

基于数据挖掘和网络药理学研究强直性脊柱炎的 用药规律及高频药物组合的分子作用机制

姜平^{1,2},何东仪^{1,2*}

¹上海中医药大学光华临床医学院,上海 201203;²上海中医药大学附属光华医院风湿免疫科,上海 200050

摘要:基于数据挖掘及网络药理学分析方法,总结上海中医药大学附属光华医院风湿免疫科医师运用中药治疗强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)的用药规律。并对出现频率最高的药对进行网络药理学分析,进一步阐释其药理作用机制,为中药治疗 AS 提供一定的参考。本研究以上海中医药大学附属光华医院为主要研究中心,采用横断面调查研究方法,对就诊于光华医院风湿免疫门诊及住院部的 AS 患者进行信息采集,收集患者的基本信息、中药治疗处方等数据资料,并依托现代计算机信息技术,采用数据挖掘方法进行分析,并对得到的高频药对进行网络药理学分析。收集到中药处方 200 个,统计中药 236 味,使用频率 $\geq 1\%$ 的中药有狗脊、白术、独活等 28 味,主要是补虚药、清热药、活血化瘀药和祛风湿药;关联规则后得到频数 ≥ 40 的药物组合 33 个,其中狗脊-续断排名最高。网络药理学分析结果显示狗脊-续断共含有 12 个有效成分,对应作用蛋白 430 个;药物作用于疾病的主要基因包括 TNF、EGFR、VEGFA、STAT3、HSP90AA1、PTGS2、MMP2、MMP9、IL2 等。基因本体论(GO)生物过程分析和京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路分析显示主要参与炎症调控反应和配体激活的转录因子活性等多项进程,并通过癌症通路、Toll 样受体信号通路、神经营养素信号通路和 T 细胞受体信号通路等多条通路作用于 AS。上海中医药大学附属光华医院在治疗 AS 上采用补虚强脊为主,兼以清热、活血化瘀、祛风除湿的标本兼治方法,为进一步应用中医药治疗 AS 提供参考;网络药理分析表明狗脊-续断中 β -谷甾醇、山奈酚等成分可能通过 TNF、VEGFA、STAT3、PTGS2、MMP9、IL2 等靶点作用于癌症通路、Toll 样受体信号通路和 T 细胞受体信号通路等,从而发挥治疗 AS 的作用。表明中医药治疗疾病具有多成分、多靶点、多通路的特点,为后续临床应用提供了理论基础。

关键词:数据挖掘;聚类分析;因子分析;网络药理学;强直性脊柱炎

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)11-1947-12

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.11.016

Study on the drug rule of prescriptions and molecular mechanism of high frequency drug pairs in the treatment of ankylosing spondylitis based on data mining and network pharmacology

JIANG Ping^{1,2}, HE Dong-yi^{1,2*}

¹Guanghua Clinical Medical College, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

²Department of Rheumatology, Shanghai Guanghua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200052, China

Abstract: Based on the methods of data mining and network pharmacological analysis, the medication rule of rheumatism immunology physicians of Guanghua Hospital affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (TCM) in the treatment of ankylosing spondylitis was summarized. To explain the pharmacological mechanism, network pharmacology of the drug pairs with the highest frequency was analyzed, so as to provide some reference for the treatment of AS with TCM. This study took Guanghua Hospital affiliated to Shanghai University of TCM as the main research center, and adopted the method of cross-sectional investigation to collect the information of AS patients in the rheumatic immunology clinic and inpatient department of Guanghua Hospital. The basic information of the patients and the treatment prescription of TCM was collected. Relying

收稿日期:2022-03-25

接受日期:2022-05-18

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82074234);2021年度上海中医药大学“研究生创新培养专项”(Y2021076)

*通信作者 Tel:86-21-62805833-8185;E-mail:dongyihe@medmail.com.cn

on modern computer information technology, the data were analyzed by data mining. The obtained high-frequency drug pairs were analyzed by network pharmacology. 200 prescriptions of TCM were collected, and 236 kinds of herbs were collected. There were 28 herbs with frequency $\geq 1\%$, such as Rhizoma Cibotii, Rhizoma Atractylodis Macrocephalae and Radix Angelicae Pubescentis, mainly tonifying deficiency, clearing heat, activating blood stasis and dispelling wind and dampness. After association rules, 33 drug combinations with frequency ≥ 40 were obtained, of which Rhizoma Cibotii-Radix Dipsaci (RC-RD) ranked the highest. The results of network pharmacological analysis showed that there were 12 active components and 430 corresponding proteins, and the main genes included TNF, EGFR, VEGFA, STAT3, HSP90AA1, PTGS2, MMP2, MMP9, and IL2. Gene Ontology (GO) biological process analysis and Kyoto Encyclopedia of Gene and Genome (KEGG) pathway analysis showed that it was mainly involved in many processes such as inflammatory regulation and ligand-activated transcription factor activity, and acts on AS through pathways in cancer, toll-like receptor signaling pathway, neurotrophin signaling pathway and T cell receptor signaling pathway. Guanghua Hospital affiliated to Shanghai University of TCM mainly adopts the methods of tonifying deficiency and strengthening spine, clearing heat, promoting blood circulation and removing blood stasis, dispelling wind and removing dampness in the treatment of AS, so as to provide reference for the further application of TCM in the treatment of AS. Network pharmacology analysis showed that β -sitosterol and kaempferol may act on TNF, VEGFA, STAT3, PTGS2, MMP9, IL2 and other targets. And they can regulate multiple pathways such as cancer signaling pathway, toll-like receptor signaling pathway and T cell receptor signaling pathway. It indicates that TCM has the characteristics of multi-components, multi-targets and multi-pathways, which provides a theoretical basis for follow-up clinical application.

