

从临床多组学整合调控网络探究雷公藤多苷片治疗 类风湿关节炎的“效-毒”关联机制

王晓月¹, 张依¹, 陈文佳¹, 万磊², 刘健², 张彦琼^{1*}, 林娜^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;

2. 安徽中医药大学 第一附属医院, 合肥 230031)

[摘要] **目的:**通过雷公藤多苷片治疗类风湿关节炎疗效应答和诱发药源性肝损伤相关分子互作网络挖掘,揭示雷公藤多苷片的“效-毒”关联机制。**方法:**利用前期已获得临床来源的雷公藤多苷片疗效应答相关基因表达谱和诱发药源性肝损伤相关蛋白质表达谱数据,根据生物分子间的相互作用信息,构建雷公藤多苷片“效-毒”关联网络,并通过计算网络节点的拓扑特征值,筛选关键网络靶标和挖掘其生物学功能。**结果:**经临床转录组学检测,获得雷公藤多苷片治疗类风湿关节炎疗效相关差异表达基因119个。经临床蛋白质组学检测,获得雷公藤多苷片诱发药源性肝损伤相关差异表达蛋白质49个。进一步的临床症状富集分析表明,雷公藤多苷片治疗类风湿关节炎的效应基因与痹症相关中医症状和医学临床表型紧密相关,雷公藤多苷片诱发药源性肝损伤相关的差异蛋白质最显著富集于消化系统异常的临床症状,可见,上述多组学数据能够表征雷公藤多苷片治疗类风湿关节炎和诱发药源性肝损伤的主要临床症状。进而,“效-毒”关联网络挖掘表明,雷公藤多苷片治疗类风湿关节炎的关键效应靶标和诱发药源性肝损伤核心致毒蛋白质均参与机体“免疫-炎症”失衡的调节,特别在中性粒细胞脱颗粒、补体级联反应、蛋白质翻译后修饰介导的免疫炎症反应等方面发挥着重要作用;二者还显著富集于肾素-血管紧张素系统(RAS)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路等与细胞增殖和细胞周期调控密切相关的信号通路,以及参与糖原代谢和氧化还原反应等肝脏功能直接相关的生物学通路。**结论:**本研究采用临床表型组学、临床转录组学和蛋白质组学整合的研究策略,系统阐释了雷公藤多苷片“效-毒”的关联特征和分子机制,为探索雷公藤多苷片“增效减毒”机制奠定良好的数据基础。

[关键词] 雷公藤多苷片; 类风湿关节炎; 药源性肝损伤; 多组学整合; “效-毒”关联网络

[中图分类号] R2-0;R33;R593.22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)05-0049-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221545 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220705.1407.003.html>

[网络出版日期] 2022-07-07 17:05:33

Exploration on "Efficacy-toxicity" Association Mechanisms of *Tripterygium wilfordii* Polyglycoside Tablets Against Rheumatoid Arthritis Based on Multi-omics Integrated Regulatory Network

WANG Xiaoyue¹, ZHANG Yi¹, CHEN Wenjia¹, WAN Lei², LIU Jian², ZHANG Yanqiong^{1*}, LIN Na^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the "efficacy-toxicity" association mechanisms of *Tripterygium wilfordii* polyglycoside tablets (TWPT) by establishing and analyzing an interaction network associated with the clinical efficacy of TWPT in the treatment of rheumatoid arthritis (RA) and TWPT-induced liver injury.

[收稿日期] 2022-04-24

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81974526);中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A03807);北京市自然科学基金面上项目(7212186);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZXKT22019)

[第一作者] 王晓月,在读博士,从事中药药理研究,E-mail:xywang94@163.com

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

*林娜,研究员,博士生导师,从事中药药理研究,E-mail:nlin@icmm.ac.cn

Method: On the basis of the TWPT efficacy-related gene expression profile and TWPT-induced liver injury-related protein expression profile which were both obtained from our clinical cohorts, the "efficacy-toxicity" association network of TWPT was constructed, and the key network targets were identified by calculating the topological values of the nodes, including the degree, closeness and betweenness. After that, the biological functions and pathways of the key network targets were investigated by enrichment analysis. **Result:** A total of 119 differentially expressed genes (58 up-regulated and 61 down-regulated) between RA patients with TWPT well and weak response were identified as TWPT efficacy-related genes by clinical transcriptomics, and 49 differentially expressed proteins (36 up-regulated and 13 down-regulated) were demonstrated to be TWPT-induced liver injury-related proteins by clinical proteomics. In addition, the clinical symptom enrichment analysis indicated that the TWPT efficacy-related genes were significantly associated with various clinical symptoms of arthralgia in traditional Chinese medicine and clinical phenotypes of modern medicine, and most of the TWPT-induced liver injury-related proteins were involved in digestive system abnormalities. Therefore, the aforementioned multi-omics data represented the main clinical symptoms of TWPT treating RA and inducing liver injury. Mechanically, the "efficacy-toxicity" association network revealed that both TWPT efficacy-related genes and TWPT-induced liver injury-related core proteins were involved in the "immune-inflammatory" imbalance, especially playing an important role in neutrophil degranulation, complement cascade reaction, and immune-inflammatory response mediated by protein post-translational modification. Notably, the above genes and proteins were also enriched in various signaling pathways related to cell proliferation and cell cycle regulation, such as RAS and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway, and in several liver functional processes, such as glycogen metabolism and redox reaction. **Conclusion:** This study systematically explained the "efficacy-toxicity" association characteristics and molecular mechanisms of TWPT by applying a research strategy integrating clinical phenomics, transcriptomics and proteomics, laying a good data foundation for exploring the "efficacy enhancing and toxicity-reducing" mechanisms of TWPT.

