适应性免疫应答,参与急性和慢性排斥反应^[22]。EB 病毒是一种 DNA 病毒,其主要靶器官除了 B 细胞和上皮细胞外,还会感染 T 细胞、NK 细胞和平滑肌细胞并具有致癌的能力^[23]。Toll 样受体信号通路在 SLE 的发病过程中发挥重要作用,研究表明,小鼠皮肤外用 Toll 样受体 7 (TLR7) 激动剂可诱导 SLE 疾病,出现肾小球肾炎等自身免疫性疾病导致的器官损害^[24]。

GN 的 GO 分析和 KEGG 分析结果显示小柴胡

汤可能通过参与模式识别受体信号通路、白细胞介导的免疫调节、白细胞增殖调节、神经炎症反应等与免疫和炎症相关的生物过程介导甲型流感、TNF 信号通路、胞质 DNA 感应通路、军团菌病 (Legionellosis)、NF- κ B 信号通路、HIF-1 信号通路等信号通路实现治疗。干扰素 (IFN) 信号通路是天然免疫的主要组成部分,在宿主抵抗病原体中发挥重要作用,临床研究发现活跃性 SLE 患者血液中单核细胞与干扰素调节和粒细胞生成相关的特定基因高表达,可通过抑制 IFN 表达发挥缓解疾病进程的作用^[25]。

数据分析显示小柴胡汤异病同治 SLE 和 GN 可能是通过细胞因子生物合成过程的正调控、髓样白细胞分化调节、对 γ -干扰素的应答以及 α -干扰素生成的正调节等生物过程发挥作用,与胞质 DNA 感应通路、NOD 样受体信号通路、人类对结核病的免疫反应、小胶质细胞病原体吞噬作用通路等免疫炎症类的信号通路密切相关。其中,胞质 DNA 感应通

路,哺乳动物细胞质中存在的 DNA 通过结合到一种名为 cGAS 的二聚体酶上,这种结合触发一种酶促反应,导致一种环状信号分子形成,进而会诱导被称作干扰素的免疫刺激蛋白合成,因此触发强大的先天免疫反应产生^[26],且胞质内不能及时清除的 DNA 会通过激活细胞内的抗病毒反应,参与 SLE 及 Aicardi-Goutieres 综合征的发生^[27];NOD 样受体主要包括 NOD1 和 NOD2,NOD1 和 NOD2 通过其富含亮氨酸的重复序列(leucine-rich repeats, LRRs)识别细菌成分,并通过下游效应器介导 NF- κ B 的激活,使促炎细胞因子释放,在细胞的炎症反应、免疫应答和应激反应等过程中起关键作用^[28,29]。

本文分析结果中 T/B 细胞功能和信号、NF- κ B 信号通路和 I 型干扰素信号通路等与临床研究中 SLE 及 GN 的潜在发病机制一致^[30],已获得批准上市的治疗 SLE 的药物贝利木单抗(Belimumab)是 B 细胞激活因子(B-cell activating factor, BAFF)的抑制性单克隆抗体^[31],BAFF 可促进 B 细胞成熟和分化,与自身免疫密切相关,在免疫应答中起重要作用。干扰素诱导的 GTP 结合蛋白 MX1,它的靶标病毒包括负链 RNA 病毒和 HBV^[32],临床研究中 MX1 可作为诊断外周血 SLE 以及肾脏中狼疮性肾炎活动的潜在标志物^[33]。通过分析发现 I 型干扰素信号通路、病毒过程的负调控、对 γ -干扰素的反应、干扰素 γ 介导的信号通路、淋巴细胞增殖负调控、干扰素 β 生成(interferon-beta production)、B 细胞增殖调节等生物过程和胞质 DNA 感应通路(cytosolic DNA-sensing pathway)、NOD 样受体信号通路(NOD-like receptor signaling pathway)、甲型流感(influenza A)等信号通路均出现在小柴胡汤干预 SLE、小柴胡汤干预 GN、小柴胡汤干预 SLE 与 GN 的交集靶点的 GO 分析和 KEGG 分析结果中(见表 5),说明小柴胡汤异病同治的潜在机制可能与这些密切相关,未来仍需进一步深入研究。

本文仍存在不足之处,本文采用的中药药效平台仍需进一步完善,目前还无法考虑到中药靶点对于疾病靶点的作用强度问题,对于甘草、大枣等成分靶点较多的中药,纳入后会干扰方中主药对疾病网络的扰动结果,因此对疾病靶点的预测中去掉了甘草、大枣这两味药。

综上所述,基于药效预测分析和生物信息学方法,本文以小柴胡汤“异病同治”SLE 和 GN 为范例,对柴胡类方异病同治的作用机理进行了系统分析,

证实小柴胡汤可通过作用于“免疫-炎症”相关的疾病环节发挥治疗 SLE 和 GN 的作用,可为今后深入研究小柴胡汤“异病同治”的作用机制提供参考和借鉴,为解释中药复方在疾病中的干预环节和作用机制奠定基础。