Key words: data mining; cluster analysis; factor analysis; network pharmacology; ankylosing spondylitis

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一种病因不明的慢性炎症性疾病。与其他系统性自身免疫性疾病不同,先天免疫系统和免疫细胞的异常活动起主导作用^[1]。在疾病发展过程中,AS易累及骶髂关节和中轴骨部位,最常见的症状是慢性背痛和脊柱僵硬,但外周和肌肉骨骼外的表现也很常见^[2]。在治疗上,非甾体抗炎药(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)仍然是一线药物治疗。作为二线药物,肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)抑制剂和白细胞介素-17(interleukin 17, IL-17)抑制剂是可用的^[3]。而最近 Janus 激酶抑制剂也显示出改善疾病症状的效果^[4,5]。虽然这些生物制剂在 AS 治疗上显示出良好的效果,但同时也存在许多不良反应。中医药传承几千年,有其自身独特的治疗优势。中医药专家一直致力于对 AS 治疗的不懈追求中,中医药在改善 AS 症状以及提高远期疗效方面有着独特的优势。上海中医药大学附属光华医院为三级甲等关节病专科医院,年门诊 23 万余人次,年出院 6 800 余人次,床位 153 张,是国内最大的风湿科之一,具有一定的研究优势。由于中医学为经验医学,且流派较多,在治疗 AS 疾病上用药无统一标准,中医药方又多为自拟方,缺乏现代药理学研究。因此,笔者采用数据挖掘技术^[6],探索院内风湿免疫科医师运用中药治疗 AS 的处方用药规律,分析出高频率使用的单味中药、药对以及高频率药物的四气五味、功效分类和归经规律等,并挖掘出新的药方,同时结合中药药理学分析,进一步阐释

中药治疗 AS 的分子作用机制,从而为中医药治疗 AS 疾病提供一定的理论基础和指导。

1 资料与方法

1.1 中药处方来源

本研究所需中药处方均来自上海中医药大学附属光华医院风湿免疫科门诊及住院部,患者就诊时间限定为 2021 年 4 月至 2022 年 2 月。

1.2 数据筛选

病种为强直性脊柱炎,中药处方数据完整且配伍合理。

1.3 数据录入

数据录入采用“人工双录入模式”,即 1 人录入、另 1 人核对,将筛选后符合条件的处方录入 Excel 2019 表格中。数据录入时以 2020 版《中国药典》^[7]为参考标准来规范中药名称,并同时录入中药的药味、药性、归经和功效。

1.4 数据分析

用 Excel 2019 数据透视表统计中药的药味、药性、归经和功效分类。用 SPSS Modeler 18.0 及 SPSS Statistics 20.0 软件对高频中药进行关联规则和系统聚类分析,得到高频药物组合并进行可视化展示。

1.5 狗脊-续断成分和作用蛋白获取

采用中药系统药理学数据库与分析平台(TCM-SP 数据库)和本草组鉴数据库(<http://herb.ac.cn/>)获取狗脊-续断的化学成分,根据化学成分的药动学参数(ADME),按照口服生物利用度(oral bio-availability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性(drug likeness, DL)

≥ 0.18 对其进行活性成分筛选,然后获取相应的成分作用蛋白,并利用 Uniprot 数据库对获得的基因蛋白进行名标准化处理。

1.6 AS 疾病基因的获取及药物-疾病核心基因的筛选

在疾病相关数据库 (GeneCards、TTD、Drug-Bank、DisGeNET、OMIM) 中分别以“ankylosing spondylitis”为关键词检索与 AS 相关的靶基因,限制靶基因物种类型为人类。然后对药物基因与疾病基因之间进行交集,交集基因通过 String 数据进行蛋白互作分析,并将结果导入 Cytoscape 3.7.2 中进行优化。

1.7 GO 富集分析与 KEGG 通路分析

将交集基因进行 GO 生物过程分析和 KEGG 通

路分析,结果得到相应的生物过程 (biological processes, BP)、细胞成分 (cellular components, CC)、分子功能 (molecular functions, MF) 条目和 KEGG 通路,以 $P \leq 0.05$ 为筛选标准,选出每个项目中符合条件的前 10 位。

2 结果

2.1 中药频次统计

本研究共纳入符合条件的处方 200 个,涉及中药 236 味,药物未被《中国药典》记录者,则不纳入统计。本研究共统计中药 236 味,总频次 3 232 次,其中使用频率 $\geq 1\%$ 的有狗脊、白术、独活、当归、续断等 28 味中药 (见表 1)。这些中药累计频次 1 742 次,占总频次的 53.90%,属于高频率使用中药。

表 1 频率 $\geq 1\%$ 的中药统计表

Table 1 Statistical table of TCM with frequency $\geq 1\%$

药名 Drug name	频数 Count	频率 Frequency(%)	药名 Drug name	频数 Count	频率 Frequency(%)
狗脊 Rhizoma Cibotii (RC)	121	3.74	陈皮 Pericarpium Citri Reticulatae (PCR)	55	1.70
白术 Rhizoma Atractylodis Macrocephalae (RAM)	118	3.65	威灵仙 Radix Clematidis (RCL)	53	1.64
独活 Radix Angelicae Pubescentis (RAP)	104	3.22	伸筋草 Herba Lycopodii (HL)	46	1.42
当归 Radix Angelicae Sinensis (RAS)	98	3.03	延胡索 Rhizoma Corydalis (RCo)	45	1.39
续断 Radix Dipsaci (RD)	92	2.85	羌活 Rhizoma et Radix Notopterygii (ReRN)	44	1.36
川芎 Rhizoma Ligustici Chuanxiong (RLC)	82	2.54	炙甘草 Radix Glycyrrhizae Preparata (RGP)	44	1.36
茯苓 Poria Cocos Wolf (PCW)	79	2.44	莪术 Rhizoma Curcumae (RCu)	43	1.33
甘草 Glycyrrhizae Radix et Rhizoma (GReR)	79	2.44	鸡血藤 Caulis Spatholobi (CS)	43	1.33
黄芪 Radix Astragali seu Hedysari (RAsh)	79	2.44	木瓜 Fructus Chaenomelis (FC)	42	1.30
牛膝 Achyranthis Bidentatae Radix (ABR)	68	2.10	苍术 Rhizoma Atractylodis (RA)	36	1.11
薏苡仁 Semen Coicis (SC)	63	1.95	黄柏 Cortex Phellodendri (CP)	36	1.11
白芍 Radix Paeoniae Alba (RPA)	57	1.76	绵萆薢 Rhizoma Dioscoreae Septemlobae (RDS)	34	1.05
丹参 Radix Salviae Miltiorrhizae (RSM)	57	1.76	山药 Rhizoma Dioscoreae (RDi)	34	1.05
槲寄生 Viscum Angulatum Heyne (VAH)	57	1.76	杜仲 Cortex Eucommiae (CE)	33	1.02