[Keywords] *Tripterygium wilfordii* polyglycoside tablets; rheumatoid arthritis; drug-induced liver injury; multi-omics integration; "efficacy-toxicity" association network

中药雷公藤为卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* 的干燥根或根的木质部,首载于明朝《滇南本草》,味辛、苦,性温,有毒,入肝脾二经,行十二经络,治筋骨疼痛,风湿寒痹,麻木不仁,瘫痪痿软,湿气流痰,暖筋,止腰疼^[1-2]。中药雷公藤的代表制剂雷公藤多苷片不仅包含雷公藤的主要化学成分,且临床治疗类风湿关节炎(RA)效果确切。近期多项双盲随机对照临床试验证明,雷公藤多苷片治疗RA患者达标率与一线抗RA药物甲氨蝶呤、柳氮磺吡啶等一致,有效率约60%^[4-5]。因而,该中药品种先后被纳入2015年版《中华人民共和国药典》、2018年版《国家基本药物目录》和2019年版《国家基本医疗保险、工伤保险和生育保险药品目录》甲类药物,中华医学会风湿病学分会发布的《2018年中国类风湿关节炎诊疗指南》与中华中医药学会风湿病分会发布的《类风湿关节炎病证结合诊疗指南》也推荐雷公藤多苷片用于RA治疗,还被世界卫生组织认定为治疗关节炎的“中国首创植物新药”。

然而,其具有化学成分复杂、生物活性特殊、易引起多系统毒副作用等特点,使其安全合理用药研究面临重大挑战^[6-7]。根据2014年9月1日—2019年8月31日期间国家药品不良反应监测中心自发呈报系统不良反应数据:由雷公藤多苷片引起的472例不良反应中,54例(11.44%)为肝功能异常;在45例严重不良反应病例中,有11例(24.44%)出现肝功能损伤^[8]。李逸群等^[9]通过对万方、维普、中国知网、PubMed、Embase和Cochrane Library等公共数据库进行检索,全面统计雷公藤多苷片临床不良反应数据,得到了与国家药品不良反应监测中心相似的结果,即雷公藤多苷片具有较高的诱发药源性肝损伤的风险,而且单用比联用出现药源性肝损伤的概率更高、情况更严重,这在一定程度上提示了合理用药方案的重要性。

鉴于雷公藤制剂在临床应用过程中常出现医生对用药指征难于准确把握、患者疗效参差不齐、毒副作用时有发生的情况,而现有药品说明书又存

在内容过于简单和宽泛的问题,国内风湿免疫临床、药物监督管理、药学和循证医学研究领域的38家权威单位和48位知名专家,共同制订并发布了《雷公藤多苷/雷公藤片治疗类风湿关节炎用药指南》^[10-12],形成雷公藤代表制剂在RA治疗中涉及功能主治、用法用量、合并用药、注意事项、疗效和安全性等方面内容的用药建议。同时,有研究聚焦临床优势获益人群的特点和表征,应用全转录组关联网络分析策略,开展效应靶标互作、microRNA介导的基因表达调控及ceRNA调控等研究,揭示了雷公藤多苷片临床治疗RA的疗效个体差异机制,并发现对临床合理用药具有指导潜能的疗效生物标志物(基因标志物轴:MX1-OASL-SPINK1-CRK-GRAPL-RNF2;miRNA标志物轴:miR-550b-2-5p-miR-4797-5p-miR-6509-5p-miR-378g;ceRNA标志物轴:lncRNA ENST00000494760-miR-654-5p-C1QC),有助于确定该品种个性化用药方案,以缩短达标前治疗时间、减少并发症和不良反应的发生,将大大提高RA患者的临床获益^[13-15]。然而,受研究条件和方法所限,有关雷公藤多苷片在治疗RA过程中的效、毒作用原理尚不明确。为改善这一困境,当务之急是明确雷公藤多苷片效、毒发生机制及其关联特征,以便进一步寻找增效减毒途径,这也是中药治疗RA研究领域的热点和突破点之一。

1 方法

本研究采用临床表型组学、临床转录组学和蛋白质组学整合的研究策略,旨在系统阐释雷公藤多苷片“效-毒”的关联特征和分子机制。

1.1 临床病例来源及样本收集 收集自2015年至2018年,于中国中医科学院广安门医院风湿病科门诊及病房就诊的RA患者12例(疗效好6例,疗效差6例)。其次,雷公藤多苷片治疗RA而诱发药源性肝损伤的病例来源于2018年至2019年,于安徽中医药大学第一附属医院风湿病科门诊及病房就诊的RA患者10例(发生肝损伤5例,未发生肝损伤5例)。

纳入标准:符合美国风湿病学会(ACR)1987年分类标准或2010年ACR/EULAR分类标准^[3]的RA患者,从未接受过雷公藤多苷片治疗或在最近4周内没有接受过TWPT治疗的受试对象。排除标准:由于各种原因不能坚持服药12周的RA患者、患有其他风湿病的患者、育龄期或有生育要求的女性。

疗效评价标准:采用ACR20和RA患者疾病活动评分(DAS)^[16]病情评价方法,每2周评价1次,每

次随访观察病情是否改善在20%以上,以及12周内DAS 28<2.4,如果达标,则表示治疗疗效好,否则为疗效差。

肝损伤评价标准:采用2021年亚太肝病学会(APASL)对药源性肝损伤(DILI)的共识指南^[17],满足以下条件之一:①丙氨酸氨基转移酶(ALT)≥5倍正常值上限(ULN);②碱性磷酸酶(ALP)≥2×ULN[尤其在伴有谷氨酰转氨酶(GGT)升高或在排除骨骼原发性病理改变时];③ALT≥3×正常上限(ULN),并且总胆红素(TBIL)>2×ULN。

