

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.07.012

雷公藤治疗类风湿关节炎作用机制的生物信息学分析及实验验证

杨豫正¹, 姚晓玲¹, 罗丰¹, 马武开²✉

1. 贵州中医药大学, 贵州省贵阳市花溪区栋青路4号, 550025; 2. 贵州中医药大学第二附属医院

[摘要] **目的** 运用生物信息学方法及试验验证探讨雷公藤治疗类风湿关节炎(RA)的可能作用机制。**方法** 通过基因表达综合数据库(GEO)、中药系统药理数据库及分析平台(TCMSP),采用基因本体论(GO)、京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集、蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络、分子对接、受试者工作特征曲线(ROC)、免疫浸润分析等生物信息学分析方法对雷公藤主要成分及作用于RA的靶点进行分析预测,并对分析获得的靶基因进行实验验证。体外实验选择人类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞(HFLS-RA),并以甲氨蝶呤为阳性对照,划痕实验检测培养24 h后细胞迁移率,Western Blot法检测蛋白水平、qPCR法检测靶基因mRNA水平,ELISA法检测炎症因子水平[包括白细胞介素1 β (IL-1 β)、白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素10(IL-10)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)]。**结果** 将雷公藤有效化合物获得的117个有效靶基因与RA发病相关基因取交集,共得到55个交集基因并将其看作关键基因。对55个关键基因进行筛选,最终获得3个核心基因(即PTGS2、CXCR4、TIMP1)。根据潜在药物靶点和雷公藤主要成分的对对应关系,得出雷公藤甲素和川陈皮素2个主要成分。分子对接结果显示,雷公藤甲素和川陈皮素与相应靶蛋白结合能 <-5 ,说明其与潜在药物靶点结合强烈。体外试验结果显示,与空白对照组比较,雷公藤甲素组、川陈皮素组、阳性对照组在培养24 h后细胞迁移率均降低($P<0.01$),各给药组PTGS2、CXCR4 mRNA表达及其蛋白水平均降低,TIMP1 mRNA表达及其蛋白水平均升高,IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平降低,IL-10水平升高($P<0.01$)。与阳性对照组比较,雷公藤甲素组和川陈皮素组细胞在培养24 h后细胞迁移率升高,PTGS2、CXCR4 mRNA表达及其蛋白水平升高,TIMP1 mRNA表达及其蛋白水平降低,IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平升高,IL-10水平降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 雷公藤的主要有效成分雷公藤甲素和川陈皮素可以抑制PTGS2、CXCR4和提高TIMP1表达,从而抑制炎症反应以达到缓解RA的作用。

[关键词] 类风湿关节炎; 雷公藤; 生物信息学; 雷公藤甲素; 川陈皮素

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以慢性关节炎症性病变为主要表现的全身性自身免疫性疾病,最终可导致关节结构破坏、关节畸形或功能障碍^[1]。本病主要累及外周关节,但全身其他器官或组织亦可受累,病程反复、缠绵不愈、致残率高,并且长期疾病活动度高的患者死亡风险显著增加^[2-3],目前尚无可以根治的方法。

雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook. f.)是卫矛科植物雷公藤的干燥根或根的木质部,具有祛风湿、活血通络功效,是中医临床治疗风湿顽痹的要药。中医运用雷公藤治疗RA的历史悠久,疗效确切^[4],但目前其治疗RA的具体作用机制尚不清楚。随着生物信息学和系统生物学已被广泛应用于探索中医药的作用机制,可运用网络描述生物系统、药物和疾病之间的复杂性^[5]。本研究通过生物信息学分析与实验验证相结合的方式揭示雷公藤治疗RA的潜在作用机制,为雷公藤治疗RA的作用机制研究提供方向。

基金项目:国家自然科学基金(82274678);贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教技[2024]122号);贵州中医药大学2024年“青年扬帆计划”(贵中医科合-QNYFZK[2024]14号)

✉ 通讯作者:walker55@163.com

1 生物信息学分析方法

1.1 数据来源

RA 患者数据来自基因表达综合数据库 (GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)。通过 R 软件包 “GEO query” (版本: version 2.62.2) 从 GEO 数据库中检索并下载 RA 全基因组表达谱 GSE181614 (Platforms GPL16956) 和 GSE89408 (Platforms GPL11154)。GSE181614 包括 5 个 RA 患者滑膜组织样本, GSE89408 包括 57 个 RA 患者滑膜活检样本和 28 个健康对照的滑膜组织活检样本。使用 R 软件包 “sva” 中的 ComBat 方法对非生物技术偏差引起的批次效应进行校正^[6]。利用主成分分析法 (PCA) 检查校正效果。本研究严格遵守每个数据库的数据访问政策。

1.2 RA 发病相关差异基因筛选

本研究使用 R 包 “limma (版本 3.50.0)” 鉴定对照组 (28 例) 与 RA 组 (62 例) 之间的差异表达基因 (DEGs), 筛选标准为 $|\log_2 \text{Fold Change}| > 0.5$ 且 P 值 < 0.05 , 并将其用于后续分析。

1.3 雷公藤有效成分及靶点筛选

通过中药系统药理学数据库及分析平台 (TCMSP, <https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 根据吸收、分布、代谢与排泄成药规律设置口服生物利用度 (OB) ≥ 30 且药物相似性 (DL) ≥ 0.18 筛选雷公藤活性成分^[7]。通过 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 筛选活性成分有效靶基因。

1.4 雷公藤治疗 RA 关键基因预测

将雷公藤活性成分靶点与 RA 相关靶点进行交叉取交集, 得到雷公藤治疗 RA 的关键基因。

1.5 基因本体论 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析

采用 R 包 “clusterProfiler (version 4.2.2)”, 设置 $P < 0.05$ 为筛选条件对雷公藤治疗 RA 相关差异表达基因进行 GO 和 KEGG 通路富集分析。

1.6 蛋白质-蛋白质互作 (PPI) 网络的构建和分析

采用 Cytoscape 软件中的 CytoHubba 插件 (版本 v0.1.3) 并运用 MCC、Betweenness、Stress、Radiality、Eccentricity、Degree 6 种算法进行计算, 每种算法均提取排名前 10 的基因, 最后取其交集以进一步确定核心基因。使用 GeneMANIA 网站 (<http://genemania.org>) 构建 PPI 网络。