2.2 药味、药性、归经及功效分类统计

对 236 味中药进行分析,结果发现:在药味分析中,苦、甘、辛三味居前三位,累计频率为 85.68%;在药性分析中,温、平、寒三性为主,累计频率为

73.31%;在药物归经分析中,主要归于肝、肺、脾、胃、肾经,累计频率为 76.91%;在药物功效分析中,补虚药、活血化瘀药、清热药、解表药和祛风湿药为常用药 (见表 2、表 3)。

表2 中药药味、药性及归经统计表

Table 2 Statistical table of TCM's taste, property and channel tropism

药味 Taste	频数 Count	频率 Frequency (%)	药性 Drug property	频数 Counts	频率 Frequency (%)	归经 Channel tropism	频数 Count	频率 Frequency (%)
苦 Bitter	112	30.27	温 Warm	63	26.69	肝 Liver	131	22.74
甘 Sweet	106	28.65	平 Calm	59	25.00	肺 Lung	82	14.24
辛 Pungent	99	26.76	寒 Cold	51	21.61	脾 Spleen	81	14.06
酸 Sour	17	4.59	微寒 Slightly cold	31	13.14	胃 Stomach	78	13.54
咸 Salty	14	3.78	微温 Slightly warm	17	7.20	肾 Kidney	71	12.33
淡 Tasteless	12	3.24	凉 Cool	8	3.39	心 Heart	52	9.03
涩 Astringent	10	2.70	热 Hot	5	2.12	大肠 Large intestine	27	4.69
			大热 Great heat	1	0.42	膀胱 Bladder	26	4.51
			大寒 Great cold	1	0.42	胆 Biliary	17	2.95
						小肠 Small intestine	8	1.39
						三焦 Triple warmer	2	0.35
						心包 Pericardium	1	0.17

表3 中药功效分类统计表

Table 3 Statistical table of TCM with efficacy

功效 Function	频数 Count	频率 Frequency (%)	功效 Function	频数 Count	频率 Frequency (%)
补虚药 Restorative CHMs	40	16.95	平肝熄风药 CHMs for calming the liver and stopping endogenous wind	10	4.24
清热药 CHMs for clearing interior heat	32	13.56	安神药 Tranquillizers	7	2.97
活血化瘀药 CHMs for invigorating circulation and removing blood stasis	23	9.75	化湿药 CHMs for removing dampness	7	2.97
祛风湿药 CHMs for dispelling wind and dampness	23	9.75	消食药 CHMs for relieving food retention	6	2.54
利水渗湿药 CHMs for promoting water and dampness	22	9.32	温里药 Warming interior CHMs	4	1.69
解表药 CHMs for relieving exterior syndromes	18	7.63	止血药 Hemostatic CHMs	4	1.69
理气药 CHMs for regulating qi	13	5.51	泻下药 Cathartic CHMs	2	0.85
化痰止咳平喘药 Phlegm resolving, antitussive and antiasthmatic CHMs	12	5.08	攻毒杀虫止痒药 CHMs for attacking poison, killing insects and relieving itching	1	0.42
收涩药 Astringent CHMs	11	4.66	开窍药 Resuscitative CHMs	1	0.42

2.3 中药聚类分析

将使用频率 $\geq 1\%$ 的28味中药运用SPSS Statistics 20.0软件采用平均联接(组间)和Pearson相关

性进行系统聚类分析,生成树状聚类图(见图1)。在中医理论指导下,以类间距为21,将药物分为6类。I类:苍术、黄柏、绵萆薢、薏苡仁、丹参;II类:

狗脊、续断、独活、威灵仙、莪术、炙甘草;Ⅲ类:伸筋草、木瓜、槲寄生、羌活、白术、黄芪、鸡血藤、延胡索;

Ⅳ类:茯苓、陈皮、山药;Ⅴ类:甘草、牛膝、白芍;Ⅵ类:当归、川芎、杜仲。

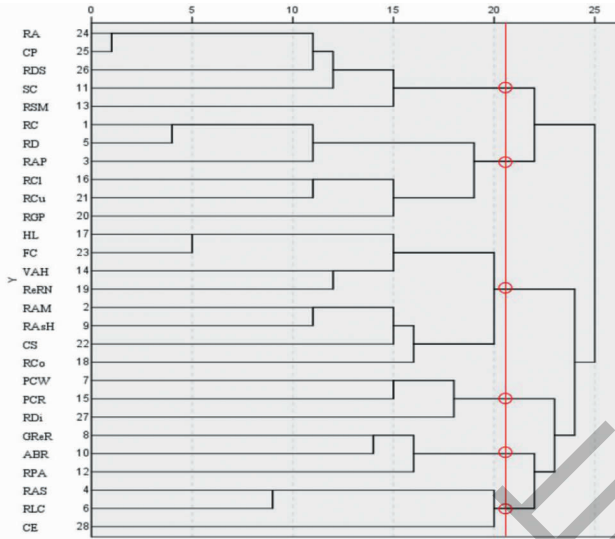


图1 药物聚类图

Fig. 1 Clustering diagram of TCM

2.4 中药关联规则分析

运用 SPSS Modeler 18.0 软件对高频中药进行关联规则分析,设置“弱链接上限”为 20,“强链接下限”为 35,结果得到频数≥40 的药物组合 33 个(见表 4)。按频数排名前 10 位的药物组合(强链接组合)依次是狗脊-续断、独活-狗脊、白术-狗脊、独活-续断、白术-独活、白术-黄芪、白术-续断、川芎-当归、

