

· 药理 ·

整合“转录组-基因调控网络”探讨白虎加桂枝汤君药石膏的性-效关联内涵

李玮婕, 毛霞, 刘毓东, 王可欣, 张彦琼*, 林娜*

(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:从“性-效”关联角度,采用“转录组-基因调控网络”整合研究策略,系统评价白虎加桂枝汤君药石膏在全方“热者寒之”药效作用中的贡献度和贡献形式。方法:20只雄性Lewis大鼠随机分为4组,每组5只:正常组、佐剂诱导型关节炎(AIA)热证模型组、AIA热证+白虎加桂枝汤组(BHGZT, 21.4 g·kg⁻¹)、AIA热证+白虎加桂枝汤去石膏拆方组(BHGZT-GYP, 10.7 g·kg⁻¹)。利用热痹经典动物模型-AIA热证大鼠来源的转录组表达谱数据,通过“病证基因-药物效应靶标”相互作用网络挖掘,预测石膏在白虎加桂枝汤干预热痹的主要作用环节。基于AIA热证大鼠模型从受累关节情况、关节临床积分、肿胀度、关节表面温度、疼痛阈值、关节损伤等疾病严重指标和病证结合指标情况,以及体内“免疫-炎症”失衡调节层面进行整体验证,并基于体外3T3-L1前脂肪细胞开展体外成脂实验验证。结果:白虎加桂枝汤君药石膏在干预热痹中的主要作用环节是调节机体能量代谢的紊乱和矫正“免疫-炎症”的失衡。动物实验观察可见,白虎加桂枝汤及其去石膏拆方均可显著缓解AIA热证大鼠受累关节红肿、畸形和疼痛等症状($P<0.01$),并抑制受累膝/踝关节损伤、滑膜炎、骨破坏等病理改变($P<0.05$),且全方作用明显优于去石膏拆方($P<0.05$)。机制研究表明,白虎加桂枝汤及其去石膏拆方可显著抑制AIA热证大鼠的胸腺/脾脏损伤和内脏指数($P<0.05$),并降低TLR4、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 及IL-18等炎症因子的表达($P<0.05$)。体外3T3-L1前脂肪细胞实验表明,与去石膏拆方组相比,白虎加桂枝汤全方能够更加显著地抑制脂肪细胞成脂,且单纯石膏对脂滴含量的抑制作用显著增强,表明石膏在全方抑制成脂中的重要作用。结论:白虎加桂枝汤君药石膏在全方缓解热痹相关的能量代谢紊乱和矫正“免疫-炎症”失衡中发挥着重要作用,这与其寒药性及其清热泻火的作用特点密切相关。

[关键词] 白虎加桂枝汤; 石膏; 热痹; “性-效”关联; 能量代谢; “免疫-炎症”平衡

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R684.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)01-0052-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20222245

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20221010.1141.002.html>

[网络出版日期] 2022-10-11 9:27

Exploration on Property-efficacy Association of Sovereign Drug Gypsum Fibrosum in Baihu Guizhitang by Integrating Transcriptomics with Gene Regulatory Network Analysis

LI Weijie, MAO Xia, LIU Yudong, WANG Kexin, ZHANG Yanqiong*, LIN Na*

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

[Abstract] **Objective:** To systematically explore the roles and contributions of the sovereign drug Gypsum Fibrosum contained in Baihu Guizhitang (BHGT) against rheumatoid arthritis (RA) with heat syndrome from property-efficacy association by an approach integrating transcriptomics with gene regulatory network analysis. **Method:** A total of 20 male Lewis rats were randomly assigned into 4 groups: a control group ($n=5$), a group of adjuvant-induced arthritis rat model with heat syndrome (AIA-H, $n=5$), an AIA-H + BHGT

[收稿日期] 2022-06-06

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81630107);中国中医科学院科技创新项目(CI2021A03808, CI2021A01508)

[第一作者] 李玮婕,博士,从事抗炎免疫中药药理学研究, E-mail: wjli@icmm.ac.cn

[通信作者] *张彦琼,博士,研究员,从事中医药系统生物学研究, E-mail: yqzhang@icmm.ac.cn;

*林娜,博士,研究员,从事抗炎免疫中药药理学研究, E-mail: nlin@icmm.ac.cn

group (BHGZT, $21.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, $n=5$), and an AIA-H + BHGZT without Gypsum Fibrosum group (BHGZT-GYP, $10.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, $n=5$). We combined the gene expression profiling based on AIA-H rat model and "disease-gene-drug effective target" network analysis to predict the major function of Gypsum Fibrosum contained in BHGZT against RA with heat syndrome. Furthermore, *in vivo* experiments with the AIA-H rat model were performed to validate the therapeutic effects on the severity of arthritis based on the representative images of arthritis, limb diameter, infrared thermography, pain thresholds, and joint injury, as well as at the level of immunity-inflammation imbalance. Oil Red O staining was employed for the differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes in the AIA-H rats treated by BHGZT, BHGZT-GYP, and GYP. **Result:** Gene expression profiling and network analysis demonstrated that Gypsum Fibrosum mainly regulated the energy metabolism disorders and the immunity-inflammation imbalance during the development and progression of RA. *In vivo* experiments showed that both BHGZT and BHGZT-GYP reduced the disease severity of AIA-H rats ($P<0.01$) by relieving joint redness and distortion, decreasing arthritis score and limb diameter, elevating pain thresholds, alleviating joint erosion, joint inflammation, and bone destruction ($P<0.05$). Notably, BHGZT outperformed BHGZT-GYP ($P<0.05$). Both BHGZT and BHGZT-GYP inhibited the pathological changes and decreased the indexes of thymus and spleen ($P<0.05$), and down-regulated the expression of inflammatory cytokines including Toll-like receptor 4 (TLR4), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-12, IL-1 β , and IL-18 ($P<0.05$). In addition, BHGZT and GYP significantly inhibited the adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells, with the performance superior to that of BHGZT-GYP. **Conclusion:** The sovereign drug Gypsum Fibrosum contained in BHGZT played a crucial role in reversing energy metabolism disorders and immunity-inflammation imbalance, which may be associated with its cold property and function of clearing heat and purging fire.

