

【网络药理学专栏】

基于系统药理学的雷公藤配伍甘草治疗类风湿性关节炎作用机制研究

陈瑾, 刘传鑫, 杨培, 曾琪, 陈敏, 雷仲夏, 詹雪艳*

北京中医药大学 中药学院, 北京 100029

摘要: 目的 基于系统药理学方法研究雷公藤配伍甘草治疗类风湿性关节炎作用机制。方法 基于中药系统药理学平台(TCMSP)数据库和文献搜索,建立雷公藤配伍甘草化学成分库。运用DRAR-CPI、中医分子机制的生物信息学分析工具(BATMAN-TCM)等在线预测网站,预测成分靶标,并与疾病靶标取交集得到雷公藤配伍甘草治疗类风湿性关节炎作用靶标。通过作用靶标反向筛选潜在活性成分,并用超高效液相色谱-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF/MS)分析手段对活性成分进行验证。利用GeneMANIA数据库搜索间接靶标并利用蛋白互作筛选关键靶标,采用分子对接技术(SystemsDock)对潜在活性成分和关键靶标进行匹配,验证前期靶标筛选的可靠性以及反向药效团匹配的正确性。通过GO和京都基因与基因组百科全书通路分析(KEGG)生物学注释分析关键作用通路,探讨雷公藤配伍甘草治疗类风湿性关节炎作用机制。结果 共得到33个化学成分和47个潜在靶标,其中32个成分31个靶标和35条通路与药对治疗类风湿性关节炎有密切关系,主要涉及花生四烯酸代谢通路、白介素(IL)-17信号通路、核因子(NF)- κ B信号通路等炎症通路以及T细胞受体信号通路、C型凝集素受体信号通路等与免疫相关的通路。结论 雷公藤配伍甘草治疗类风湿性关节炎主要通过炎症与免疫调节等多条途径得以实现。

关键词: 雷公藤; 甘草; 类风湿性关节; 系统药理学; 靶点; 通路; 机制

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2019)09-1705-18

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.09.003

Exploration of *Triptergium wilfordii* Hook. F combined with *Glycyrrhiza uralensis* in treatment of Rheumatoid Arthritis based on systematic pharmacology

CHEN Jin, LIU Chuanxin, YANG Pei, ZENG Qi, CHEN Min, LEI Zhongxia, ZHAN Xueyan

School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 10029, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of *Triptergium wilfordii* combined with *Glycyrrhiza uralensis* in the treatment of Rheumatoid Arthritis based on systematic pharmacology. **Methods** TCMSP database and literature search were used to establish the chemical constituents Library of *Triptergium wilfordii* combined with *Glycyrrhiza uralensis*. The target of components was predicted through DRAR-CPI, BATMAN-TCM and other online prediction websites, and intersect with disease targets to obtain the therapeutic targets of *Triptergium wilfordii* combined with *Glycyrrhiza uralensis* for Rheumatoid Arthritis. Potential active components were screened by reverse targeting and verified by ultra-high performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS). GeneMANIA database was used to search indirect targets and protein interaction was used to screen key targets. Molecular docking technology (Systems Dock) was used to match potential active ingredients with key targets to verify the reliability of previous target screening and the correctness of reverse pharmacophore matching. To explore the mechanism of *Triptergium wilfordii* combined with *Glycyrrhiza uralensis* in the treatment of rheumatoid arthritis, key pathways were analyzed by GO and KEGG biological annotations. **Results** A total of 33 chemical constituents and 47 potential targets were obtained. Among them, 31 targets of 32 components and 35 pathways were closely related to drug therapy for Rheumatoid Arthritis, mainly involving the inflammatory pathways such as arachidonic acid metabolic pathway, IL-17 signaling pathway, as well as the immune-related pathways such as NF- κ B signaling pathway and T cell receptor signaling pathway. **Conclusion** The treatment of *Triptergium*

收稿日期: 2019-04-01

第一作者: 陈瑾(1994—),女,硕士,研究方向为中药分析与系统药理学。E-mail:15930271205@163.com

*通信作者: 詹雪艳 E-mail:snowzhan@126.com

wilfordii combined with *Glycyrrhiza uralensis* mainly through inflammation and immune regulation.