上述所有研究对象均自愿签署知情同意书,并通过临床伦理审核。

1.2 芯片检测分析 临床来源TWPT治疗RA疗效好(6例)和疗效差(6例)患者的外周血样本,使用TRIzol试剂(美国赛默飞,货号15596026)提取总RNA并对RNA质量进行鉴定,合格的样品采用Affymetrix EG1.0 arrays(美国Affymetrix)对上述样品进行表达谱检测,结果包含119个差异表达基因(差异倍数Fold Change≥1.2,差异显著性 $P<0.05$),其中上调表达基因58个和下调表达基因61个,即雷公藤多苷片治疗RA效应靶标基因集。

1.3 蛋白质组学分析 临床来源TWPT治疗RA发生肝损伤(5例)和未发生肝损伤(5例)患者的外周血样本,通过蛋白提取、纯化、还原、烷基化、酶解消化、脱盐等处理。采用LC-MS/MS对处理好样本进行肽段鉴定,对蛋白质进行定性定量分析。结果包含49个差异表达蛋白质,差异倍数Fold Change≥1.2,差异的显著性 $P<0.05$ 。其中上调和下调表达蛋白质分别36和13个。获得的差异蛋白对应49个编码基因,即雷公藤多苷片诱发药源性肝损伤相关蛋白质的编码基因集。

1.4 “效-毒”关联网络构建和生物分子功能的富集分析 本研究将上述效应靶标基因和药源性肝损伤相关蛋白质编码基因导入String(<https://cn.string-db.org/>),提取“效-毒”之间的相互作用信息,构建雷公藤多苷片治疗RA的“效-毒”关联网络。再利用Cytoscape 3.9.0软件计算节点基因在网络中的拓扑特征值(连接度、介度、紧密度),筛选关键网络靶标基因。进一步运用Cytoscape 3.9.0软件中ClueGO插件,挖掘“效-毒”关联网络节点中的功能(基于KEGG和Reactome Pathway Databases)。

1.5 临床症状富集分析 针对目标基因或蛋白质,采用证候本体数据库及多维定量关联计算平台——SoFDA(<http://www.tcmip.cn/Syndrome/front/#/>)^[16]

的富集工具,对其相关的中医临床症状和现代医学临床表型进行富集分析。该工具是第1个可用的中药证候本体、证候分类工具以及与疾病和处方的相关特征关联。

1.6 统计学分析 使用SPSS 21.0统计软件,所有连续性变量采用Kolmogorov-Smirnov进行的正态性分布检验,符合正态分布的连续性变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本*t*检验;非正态分布的连续性变量采用中位数及范围表示,组间比较采用Kruskal-Wallis H检验;计数资料用例及百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床基线资料对比 本研究所纳入的来自中

国中医科学院广安门医院风湿病科、接受雷公藤多苷片治疗的12例RA患者,根据其12周的随访结果,将病情改善率 $>20\%$ 且DAS28 <2.4 的RA患者划分为疗效好组;反之,则为疗效差组;相关临床基线资料见项目组前期研究报道^[15]。

本研究所纳入的来自安徽中医药大学第一附属医院风湿病科、接受雷公藤多苷片治疗的10例RA患者,根据2021年亚太肝病学会(APASL)对药源性肝损伤的共识指南^[17],将其划分为肝损伤组和未发生肝损伤组。将两组患者年龄、身高、体质量、合并症及实验室指标ALT、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)和ALP的入院前一般资料进行对比,两组间差异无统计学意义。见表1。

表1 服用雷公藤多苷片治疗RA发生和未发生药源性肝损伤的患者基线资料对比

Table 1 Summary on clinical characteristics between RA patients with or without liver injury induced by TWPT

基线资料	人口学资料					合并症/例(%)				实验室检测($\bar{x} \pm s$)/U·L ⁻¹		
	女/例 (%)	男/例 (%)	年龄 ($\bar{x} \pm s$) /岁	体质量 ($\bar{x} \pm s$) /kg	身高 ($\bar{x} \pm s$) /cm	手足 真菌 感染	间质 性肺 炎	骨关 节炎	干燥 综合 征	ALT	AST	ALP
肝损伤组	4(80)	1(20)	55.40±12.34	59.60±6.97	164.60±5.81	1(20)	2(40)	2(40)	0(0)	10.60±4.92	14.20±4.02	85.60±10.81
未损伤组	4(80)	1(20)	59.20±9.74	57.20±6.46	165.60±3.00	0(0)	3(60)	1(20)	1(20)	9.60±4.50	14.40±3.72	93.60±27.76

2.2 雷公藤多苷片“效”的生物内涵挖掘 基于SoFDA^[16]平台的中医和现代医学临床症状富集分析结果表明,雷公藤多苷片“效”差异基因显著富集于肢重骨痛($P=0.041$)和发热($P=0.022$)等痹证相关的中医症状,还参与了多个RA相关的现代医学临床症状,包括脂质代谢异常相关表型(lipid metabolism phenotypes, $P < 0.01$)、补体系统异常(classic complement pathway component defects, $P=0.029$)和成骨不全(osteogenesis imperfecta, $P=0.046$)。进一步,通过功能富集分析,发现雷公藤多苷片“效”差异基因主要参与机体“免疫-炎症”系统的平衡调节,如中性粒细胞趋化性的调节(regulation of neutrophil chemotaxis)、T细胞增殖活性调节(regulation of T cell proliferation)、免疫应答(immune response)等;其次,雷公藤多苷片“效”差异基因还在细胞功能调控[如核小体组装(nucleosome assembly)、MAPK级联反应(MAPK cascade)、细胞增殖调控(regulation of cell proliferation)、氧化还原反应(oxidation-reduction process)];以及脂质代谢调节,如脂质转运(lipid transport)、脂质代谢反应(lipid metabolic process)中发挥作用。见增强出版附加材料。