[Keywords] Baihu Guizhitang; Gypsum Fibrosum; heat arthralgia; association of property and efficacy; energy metabolism; immunity-inflammation balance

类风湿关节炎(RA)为临床常见的、以慢性滑膜炎为特征的全身性自身免疫病,往往导致受累关节的肿胀、疼痛、畸变和功能下降等^[1]。现代医学的治疗手段主要分为药物治疗和手术治疗,其中,常用药物包括:风湿病情改善药物(DMARDs)、非甾体抗炎药物(NSAIDs)、糖皮质激素类药物及生物制剂,上述药物主要缓解疼痛、防止关节损伤和缓解疾病进展的作用^[2],但常引发恶心、脱发、肝毒性等不良反应^[3]。因而,亟需寻找一种高效、低毒、可替代的治疗方法。

素以整体观念、辨证论治为核心思想的中医药,具有疗效确切、药效持久、不良反应少、复发率低等特点^[4],临床治疗 RA 等慢性、复杂性疾病具有独特的优势。出自汉代张仲景《金匮要略》的白虎加桂枝汤是治疗热痹的代表方剂,由石膏、知母、桂枝、粳米和炙甘草 5 味中药组成,具有清热泻火、通络止痛之功效,治疗 RA 疗效确切^[5-7],尤以治疗风湿热痹(RA 热证)为佳^[7]。该方对早期炎症具有较好的拮抗效应,主要与调节“免疫-炎症”失衡相关^[8-10],其次与滑膜血管翳过度新生相关^[11]。方中君药石膏具有抑制解热、促进机体非特异性或者特异性

免疫功能、抗变态反应等功效^[12-13],可见其药性与功效具有密切地相关性。然而受限于当前研究方法条件,其“性-效”关联的内涵尚不明确。因此,本研究首先采用转录组表达谱数据挖掘、药物靶标预测及网络分析,考察白虎加桂枝汤君药石膏的“性-效”关联网络调控机制;并利用热痹经典动物模型-佐剂诱导型关节炎(AIA)病证结合大鼠模型,分别考察白虎加桂枝汤及其去石膏拆方对 AIA 热证疾病严重程度及病证特征指标的影响,并基于体外 3T3-L1 前脂肪细胞(国际公认的细胞脂质代谢研究模式细胞)考察白虎加桂枝汤、拆方组及单纯石膏对脂滴形成的影响,初步揭示石膏对于全方药效的贡献度和贡献形式,并阐释其“性-效”关联的生物内涵。

1 材料

1.1 药品及试剂 白虎加桂枝汤药材(石膏 60 g、知母 15 g、炙甘草 5 g、桂枝 30 g 及粳米 30 g)均购自北京同仁堂,经中国中医科学院中药研究所刘颖研究员鉴定为合格药材;M tuberculosis H37 Ra 灭活结核杆菌(美国 BD 公司,货号 231141);苏木素、伊红染色液(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 ZLI-9610、ZLI-9613);青霉素/链霉素原液

(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司, 货号PS2004HY);大鼠Toll样受体4(TLR4)、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-6、IL-12、IL-1 β 、IL-18酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司, 货号分别为ml003365-C、ml002859-C、ml102828-C、ml037370-C、ml037361-C、ml002816-C);油红O染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司, 货号G1262)。

1.2 仪器 Model 390型热辐射疼痛测试仪(美国IITC Life Science公司);980-02546-00型触觉测量套件(丹麦全球有限责任公司);RS0800604-0063型微计算机断层扫描(Micro-CT, 美国GE healthcare公司);Novocyte 2040R型流式细胞分析仪(北京艾森思科技有限公司);AE30/31型普通光学显微镜(日本尼康株式会社)。

1.3 动物与细胞 SPF级雄性Lewis大鼠20只, 6~8周龄, 体质量(200 $\pm$ 20)g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物合格证号SCXK(京)2016-0006。所有动物均按照相应规章制度饲养于中国中医科学院基础所实验动物中心, 实验动物许可证号SYXK(京)2021-0017。实验动物福利伦理审查号IBTCMCACMS21-2105-01。实验期间自由饮水, 固体饲料, 饲养在温度为(24 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C的恒温条件下, 光照/黑暗周期12 h。3T3-L1前脂肪细胞(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库/中国科学院), 传至4~9代进行实验, 按照常规培养于完全培养基中[基础培养基、10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素/链霉素原液], 于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的饱和湿度培养箱内孵育。

2 方法

2.1 AIA热证发病相关基因集和石膏候选靶标谱的收集和整理 利用本课题组前期研究获得的AIA热证与正常组大鼠受累关节滑膜组织的转录组表达谱芯片检测数据(GEO No.GSE189942)和外周血细胞样本的RNA测序数据(GEO No.GSE190523), 分别表征疾病靶组织及全身的病理状态^[9,11]。以差异倍数(Fold change)>2.0, 学生t检验 $P<0.05$ 为标准筛选组间差异表达基因, 获得AIA热证发病相关基因集。基于TCMIP v2.0(Integrative Pharmacology-based Research Platform of Traditional Chinese Medicine, <http://www.tcmip.cn/TCMIP/index.php/Home>)^[14], 预测石膏所含化合物的候选靶标信息(可信度得分>0.8)。

2.2 生物分子网络构建与分析 基于前期研究

方法, 采用String数据库(Version 11.5, <https://cn.string-db.org/>)构建“石膏候选靶标-AIA热证相关基因”互作网络^[15], 并进行拓扑特征计算和功能富集分析^[16-18]。

2.3 药物制备 白虎加桂枝汤组(BHGZT)按照白虎加桂枝汤原方比例, 用分析天平分别称取生石膏60 g、知母15 g、炙甘草5 g、粳米30 g和桂枝10 g, 依据前期煎煮方法进行制备, 低温冷冻干燥成粉, 1 g冻干粉相当于12 g白虎加桂枝汤生药量。白虎加桂枝汤拆方组(BHGZT-GYP)按照白虎加桂枝汤原方比例去掉石膏, 分别称取知母15 g、炙甘草5 g、粳米30 g和桂枝10 g, 依据常规煎煮方法进行制备, 低温冷冻干燥成粉, 1 g冻干粉相当于3 g生药量。