1.7 分子对接

确认核心基因后将其作为雷公藤治疗 RA 的潜在药物靶点, 并通过潜在药物靶点和雷公藤主要成

分的对应关系按 OB 排序后确定雷公藤主要活性成分, 从 PubChem 下载雷公藤主要活性成分的 SDF 格式文件, 通过文件格式转换工具 OpenBabel (版本 2.4.1) 将 SDF 格式转换为 mol2 格式, 将配体的 mol2 格式导入到分子对接工具 AutoDockTools (版本 1.5.7) 中, 设置扭转并将其输出为 pdbqt 格式文件。在蛋白质结构数据库 (PDB, <https://www.rcsb.org/>) 下载核心基因目标蛋白的 PDB 文件, 并将蛋白质在分子可视化工具 PyMOL (版本 2.5.0) 中脱水和去配体。蛋白质在 AutoDockTools 中进行氢化, 并以 pdbqt 格式的文件输出。分子对接在 AutoDockTools 中进行, 分子对接的结果在 PyMOL 中可视化。

1.8 受试者工作特征曲线 (ROC)

使用 R 包 “pROC” 创建 ROC 曲线, 以确定曲线下面积 (AUC), 用于筛选枢纽基因 (Hub 基因) 并评估其诊断价值。AUC 值一般在 0.5~1 之间, AUC 值越接近于 1, 说明诊断效果越好^[8]。

1.9 免疫浸润分析

免疫细胞浸润在 RA 的发病机制中可能发挥着重要作用^[9-11]。为探讨免疫细胞浸润在 RA 发病中的作用, 从肿瘤和免疫系统相互作用数据库 (TISIDB, <http://cis.hku.hk/TISIDB/index.php>) 下载免疫细胞标记基因数据。每个免疫细胞的相对富集分数从每个样本的基因表达谱中计算, 通过 R 包 [ggplot2 (版本 3.3.6)] 绘制 RA 组和对对照组中样本的免疫细胞浸润水平变化^[12]。

2 生物信息分析结果

2.1 RA 相关差异表达基因

通过对照组与 RA 组的比较, 共确定了 7268 个 DEGs。相较于对照组, 在 RA 组样本中, 有 3840 个基因上调, 3428 个基因下调。

2.2 雷公藤有效成分及靶点筛选结果

通过 TCMSP 收集到雷公藤化合物 144 个, 根据 OB ≥ 30 、DL ≥ 0.18 筛选出有效化合物 51 个。通过 PubChem 数据库筛选活性成分有效靶基因 117 个。

2.3 雷公藤治疗 RA 关键基因

将雷公藤有效化合物获得的 117 个有效靶基因与 RA 发病相关基因取交集共得到 55 个交集基因并将其看作关键基因。

2.4 GO 和 KEGG 通路富集分析结果

为揭示雷公藤在 RA 治疗中的作用, 对 55 个关键基因进行 GO 富集分析。共有 934 个 GO 术语显著

富集 ($P<0.05$), 其中包括 859 个生物过程, 10 个细胞组分和 65 个分子功能。结果显示, 这些基因主要富集在对脂多糖的反应、对肿瘤坏死因子的反应、膜微区、转录共激活因子结合等。

对 55 个关键基因进行 KEGG 通路富集分析, 共鉴定出 124 条通路 ($P<0.05$)。位于前 9 条的信号通路为: 肿瘤坏死因子信号通路、脂质与动脉粥样硬化、乙型肝炎、化学致癌-受体激活、白细胞介素 17 信号通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、流体剪切应力与动脉粥样硬化、Toll 受体信号通路、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染信号通路。富集的信号通路大多与炎症相关, 提示雷公藤可能通过干预炎症相关的信号通路来治疗 RA。

2.5 核心基因相互作用分析

使用 CytoHubba 对 55 个关键基因进行筛选, 并将每个算法得到的基因取交集, 最终获得 3 个核心基因, 即前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2)、C-X-C 基序趋化因子受体 4 (CXCR4)、基质金属蛋白酶组织抑制因子 1 (TIMP1) 以及 20 个与核心基因相关的基因, 并使用 GeneMANIA 数据库创建核心基因的 PPI 网络, 证实了核心基因间有互作关系, 见图 1。

2.6 分子对接验证雷公藤主要成分与核心靶蛋白结合能力

通过上述分析, 最终得到 3 个核心靶蛋白, 即 PTGS2、CXCR4、TIMP1, 并将其作为治疗 RA 的

潜在药物靶点。根据潜在药物靶点和雷公藤主要成分的对对应关系, TIMP1 和 CXCR4 只对应一种有效成分 (TIMP1 对应川陈皮素, CXCR4 对应雷公藤甲素), PTGS2 对应的有效成分按照 OB 降序排序后因未能在库中获取到前 2 个有效成分的结构信息, 所以选择了排名第三的川陈皮素, 并在查阅文献后证实了雷公藤甲素和川陈皮素治疗 RA 的有效性^[13-17]。分子对接结果如表 1 示, 雷公藤的两个主要成分雷公藤甲素和川陈皮素与 PTGS2、CXCR4、TIMP1 蛋白的结合能均 <-5 , 说明其与潜在药物靶点结合强烈。分子对接可视化结果见图 2。

表 1 雷公藤主要成分与核心靶蛋白分子对接的基本信息
Table 1 Basic information on molecular docking of key active components of Leigongteng with core targets

主要成分	核心靶蛋白	PDB ID	结合能/ $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$
雷公藤甲素	CXCR4	4rws	-7.828
川陈皮素	PTGS2	5kir	-8.589
川陈皮素	TIMP1	7s7m	-6.213

注: CXCR4, C-X-C 基序趋化因子受体 4; PTGS2, 前列腺素内过氧化物合酶 2; TIMP1, 基质金属蛋白酶组织抑制因子 1。

2.7 核心基因的验证价值验证结果

使用 ROC 曲线验证核心基因 (见图 3), 发现 PTGS2 (AUC=0.9050), CXCR4 (AUC=0.9041), TIMP1 (AUC=0.7949) 的 AUC 值均 >0.6 ($P<0.05$), 这表明核心基因作为 RA 的潜在生物标志物具有鉴别能力。