白术-当归、当归-狗脊。药物间的关联通过网络图进行展示(见图 2)。然后利用 Apriori 建模进一步挖掘药物之间的配伍关系,设置支持度为 10%,置信度为 90%,调整最大前项数为 5,分析挖掘出潜在药物组合。按照支持度排名,结果得到 10 个核心药物组合(见表 5)。其中独活、狗脊、续断、白术在多个药物组合中频繁出现,因此是中药关联规则网络的核心药物。

表 4 频数≥40 的药物组合

Table 4 Drug combinations with count ≥40

序号 No.	药物组合 Drug combination	频数 Count	序号 No.	药物组合 Drug combination	频数 Count
1	RC-RD	89	19	RC-VAH	47
2	RAP-RC	85	20	RCI-RD	44
3	RAM-RC	82	21	RAS-RAsH	44
4	RAP-RD	70	22	RAS-GRaR	44
5	RAM-RAP	69	23	RAM-VAH	43
6	RAM-RAsH	67	24	RAM-RLC	42
7	RAM-RD	65	25	RAP-RAsH	42
8	RLC-RAS	65	26	GRaR-ABR	42
9	RAM-RAS	62	27	RAM-GRaR	42
10	RAS-RC	56	28	RC-SC	42
11	RC-RAsH	54	29	RAsH-RD	41
12	RAM-PCW	50	30	RAS-PCW	41
13	RAS-RAP	49	31	PCW-GRaR	41
14	RC-RCI	48	32	RAM-PCR	41
15	RAS-RD	47	33	PCW-RC	40
16	RAP-VAH	47			

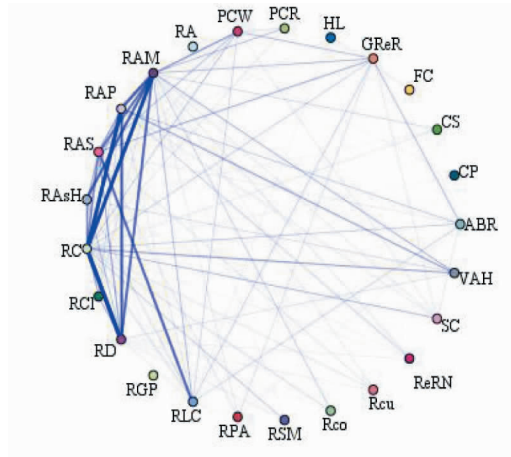


图 2 药物关联网络图

Fig. 2 Drug association of network diagram

表 5 中药关联规则分析

Table 5 Analysis of association rules of TCM

序号 No.	关联规则 Association rule	支持度 Support degree (%)	置信度 Confidence degree (%)	提升度 Upgrade degree
1	RAP-RC	52.00	81.73	1.35
2	RD-RC	46.00	96.74	1.60
3	RAP、RC-RD	42.50	80.00	1.74
4	RAsh-RAM	39.50	84.81	1.45
5	RD、RAP-RC	35.00	97.14	1.61
6	RAP、RAM-RC	34.50	89.86	1.49
7	RD、RAM-RAP	32.50	81.54	1.57
8	RD、RAM-RC	32.50	98.46	1.63
9	RD、RC、RAM-RAP	32.00	81.25	1.56
10	RAP、RC、RAM-RD	31.00	83.87	1.82

2.5 中药因子分析

应用 SPSS Statistics 20.0 软件对高频中药(使用频率 $\geq 1\%$)进行因子分析,结果显示 KMO 值为 $0.692 > 0.5$, Bartlett 球形度检验值为 378,且 P 值 < 0.01 ,表明本数据具有较好的线性关系,可进行因子分析。在方法中选择最大方差法旋转分析,结果得到 8 个公因子,其累积方差贡献率为 65.302%。由碎石图(见图 3)可以看出,从第 8 因子之后,线条趋势趋于平缓。经过因子分析,形成高频中药的旋转成分矩阵表(见表 6)。之后根据旋转成分信息表提取药物因子分析组合(见表 7),最后产生因子分析