基于SoFDA^[16]平台的中医和现代医学临床症

状富集分析结果表明,雷公藤多苷片致毒相关蛋白质的编码基因最显著富集于消化系统异常的中医症状:泛吐清水、食入即吐、呕逆、胃痛($P < 0.01$)、纳呆呕恶($P < 0.01$)、吐血、衄、尿血、便血($P=0.019$)等,以及神经系统异常表现,如神志昏迷($P < 0.01$)、精神烦躁或昏迷谵妄($P < 0.01$)、昏昏欲睡($P=0.015$);在现代医学临床症状相关性方面,雷公藤多苷片致毒相关蛋白质编码基因的异常表达主要导致包括呕吐(vomiting, $P < 0.01$)、昏迷(coma, $P < 0.01$)和无精打采(lethargy, $P=0.013$)、复发性骨折(recurrent fractures, $P=0.014$)和肝肿大(hepatomegaly, $P=0.022$)等消化系统、神经系统、骨骼系统异常的临床症状;相应的,这些毒性相关基因往往引发血液系统疾病,如巨血小板减少症(macrothrombocytopenia, $P=0.022$)、凝血活酶时间活化症(activated partial thromboplastin time, $P=0.036$)等,免疫系统疾病,如经典补体通路成员蛋白水平异常或缺陷(classic complement pathway component defects, $P < 0.01$)等,消化系统疾病,如肝酶水平(碱性磷酸酶)异常[Abnormal of liver enzyme levels (alkaline phosphatase), $P < 0.01$]等,神经系统疾病,如头痛(migraine, $P=0.02$)等,以及泌尿系统疾病,如肾病(nephropathy, $P=0.02$)等。

针对生物学功能的富集结果显示,雷公藤多苷片致毒相关蛋白质的编码基因主要参与机体“免疫-炎症”系统的平衡调节,如非经典的NF- κ B信号通路(noncanonical NF- κ B signaling, $P < 0.01$)、白细胞介素-1信号通路(interleukin-1 signaling, $P < 0.01$)、CD4降解(degradation of CD4, $P < 0.01$)、T细胞受体下游信号通路(downstream TCR signaling, $P < 0.01$)和补体激活通路(regulation of complement activation, $P < 0.01$)等;其次,还在细胞功能调控[如G₂/M检查点(G₂/M checkpoints, $P < 0.01$)、MAPK通路(MAPK6/4 signaling, $P < 0.01$)等]和凝血系统调节(blood coagulation, $P = 0.013$)中发挥着作用。

2.3 雷公藤多苷片“效-毒”关联网络挖掘 利用雷公藤多苷片疗效相关基因集和诱发药源性肝损伤相关致毒基因集(致毒相关蛋白质的编码基因)的交互信息,构建了药物的“效-毒”关联网络,并通过计算网络节点的拓扑特征值(连接度、介度、紧密度),以各特征值的中位数为卡值,筛选网络核心网络靶标;进一步,提取核心网络靶标之间的直接相互作用信息,建立由疗效核心网络靶标和致毒核心网络靶标共同参与的“效-毒”关联子网,再进行深入的功能挖掘。该网络中存在两个“效-毒”差异基因共同参与的子网,见增强出版附加材料。

针对第一个雷公藤多苷片“效-毒”关联子网,根据靶标分子富集分析结果可分为3个功能模块。分别是“免疫-炎症”、细胞功能调控模块和糖原代谢反应和氧化还原反应模块。第二个雷公藤多苷片“效-毒”关联子网,可分为2个功能模块,分别是蛋白质翻译后修饰介导的免疫炎症和RNA剪切和翻译控制模块。见增强出版附加材料。

2.3.1 “免疫-炎症”效毒关联反应模块 该模块中的疗效差异基因和肝损伤差异基因显著富集于中性粒细胞脱颗粒、补体级联反应调控、免疫系统反应、炎症反应。在RA患者中,活化中性粒细胞通过呈递抗原刺激T细胞活化,并积极合成和分泌细胞因子、趋化因子、白三烯和前列腺素等,导致促炎因子在RA关节内大量积累,促进局部炎症^[18]。AKK等^[19]发现,补体激活释放的C5a刺激中性粒细胞脱颗粒过程,进一步放大炎症反应。另一方面,补体激活诱导中性粒细胞聚集,在微血管内形成栓子阻碍血流,并释放溶酶体酶造成组织损伤^[20-21]。

2.3.2 “细胞功能调控”功能模块 参与其中的疗效差异基因和肝损伤差异基因显著富集于肾素-血管紧张素系统(RAS)和丝裂原活化蛋白激酶

(MAPK)信号级联、细胞增殖和细胞周期调控等。RAS/MAPK级联反应是控制细胞生长的主要细胞内信号转导途径。SINGH等^[22]发现,RA患者T细胞中BRAF和KRAS的转录水平明显增加,进而促进ERK通路激活。研究表明,MAPK通路介导RA中血管翳生成、白细胞募集、调节骨吸收等,与RA疾病发展密切相关^[23]。而在药源性肝损伤中,也观察到RAS/MAPK通路的异常活化,对乙酰氨基酚(APAP)诱发肝损伤中Ras的活化,MAPK级联效应放大APAP诱导的线粒体功能障碍^[24-26]。在防治肝损伤方面,抑制RAS/MAPK信号级联下游JNK1/2,可有效减轻APAP和病毒引发的肝损伤^[26-28]。

2.3.3 “糖原代谢反应和氧化还原反应”模块 糖原代谢反应和氧化还原反应模块,参与该模块的均为肝损伤差异基因,其与肝损伤的相关性也非常密切。研究表明在药源性肝损伤(对乙酰氨基酚)、有机物(乙醇、三氯甲烷)致肝损伤肝脏损伤中均存在糖原代谢的改变^[29-30]。药物代谢过程中产生的反应性代谢物可直接损伤肝细胞线粒体,进而促进氧化应激,氧化应激被认为是许多药物毒性的主要机制^[31]。值得注意的是参与该模块的基因均为肝损伤差异基因,而该模块所代表的生物学反应可能与肝脏功能直接相关。