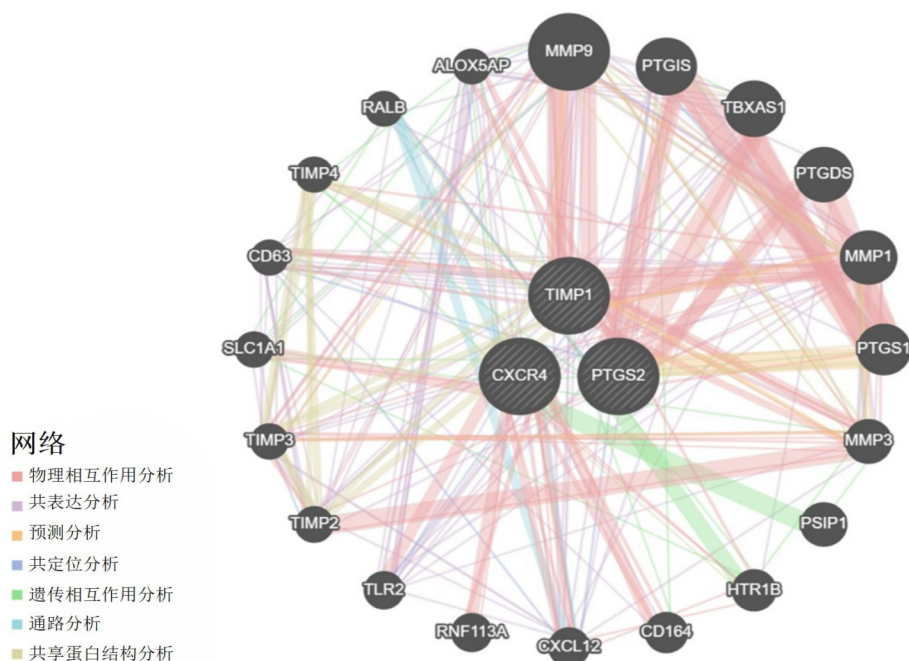
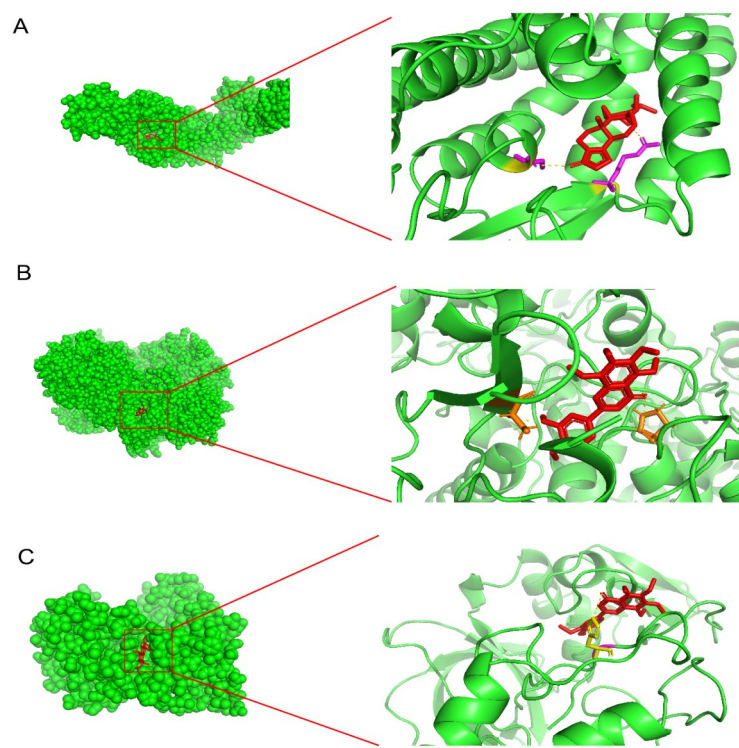


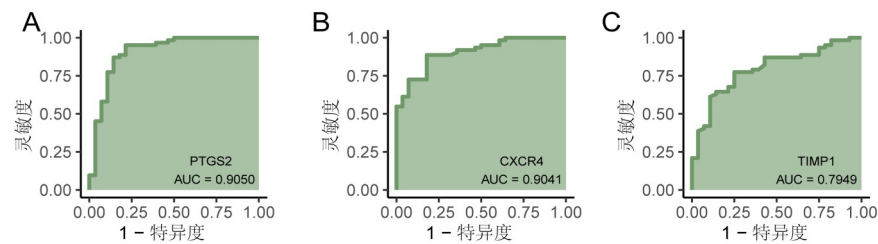
图 1 雷公藤治疗类风湿关节炎核心基因的互作分析网络图
Figure 1 Interaction analysis of core genes in Leigongteng treatment of rheumatoid arthritis



注：A，雷公藤甲素与靶蛋白 CXCR4 的分子对接；B，川陈皮素与靶蛋白 PTGS2 的分子对接；C，川陈皮素与靶蛋白 TIMP1 的分子对接；PTGS2，前列腺素内过氧化物合酶 2；CXCR4，C-X-C 基序趋化因子受体 4；TIMP1，基质金属蛋白酶组织抑制因子 1。

图2 雷公藤主要成分与靶蛋白分子对接图

Figure 2 Molecular docking diagram of key active components of Leigongteng with target proteins



注：A，PTGS2 的 ROC 曲线；B，CXCR4 的 ROC 曲线；C，TIMP1 的 ROC 曲线；AUC，曲线下面积；PTGS2，前列腺素内过氧化物合酶 2；CXCR4，C-X-C 基序趋化因子受体 4；TIMP1，基质金属蛋白酶组织抑制因子 1。