图(见图 4)。

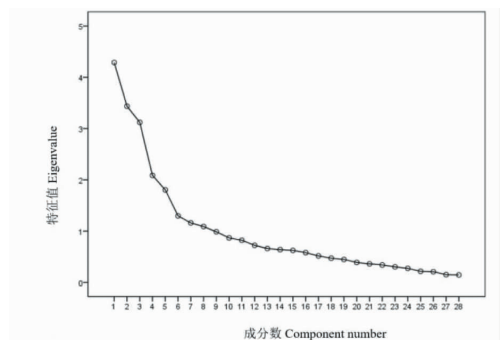


图 3 中药因子分析碎石图

Fig. 3 Lithotripsy by factor analysis of TCM

表6 高频中药的旋转成分矩阵表

Table 6 Rotational component matrix of high frequency TCM

药物 Drug	成分 Component							
	1	2	3	4	5	6	7	8
RC	0.212	0.387	0.631	0.247	-0.097	0.025	-0.217	0.062
RAM	-0.326	0.192	0.228	0.581	0.092	0.129	-0.206	0.056
RAP	0.066	0.049	0.807	0.031	-0.045	-0.037	-0.002	-0.124
RAS	-0.260	0.387	-0.015	0.082	-0.089	0.118	0.678	-0.003
RD	0.178	0.468	0.537	0.270	-0.315	-0.216	-0.098	-0.105
RLC	-0.103	-0.102	-0.163	0.075	-0.099	0.000	0.852	0.154
PCW	-0.068	-0.066	-0.228	0.169	0.735	0.132	0.143	0.068
GReR	0.147	-0.022	-0.429	0.086	0.014	0.560	0.178	-0.277
RAsH	-0.120	-0.118	0.026	0.736	-0.102	-0.117	0.013	0.114
ABR	0.412	-0.167	0.099	-0.202	0.108	0.455	0.408	-0.092
SC	0.536	-0.004	-0.057	0.015	0.314	0.247	-0.183	-0.127
RPA	-0.147	-0.167	-0.035	-0.174	-0.224	0.737	0.070	0.146
RSM	0.644	0.263	-0.236	0.119	0.038	-0.090	-0.010	0.074
VAH	-0.155	-0.385	0.559	0.254	-0.269	0.032	-0.117	0.249
PCR	-0.016	-0.036	0.049	0.271	0.417	0.483	-0.178	0.041
RCl	0.306	0.737	0.185	-0.003	0.107	-0.007	-0.002	-0.125
HL	-0.239	-0.209	-0.030	0.127	-0.636	0.270	0.192	0.075
RCo	0.040	0.119	0.131	0.576	-0.026	0.151	0.081	-0.196
ReRN	-0.309	-0.401	0.454	0.313	-0.123	-0.341	0.175	-0.282
RGP	-0.351	0.516	-0.022	-0.217	0.277	-0.284	-0.005	0.308
RCu	-0.154	0.767	0.000	0.049	0.093	-0.145	0.088	0.012
CS	0.007	-0.083	0.059	0.594	0.058	-0.138	0.129	0.177
FC	-0.247	-0.283	0.110	0.159	-0.710	0.116	0.160	-0.055
RA	0.730	-0.132	0.260	-0.325	0.148	0.030	-0.076	-0.083
CP	0.700	-0.090	0.305	-0.336	0.112	0.123	-0.089	-0.016
RDS	0.785	0.051	0.010	0.024	-0.059	-0.131	-0.071	0.011
RD _i	-0.041	0.315	-0.288	0.381	0.264	0.066	-0.172	0.117
CE	-0.016	-0.021	-0.055	0.166	0.041	0.038	0.133	0.857

表7 因子分析组合

Table 7 Combination of factor analysis

公因子 Common factor	因子分析组合 Combination of factor analysis
CF1	SC、RSM、RA、CP、RDS
CF2	RCl、RGP、RCu
CF3	RC、RAP、RD、VAH
CF4	RAM、RAsH、RCo、CS
CF5	PCW
CF6	GReR、RPA
CF7	RAS、RLC
CF8	CE

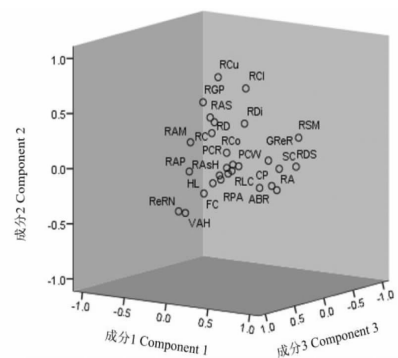


图4 中药因子分析旋转空间成分图

Fig. 4 Rotation space component diagram of factor analysis

2.6 新药物组合

综合上述研究结果,最终可以形成以“狗脊-续断”为核心的新配伍药物组合,包括组合 1:狗脊、续断、独活、威灵仙、莪术、炙甘草;组合 2:狗脊、续断、白术、独活;组合 3:狗脊、独活、续断、槲寄生。这些新药物组合有利于指导 AS 的临床治疗,之后的研究课题将对这些药物组合进行深层次的分子作用机制研究和实验验证。

2.7 狗脊-续断的成分和作用蛋白

根据第一部分数据挖掘结果,狗脊-续断药物组合使用频率最高,运用网络药理学方法进一步分析狗脊-续断治疗 AS 的具体作用机制。通过数据库筛选,结果获得狗脊-续断的有效成分 12 个(见表 8),获取基因 430 个。

2.8 疾病基因的获取和核心基因的筛选

共获得疾病基因 2 465 个,药物与疾病间的交集基因 125 个(见图 5),交集基因的 PPI 分析结果显示 TNF、EGFR、VEGFA、STAT3、HSP90AA1、PTGS2、MMP2、MMP9、IL2 等为主要作用蛋白(见图 6)。

2.9 GO 和 KEGG 分析结果

GO 分析结果显示 BP 主要包括炎症调控反应(inflammatory response)和药物反应(response to drug)等过程;CC 主要包括谷氨酸能突触(glutamatergic synapse)和内吞溶酶体(endolysosome)等结构;MF 主要包括核受体活性(nuclear receptor activity)和配体激活的转录因子活性(ligand-activated transcription factor activity)等功能(见图 7)。KEGG

表 8 狗脊-续断活性成分
Table 8 Active components of RC-RD

来源 Source	MOL ID	成分 Component
RC	MOL003389	3'-O-甲基香豌豆苷元 3'-O-Methylorobol
RC	MOL002608	绵马酚 Aspidinol
RC	MOL001945	佛手柑内酯 Bergapten
RC	MOL000448	异补骨脂甲素 Isobavachin
RC	MOL000422	山奈酚 Kaempferol
RC	MOL004328	柚皮素 Naringenin
RC	MOL003673	怀特酮 Wighteone
RD	MOL003152	龙胆根黄素 Gentisin
RD	MOL000358	β -谷甾醇 β -Sitosterol
RD	MOL009312	(-)-3,5-二咖啡酰奎宁酸 (<i>E,E</i>)-3,5-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid
RD	MOL008188	臭山羊碱 Japonine
RD	MOL009322	林生续断苷 III Sylvestroside III