2.3.4 “蛋白质翻译后修饰介导的免疫炎症”功能模块 该模块富集于泛素-蛋白酶体通路,泛素化是一种蛋白质修饰的翻译后机制,泛素化调节涉及T细胞激活,并且可以通过调节26S蛋白酶体来控制核转录因子- κ B(NF- κ B)的激活^[32-33]。NF- κ B参与多种炎症反应,介导RA疾病进展中的关键细胞因子[白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等]和趋化因子(CXCL10等)的表达^[34]。研究表明,雷公藤多苷片有效成分雷公藤甲素,对NF- κ B的调控高度依赖于泛素-蛋白酶体途径^[35]。在肝损伤中,蛋白酶体活性降低促进肝脏氧化应激状态,加重肝脏损伤,增加肝毒性风险^[36-38],使用蛋白酶体抑制剂硼替佐米有助于缓解APAP诱导的急性肝损伤^[39]。

2.3.5 “RNA剪切和翻译控制”功能模块 蛋白质合成涉及一个复杂的机制,特定蛋白质的合成需要转录其mRNA,mRNA可能在其末端(加帽和多聚腺苷酸化)以及内部(剪切、甲基化等)进行一些关键的修饰^[40]。mRNA的转录由RNA结合蛋白(RBP)介导,并且该活性受到蛋白质翻译后修饰的严格控制。RBP通常包含多个蛋白质翻译后修饰位点,其中最常见的是磷酸化(丝氨酸)、乙酰化(赖

氨酸)和精氨酸甲基化,多数细胞功能调控通路均可通过靶蛋白的直接翻译后修饰专用酶行使功能^[41-42]。有学者发现,IL-32 γ 在RA滑膜和成纤维细胞中促进炎症介质分泌加重炎症,在剪切后IL-32 β 后缓解炎症,IL-32 β 的剪切有益于RA的临床治疗^[43-44]。RNA剪切机制的失调同时也存在肝脏疾病中,剪切因子的表达与肝脏炎症、肝脏脂肪变性、肝脏纤维化程度相关^[45-46]。

3 讨论

传统中医药理论认为“药”与“毒”不分,“毒药”是一切药物的总称,正所谓“药者,毒也”。根据中药药性理论认知,中药以其化学成分为始动因素,进入机体后的正向表达为“效”,而负向表达则为“毒”^[47]。中成药亦属于中药范畴,与中药饮片一样具有其药性特点。中成药制备过程中的各种处理方式、工艺参数、制剂辅料、剂型等因素会影响其所含化学成分谱、药动特点和生物利用度,从而会使其药性在一定程度上有别于饮片的药性^[48]。因此,本研究针对雷公藤多苷片所面临的临床应用困境,以其“效-毒”关联特征为切入点,利用临床多组学整合研究策略,初步探析了该品种发挥疗效和导致毒性与其效应靶标参与机体“免疫-炎症”平衡调节、细胞功能调控以及糖原和脂质代谢等环节相关,进一步阐释其药性特点和生物内涵,为寻找其增效减毒途径奠定了良好的数据基础。

多项研究表明,雷公藤多苷片治疗RA的疗效优势环节主要表现在改善关节骨质破坏,缓解晨僵、关节疼痛,降低炎症因子表达等方面^[69]。补体系统激活和中性粒细胞活化与上述RA的临床症状和表型密切相关^[49]。HOLERS等^[50]的研究发现,RA患者血清中的补体(C1q)水平与疾病活动度呈正相关;患者滑膜液中C3d、C4d等补体调节蛋白的水平均异常升高。补体激活有利于中性粒细胞胞外陷阱(NETs)的形成^[51],给予雷公藤甲素干预可有效抑制该进程,从而减少中性粒细胞募集和抑制患者IL-6和TNF- α 血清水平,并减轻中性粒细胞炎症和缓解RA病情严重程度^[52-53]。RAS/MAPK信号级联通路的异常激活也参与了RA的进展过程,Ras蛋白是小的GTP酶,对MAPK、PI3K等通路的启动的激活至关重要。RA患者T细胞中存在异常活化的RAS/MAPK通路,ZAYOUD等^[54]发现靶向Ras信号级联通路的药物在经典的关节炎动物模型AIA中表现出有效的抗炎和免疫调节作用。此外,蛋白质翻译后修饰所介导的“免疫-炎症”反应与多种自身

免疫病,如RA、系统性红斑狼疮密切相关,抗环瓜氨酸抗体已经成为RA的诊断指标^[55-56]。该模块中泛素化-蛋白酶体途径的失调参与RA疾病的发展^[57],在关联子网二中的核心基因蛋白酶体(PSMA3),是幼年特发性关节炎亚型的风险因素^[58]。多个研究表明,蛋白酶体抑制剂治疗可增加成骨细胞分化和骨形成、促进滑膜细胞凋亡、缓解关节炎及镇痛作用^[59-60],值得注意的是,雷公藤红素已被鉴定为一种天然的26S蛋白酶体抑制剂,这或许是雷公藤多苷片治疗RA的潜在机制^[61]。