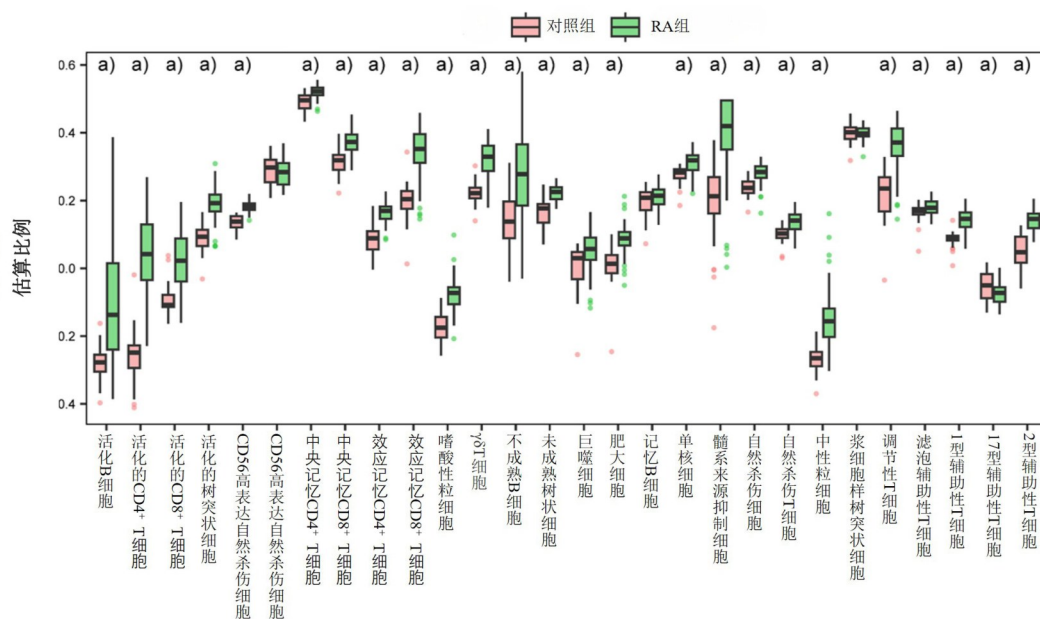
图3 雷公藤治疗类风湿关节炎的核心基因 ROC 曲线图

Figure 3 ROC curve of Hub genes in Leigongteng treatment of rheumatoid arthritis

2.8 免疫浸润分析结果

在 28 种免疫细胞中有 25 种免疫细胞在两组中免疫浸润丰度差异显著 ($P<0.05$) (见图 4)。其中 24 种免疫细胞 (活化 CD8⁺ T 细胞、中央记忆 CD8⁺ T 细胞、效应记忆 CD8⁺ T 细胞、活化 CD4⁺ T 细胞、中央记忆 CD4⁺ T 细胞、效应记忆 CD4⁺ T 细胞、滤泡辅助性 T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、1 型辅助性 T 细胞、2 型辅助性 T 细胞、调节性 T 细胞、活化 B 细胞、不成熟 B 细胞、自然杀伤细胞、自然杀伤 T 细

胞、CD56 高表达自然杀伤细胞、髓系来源抑制细胞、活化的树突状细胞、未成熟树状细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、单核细胞、中性粒细胞) 在 RA 组的浸润丰度显著高于对照组。此外，检验了每个 Hub 基因与相应免疫细胞之间的显著相关性，排名前 2 位的是 CXCR4 和效应记忆 CD8⁺ T 细胞显著相关 ($r=0.915$, $P<0.001$)；CXCR4 和活化 CD4⁺ T 细胞显著相关 ($r=0.899$, $P<0.001$)。



注: a) $P < 0.05$ 。RA, 类风湿关节炎。

图4 RA组和对照组样本免疫细胞浸润差异

Figure4 Differences in immune cell infiltration between RA group and the control group

3 体外实验验证材料及方法

根据生物信息学分析结果, 得到3个核心靶点 (PTGS2, CXCR4, TIMP1) 以及2个主要成分 (雷公藤甲素和川陈皮素), 为增强研究结果的可信度, 并进一步探讨上述核心靶点和主要成分之间的作用机制, 进行了体外实验验证。

3.1 药物

雷公藤甲素 (MCE公司, 货号HY-14519); 川陈皮素 (MCE公司, 货号HY-N0155); 甲氨蝶呤 (MCE公司, 货号HY-14519); DMSO (Invitrogen™公司, 货号D12345)。雷公藤甲素、川陈皮素、甲氨蝶呤分别溶解在DMSO中, 分别配制成1 mg/ml 雷公藤甲素储液、2.5 mmol/L 川陈皮素储液、2.2 mmol/L 甲氨蝶呤储液, 分装-80 °C保存, 使用时用DMEM完全培养基稀释至指定浓度, 0.22 μm 滤膜过滤除菌处理。

3.2 细胞

人类类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞(HFLS-RA)细胞系, 购于派瑞曼公司 (货号P-X109)。

3.3 主要试剂与仪器

胎牛血清 (上海李记生物科技有限公司, 货号AC03L055D); DMEM完全培养基 (美国GIBCO公司, 货号11995065); 胰蛋白酶 (上海源培生物科技股份有限公司, 货号S310KJ); DMSO (Invitrogen™公司, 货号D12345); 白细胞介素1β (IL-1β)

ELISA试剂盒 (货号EK101B-48)、白细胞介素6 (IL-6) ELISA试剂盒 (货号EK106/2-48)、白细胞介素10 (IL-10) ELISA试剂盒 (货号EK110/2-48)、肿瘤坏死因子α (TNF-α) ELISA试剂盒 (货号EK182-48), 中国联科生物技术有限公司; PTGS2抗体 (货号A3560)、CXCR4抗体 (货号A19035)、TIMP1抗体 (货号A1389), abclonal公司; CKK-8试剂 (上海碧云天生物技术有限公司, 货号C0038); RNA提取试剂 (北京康为世纪生物科技有限公司, 货号CW0580S); 逆转录试剂盒 (北京擎科生物科技有限公司, 货号TSK302M)。

微量紫外-可见光分光光度计 (NanoDrop One/One C型)、台式冷冻高速离心机 (Legend Micro 21R型), 美国Thermo公司; 核酸蛋白凝胶成像仪 (Gel Doc XR+型)、实时荧光定量PCR仪 (IQ5型)、蛋白电泳仪 (Mini-Sub Cell GT型)、蛋白湿转仪 (Mini Trans-Blot® Cell型)、核酸蛋白凝胶成像仪 (Universal Hood II型), 美国Bio-Rad公司; 酶标仪 (CMax Plus型), 美国molecular devices公司; 倒置生物显微镜 (BLD-200型), 北京世纪科信科学仪器有限公司。

3.4 CKK-8法确定雷公藤甲素、川陈皮素给药剂量

取生长状态良好的对数生长期HFLS-RA细胞, 加入0.25%胰酶进行消化, 离心后弃上清, 加入培养基, 调整细胞密度至 2×10^5 个/ml并接种至96

孔板。细胞贴壁后分组：对照组（使用 DMEM 完全培养基正常培养），雷公藤甲素分别分为 5 ng/ml 组、10 ng/ml 组、20 ng/ml 组，每组设置重复孔 3 个，分别使用含相应浓度雷公藤甲素的 DMEM 完全培养基培养 24 h 后，向每孔加 10 μ l CKK-8 溶液，用加了相应量细胞培养液和 CKK-8 溶液但没有加入细胞的孔作为调零孔，在细胞培养箱内继续孵育 1 h；使用酶标仪在 450 nm 测定吸光度，计算细胞活力。细胞活力(%)=(实验组-调零孔)/(对照组-调零孔)×100%，同时根据半数毒性浓度结果选择后续药物的处理浓度。