Key words: *Tripterygium wilfordii* Hook. F; *Glycyrrhiza uralensis*; Rheumatoid Arthritis; systemic pharmacology; targets; pathways; mechanism

类风湿关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)是一种以慢性进展性滑膜炎并侵蚀软骨、最终导致骨与关节破坏为特征的世界难治性自身免疫性疾病。发病率和致残率高,我国的患病率为0.32%~0.36%,近年已被发达国家列为未来25年中对人类健康影响最大、医疗消费最高的五大疾病之一^[1]。

目前西药治疗RA虽然有起效快、种类多的优点,但这些药物都具有潜在的副作用,例如免疫缺陷、肝损伤、胃肠道反应、低血细胞计数、心脏病等^[2]。中药治疗RA有独特的优势,表现出整体调节、多层次、多靶点的作用,常用除湿、祛风、散寒、通络、行瘀等法,兼以扶正治疗,而且还能缓解和对抗西药的毒副作用^[3]。雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. F 具有明确的抗风湿作用,甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 可以缓解雷公藤的毒性,两药为治疗RA的常用中药,但其抗风湿的作用机制尚不清楚。

系统药理学是从系统水平研究药物与机体相互作用及其规律和作用机制的一门新兴学科^[4]。其突破了传统的“一个药物一个靶标,一种疾病”理念^[5],具有整体性、系统性的特点,这与中医药整体观与辩证论治的原则不谋而合^[6-8]。从系统水平研究中药和机体的相互作用,为新药开发、靶点发现、新的治疗策略等提供简便的研究方法。然而系统药理学研究是基于数据挖掘的分析方法,数据库信息来源有限,如果未经实验验证可能会导致结果的假阳性或假阴性。而UPLC-Q-TOF/MS作为一种分析手段可以为科学阐明配伍中药效物质基础和建立质量控制体系提供依据。

基于以上研究现状,本实验通过液质联用技术对系统药理学研究过程中发现的潜在活性成分进行了检测,将二者相结合有利于阐明配伍中的药效物质基础和挖掘作用机制相关靶点、通路等信息。本研究通过反向筛选发现雷公藤配伍甘草的33个潜在活性成分,作用于肿瘤坏死因子(TNF)、白介素(IL)-10、前列腺素内过氧化物合酶2(PTGS2)等核心靶标,从而调节相关通路,抑制类风湿性关节炎,为后续的分子药理学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 系统药理学研究

1.1.1 化学成分库构建 以“雷公藤”“甘草”为关

键词,从中药系统药理学平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology, TCMSP)(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)和中医分子机制的生物信息学分析工具(Bioinformatics Analysis Tool for Molecular Mechanism of TCM, BATMAN-TCM)(<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)中检索与这两味中药相关的所有化学成分。

1.1.2 活性化合物的阈值筛选 本研究选择化合物口服生物利用度(oral bioavailability, OB),筛选阈值为OB≥30%,化合物类药性(druglikeness, DL),筛选阈值为DL≥0.18^[9],作为筛选化合物分子的条件。

1.1.3 “成分-靶标”的预测和构建 依托BATMAN-TCM(<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)和DRAR-CPI(<http://cpi.bio-x.cn/drar/>)两个在线数据库搜索雷公藤和甘草中化学成分的作用靶标信息。在BATMAN-TCM数据库中,分别以“雷公藤”、“甘草”为关键词,设置“药物-靶点”相似性模型阈值Score cutoff≥20和P≤0.05,检索筛选雷公藤和甘草的活性成分及对应的潜在靶点^[10]。利用Pubchem数据库,下载这两味中药所有化学成分的SDF格式,未收录的通过InDraw软件绘制。将所有的成分SDF格式在DRAR-CPI数据库进行上传,以Z'-score<-0.5为标准纳入为潜在靶点^[11];将BATMAN-TCM和DRAR-CPI数据库筛选各化学成分作用靶标进行整合,通过UniProt(<https://www.uniprot.org/>)数据库检索,限定物种为Homo sapiens,校正靶标为标准基因名,得到雷公藤配伍甘草的“化学成分-作用靶标”信息。

1.1.4 “类风湿性关节炎-靶标”库的筛选和构建 在比较基因组学毒理数据库(The Comparative Toxicogenomics Database, CTD)(<http://ctdbase.org/>)和治疗靶点数据库(Therapeutic Target Database, TTD)(<http://bidd.nus.edu.sg/BIDD-Databases/TTD/TTD.asp>)这两个数据库中输入关键词“类风湿性关节炎(Rheumatoid Arthritis)”筛选已报道的、与类风湿性关节炎相关的基因,得到类风湿性关节炎靶标数据库。

1.1.5 共有靶标的获取 将“1.1.3”和“1.1.4”取交集得到的雷公藤配伍甘草治疗RA的作用靶标,并

通过作用靶标反向筛选潜在活性成分。

1.2 基于 UPLC-Q-TOF/MS 潜在药效物质基础的验证

1.2.1 材料

(1) 药品与试剂甘草饮片、雷公藤药材(河北安国), 质谱级乙腈(赛默飞世尔科技有限公司), 质谱级甲酸(赛默飞世尔科技有限公司), 屈臣氏超纯水(广州屈臣氏食品饮料有限公司)

(2) 仪器与设备 Waters Acquity UPLC Class H 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), Waters G2 Q-TOF/MS 高分辨质谱仪(美国 Waters 公司), Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)(美国 Waters 公司), 数据处理软件 MassLynx 4.1。