2.4 AIA病证结合大鼠模型的建立 按照前期研究方法分别制备单纯AIA模型及AIA热证模型^[5,8-10]。除正常组, 其余3组雄性Lewis大鼠尾部皮下注射配置好的10 g $\cdot$ L⁻¹的造模剂(灭活结核杆菌M tuberculosis H37 Ra 100 mg溶于液体石蜡中配置为混悬液10 mL)0.1 mL, 诱导AIA大鼠模型。正常组以等体积生理盐水处理。同时模拟RA致病原因, 施加外界风湿热(风速6 m $\cdot$ s⁻¹, 相对湿度约90%, 温度37 $^{\circ}$ C)连续15 d条件刺激, 造成AIA风湿热证(AIA热证)模型。定义每只大鼠关节炎评分 ≥ 0.5 分为关节炎发病, 关节炎评分 ≥ 1.5 分为造模成功^[20]。

2.5 分组及给药 20只雄性Lewis大鼠随机分4组: 正常组、AIA热证组、AIA热证+白虎加桂枝汤组(BHGZT)、AIA热证+白虎加桂枝汤拆方组(BHGZT-GYP), 每组5只。白虎加桂枝汤及其拆方组给药剂量分别为21.4、10.7 g $\cdot$ kg⁻¹, 为2倍临床等效剂量, 药效最优剂量^[8-10]。大鼠给药按10 mL $\cdot$ kg⁻¹体质量灌胃, 自免疫当天灌胃给药, 正常组和模型组灌服等体积生理盐水。给药至免疫第30天取材。

2.6 疾病严重程度及病证指标评价 观察并记录各组大鼠疾病严重程度^[5,8-9], 采用关节炎临床积分、关节肿胀度、关节表面温度及疼痛阈值综合评价; 并采用苏木素-伊红(HE)染色及Micro-CT观察各组大鼠关节右后肢病理改变, 采用骨矿物质密度(BMD)、组织骨密度(TMD)、骨表面积组织体积比(BV/TV)、骨表面积骨体积比(BS/BV)、骨小梁厚度(Tb.Th.)及骨小梁分离度(Tb.Sp.)对膝关节感兴趣区域(ROI)进行定量。此外, 采用胸腺指数(各组大鼠胸腺及大脑组织质量之比, g $\cdot$ g⁻¹)、脾脏指数(各组大鼠脾脏及大脑组织质量之比, g $\cdot$ g⁻¹)及HE染色观察各组大鼠胸腺及脾脏病理改变。

2.7 炎症细胞因子表达 所有大鼠于造模第30天麻醉,腹主动脉采血,3 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径15.7 cm)取上层清液。采用ELISA检测各组大鼠血清中TLR4、TNF- α 、IL-6、IL-12、IL-1 β 及IL-18蛋白表达。采用按照上海酶联生物科技有限公司ELISA试剂盒说明书进行操作。

2.8 3T3-L1前脂肪细胞成脂诱导与分组给药 经典三联法诱导成脂:待细胞长满以后产生接触抑制2 d,加入诱导液I(完全培养基中加入终浓度为0.5 mmol·L⁻¹ 3-异丁基-1-甲基-黄嘌呤、1 μ mol·L⁻¹地塞米松和1 mg·L⁻¹胰岛素)诱导2 d,再换成诱导液II(完全培养基中加入终质量浓度为5 mg·L⁻¹的胰岛素)诱导2 d,后换为正常培养基培养,每2 d换液,8~10 d出现脂肪滴;油红O溶于异丙醇中,染料稀释,过滤,固定液5 min,染色液15 min,镜检。细胞给药与处理:实验分为3组,分别为经典三联法诱导模型组、经典三联法诱导模型+白虎加桂枝汤组(2.0 mg·L⁻¹,BHGZT)、经典三联法诱导模型组+白虎加桂枝汤拆方组(2.0 mg·L⁻¹,BHGZT-GYP)、经典三联法诱导模型组+单纯石膏组(2.0 mg·L⁻¹,GYP)。实验第10天左右脂肪细胞形成时,采用油红O染色观察不同组别细胞成脂。前期实验表明,2.0 mg·L⁻¹白虎加桂枝汤为最佳给药剂量,因此采用此剂量进行全方、拆方及单纯石膏组的药效对比研究。

2.9 统计学分析 运用Graphpad prism (Version 8.0.2)软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 白虎加桂枝汤中君药石膏的主要作用挖掘 基于转录组表达谱数据分析^[11],共得到473个AIA热证发病相关基因,并通过TCMIP v2.0共获得197个石膏候选靶标。通过string数据库获取石膏候选靶标与AIA热证发病基因之间的相互作用信息,并构建相关生物分子网络,通过计算网络中节点连接度、介度和紧密度,共筛选出76个关键网络节点,其中53个AIA热证发病相关基因,23个为石膏候选靶标。

如图1所示,上述关键网络靶标主要参与机体能量代谢调节,相关富集通路有胆碱能突触(cholinergic synapse)、多巴胺能突触(dopaminergic synapse)、cAMP(cyclic adenosine monophosphate)信号通路、谷氨酸能突触(glutamatergic synapse)及雌激素信号通路(estrogen signaling pathway),其次