川陈皮素给药剂量筛选方法同上，分为 50 μ mol/L 组、100 μ mol/L 组、200 μ mol/L 组，每组设置重复孔 3 个，各组培养 24 h 后采用 CKK-8 法进行检测。

3.5 细胞分组及培养

将 1 ml 浓度为 5×10⁵/ml 细胞液接种于底面标记的 6 孔板中，试验分为空白对照组（DMEM 培养液）、雷公藤甲素组（含筛选浓度雷公藤甲素的 DMEM 完全培养基）、川陈皮素组（含筛选浓度川陈皮素的 DMEM 完全培养基）、阳性对照组（含 280 μ mol/L 甲氨蝶呤的 DMEM 完全培养基），每组 3 个复孔，各组培养 24 h。

3.6 观察指标及方法

3.6.1 细胞划痕实验检测雷公藤甲素、川陈皮素对细胞迁移能力的影响 各组培养 24 h 后在显微镜下拍照观察细胞运动的距离。Image J(版本 1.52a) 计算各组细胞运动距离，迁移率=(初始划痕面积-最终划痕面积)/初始划痕面积×100%。

3.6.2 qPCR 法检测细胞中 *PTGS2*、*CXCR*、*TIMP1* mRNA 表达 细胞培养 24 h 后，收集各组细胞，提取总 RNA，各样本取 1 μ l RNA 提取物加入微量紫外-可见光分光光度计中，分别测定 230 nm、260 nm、280 nm 的吸收峰值和比值，计算各样本中 RNA 的浓度和纯度。反转录合成 cDNA，反应条件如下：25 $^{\circ}$ C，10 min；55 $^{\circ}$ C，15 min；85 $^{\circ}$ C，5 min；4 $^{\circ}$ C，+ ∞ 。引物设计由重庆博艾迈迪森生物有限公司完成，*PTGS2* 引物：上游 GTTCCACCCGCACTACAGAA，下游 AGGGCTTCAGCATAAAGCGT，产物长度 106 bp；*CXCR4* 引物：上游 GAAACCTCAGCGTCTCAGT，下游 AGTAGTGGGCTAAGGGCACA，产物长度 154 bp；*TIMP1* 引物：上游 GCGGATACTTCCACAGGTCC，下游 GTAGGTCTTGGTGAAGCCCC，产物长度 152 bp；内参 *GAPDH* 引物：上游 TCAAGGCTGAGAACGGG-AAG，下游 TCGCCCCACTTGATTTTGGGA，产物长

度 88 bp。最后按 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法计算 mRNA 相对表达量。

3.6.3 Western Blot 法检测细胞中 *PTGS2*、*CXCR4*、*TIMP1* 蛋白水平 细胞培养 24 h 后，裂解细胞，严格按照试剂说明书提取总蛋白；分别从各样本总蛋白中取出 500 μ g 与 5×SDS 上样缓冲液按 4：1 比例混合，金属浴加热 100 $^{\circ}$ C 加热 6 min 使蛋白变性；各取 60 μ g 变性后的总蛋白进行上样、转膜操作，取膜后在 TBST 中清洗 1 min 并用 5% 脱脂牛奶封闭液室温封闭 1 h；封闭完毕，用 TBST 洗 3 次，每次 5 min；然后一抗稀释 1：1000，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜；用 TBST 洗 3 次，用封闭液将二抗稀释成 1：2000，室温孵育 1 h，用 TBST 清洗 3 次，加入曝光液混匀后，反应 1 min 放入曝光仪曝光检测，使用 Image J（版本 1.52a）处理图像及读取灰度值，计算蛋白相对表达量，蛋白相对表达量=目的蛋白的灰度值/内参的灰度值。

3.6.4 ELISA 法检测培养上清中 IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF- α 水平 培养 24 h 后根据各试剂盒说明书进行操作，使用酶标仪在 450 nm 波长测定吸光度值。

3.7 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行，计量资料均符合正态分布且方差齐性用均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较用 LSD 法。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

4 体外实验验证结果

4.1 给药剂量筛选结果

表 2、表 3 示，与对照组比较，雷公藤甲素、川陈皮素各浓度干预后均可导致细胞活力下降，且呈剂量依赖性，浓度越大细胞活力越低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。当用 10 ng/ml 雷公藤甲素、100 μ mol/L 川陈皮素分别处理细胞时，细胞活力均降至 50% 左右（半数抑制），因此选取 10 ng/ml 雷公藤甲素、100 μ mol/L 川陈皮素作为后续药物的处理浓度。

表 2 不同浓度雷公藤甲素干预后细胞活力比较
Table 2 Comparison of cell viability after intervention with different concentrations of triptolide (%， $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	细胞活力
对照组	3	100.00±7.57
5 ng/ml 组	3	76.79±5.83 ^{a)}
10 ng/ml 组	3	49.72±4.72 ^{a) b)}
20 ng/ml 组	3	30.62±3.82 ^{a) b) c)}

注：a) 与对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与 5 ng/ml 组比较， $P<0.01$ ；c) 与 10 ng/ml 组比较， $P<0.01$ 。

表 3 不同浓度川陈皮素干预后细胞活力比较

Table 3 Comparison of cell viability after intervention with different concentrations of nobiletin (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	细胞活力
对照组	3	100.00±12.31
50 $\mu\text{mol/L}$ 组	3	79.11±5.76 ^{a)}
100 $\mu\text{mol/L}$ 组	3	54.44±12.82 ^{b) c)}
200 $\mu\text{mol/L}$ 组	3	28.58±2.59 ^{b) d) e)}

注：a) 与对照组比较， $P<0.05$ ；b) 与对照组比较， $P<0.01$ ；c) 与 50 $\mu\text{mol/L}$ 组比较， $P<0.05$ ；d) 与 50 $\mu\text{mol/L}$ 组比较， $P<0.01$ ；e) 与 100 $\mu\text{mol/L}$ 组比较， $P<0.01$ 。

4.2 各组细胞培养 24 h 后迁移能力比较

表 4 示，与空白对照组比较，雷公藤甲素组、川陈皮素组、阳性对照组在培养 24 h 后细胞迁移率均降低 ($P<0.01$)。与阳性对照组比较，雷公藤甲素组和川陈皮素组在培养 24 h 后细胞迁移率升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。雷公藤甲素组和川陈皮素组在培养 24 h 后细胞迁移率组间比较，差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 4 各组细胞培养 24 h 后迁移率比较