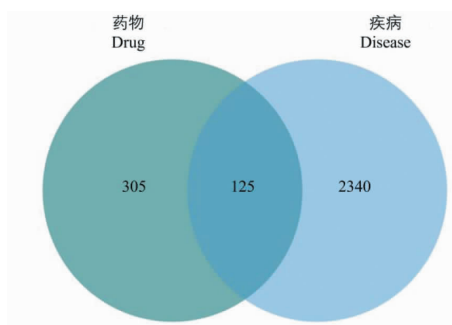


图 5 交集基因

Fig. 5 Intersection genes

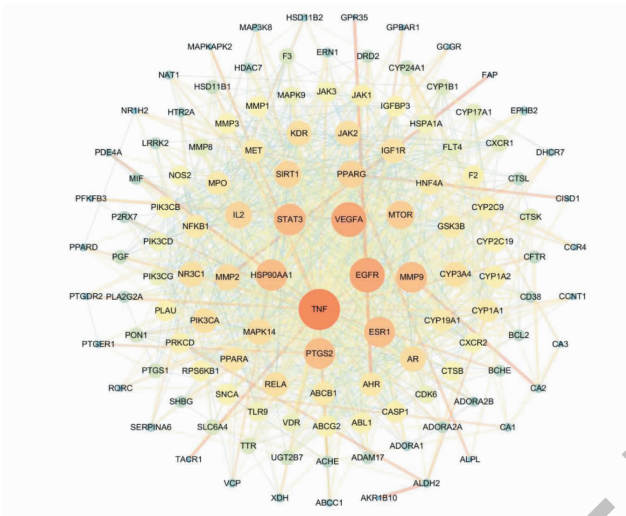


图6 互作分析

Fig. 6 Interaction analysis

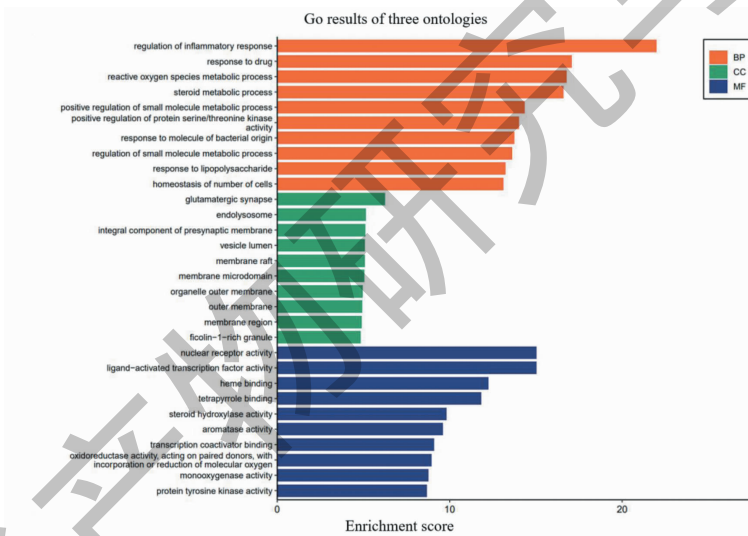


图7 GO 结果分析

Fig. 7 Analysis of GO results

通路主要包括:癌症通路 (pathways in cancer)、Toll 样受体信号通路 (toll-like receptor signaling pathway)、神经营养素信号通路 (neurotrophin signaling pathway) 和 T 细胞受体信号通路 (T cell receptor signaling pathway) 等 (见图 8), 表明狗脊-续断可能通过上述通路作用于 AS。并将富集在通路上的基因进行可视化分析, 绘制基因-通路关联网络图 (见图 9)。从图 9 可知, 一条 KEGG 通路可以富集到多个基因, 而一个基因又可以同时出现在多条通路上, 表明狗脊-续断是通过多成分、多靶点、多通路来治疗 AS 疾病。

3 讨论与结论

AS 的病因病机目前仍无法完全解释。现在中医普遍认为本病在早期是以邪实为主, 日久痰瘀互结, 阻滞督脉, 导致脊背僵硬不舒, 后期出现肝肾亏虚、督脉受损, 形成“早邪、中瘀、晚虚”的病理特点^[8]。中医药治疗 AS 历史悠久, 古代医家的治疗处方也是非常丰富。随着现代信息技术的发展, 利用网络数据库, 我们可以发现中医药治疗疾病的用药规律, 并总结出中药的药性、归经和功效等, 从中医学角度进一步研究疾病。