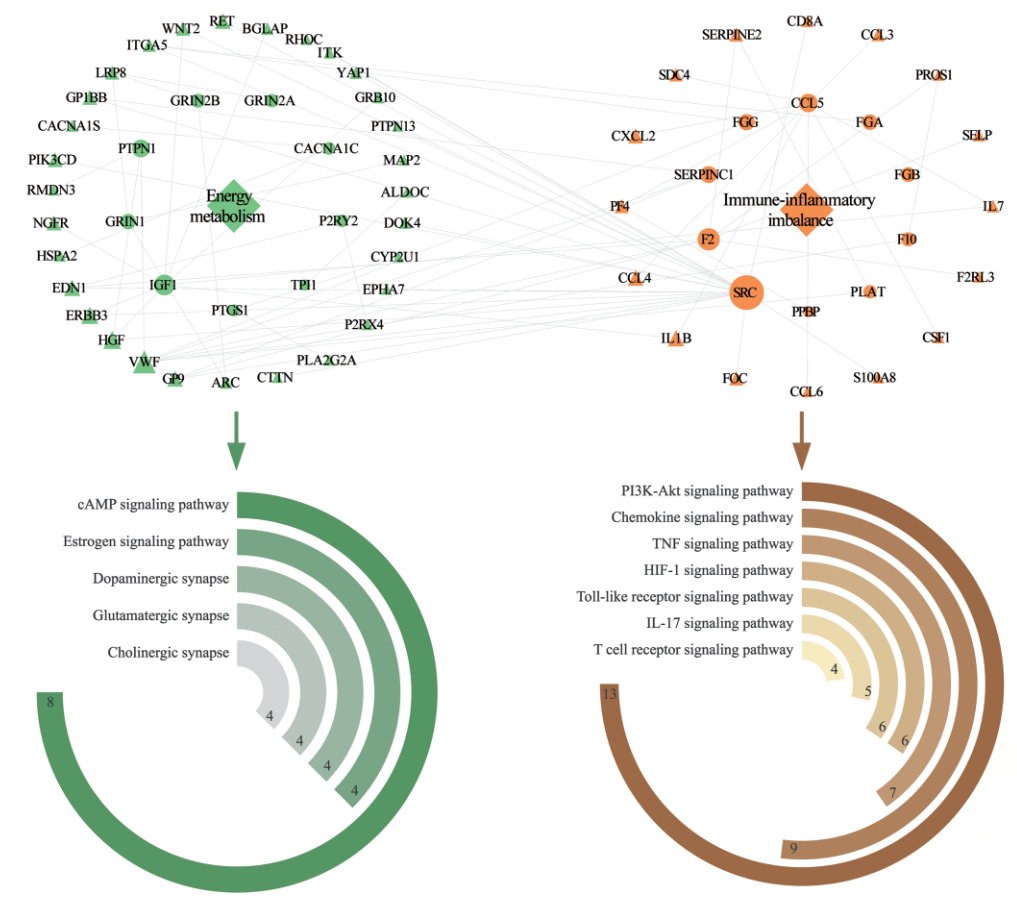
与调节机体“免疫-炎症”平衡相关,如肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、趋化因子信号通路(chemokine signaling pathway)、白细胞介素-17(IL-17)信号通路、Toll样受体信号通路(Toll-like receptor signaling pathway)、缺氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路及磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路,提示君药石膏在白虎加桂枝汤治疗RA热证过程中的主要作用环节是调节RA相关的机体能量代谢紊乱和矫正“免疫-炎症”失衡。

3.2 白虎加桂枝汤的君药石膏在改善AIA热证疾病严重程度中的作用 与正常组比较,AIA热证大鼠关节红肿、畸变严重,关节表面温度均显著升高($P < 0.01$);与AIA热证组比较,BHGZT及BHGZT-GYP均可改善关节宏观表现,缓解关节病变程度,降低关节炎临床积分($P < 0.01$)、右后肢关节肿胀度($P < 0.01$)及关节表面温度($P < 0.05$);与BHGZT组比较,BHGZT-GYP对三者的缓解作用均明显降低($P < 0.05$)。见图2、表1。

3.3 白虎加桂枝汤的君药石膏在改善AIA热证痛阈值的作用 与正常组比较,AIA热证大鼠自免疫第5天起,机械痛阈值、丙酮刺激冷痛阈值及热辐射痛阈值均显著降低($P < 0.01$);与AIA热证组比较,BHGZT及BHGZT-GYP对3种痛阈的起效时间分别为10、15 d,25、15 d,10 d;与BHGZT组比较,自15 d起BHGZT-GYP对机械痛阈值及冷痛阈值的改善作用明显减弱($P < 0.05$),在第10天时BHGZT-GYP对热辐射痛阈值的改善作用显著减弱($P < 0.01$)。见表2-表4。

3.4 白虎加桂枝汤的君药石膏在改善AIA热证关节损伤病理形态的作用 与正常组比较,AIA热证大鼠骨与软骨破坏严重,大量炎性细胞浸润,滑膜增生严重($P < 0.01$);与AIA热证组比较,BHGZT及BHGZT-GYP均可明显改善AIA热证大鼠骨与软骨破坏,降低炎性细胞浸润、骨破坏和滑膜增生评分($P < 0.05$);与BHGZT组比较,BHGZT-GYP对上述三者抑制作用稍弱,差异无统计学意义。见图3、表5。

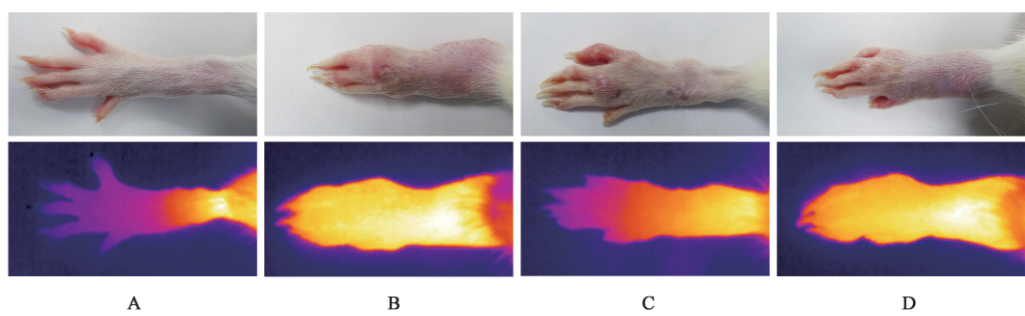
3.5 白虎加桂枝汤的君药石膏在改善AIA热证关节损伤的作用 正常组大鼠膝关节及踝关节表面光滑、外形完整;AIA热证大鼠膝/踝关节表面凹凸不平、外形损伤严重,骨计量学指标中TMD、BMD、BV/TV及Tb.Th.均显著降低($P < 0.01$),BS/BV及Tb.Sp.显著升高($P < 0.01$);与AIA热证组比较,BHGZT组及BHGZT-GYP组膝/踝关节表面稍



注:三角形节点为RA热证发病相关基因;圆形节点为石膏候选靶标;菱形节点为相关功能模块;绿色代表与机体能量代谢失衡相关靶标及通路;橙色代表与机体免疫-炎症系统失衡相关靶标及通路

图1 “石膏候选靶标-AIA热证发病相关基因”相互作用网络及其关键网络靶标的功能挖掘

Fig. 1 Interaction network of gypsum key targets and RA hot-related genes, and its involved pathways and major pathological changes during RA progression



注:A.正常组;B.AIA热证组;C.BHGZT组;D.BHGZT-GYP组(图3和图4同)