Table 4 Comparison of cell migration rates after 24 h of culture in each group (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	迁移率
空白对照组	3	50.13±3.26
阳性对照组	3	26.18±1.53 ^{a)}
雷公藤甲素组	3	34.36±3.35 ^{a) b)}
川陈皮素组	3	37.13±3.82 ^{a) c)}

注：a) 与空白对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与阳性对照组比较， $P<0.05$ ；c) 与阳性对照组比较， $P<0.01$ 。

4.3 各组细胞中 *PTGS2*、*CXCR4*、*TIMP1* mRNA 表达比较

表 5 示，与空白对照组比较，雷公藤甲素组、川陈皮素组、阳性对照组 *PTGS2* 与 *CXCR4* mRNA

表 5 各组细胞中 *PTGS2*、*CXCR4*、*TIMP1* mRNA 表达比较

Table 5 Comparison of *PTGS2*, *CXCR4*, and *TIMP1* mRNA expression in cells of each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	<i>PTGS2</i>	<i>CXCR4</i>	<i>TIMP1</i>
空白对照组	3	1.00±0.09	1.00±0.11	1.00±0.12
阳性对照组	3	0.48±0.05 ^{a)}	0.33±0.04 ^{a)}	1.96±0.09 ^{a)}
雷公藤甲素组	3	0.65±0.04 ^{a) b)}	0.51±0.01 ^{a) c)}	1.65±0.10 ^{a) c)}
川陈皮素组	3	0.70±0.05 ^{a) c)}	0.54±0.04 ^{a) c)}	1.57±0.14 ^{a) c)}

注：*PTGS2*，前列腺素内过氧化物合酶 2；*CXCR4*，C-X-C 基序趋化因子受体 4；*TIMP1*，基质金属蛋白酶组织抑制因子 1。

a) 与空白对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与阳性对照组比较， $P<0.05$ ；c) 与阳性对照组比较， $P<0.01$ 。

表达均降低，*TIMP1* mRNA 表达均升高 ($P<0.01$)。与阳性对照组比较，雷公藤甲素组和川陈皮素组细胞 *PTGS2* 与 *CXCR4* mRNA 表达升高，*TIMP1* mRNA 表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。雷公藤甲素组和川陈皮素组 *PTGS2*、*CXCR4*、*TIMP1* mRNA 表达组间比较，差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

4.4 各组细胞中 *PTGS2*、*CXCR4*、*TIMP1* 蛋白相对表达量比较

表 6 示，与空白对照组比较，雷公藤甲素组、川陈皮素组、阳性对照组 *PTGS2* 与 *CXCR4* 蛋白相对表达量均降低，*TIMP1* 蛋白相对表达量均升高 ($P<0.01$)。与阳性对照组比较，雷公藤甲素组和川陈皮素组细胞 *PTGS2* 与 *CXCR4* 蛋白相对表达量升高，*TIMP1* 蛋白相对表达量降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。雷公藤甲素组和川陈皮素组 *PTGS2*、*CXCR4*、*TIMP1* 蛋白相对表达量组间比较，差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。各组细胞中 *PTGS2*、*CXCR4*、*TIMP1* 蛋白电泳图见图 5。

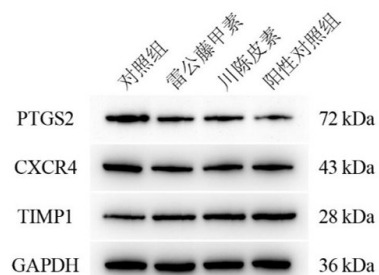
表 6 各组细胞中 *PTGS2*、*CXCR4*、*TIMP1* 蛋白相对表达量比较

Table 6 Comparison of relative protein expression levels of *PTGS2*, *CXCR4*, and *TIMP1* in cells of each group (/GAPDH, $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	<i>PTGS2</i>	<i>CXCR4</i>	<i>TIMP1</i>
空白对照组	3	0.64±0.05	0.85±0.03	0.44±0.05
阳性对照组	3	0.29±0.03 ^{a)}	0.55±0.03 ^{a)}	0.76±0.03 ^{a)}
雷公藤甲素组	3	0.37±0.03 ^{a) b)}	0.62±0.05 ^{a) b)}	0.64±0.04 ^{a) c)}
川陈皮素组	3	0.40±0.00 ^{a) c)}	0.64±0.03 ^{a) b)}	0.62±0.04 ^{a) c)}

注：*PTGS2*，前列腺素内过氧化物合酶 2；*CXCR4*，C-X-C 基序趋化因子受体 4；*TIMP1*，基质金属蛋白酶组织抑制因子 1。

a) 与空白对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与阳性对照组比较， $P<0.05$ ；c) 与阳性对照组比较， $P<0.01$ 。



注：*PTGS2*，前列腺素内过氧化物合酶 2；*CXCR4*，C-X-C 基序趋化因子受体 4；*TIMP1*，基质金属蛋白酶组织抑制因子 1。

图 5 各组细胞中 *PTGS2*、*CXCR4*、*TIMP1* 蛋白电泳图

Figure 5 Western blotting images of *PTGS2*, *CXCR4*, and *TIMP1* proteins in cells of each group

表 7 各组细胞上清中 IL-1β、IL-6、IL-10、TNF-α 水平比较
Table 7 Comparison of IL-1β, IL-6, IL-10, and TNF-α levels in cell supernatants of each group (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	IL-1β	IL-6	TNF-α	IL-10
空白对照组	3	155.54±8.55	75.08±3.23	106.91±8.26	38.61±1.33
阳性对照组	3	91.97±2.76 ^{a)}	38.61±1.33 ^{a)}	37.39±6.04 ^{a)}	70.92±4.83 ^{a)}
雷公藤甲素组	3	109.02±6.09 ^{a) b)}	48.49±1.07 ^{a) b)}	59.70±6.55 ^{a) b)}	59.70±3.45 ^{a) b)}
川陈皮素组	3	129.76±5.53 ^{a) b) c)}	59.70±3.45 ^{a) b) c)}	77.64±3.80 ^{a) b) c)}	48.49±1.07 ^{a) b) c)}

注：IL-1β，白细胞介素 1β；IL-6，白细胞介素 6；IL-10，白细胞介素 10；TNF-α，肿瘤坏死因子 α。
a) 与空白对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与阳性对照组比较， $P<0.01$ ；c) 与雷公藤甲素组比较， $P<0.01$ 。