参考文献

- 1 Sheng X, Zou ZL. Effect of Xiaochaihu Decoction combined with interferon alpha on liver fibrosis of chronic hepatitis B and its influence on cellular immune status[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊),2018,36:2016-2018.
- 2 Ju F, Huang YL, Han LY, et al. Effect of Xiaochaihu Decoction combined with Gegen Qinlian Decoction on clinical prognosis and islet function in patients with type 2 diabetes mellitu[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊),2021,39(3):37-39.
- 3 Zhao ZX, Zhao ZM, Zhu YX, et al. Clinical study on treatment of subacute thyroiditis in acute stage with modified minor Xiaochaihu Decoction[J]. Henan Tradit Chin Med(河南中医),2018,38:1795-1798.
- 4 Tang TT, Shi BD, Chen XH, et al. Xiaochaihu Decoction on inflammatory factor and immune function when assisting chemotherapy for patients with advanced lung cancer[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊),2016,34:1759-1761.
- 5 Ding Y, Shi J. Observation of the clinical effect of Xiaochaihu Decoction in the treatment of pyogenic liver abscess[J]. Clin J Chin Med(中医临床研究),2020,12(21):66-67.
- 6 Li JY, Chen DJ, Yu Q. Clinical randomized controlled trail on enema and oral administration of small Radix Bupleuri Decoction in treatment of children acute respiratory infection [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊),2013,31:1442-1443.
- 7 Wang LM, Zhang LY, Gu S. Mechanism of reconciliation of Xiaochaihu Decoction regulating autoimmune disease [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊),2018,36(1):218-221.
- 8 Cai YH, Cai WF, Xiong D. Effect of Xiaochaihu Decoction on inflammation and proteinuria in patients with chronic glomerulonephritis[J]. Shaanxi J Tradit Chin Med(陕西中医),2018,39:1405-1407.
- 9 Zhang ZX, Liu CF, Liu MY, et al. Research progress on pharmacological action and clinical application of Xiaochaihu Decoction[J]. Clin J Tradit Chin Med(中医药临床杂志),2021,33:580-584.
- 10 Bai YW, Yang LS, Wei GM, et al. Observation on curative

- effect of Xiaochaihu Decoction in treating fever caused by upper respiratory tract infection [J]. *Shaanxi J Tradit Chin Med* (陕西中医), 2019, 40: 223-225.
- 11 Chen J, Han ZF, Fu YJ, et al. Effects of Xiaochaihu Decoction on expressions of IL-1 β , IL-6, p-p38 MARK and NF- κ B in hippocampus of Alzheimer's disease mice [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中华中医药学刊), 2020, 38 (12): 217-220.
- 12 Guo FF, Zhang W, Su J, et al. Prediction of drug positioning for Quan-Du-Zhong Capsules against hypertensive nephropathy based on the robustness of disease network [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 49.
- 13 Guo FF, Zhang YQ, Tang SH, et al. TCMATCOV--a bioinformatics platform to predict efficacy of TCM against COVID-19 [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2020, 45: 2257-2264.
- 14 Tang X, Tong L, Guo FF, et al. Analysis of potential role of Chinese classic prescriptions in treatment of COVID-19 based on TCMATCOV platform [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2020, 45: 3028-3034.
- 15 Gaulton A, Hersey A, Nowotka M, et al. The ChEMBL database in 2017 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45 (D1): D945-D954.
- 16 Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365: 2110-2121.
- 17 Zeng XF, Chen YL. 2020 Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of systemic lupus erythematosus [J]. *Chin J Intern Med* (中华内科杂志), 2020, 59 (3): 172-185.
- 18 Aringer M, Costenbader K, Daikh D, et al. 2019 European league against rheumatism/american college of rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus [J]. *Ann Rheum Dis*, 2019, 78: 1151-1159.
- 19 Chadban SJ, Atkins RC. Glomerulonephritis [J]. *Lancet*, 2005, 365: 1797-1806.
- 20 Satoskar AA, Parikh SV, Nadasdy T. Epidemiology, pathogenesis, treatment and outcomes of infection-associated glomerulonephritis [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16 (1): 32-50.
- 21 Kiriakidou M, Ching CL. Systemic lupus erythematosus [J]. *Ann Intern Med*, 2020, 172 (11): C81-C96.
- 22 Salehi S, Reed EF. The divergent roles of macrophages in solid organ transplantation [J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2015, 20: 446-453.
- 23 Hutt-Fletcher LM. Epstein-Barr virus entry [J]. *J Virol*, 2007, 81: 7825-7832.
- 24 Yokogawa M, Takaishi M, Nakajima K, et al. Epicutaneous application of toll-like receptor 7 agonists leads to systemic autoimmunity in wild-type mice; a new model of systemic Lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66: 694-706.
- 25 Bennett L, Palucka AK, Arce E, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood [J]. *J Exp Med*, 2003, 197: 711-723.
- 26 Andreeva L, Hiller B, Kostrewa D, et al. cGAS senses long and HMGB/TFAM-bound U-turn DNA by forming protein-DNA ladders [J]. *Nature*, 2017, 549: 394-398.
- 27 Stetson DB, Ko JS, Heidmann T, et al. Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity [J]. *Cell*, 2008, 134: 587-598.
- 28 Zheng C. The emerging roles of NOD-like receptors in antiviral innate immune signaling pathways [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 169: 407-413.
- 29 Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis [J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3: 371-382.
- 30 Ouyang Y. Study of chromatin accessibility associated with type 1 interferon signaling pathway in Systemic Lupus Erythematosus [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University (上海交通大学), 2018.
- 31 Navarra SV, Guzman RM, Gallacher AE, et al. Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus; a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. *Lancet*, 2011, 377: 721-731.
- 32 Haller O, Staeheli P, Schwemmler M, et al. Mx GTPases; dynamins-like antiviral machines of innate immunity [J]. *Trends Microbiol*, 2015, 23 (3): 154-163.
- 33 Shimizu Y, Yasuda S, Kimura T, et al. Interferon-inducible Mx1 protein is highly expressed in renal tissues from treatment-naive lupus nephritis, but not in those under immunosuppressive treatment [J]. *Mod Rheumatol*, 2018, 28: 661-669.