在诱发药源性肝损伤方面,雷公藤多苷片主要导致RA患者肝功能异常(血清中ALT和AST升高)、上腹部不适(肝区叩击痛阳性)消化系统功能异常(恶心、呕吐)等临床表现^[9,62-63],一致地,本研究所产出的“毒”差异基因也显著富集于呕逆、呕吐和肝肿大等消化系统、神经系统(昏迷等)的临床症状。微观机制层面,雷公藤多苷片致肝损伤也通过“炎症-免疫”模块发挥作用。多个研究表明,雷公藤多苷片的主要活性成分之一雷公藤甲素诱导的小鼠肝损伤中伴有中性粒细胞浸润,诱导白细胞募集,激活自然杀伤T细胞^[64-66]。ZOU等^[67]发现雷公藤甲素促进激活自然杀伤T细胞细胞,促进以CXCL10、ICAM-1和Egr-1为代表的免疫调节因子的表达,进而影响胆汁淤积相关的核受体FXR、转运蛋白OATP1B2和CYP450,造成严重的胆汁淤积性肝损伤。在信号转导方面,多项研究表明,经典药源性肝损伤模型—APAP诱发的肝损伤中可检测到显著的Ras活化表征,且MAPK级联效应会显著加重APAP诱导所致的肝细胞线粒体功能障碍^[24-26];而通过抑制RAS-MAPK信号轴的级联反应,又可有效减轻APAP诱发的肝损伤^[26-28]。线粒体功能障碍是药源性肝损伤的重要原因,在肝损伤中,线粒体蛋白被不同形式的蛋白质翻译后修饰,导致线粒体功能障碍促进氧化应激,影响肝脏内正常的生理代谢^[68-69]。已有多项研究发现,蛋白酶体活性降低促进肝脏氧化应激状态,加重肝脏损伤,增加药物肝毒性的风险^[36-38]。可见,蛋白酶体功能障碍与药源性肝损伤密切相关,而雷公藤多苷片通过调控蛋白酶体相关信号轴而诱发肝损伤的致毒机制尚值得深入的实验验证。

综上所述,本研究通过采用临床表型组学、转录组学和蛋白质组学整合的研究策略,系统阐释了雷公藤多苷片“效-毒”的关联特征和分子机制,丰富了中药雷公藤“毒”药性的科学内涵。RA和药源性

肝损伤发病机制和临床表型复杂多样,雷公藤多苷片所含成分和作用靶点繁多,因而,尚有较多问题有待进一步深入研究,诸如受限于数据资源,雷公藤多苷片“量-效-毒”的关联性研究尚未涉及;难以依托临床多组学数据识别和评价雷公藤多苷片的药效成分群和致毒成分群。因此,破解中药雷公藤制剂临床合理用药的“卡脖子”难题,尚需要高质量的数据资源及有力的研究方法和工具提供支撑。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 兰茂. 滇南本草[M]. 3卷. 昆明:云南人民出版社, 1978:139-139.
- [2] 高伟,刘梦婷,程琪庆,等. 雷公藤的本草考证[J]. 世界中医药,2012,7(6):560-562.
- [3] KAY J, UPCHURCH K S. ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria [J]. Rheumatology,2012,51(6):5-9.
- [4] LV Q W, ZHANG W, SHI Q, et al. Comparison of *Tripterygium wilfordii* Hook F with methotrexate in the treatment of active rheumatoid arthritis (TRIFRA): A randomised, controlled clinical trial[J]. Ann Rheum Dis,2015,74(6):1078-1086.
- [5] GOLDBACH-MANSKY R, WILSON M, FLEISCHMANN R, et al. Comparison of *Tripterygium wilfordii* Hook F versus sulfasalazine in the treatment of rheumatoid arthritis: A randomized trial [J]. Ann Intern Med,2009,151(4):229-240, W49-51.
- [6] DUAN X Y, MA R J, HSIAO C D, et al. *Tripterygium wilfordii* multiglycoside-induced hepatotoxicity via inflammation and apoptosis in zebrafish[J]. Chin J Nat Med,2021,19(10):750-757.
- [7] 李逸群,刘春芳,贾可欣,等. 6个不同厂家雷公藤多苷片大剂量致正常大鼠慢性多脏器损伤的比较研究[J]. 中国中药杂志,2020,45(4):746-754.
- [8] ZHANG Y, MAO X, CHEN W, et al. A Discovery of clinically approved formula FBRP for repositioning to treat HCC by inhibiting PI3K/Akt/NF- κ B activation [J]. Mol Ther Nucleic Acids,2020,19:890-904.
- [9] 李逸群,胡瑞学,贾可欣,等. 雷公藤多苷(甙)片治疗类风湿关节炎的安全性系统评价[J]. 中国中药杂志,2020,45(4):775-790.
- [10] 林娜,姜泉,刘维,等. 雷公藤多苷/雷公藤片治疗类风湿关节炎用药指南[J]. 中国中药杂志,2020,45(17):4149-4153.
- [11] 林娜,姜泉,刘维,等.《雷公藤多苷/雷公藤片治疗类风湿关节炎用药指南》编制说明[J]. 中国中药杂志,2020,45(17):4154-4157.
- [12] LIN N, ZHANG Y Q, JIANG Q, et al. Clinical practice guideline for tripterygium glycosides/*Tripterygium wilfordii* tablets in the treatment of rheumatoid arthritis [J]. Front Pharmacol,2020,11:608703.
- [13] ZHANG Y, WANG X, LI W, et al. Inferences of individual differences in response to Tripterygium glycosides across patients with rheumatoid arthritis using a novel ceRNA regulatory axis [J]. Clin Transl Med,2020,10(6):e185.
- [14] ZHANG Y, WANG H, MAO X, et al. A novel circulating miRNA-based model predicts the response to Tripterygium glycosides tablets: Moving toward model-based precision medicine in rheumatoid arthritis [J]. Front Pharmacol, 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.00378.
- [15] ZHANG Y, WANG H, MAO X, et al. A novel gene-expression-signature-based model for prediction of response to Tripterygium glycosides tablet for rheumatoid arthritis patients [J]. J Transl Med,2018, doi:10.1186/s12967-018-1549-9.
- [16] ZHANG Y, WANG N, DU X, et al. SoFDA: An integrated web platform from syndrome ontology to network-based evaluation of disease-syndrome-formula associations for precision medicine [J]. Sci Bull (Beijing),2022,67(11):1097-1101.
- [17] DEVARBHAVI H, AITHAL G, TREEPRASERTSUK S, et al. Drug-induced liver injury: Asia pacific association of study of liver consensus guidelines [J]. Hepatol Int,2021,15(2):258-282.
- [18] WRIGHT H L, MOOTS R J, BUCKNALL R C, et al. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases [J]. Rheumatology,2010,49(9):1618-1631.
- [19] AKK A, SPRINGER L E, YANG L, et al. Complement activation on neutrophils initiates endothelial adhesion and extravasation [J]. Mol Immunol, 2019, 114: 629-642.
- [20] 李峰,金丽娟. 青藤碱和阿魏酸钠防止补体激活引起的白细胞聚集[J]. 中国病理生理杂志,1990,1:19-22.
- [21] WESTENBERGER G, SELLERS J, FERNANDO S, et al. Function of mitogen-activated protein kinases in hepatic inflammation [J]. J Cell Signal, 2021, 2(3):172-180.
- [22] SINGH K, DESHPANDE P, LI G, et al. K-RAS GTPase- and B-RAF kinase-mediated T-cell tolerance defects in rheumatoid arthritis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2012,109(25):E1629-1637.