4.5 各组细胞上清中的 IL-1β、IL-6、IL-10、TNF-α 水平比较

表 7 示，与空白对照组比较，雷公藤甲素组、川陈皮素组、阳性对照组细胞上清中 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平均降低，IL-10 水平升高 ($P<0.01$)。与阳性对照组比较，雷公藤甲素组和川陈皮素组细胞上清中 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平均升高，IL-10 水平降低 ($P<0.01$)。与雷公藤甲素组比较，川陈皮素组细胞上清中 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平均升高，IL-10 水平降低 ($P<0.01$)。

5 讨论

RA 属于中医学“痹证”范畴，风、寒、湿三气杂至形成致痹因子，是 RA 的发病条件^[18]，治以祛风除湿、通络止痛。雷公藤为临床治疗 RA 常用药，《本草便读》载：“此物善治风疾，故一切历节麻痺皆治之”。雷公藤具有活血通络、消肿止痛、祛风除湿等功效。已有大量证据显示雷公藤治疗 RA 确有疗效^[19-20]，但是其有效成分和作用机制仍不明确。

本研究首先将来自 GEO 的 RA 数据中的 RA 组与对照组比较，找到了 RA 发病主要调控基因 7268 个，通过 TC MSP 数据库得到了雷公藤有效化合物 51 个，并通过 PubChem 筛选出有效靶基因 117 个。将雷公藤有效化合物与发病主要调控基因相交集，得到雷公藤治疗 RA 的关键基因共 55 个。对这些关键基因进行了功能富集分析显示，雷公藤治疗 RA 主要可能与对脂多糖的反应、对肿瘤坏死因子的反应、膜微区、转录共激活因子结合等有关，主要通路涉及肿瘤坏死因子信号通路、白细胞介素 17 信号通路、Toll 样受体信号通路等，提示雷公藤可能通过干预与炎症相关通路调控 RA 的发展。炎症因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 及 IL-10 在 RA 诊断和治疗中具有重要作用^[21]。在体外实验验证中，检测了细胞上清中 IL-1β、IL-6、TNF-α 及 IL-10 水平，发现雷公藤甲素和川陈皮素对上述炎症因子具有调节

作用。对雷公藤治疗 RA 的 55 个关键基因在 Cyto-Hubba 中进一步筛选核心基因，最终得到 3 个核心基因 (*PTGS2*, *CXCR4*, *TIMP1*)。既往研究发现，作用于以 *PTGS2* 为主的多个靶点起到减轻 RA 大鼠急性炎症的作用^[22]；RA 患者血清和关节滑液中 *CXCR4* 高表达^[23]；活动期 RA 患者血清 *TIMP-1*、基质金属蛋白酶 3 (*MMP-3*) 水平明显升高，*MMP-3*/*TIMP-1* 失衡可能在 RA 发生发展中扮演重要角色^[24]。本研究通过生物信息学发现的潜在核心靶点与上述报道相一致。单基因的 ROC 曲线结果显示，*PTGS2* 与 *CXCR4* 的 AUC 均大于 0.9，证明它们对 RA 有极佳的诊断效能，*TIMP1* 的 AUC 为 0.795，也表现出对 RA 良好的诊断效能。进一步利用分子对接验证了雷公藤主要化合物与核心蛋白的结合强度，发现雷公藤的 2 个主要成分雷公藤甲素、川陈皮素与相应潜在药靶的结合能小于 -5，说明雷公藤主要成分与潜在药靶结合强烈，在 RA 的治疗方面有极大的潜能。此外，免疫浸润提示了 RA 中显著改变的免疫微环境，28 种免疫细胞有 25 种在 RA 组与对照组存在差异，其中 *CXCR4* 和效应记忆 CD8⁺ T 细胞及活化 CD4⁺ T 细胞之间存在显著正相关，提示雷公藤可能作用于 *CXCR4*，进而影响了效应记忆 CD8⁺ T 细胞与活化 CD4⁺ T 细胞，以起到治疗 RA 的结果。

基于生物信息学分析结果，本研究进一步通过实验进行了验证。通过 qPCR 法检测发现，与空白对照组比较，经雷公藤甲素和川陈皮素处理 HFLS-RA 细胞后 *PTGS2*、*CXCR4* mRNA 表达均降低，而 *TIMP1* mRNA 表达升高，Western Blot 法检测结果与 qPCR 法一致。ELISA 法检测结果显示，与空白对照组比较，促炎因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平降低，而抑炎因子 IL-10 水平升高。实验验证结果与生物信息学分析相一致，为后续机制研究及新药开发奠定了基础。

综上所述，雷公藤中的主要活性成分雷公藤甲

素和川陈皮素与核心基因 *PTGS2*、*CXCR4*、*TIMP1* 具有强烈的结合能力, 且这些靶点在 RA 的发病机制中可能扮演关键角色。雷公藤甲素和川陈皮素可能通过抑制 *PTGS2*、*CXCR4* 蛋白及其 mRNA 表达, 增强 *TIMP1* 蛋白及其 mRNA 表达, 降低促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平及增强抑炎因子 IL-10 水平, 从而发挥治疗 RA 的作用。本研究的数据库均难以全面覆盖所有潜在的致病靶基因, 加之雷公藤作为一种成分复杂的中药, 在现有技术条件下, 可能存在尚未被发掘或报道的有效成分。关于这些成分及靶点在 RA 的整个疾病过程中所涉及的信号通路及其具体作用机制, 仍需更为深入且系统地研究。