图2 白虎加桂枝汤及其去石膏拆方对AIA热证大鼠关节宏观表现及关节表面温度的影响

Fig. 2 Effect of BHGZT and its disassembled formula on severity of arthritis in AIA-H rats

光滑,外形较完整,TMD、BMD、BV/TV及Tb.Th.均显著升高($P<0.01$),BS/BV及Tb.Sp显著降低($P<0.01$);与BHGZT组比较,BHGZT-GYP对TMD、BMD、BV/TV、BS/BV及Tb.Sp.指标的改善作用均明显降低($P<0.05$)。见图4、表6。

3.6 白虎加桂枝汤的君药石膏在矫正AIA热证导致的免疫系统失衡中的作用 正常组大鼠胸腺结

构清晰,皮质和髓质比例正常,着色较深;AIA热证组大鼠胸腺结构清晰,形成大小不等的囊腔,淋巴细胞明显增生,小叶间隔增厚;BHGZT及BHGZT-GYP组囊腔、淋巴细胞、小叶间隔减少。正常组大鼠脾脏结构清晰,红髓、白髓和边缘区比例正常,脾小体B细胞和动脉周围淋巴鞘T细胞数量正常;AIA热证组大鼠脾脏结构清晰,脾小体变大,B淋巴

表 1 白虎加桂枝汤及其去石膏拆方对 AIA 热证大鼠关节炎严重程度的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 1 Effect of Baihu Guizhitang (BHGT) and its disassembled formula on severity of arthritis in AIA-H rats ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	关节临床积分/分	关节肿胀度/cm	关节表面温度/℃
正常组		0.00±0.00	0.65±0.03	25.88±1.29
AIA 热证组		76.27±2.19 ²⁾	1.16±0.08 ²⁾	35.54±0.56 ²⁾
BHGT 组	21.4	40.33±5.63 ⁴⁾	0.71±0.06 ⁴⁾	30.96±0.50 ⁴⁾
BHGT-GYP 组	10.7	56.53±15.22 ^{4,5)}	0.97±0.04 ^{4,6)}	33.38±1.06 ^{3,6)}

注:与正常组比较 ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01;与 AIA 热证组比较 ³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01;与 BHGT 组比较 ⁵⁾P<0.05, ⁶⁾P<0.01(表 2-表 6 同)

表 2 白虎加桂枝汤及其去石膏拆方对 AIA 热证大鼠机械痛阈值的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Effect of BHGT and its disassembled formula on mechanical-induced hyperalgesia in AIA-H rats ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	机械痛阈值					
		0 d	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d
正常组		15.78±1.58	16.71±2.96	17.84±4.78	15.83±1.53	15.69±1.58	16.24±1.50
AIA 热证组		16.61±1.84	4.61±2.33 ²⁾	3.03±1.86 ²⁾	2.06±1.29 ²⁾	1.84±1.10 ²⁾	1.85±1.42 ²⁾
BHGT 组	21.4	15.80±1.15	4.91±0.82	5.71±1.40 ⁴⁾	7.26±0.72 ⁴⁾	7.38±0.86 ⁴⁾	7.77±0.64 ⁴⁾
BHGT-GYP 组	10.7	17.84±2.40	3.32±1.83	7.51±1.98 ⁴⁾	1.37±0.57 ⁶⁾	1.90±0.39 ⁶⁾	1.43±1.45 ⁶⁾

表 3 白虎加桂枝汤及其去石膏拆方对 AIA 热证大鼠冷痛阈值的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 3 Effect of BHGT and its disassembled formula on acetone-induced hyperalgesia in AIA-H rats ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	冷痛阈值					
		0 d	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d
正常组		0.04±0.12	0.13±0.25	0.04±0.12	0.04±0.12	0.17±0.36	0.25±0.39
AIA 热证组		0.08±0.15	0.46±0.17 ²⁾	1.29±0.28 ²⁾	2.08±0.43 ²⁾	2.37±0.21 ²⁾	2.62±0.28 ²⁾
BHGT 组	21.4	0.08±0.15	0.46±0.25	1.08±0.50	0.92±0.23 ⁴⁾	1.04±0.12 ⁴⁾	1.08±0.24 ⁴⁾
BHGT-GYP 组	10.7	0.20±0.30	0.60±0.68	1.27±1.09	1.53±0.69 ⁵⁾	2.27±0.76 ⁶⁾	1.53±0.80 ⁴⁾

表 4 白虎加桂枝汤及其去石膏拆方对 AIA 热证大鼠热辐射阈值的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 4 Effect of BHGT and its disassembled formula on thermal-induced hyperalgesia in AIA-H rats ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	热辐射痛阈值					
		0 d	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d
正常组		18.09±1.15	17.76±1.51	17.70±1.66	18.48±1.43	17.76±0.36	17.82±1.26
AIA 热证组		17.68±1.41	14.74±1.93 ²⁾	12.41±1.25 ²⁾	9.05±2.26 ²⁾	10.20±1.92 ²⁾	6.63±2.51 ²⁾
BHGT 组	21.4	18.24±1.44	14.65±2.10	12.64±1.43	15.12±1.27 ⁴⁾	14.26±2.20 ⁴⁾	14.41±2.06 ⁴⁾
BHGT-GYP 组	10.7	16.65±2.61	15.84±1.67	15.24±1.39 ^{4,6)}	15.44±1.27 ⁴⁾	13.11±1.49 ³⁾	13.90±1.94 ⁴⁾

细胞明显增生,可见明显生发中心和充血;BHGT 及 BHGT-GYP 组脾脏结构清晰,生发中心及充血减少。见图 5。与正常组比较,AIA 热证胸腺及脾脏指数显著升高($P<0.01$);与 AIA 热证组比较,BHGT 及 BHGT-GYP 组中胸腺指数均明显降低($P<0.05$),且 BHGT 对脾脏指数也具有明显抑制作用($P<0.05$),BHGT-GYP 对脾脏指数的改善差异无统计学意义;与 BHGT 组比较,BHGT-GYP 对二者的抑制作用明显降低($P<0.05$)。见表 7。