- [23] RALPH J A, MORAND E F. MAPK phosphatases as novel targets for rheumatoid arthritis[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2008, 12(7):795-808.
- [24] DAVIS M, STAMPER B D. TAMH: A useful *in vitro* model for assessing hepatotoxic mechanisms [J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016:4780872.
- [25] RAMACHANDRAN A, JAESCHKE H. Acetaminophen hepatotoxicity [J]. *Semin Liver Dis*, 2019, 39(2):221-234.
- [26] SAHA B, NANDI D. Farnesyltransferase inhibitors reduce Ras activation and ameliorate acetaminophen-induced liver injury in mice[J]. *Hepatology*, 2009, 50(5):1547-1557.
- [27] SREEKANTH G P, CHUNCHARUNEE A, CHEUNSUCHON B, et al. JNK1/2 inhibitor reduces dengue virus-induced liver injury [J]. *Antiviral Res*, 2017, 141:7-18.
- [28] IORGA A, DONOVAN K, SHOJAIE L, et al. Interaction of RIPK1 and A20 modulates MAPK signaling in murine acetaminophen toxicity [J]. *J Biol Chem*, 2021, doi: 10. 1016/j. jbc. 2021. 100300.
- [29] PANNALA V R, ESTES S K, RAHIM M, et al. Toxicant-induced metabolic alterations in lipid and amino acid pathways are predictive of acute liver toxicity in rats[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21):8250.
- [30] GU J, ZHANG Y, XU D, et al. Ethanol-induced hepatic steatosis is modulated by glycogen level in the liver[J]. *J Lipid Res*, 2015, 56(7):1329-1339.
- [31] VILLANUEVA-PAZ M, MORÁN L, LÓPEZ-ALCÁNTARA N, et al. Oxidative stress in drug-induced liver injury (DILI) : From mechanisms to biomarkers for use in clinical practice [J]. *Antioxidants*, 2021, doi: 10. 3390/antiox10030390.
- [32] ZHOU X, SUN S. Targeting ubiquitin signaling for cancer immunotherapy[J]. *Signal Transduc Tar*, 2021, 6(1):1-15.
- [33] GRISHAM M B, PALOMBELLA V J, ELLIOTT P J, et al. Inhibition of NF- κ B activation *in vitro* and *in vivo*: Role of 26S proteasome [M]. *Oxidants and Antioxidants Part B: Academic Press*, 1999:345-363.
- [34] ILCHOVSKA D D, BARROW D M. An overview of the NF- κ B mechanism of pathophysiology in rheumatoid arthritis, investigation of the NF- κ B ligand RANKL and related nutritional interventions [J]. *Autoimmun Rev*, 2021, doi: 10. 1016/j. autrev. 2020. 102741.
- [35] YANG H, LIU J, DOU Q P. Targeting tumor proteasome with traditional Chinese medicine[J]. *Curr Drug Discov Technol*, 2010, 7(1):46-50.
- [36] LIU X W, LU F G, ZHANG G S, et al. Proteomics to display tissue repair opposing injury response to LPS-induced liver injury [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(18):2701-2705.
- [37] OSNA N A, DONOHUE T M. Implication of altered proteasome function in alcoholic liver injury [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(37):4931-4937.
- [38] DONOHUE T M, KHARBANDA K K, CASEY C A, et al. Decreased proteasome activity is associated with increased severity of liver pathology and oxidative stress in experimental alcoholic liver disease [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2004, 28(8):1257-1263.
- [39] PARK W J, KIM S Y, KIM Y R, et al. Bortezomib alleviates drug-induced liver injury by regulating CYP2E1 gene transcription [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(3):613-622.
- [40] HERSHEY J W B, SONENBERG N, MATHEWS M B. Principles of translational control [J]. *Csh Perspect Biol*, 2019, doi: 10. 1101/cshperspect. a032607.
- [41] VELÁZQUEZ-CRUZ A, BAÑOS-JAIME B, DÍAZ-QUINTANA A, et al. Post-translational control of RNA-binding proteins and disease-related dysregulation [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, doi: 10. 3389/fmolb. 2021. 658852.
- [42] RUTA V, PAGLIARINI V, SETTE C. Coordination of RNA processing regulation by signal transduction pathways [J]. *Biomolecules*, 2021, doi: 10. 3390/biom11101475.
- [43] HEINHUIS B, KOENDERS M I, VAN DE LOO F A, et al. Inflammation-dependent secretion and splicing of IL-32 γ in rheumatoid arthritis [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2011, 108(12):4962-4967.
- [44] IBÁÑEZ-COSTA A, PEREZ-SANCHEZ C, PATIÑO-TRIVES A M, et al. Splicing machinery is impaired in rheumatoid arthritis, associated with disease activity and modulated by anti-TNF therapy [J]. *Ann Rheum Dis*, 2022, 81(1):56-67.
- [45] LI Y, ZHOU J. Roles of silent information regulator 1-serine/arginine-rich splicing factor 10-lipin 1 axis in the pathogenesis of alcohol fatty liver disease [J]. *Exp Biol Med*, 2017, 242(11):1117-1125.
- [46] WU P, ZHANG M, WEBSTER N J G. Alternative RNA splicing in fatty liver disease [J]. *Front Endocrinol*, 2021, doi: 10. 3389/fendo. 2021. 613213.
- [47] 魏瑞丽,王连心,谢雁鸣. 中药药性认知与临床合理用药的思考 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(21):5462-5467.