参考文献

- [1]SMOLEN JS, ALETAHA D, MCINNES IB. Rheumatoid arthritis[J]. Lancet, 2016, 388(10055): 2023–2038.
- [2]PRASAD P, VERMA S, SURBHI, et al. Rheumatoid arthritis: advances in treatment strategies[J]. Mol Cell Biochem, 2023, 478(1): 69–88.
- [3]LISTING J, KEKOW J, MANGER B, et al. Mortality in rheumatoid arthritis: the impact of disease activity, treatment with glucocorticoids, TNF α inhibitors and rituximab[J]. Ann Rheum Dis, 2015, 74(2): 415–421.
- [4]胡剑威, 徐浩南, 张玉莹, 等. 雷公藤及其制剂治疗类风湿性关节炎研究进展[J/OL]. 陕西中医药大学学报. (2024-12-27)[2025-01-05]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1501.R.20241226.1304.010.html>.
- [5]ZHANG R, ZHU X, BAI H, et al. Network pharmacology databases for traditional Chinese medicine: review and assessment[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 123. doi: 10.3389/fphar.2019.00123.
- [6]LEEK JT, JOHNSON WE, PARKER HS, et al. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments[J]. Bioinformatics, 2012, 28(6): 882–883.
- [7]RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminforma, 2014, 6: 13. doi: 10.1186/1758-2946-6-13.
- [8]ROBIN X, TURCK N, HAINARD A, et al. pROC: an open-source package for R and S⁺ to analyze and compare ROC curves[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12: 77. doi: 10.1186/1471-2105-12-77.
- [9]EDILOVA MI, AKRAM A, ABDUL-SATER AA. Innate immunity drives pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. Biomed J, 2021, 44(2): 172–182.
- [10]王晨宇, 邱波. 免疫细胞在类风湿关节炎发病机制中作用的研究进展[J]. 现代医学, 2023, 51(1): 121–125.
- [11]杨传刚, 王冬. 免疫细胞参与类风湿关节炎发病的研究进展[J]. 国际老年医学杂志, 2020, 41(1): 62–64.
- [12]ITO K, MURPHY D. Application of ggplot2 to Pharmacometric Graphics[J]. CPT: pharmacometrics Syst Pharmacol, 2013, 2(10): e79.
- [13]范文强, 吕书龙, 马玲, 等. 雷公藤甲素治疗类风湿关节炎的作用机制及安全性分析[J]. 中草药, 2019, 50(16): 3866–3871.
- [14]陈欢欢, 宋信莉, 汪云霞, 等. 雷公藤甲素、红素可溶性微针抗类风湿性关节炎的药效研究[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(12): 7374–7378.
- [15]YANG G, LI S, YUAN L, et al. Effect of nobiletin on the MAPK/NF- κ B signaling pathway in the synovial membrane of rats with arthritis induced by collagen[J]. Food Funct, 2017, 8(12): 4668–4674.
- [16]LIU Z, GUO S, DONG Q. Nobiletin suppresses IL-21/IL-21 receptor-mediated inflammatory response in MH7A fibroblast-like synoviocytes (FLS): an implication in rheumatoid arthritis[J]. Eur J Pharmacol, 2020, 875: 172939. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.172939.
- [17]徐德钢, 钱文旭, 王武, 等. 川陈皮素调节 Notch/NF- κ B/NLRP3 信号通路对类风湿关节炎大鼠炎症损伤的影响[J]. 免疫学杂志, 2023, 39(7): 616–624.
- [18]庞宇舟, 罗志洪, 汤倩倩, 等. 类风湿关节炎中医病机证素: “致痹因子”初探[J]. 中医杂志, 2018, 59(5): 390–393.
- [19]姜泉, 王海隆, 巩勋, 等. 类风湿关节炎病证结合诊疗指南[J]. 中医杂志, 2018, 59(20): 1794–1800.
- [20]王翰洲, 朱光昭, 杨豫正, 等. 雷公藤多苷片治疗类风湿关节炎作用于 IL-23/IL-17 轴相关细胞因子的系统评价和 meta 分析[J]. 中国医药导报, 2020, 17(12): 128–132, 160.
- [21]李巧林, 樊斗霜, 牛彦红. 细胞因子在类风湿性关节炎中的作用[J]. 甘肃医药, 2014, 33(11): 847–849.
- [22]梁健钦, 严炯艺, 冯茵怡, 等. 瑶药四方藤小复方对类风湿性关节炎大鼠的作用及机制研究和 Q-marker 预测[J]. 中草药, 2019, 50(19): 4705–4712.
- [23]PENG L, ZHU N, MAO J, et al. Expression levels of CXCR4 and CXCL12 in patients with rheumatoid arthritis and its correlation with disease activity[J]. Exp Ther Med, 2020, 20(3): 1925–1934.
- [24]崔静, 王晓霞, 王洪, 等. MMP-3/TIMP-1、Th17/Treg 在类风湿关节炎中的作用及其临床意义[J]. 中国现代医生, 2018, 56(13): 160–163, 168.

Bioinformatics Analysis and Experimental Validation of the Mechanism of Leigongteng (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.) in Treating Rheumatoid Arthritis

YANG Yuzheng¹, YAO Xiaoling¹, LUO Feng¹, MA Wukai²

1. Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang, 550025; 2. The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Chinese Medicine

ABSTRACT **Objective** To explore the potential mechanisms of Leigongteng (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.) in treating rheumatoid arthritis (RA) using bioinformatics analysis and experimental validation. **Methods** Bioinformatics approaches, including the Gene Expression Omnibus (GEO), the traditional Chinese medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), Gene Ontology (GO) enrichment analysis, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment, protein-protein interaction (PPI) network analysis, molecular docking, receiver operating characteristic (ROC) analysis, and immune infiltration analysis, were used to predict the key active components of Leigongteng and its target genes for RA treatment. Experimental validation was conducted using human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes (HFLS-RA) in vitro, with methotrexate as the positive control. A scratch assay was performed to assess cell migration after 24 hours of culture. Western blotting was used to detect protein expression levels, qPCR was used to measure target gene mRNA levels, and ELISA was conducted to evaluate inflammatory cytokine levels, including interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), and tumor necrosis factor- α (TNF- α). **Results** A total of 117 target genes of Leigongteng were identified and intersected with RA-related genes, yielding 55 key genes. Further screening identified three core genes: *PTGS2*, *CXCR4*, and *TIMP1*. Based on the correspondence between potential drug targets and key components, triptolide and nobiletin were identified as the primary active compounds. Molecular docking results showed that both triptolide and nobiletin had binding energies lower than -5 kcal/mol with their respective target proteins, indicating strong interactions. In vitro experiments demonstrated that, compared with the blank control group, the triptolide, nobiletin, and positive control groups exhibited reduced cell migration rates after 24 hours of culture ($P < 0.01$). The expression levels of *PTGS2* and *CXCR4* (both mRNA and protein) were significantly downregulated, while *TIMP1* expression was upregulated. Levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α decreased, whereas IL-10 levels increased ($P < 0.01$). Compared with the positive control group, the triptolide and nobiletin groups showed increased cell migration rates, upregulated *PTGS2* and *CXCR4* expression (mRNA and protein), downregulated *TIMP1* expression (mRNA and protein), increased IL-1 β , IL-6, and TNF- α levels, and decreased IL-10 levels ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The key active components of Leigongteng, triptolide and nobiletin, may alleviate RA by inhibiting *PTGS2* and *CXCR4* while promoting *TIMP1* expression, thereby suppressing inflammatory responses.

Keywords rheumatoid arthritis; Leigongteng (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.); bioinformatics; triptolide; nobiletin

(收稿日期: 2025-01-05; 修回日期: 2025-02-14)

[编辑: 邓媛]