文章第一部分通过数据挖掘对本院治疗 AS 的

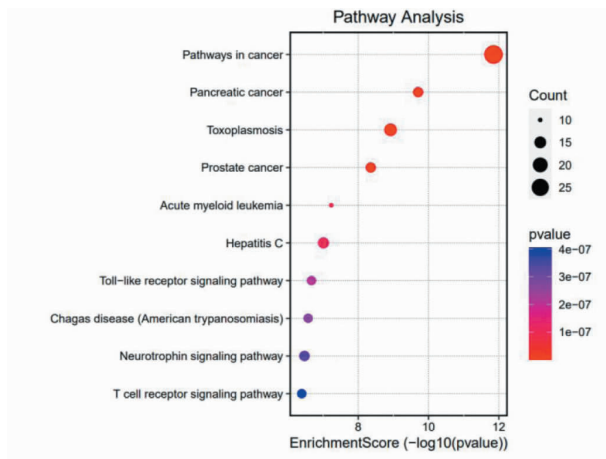


图8 KEGG 通路分析气泡图

Fig. 8 Bubble diagram of KEGG pathway

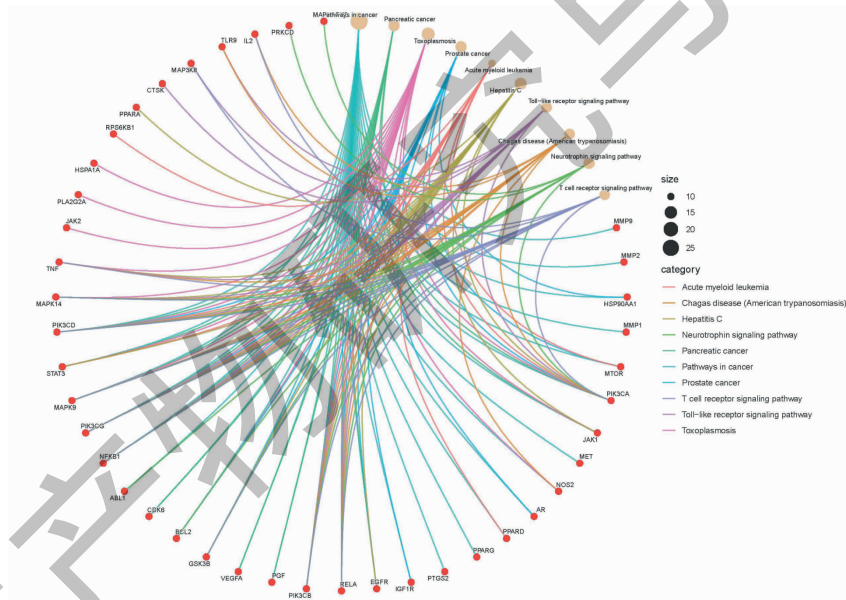


图9 基因-通路关联图

Fig. 9 Gene-pathway association's network

中药处方进行收集、整理。共收集处方 200 个,统计中药 236 味,结果发现现代医家在治疗 AS 上与古代医家用药基本相似^[9]。用药上以补虚药、活血化瘀药、清热药和祛风湿药为主,如狗脊祛风湿、补肝肾、强筋骨,续断补肝肾,当归活血化瘀,独活祛风除湿等。药味以苦、甘、辛为主,药性主要是温、平、寒,走行于肝、肺、脾、胃、肾等经络。中医理论认为肝主筋,肾主骨藏精,脾胃主运化,为后天之本。肝、肾、脾、胃功能正常,则精血充足,筋骨得以濡养后脊柱关节才能正常活动^[10]。之后对使用频率 $\geq 1\%$ 的高频率使用药物进行了聚类分析。结果则划分为 6

类,其中以祛风湿、活血化瘀和补肾强骨药为主。符合 AS 多以肝肾亏虚,督脉受损,并伴随久痹成瘀的病理特点^[11]。关联规则分析结果显示出排名较高的 33 对药物组合主要是补虚药、活血化瘀药和祛风湿药之间相互组合。像狗脊-续断、独活-狗脊、川芎-当归等,与高频率中药分析结果可以相互对应,证实了数据分析结果的可靠性。中药因子分析部分,则提取了 8 个公因子,如 CF1 是清热药、活血化瘀药和祛风湿药组合,CF2 是祛风湿药、补虚药和活血化瘀药组合,CF3 是祛风湿药和补虚药组合等。可以看出因子分析结果与关联规则分析结果基本吻合,

具有较高的准确性。

第二部分针对数据挖掘结果中发现的高频率药物组合狗脊-续断进行进一步的网络药理学分析,阐述狗脊-续断治疗 AS 的具体分子作用机制。药物成分分析发现,在狗脊-续断治疗 AS 中发挥主要作用的活性成分为 β -谷甾醇、山柰酚和柚皮素等,具有重要的药理作用。 β -谷甾醇属于植物甾醇类成分之一,属于四环三萜类化合物。 β -谷甾醇以其特有的生物学特性和物理化学性质被较多地应用到医药行业中。研究发现 β -谷甾醇具有重要的抗炎、抗氧化、抗肿瘤、促进创伤愈合和免疫调节作用,抑制肿瘤坏死因子的聚集与释放,主要用于心血管系统和肿瘤等疾病的治疗^[12,13]。此外,也有研究发现,山柰酚也具有抗炎、抗细菌病毒感染和免疫调节的作用。它能够能增强调节性 T 细胞的抑制功能,提高 FOXP3 的表达水平,并能预防和治疗 AS 等炎症性疾病^[14]。通过药理学分析可以发现,在狗脊-续断中存在多种具有抗炎、抗氧化和免疫调节作用的活性成分,这些成分是狗脊-续断发挥治疗 AS 作用的关键成分。每个药物成分都有自己的目标作用蛋白,为进一步阐述两者之间的关系,将成分与基因进行网络分析,得到了 TNF、EGFR、VEGFA、STAT3、HSP90AA1、PTGS2、MMP2、MMP9、IL2 等多个主要作用蛋白。像 TNF 在自身免疫性疾病和炎症性疾病中作用机制目前已经有很多报道,相关治疗药物也已经应用于临床治疗,且具有较好的疗效^[15,16]。PTGS2 是前列腺素生物合成中的关键酶,既是一种双加氧酶又是一种过氧化物酶。它常常参与机体的各种炎症反应,具有抑制炎症因子分泌和抗炎、镇痛的作用^[17,18]。此外,对 EGFR^[19]、STAT3^[20,21] 等基因的研究也有很多,不再详细阐述。综上分析,可以发现 TNF、EGFR、VEGFA、STAT3、HSP90AA1、PTGS2 等基因是狗脊-续断作用于 AS 的关键基因。后续的通路富集分析发现,这些关键基因主要富集在 Toll 样受体信号通路和 T 细胞受体信号通路等,并主要参与炎症调控反应、核受体活性和配体激活的转录因子活性等进程。研究表明,Toll 样受体是免疫应答的重要启动者,包括先天免疫应答和后天免疫应答。Toll 样受体内的基因多态性会导致某些相关的关键信号通路功能障碍,从而增加自身免疫性疾病的风险^[22],如调控 AS 的炎症反应^[23]。而 T 细胞在免疫反应上也发挥着重要的作用,它可以通过消除感染和肿瘤来帮助产生保护性免疫,或者通