3.7 白虎加桂枝汤中的君药石膏在矫正 AIA 热证导致“免疫-炎症”失衡中的作用 与正常组比较,

AIA 热证大鼠血清中 TLR4、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 及 IL-18 含量均显著升高($P<0.01$);与 AIA 热证组比较,BHGT 及 BHGT-GYP 均明显抑制以上炎症因子的异常高表达($P<0.05, P<0.01$);与 BHGT 组比较,除 IL-12 外,BHGT-GYP 对上述炎症因子表达的抑制作用明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表 8。

3.8 白虎加桂枝汤中的君药石膏在抑制 3T3-L1 细胞成脂中的作用 为考察白虎加桂枝汤中石膏在能量代谢调节中的作用,本研究于诱导分化过程中分别采用白虎加桂枝汤、去石膏拆方及单纯石膏处理,利用油红 O 染色,显微镜下观察 3T3-L1 细胞成

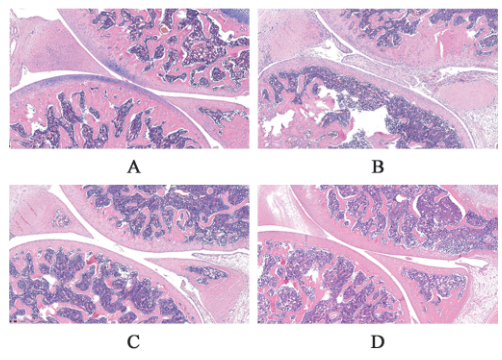


图 3 白虎加桂枝汤及其去石膏拆方对 AIA 热证大鼠膝关节损伤的影响 (HE, ×4)

Fig. 3 Effect of BHGZT and its disassembled formula on knee joint destruction in AIA-H rats (HE, ×4)

表 5 白虎加桂枝汤及其去石膏拆方对 RA 热证大鼠膝关节组织病理学的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 5 Effect of BHGZT and its disassembled formula on pathological changes of knee joints in AIA-H rats ($\bar{x} \pm s, n=5$) 分

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	炎性细胞 浸润	骨破坏	滑膜增生
正常组		0.50±0.58	0.25±0.50	0.25±0.50
AIA 热证组		3.00±0.82 ²⁾	2.00±0.00 ²⁾	2.00±0.00 ²⁾
BHGZT 组	21.4	1.50±0.58 ⁴⁾	1.25±0.50 ⁴⁾	1.00±0.00 ⁴⁾
BHGZT-GYP 组	10.7	1.75±0.50 ³⁾	1.50±0.58 ³⁾	0.75±0.50 ⁴⁾

脂过程。与模型组比较, BHGZT 及 BHGZT-GYP 均可显著抑制成脂; 与 BHGZT 组比较, BHGZT-GYP 组对 3T3-L1 细胞中被染色的脂滴含量的抑制作用显著降低; 与 BHGZT-GYP 组比较, GYP 对脂滴

含量的抑制作用显著增强。见图 6。

4 讨论

中药四气、五味及归经为中药药性理论的重要组成部分, 并从不同层次表达每一味中药的功效, 且药性各性能间及药性与功能间的相互作用, 在疾病治疗和转归中具有重要意义。白虎加桂枝汤中君药石膏作为清热药, 具有明显清阳明气分实热证之功, 但其“性-效”关联内涵不明。本研究首先通过转录组表达谱数据挖掘、药物靶标预测及网络分析整合研究, 发现白虎加桂枝汤君药石膏在全方缓解热痹的药效贡献主要体现在调节机体能量代谢紊乱和矫正“免疫-炎症”失衡; 进而利用热痹经典动物模型 AIA 病证结合大鼠模型及体外 3T3-L1 细胞分别通过白虎加桂枝汤及其去石膏拆方验证石膏在以上两个方面的贡献度。作为甘寒之性的代表性中药, 石膏具有清火生津之功, 在本研究中明显观察到白虎加桂枝汤及其去石膏拆方给药处理后, 均可显著缓解 AIA 热证大鼠关节红肿、畸变和疼痛症状, 抑制膝/踝关节损伤、滑膜炎症、骨破坏和滑膜增生, 且全方作用显著优于去石膏拆方。此外, 石膏的清热功效还体现在可抑制功能亢进, Na⁺/K⁺-ATP 酶活性, 并促进机体非特异性或者特异性免疫功能。当前研究也表明, 白虎加桂枝汤及其去石膏拆方可显著抑制 AIA 热证大鼠中胸腺/脾脏损伤和内脏指数, 并改善 TLR4、TNF-α、IL-6、IL-1β 及 IL-18 等炎症因子的表达, 全方作用显著优于去石膏

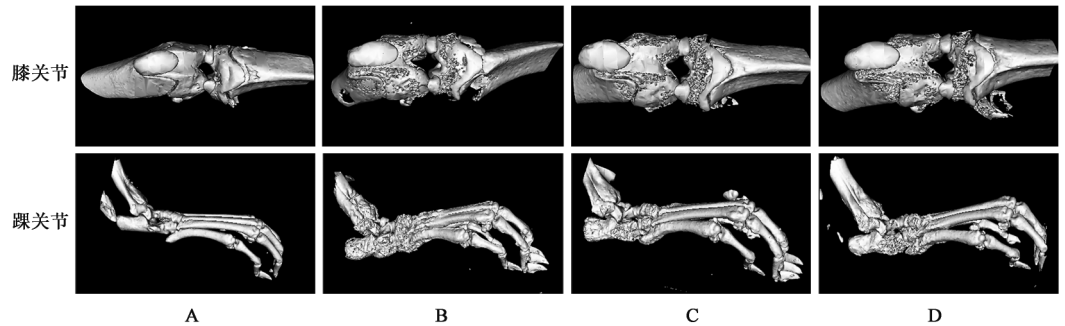


图 4 白虎加桂枝汤及其去石膏拆方对 AIA 热证大鼠膝/踝关节损伤的影响 (Micro-CT)

Fig. 4 Effect of BHGZT and its disassembled formula on joint destruction in AIA-H rats (Micro-CT)