- [48] 王美菊. 制剂因素对中成药药性的影响探究[J]. 中国处方药, 2016, 14(1): 107-108.
- [49] 常永龙, 郭锦晨. 中性粒细胞胞外诱捕网在类风湿关节炎免疫炎症中的研究进展[J]. 风湿病与关节炎, 2022, 11(2): 66-70, 76.
- [50] HOLERS V M, BANDA N K. Complement in the initiation and evolution of rheumatoid arthritis [J]. *Front Immunol*, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01057.
- [51] DE BONT C M, BOELENS W C, PRUIJN G. NETosis, complement, and coagulation: A triangular relationship [J]. *Cell Mol Immunol*, 2019, 16(1): 19-27.
- [52] GUAN H, XIE L, JI Z, et al. Triptolide inhibits neutrophil extracellular trap formation [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(17): 1384.
- [53] HUANG G, YUAN K, ZHU Q, et al. Triptolide inhibits the inflammatory activities of neutrophils to ameliorate chronic arthritis [J]. *Mol Immunol*, 2018, 101: 210-220.
- [54] ZAYOUD M, MARCU-MALINA V, VAX E, et al. Ras signaling inhibitors attenuate disease in adjuvant-induced arthritis via targeting pathogenic antigen-specific Th17-type cells [J]. *Front Immunol*, 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.00799.
- [55] ALGHAMDI M, ALASMARI D, ASSIRI A, et al. An overview of the intrinsic role of citrullination in autoimmune disorders [J]. *J Immunol Res*, 2019, 2019: 7592851.
- [56] KLARESKOG L, RÖNNELID J, LUNDBERG K, et al. Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis [J]. *Annu Rev Immunol*, 2008, 26(1): 651-675.
- [57] CHITRA S, NALINI G, RAJASEKHAR G. The ubiquitin proteasome system and efficacy of proteasome inhibitors in diseases [J]. *Int J Rheum Dis*, 2012, 15(3): 249-260.
- [58] SJAKSTE T, PARAMONOVA N, RUMBAROZENFELDE I, et al. Juvenile idiopathic arthritis subtype- and sex-specific associations with genetic variants in the PSMA6/PSMC6/PSMA3 gene cluster [J]. *Pediatr Neonatol*, 2014, 55(5): 393-403.
- [59] WANG Z, LI Z, WANG G, et al. Salubrinal alleviates collagen-induced arthritis through promoting p65 degradation in osteoclastogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(7): 3501.
- [60] KIM E Y, SUDINI K, SINGH A K, et al. Ursolic acid facilitates apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by inducing SP1-mediated Noxa expression and proteasomal degradation of Mcl-1 [J]. *FASEB J*, 2018, 32(11): 6174-6185.
- [61] 池宏宇, 姚雪敏, 张国鑫, 等. 肥胖与抑郁共病小鼠模型建立及在雷公藤红素药效药理研究中的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(14): 81-91.
- [62] 杨超, 胡智星, 明瑞蕊, 等. 雷公藤多苷片联用甲氨蝶呤和/或来氟米特对类风湿关节炎自身抗体影响的Meta分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(5): 39-48.
- [63] 张依, 王晓月, 丁子禾, 等. 中药配伍雷公藤制剂治疗类风湿关节炎的安全性系统评价及其增效减毒网络调控机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(5): 1-8.
- [64] WANG X, XUE R, ZHANG S, et al. Activation of natural killer T cells contributes to triptolide-induced liver injury in mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(12): 1847-1854.
- [65] YUAN Z, HASNAT M, LIANG P, et al. The role of inflammasome activation in Triptolide-induced acute liver toxicity [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 75: 105754-105754.
- [66] WANG X, ZHANG S, XU Y, et al. The role of neutrophils in triptolide-induced liver injury [J]. *Chin J Nat Medicines*, 2018, 16(9): 653-664.
- [67] ZOU M, NONG C, YU Z, et al. The role of invariant natural killer T cells and associated immunoregulatory factors in triptolide-induced cholestatic liver injury [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, doi: 10.1016/j.fct.2020.111777.
- [68] DAS D, PAUL A, LAHIRI A, et al. Proteasome dysfunction under compromised redox metabolism dictates liver injury in NASH through ASK1/PPAR γ binodal complementary modules [J]. *Redox Biol*, 2021, doi: 10.1016/j.redox.2021.102043.
- [69] SONG B J, AKBAR M, ABDELMEGEED M A, et al. Mitochondrial dysfunction and tissue injury by alcohol, high fat, nonalcoholic substances and pathological conditions through post-translational protein modifications [J]. *Redox Biol*, 2014, 3: 109-123.

[责任编辑 孙丛丛]