过破坏宿主细胞来调控免疫和炎症反应。通过精确定位抗原特异性 T 细胞受体信号来调节 T 细胞反应,有可能从根本上改变自身免疫性疾病的治疗策略^[24]。综上所述,狗脊-续断中的 β -谷甾醇和山柰酚等重要活性成分通过 TNF、EGFR 和 PTGS2 等基因作用于 Toll 样受体信号和 T 细胞受体信号等通路发挥治疗 AS 的作用,体现了中医药治疗疾病多成分、多靶点、多通路的特点,并为应用数据挖掘的结果提供了更好的理论基础。

文章通过应用数据挖掘和网络药理学方法,对上海中医药大学附属光华医院在中医药治疗 AS 上的处方用药规律进行了总结分析,发现了狗脊-续断等常用药物组合。并对这一药物组合进行了分子作用机制的研究,直观地验证了狗脊-续断多成分、多靶点、多通路治疗 AS 的特点,体现了中医药治疗疾病的独特优势。此外,本研究也存在一些不足之处,部分医生开具中药时会完全依照协定处方,使收集的处方数据存在一定的局限性。而网络药理学分析也只是在理论上阐述出狗脊-续断治疗 AS 的分子作用机制,后续还需要进一步动物实验或细胞实验进行验证,从而完善研究。

参考文献

- 1 Mauro D, Thomas R, Guggino G, et al. Ankylosing spondylitis: an autoimmune or autoinflammatory disease? [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2021, 17: 387-404.
- 2 Schwartzman S, Ruderman EM. A road map of the axial spondyloarthritis continuum [J]. *Mayo Clin Proc*, 2022, 97: 134-145.
- 3 Jiang P, Wei K, Jin YH, et al. A brief discussion on the progress of ankylosing spondylitis-related biological agents [J]. *Rheu Arth* (风湿病与关节炎), 2021, 10: 60-64.
- 4 Navarro-Compán V, Sepriano A, El-Zorkany B, et al. Axial spondyloarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2021, 80: 1511-1521.
- 5 Robinson PC, van der Linden S, Khan MA, et al. Axial spondyloarthritis: concept, construct, classification and implications for therapy [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2021, 17: 109-118.
- 6 Zhong F, Yang W, Zhao C, et al. Research on the application of data mining technology in TCM medical records [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2020, 27: 141-144.
- 7 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典: 第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020:

- 42.
- 8 Wu C. On the standardization of TCM syndrome research of ankylosing spondylitis based on the theory of “Xu Xie Yu” [D]. Henan University of Traditional Chinese Medicine (河南中医药大学), 2016.
- 9 Jiang P, Wei K, Jin YH, et al. Study on the drug rule of ancient prescriptions in the treatment of ankylosing spondylitis and the related pharmacological analysis based on data mining and network pharmacology [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2021, 33:1769-1782.
- 10 Wu XH, Li M, Wang GM, et al. Effects of liver-adjusting therapy on improving the ability of spinal core muscles in ankylosing spondylitis [J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2021, 36:3754-3757.
- 11 Yang AJ, Sun WT, Hu LF, et al. Professor Yan Xiaoping's experience in treating ankylosing spondylitis with the method of promoting blood circulation and dredging collaterals [J]. J China-Japan Friendship Hosp (中日友好医院学报), 2020, 34:309.
- 12 Van Vo G, Guest PC, Nguyen TT, et al. Evaluation of anti-hepatocellular-cancer properties of β -sitosterol and β -sitosterol-glucoside from *Indigofera zollingeriana* Miq [J]. Methods Mol Biol, 2022, 2343:229-240.
- 13 Yang C, Chen ZY, Wong SL, et al. β -Sitosterol oxidation products attenuate vasorelaxation by increasing reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 [J]. Cardiovasc Res, 2013, 97:520-532.
- 14 Lin F, Luo X, Tsun A, et al. Kaempferol enhances the suppressive function of Treg cells by inhibiting FOXP3 phosphorylation [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 28:859-865.
- 15 Taurog JD, Chhabra A, Colbert RA. Ankylosing spondylitis and axial spondyloarthritis [J]. New Engl J Med, 2016, 374:2563-2574.
- 16 Min HK, Kim HR, Lee SH, et al. Retention rate and effectiveness of secukinumab vs TNF inhibitor in ankylosing spondylitis patients with prior TNF inhibitor exposure [J]. Rheumatology, 2021, 60:5743-5752.
- 17 Bowers RR, Delaney JR, Spyropoulos DD. Treating the disease, not the symptom: beyond NSAIDs [J]. Trends Cancer, 2020, 6:363-365.
- 18 Hsu PS, Lin CM, Chang JF, et al. Participation of NADPH oxidase-related reactive oxygen species in leptin-promoted pulmonary inflammation: regulation of cPLA2alpha and COX-2 expression [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20:1-15.
- 19 Harrison PT, Vyse S, Huang PH. Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer [J]. Semin Cancer Biol, 2020, 61:167-179.
- 20 Jo S, Won EJ, Kim MJ, et al. STAT3 phosphorylation inhibition for treating inflammation and new bone formation in ankylosing spondylitis [J]. Rheumatology, 2021, 60:3923-3935.
- 21 Liang T, Chen JR, Xu GY, et al. STAT3 and SPI1, may lead to the immune system dysregulation and heterotopic ossification in ankylosing spondylitis [J]. BMC Immunol, 2022, 23:3.
- 22 Zhang Y, Liu J, Wang C, et al. Toll-Like receptors gene polymorphisms in autoimmune disease [J]. Front Immunol, 2021, 12:672346.
- 23 Zhang J, Xu R, Wu L, et al. Expression and function of toll-like receptors in peripheral blood mononuclear cells in patients with ankylosing spondylitis [J]. Mol Med Rep, 2019, 20:3565-3572.
- 24 Matson CA, Singh NJ. Manipulating the TCR signaling network for cellular immunotherapy: challenges & opportunities [J]. Mol Immunol, 2020, 123:64-73.