表 6 白虎加桂枝汤及其去石膏拆方对 RA 热证大鼠膝关节损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 6 Effect of BHGZT and its disassembled formula on knee destruction in AIA-H rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TMD/mg·cc ⁻¹	BMD/mg·cc ⁻¹	BV/TV/%	BS/BV/1·mm ⁻¹	Tb.Th./mm	Tb.Sp./mm
正常组		533.95±3.65	457.79±8.61	0.88±0.01	3.99±0.52	0.51±0.07	0.08±0.01
AIA 热证组		399.05±0.37 ²⁾	188.94±5.27 ²⁾	0.27±0.01 ²⁾	21.6±1.43 ²⁾	0.09±0.01 ²⁾	0.24±0.01 ²⁾
BHGZT 组	21.4	445.74±10.50 ⁴⁾	259.36±22.84 ⁴⁾	0.54±0.04 ⁴⁾	13.17±1.63 ⁴⁾	0.15±0.02 ⁴⁾	0.13±0.01 ⁴⁾
BHGZT-GYP 组	10.7	427.85±3.39 ^{4, 6)}	212.56±4.09 ^{4, 5)}	0.47±0.00 ^{4, 5)}	15.29±0.23 ^{4, 5)}	0.13±0.00 ⁴⁾	0.17±0.01 ^{4, 5)}

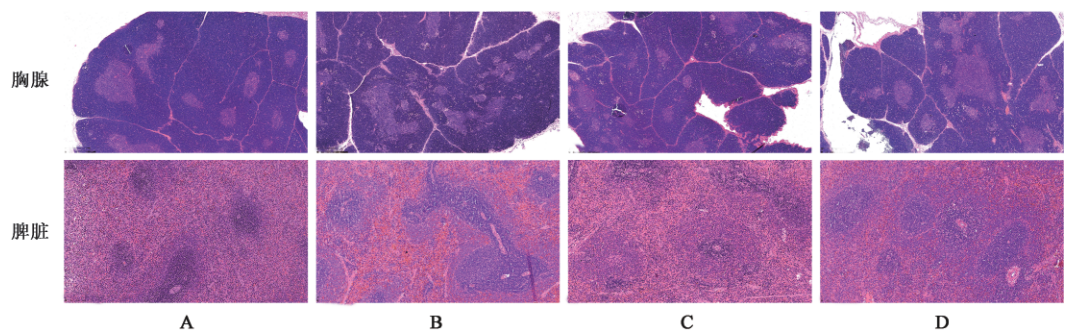


图 5 白虎加桂枝汤及其去石膏拆方对 AIA 热证大鼠脾脏和胸腺的影响 (HE, ×4)

Fig. 5 Effect of BHGZT and its disassembled formula on pathological changes of thymus and spleen in AIA-H rats (HE, ×4)

表 7 白虎加桂枝汤及其去石膏拆方对 AIA 热证大鼠脾脏和胸腺指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 7 Effect of BHGZT and its disassembled formula on thymus and spleen indexes in AIA-H rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	胸腺指数	脾脏指数
正常组		0.12±0.02	0.09±0.02
AIA 热证组		0.21±0.02 ²⁾	0.42±0.13 ²⁾
BHGZT 组	21.4	0.07±0.03 ⁴⁾	0.28±0.02 ³⁾
BHGZT-GYP 组	10.7	0.11±0.01 ^{4,5)}	0.35±0.05 ⁵⁾

拆方,且白虎加桂枝汤全方更加显著地抑制 3T3-L1 脂肪细胞成脂^[21]。本研究从石膏“性-效”关联角度,采用“转录组-基因调控网络”整合研究策略,系统评

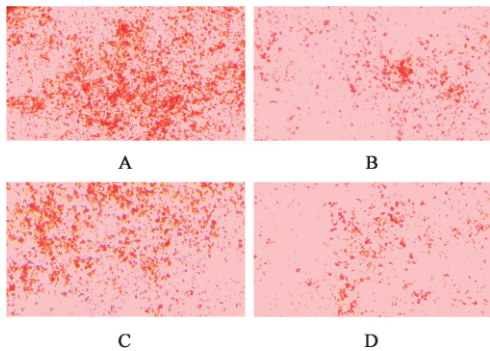
价了白虎加桂枝汤君药石膏在全方“热者寒之”药效作用中的贡献度和贡献形势。

以往中药的“药-效”研究主要是基于数学思维通过构建中药“性-效”关联模型及知识元语义分析探讨中药“性-效”关联规律^[22-24],或通过古今文献分析药性与功效挖掘其规律^[25]。本研究借助于病证结合动物模型,表征药物药性及药效特色,同时体现药物的性-效特点;在此基础上,开展转录组学检测,系统获得病证相关基因和药物效应基因,并通过生物分子网络分析具有药性特点的药物主要发挥哪些药效作用;最后,结合药效效应病理环节进行体内外实验验证。从不同层面较为完善地获得“性-效”关联的结果。

表 8 白虎加桂枝汤及其去石膏拆方对 AIA 热证大鼠血清中炎症因子表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 8 Effect on inflammatory factor protein in serum of AIA-hot rats after treatment of BHGZT and its disassembled formula ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TLR4/μg·L ⁻¹	TNF-α/ng·L ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹	IL-12/ng·L ⁻¹	IL-1β/ng·L ⁻¹	IL-18/ng·L ⁻¹
正常组		13.50±0.57	111.86±2.52	102.10±3.25	12.89±1.52	9.60±1.55	56.54±9.91
AIA 热证组		21.81±0.87 ²⁾	264.76±13.05 ²⁾	158.41±9.70 ²⁾	19.42±1.44 ²⁾	30.08±1.58 ²⁾	125.01±19.13 ²⁾
BHGZT 组	21.4	17.61±0.30 ⁴⁾	135.04±14.50 ⁴⁾	108.86±14.97 ⁴⁾	13.66±1.59 ⁴⁾	11.39±4.37 ⁴⁾	60.65±4.97 ⁴⁾
BHGZT-GYP 组	10.7	19.57±1.34 ^{4,5)}	172.24±15.06 ^{4,6)}	133.08±15.96 ^{3,5)}	15.93±1.55 ³⁾	19.37±1.79 ^{4,6)}	87.85±12.10 ^{4,5)}



注:A.模型组;B.BHGZT组;C.BHGZT-GYP组;D.GYP组

图 6 白虎加桂枝汤及其去石膏拆方对 3T3-L1 细胞成脂的影响 (油红 O, ×4)

Fig. 6 Effect of BHGZT and its disassembled formula on adipogenic differentiation in 3T3-L1 cells (oil red O, ×4)

然而,本研究依存在以下不足:尚未对石膏在白虎加桂枝汤全方抗 RA 热证中的调节机制进行验证。本研究基于 TCMIP v2.0 数据库收集石膏中化学成分信息,并进行靶标预测和网络分析,发现石膏的效应基因主要作用环节是调节机体能量代谢的紊乱和矫正“免疫-炎症”的失衡。基于网络靶标分析结果,利用 AIA 病证结合大鼠模型及体外细胞实验验证石膏在以上 2 个环节上对全方药效贡献度。由于当前成分鉴定技术受限无法精准获得石膏中化学成分谱和入血成分谱。有待于解决矿物药石膏体内外成分谱鉴定的技术瓶颈,为深入挖掘其在白虎加桂枝汤全方缓解 RA 热证中的机制特点提供可靠数据资源。

综上所述,本研究采用转录组表达谱数据挖掘、靶标预测、网络分析初步发现白虎加桂枝汤君药石膏在全方缓解热痹相关的能量代谢紊乱和矫正“免疫-炎症”失衡中发挥重要作用;并利用AIA病证结合大鼠模型及体外3T3-L1细胞成脂模型对以上2个方面进行验证。揭示石膏在全方中的贡献度和贡献形式,并阐释其“性-效”关联的生物内涵。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 孙明慧,吴虹,卜妍红,等. 介导缺氧诱导因子-1 α 表达的相关信号通路在类风湿性关节炎中的研究进展[J]. 中国药理学通报,2019,35(9):1197-1202.
- [2] GUO Q, WANG Y, XU D, et al. Rheumatoid arthritis: Pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies[J]. Bone Res, 2018, 6: 15-29.
- [3] ALETAHA D, BINGHAM C, TANAKA Y, et al. Efficacy and safety of sirukumab in patients with active rheumatoid arthritis refractory to anti-TNF therapy (SIRROUND-T): A randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, multinational, phase 3 study [J]. Lancet, 2017, 389 (10075):1206-1217.
- [4] LÜ S, WANG Q, LI G, et al. The treatment of rheumatoid arthritis using Chinese medicinal plants: From pharmacology to potential molecular mechanisms [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 176: 177-206.
- [5] 李玮婕,卢建秋,毛霞,等. 基于靶标网络分析的治痹寒热经方抗类风湿关节炎作用机制对比研究[J]. 药学报,2018,53(9):1387-1397.
- [6] 冯晓东. 白虎加桂枝汤合二妙散治疗热痹75例[J]. 陕西中医,2010,31(11):1480-1481.
- [7] 王菁斐. 白虎加桂枝汤治疗类风湿关节炎湿热痹阻证的临床疗效及可行性分析[J]. 中国现代药物应用,2022,16(2):204-206.
- [8] 李玮婕. 从“炎症-免疫”网络探索白虎加桂枝汤干预类风湿关节炎的作用机制[D]. 北京:北京中医药大学,2019.
- [9] LI W, MAO X, WANG X, et al. Disease-modifying anti-rheumatic drug prescription Baihu Guizhitang attenuates rheumatoid arthritis via suppressing toll-like receptor 4-mediated NLRP3 inflammasome activation [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 743086-743100.
- [10] LI W, MAO X, WU H, et al. Deciphering the chemical profile and pharmacological mechanisms of Baihu Guizhitang using ultra-fast liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry coupled with network pharmacology-based investigation [J]. Phytomedicine, 2020, 67: 153156-153173.
- [11] 李聪翀,张彦琼,李玮婕,等. 从 VEGF/VEGFR2/PI3K/Akt 信号轴所介导的血管新生调控网络探索白虎加桂枝汤干预类风湿关节炎热证的作用及其机制[J]. 药学报,2022,57(4):1044-1053.
- [12] 白鑫宇,冯程程,石琬岚,等. 加味五味石膏汤通过调节 Th1/Th2 免疫失衡及抑制 NLRP3/Caspase-1 炎症小体对支气管哮喘小鼠的保护作用[J]. 中药药理与临床,2018,34(6):15-19.
- [13] 叶鸿博. 石膏及其配伍解热作用的物质基础及机制研究[D]. 吉林:长春中医药大学,2020.
- [14] XU H, ZHANG Y, LIU Z, et al. ETCM: An encyclopaedia of traditional Chinese medicine [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1): D976-D982.
- [15] SZKLARCZYK D, FRANCESCHINI A, WYDER S, et al. STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(Database issue): D447-D452.
- [16] WANG Y, LIU Z, LI C, et al. Drug target prediction based on the herbs components: The study on the multitargets pharmacological mechanism of Qishenkeli acting on the coronary heart disease [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, doi:10. 1155/2012/698531.
- [17] 毛霞. 乌头汤缓解类风湿关节炎寒证的关键药效物质基础及其作用机制研究[D]. 北京:中国中医科学院,2020.
- [18] KANEHISA M, SATO Y, KAWASHIMA M. KEGG mapping tools for uncovering hidden features in biological data [J]. Protein Sci, 2022, 31(1): 47-53.
- [19] MAO X, LI W, CHEN W, et al. Exploring and characterizing a novel combination of paeoniflorin and talatizidine for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. Pharmacol Res, 2020, 153: 104658-104673.
- [20] MOSSIAT C, LAROCHE D, PRATI C, et al. Association between arthritis score at the onset of the disease and long-term locomotor outcome in adjuvant-induced arthritis in rats [J]. Arthritis Res Ther, 2015, 17 (1): 184-196.
- [21] 蔡教英,刘姚,王文君,等. 3T3-L1 前脂肪细胞在功能性成分评价中的应用[J]. 食品科学, 2011, 32(21): 301-305.
- [22] 汤金波. 基于数学思维探讨中药“性-效关联”[D]. 广州:广州中医药大学,2012.
- [23] 汤金波,帅真,许仕杰,等. 基于数学思维构建中药“性-效关联”模型[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2011, 13(6): 1099-1102.
- [24] 许仕杰,陈冠林,汤金波,等. 基于“知识元语义分析”探讨“五脏功效群”性效关联规律[J]. 中国医药指南, 2010, 8(23): 38-40.
- [25] 王建,王世宇,王洋,等. 芳香开窍中药的“性-效”关联表征探微[J]. 中药与临床, 2010, 1(1): 45-47.

[责任编辑 孙丛丛]