1.2.2 溶液的配制

取适量雷公藤药材(粉碎成粗颗粒状)以及生甘草饮片。雷公藤:甘草分别为 45:5^[12]、60:9^[12]、3:1^[13]、15:7.5^[12], 8 倍体积, 60% 乙醇回流提取 3 次, 合并滤液。滤液 12 000 r/min 离心, 取上清液, 备用。

1.2.3 分析条件

(1) 色谱条件色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 40 °C, 进样量 5 μL, 流动相: A 相为 0.1% 甲酸水溶液, B 相为 0.1% 甲酸乙腈, 采用梯度洗脱, 具体洗脱条件见表 1。

表 1 雷公藤配伍甘草 UPLC-Q-TOF/MS 色谱洗脱条件
Table 1 Chromatographic Elution Conditions for UPLC-Q-TOF/MS Detection of Tw combined with GR

t/min	A(0.1% 甲酸水)	B(0.1% 甲酸乙腈)
0	98%	2%
14	40%	60%
16.5	2%	98%
18	2%	98%
20	98%	2%

(2) 质谱条件采用电喷雾电离源 ESI, 在正、负离子模式下分别进行质谱检测分析。使用高纯 N₂ 作为辅助喷雾电离与脱溶剂气体, 干燥气体积流量为 10 mL/min, N₂ 温度为 120 °C, 雾化气气压为 310 kPa, 脱溶剂氮气体积流量 900 L/h, 锥孔反吹氮气 50 L/h。毛细管电离电压 500 V, 锥孔电压 40 V, 碰撞能量为 40~65 eV, 四极杆扫描范围为 50~1 200。

1.3 生物信息学分析

1.3.1 间接靶标的获取 将“1.1.5”得到的雷公藤

配伍甘草治疗 RA 的作用靶标导入 GeneMANIA(<http://genemania.org/>)数据库, 获取靶标之间相互作用关系, 进而得到间接靶标。

1.3.2 大规模蛋白互作分析 基于 String 平台挖掘其蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI), 并将其导入 Cytoscape 平台进行网络分析, 选择 Homo sapiens, 打分默认 0.4^[14], 获取 TSV 格式, 保留文件中 node1、node2 数据导入 Cytoscape 3.7.1 软件绘制互作网路, 删除重复和孤立边, 以节点反映网络中连接“度”的大小, 并以此作为重要参考, 筛选网络拓扑中的关键靶蛋白。提取分析这些候选节点网络关系, 计算节点的中介中心度 (Betweenness Centrality, BC)、接近中心性 (Closeness Centrality, CC) 和拓扑系数 (Topological Coefficient, TC) 的相关信息。

1.3.3 分子对接验证 分子对接是通过受体的特征以及受体和药物分子之间的相互作用方式来进行药物设计的方法。主要研究分子间(如配体和受体)相互作用, 并预测其结合模式和亲和力的一种理论模拟方法。系统对接分析 (SystemsDock) 系统对接网站 (Systems Dock Web Site) 可以对小分子靶点、配体与受体结合进行在线分析, 基于 Dock-IN 评分预测配体和受体结合潜力^[15]。首先从蛋白质晶体结构数据库 PDB(<http://www.Rcsb.org/pdb>) 得到网络拓扑学分析中重要靶蛋白的 3D 晶体结构, 本研究基于在线 SystemsDock Web Site 网站, 在 Proteins and binding sites 中输入 PDB ID。在准备小分子一栏中上传活性化合物 SDF 结构 (5 个/次), 然后进行对接。参考 degree 值, 在拓扑学分析中排名前三的蛋白被认为是关键靶蛋白, 将 1.6 得到的关键靶蛋白通过分子对接验证前期靶标筛选的可靠性, 通过将关键靶蛋白与化学成分进行对接以验证前期反向药效团匹配的正确性。

1.3.4 通路富集分析 基因本体论 GO 分析是一种通过生物途径、细胞组分、和分子功能对基因进行说明与注释的通路富集分析方法。京都基因与基因组百科全书通路分析 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway, KEGG) 可对筛选靶标参与的通路利用统计分析方法进行富集分析。采用 Metascape 基因聚类在线分析工具库 (<http://metascape.org/gp/index.html>), 基于上述所得到的所有互作靶标, 进行 GO 生物分析: 选择数据类型为 H. sapiens, 然后进行 Custom Analysis, 分别选 GO Biological Processes, GO Cellular Components 和 GO

Molecular Functions。其他设置默认,筛选生物途径和分子功能筛选错误率(false discovery rate, FDR)值小于0.01的生物过程或者相关通路,细胞组分FDR值小于0.05的生物过程或者相关通路。将作用靶标导入 The carcinogenic potency Database (CPDB) (<http://cpdb.molgen.mpg.de/>)在线数据库进行 KEGG 通路分析: 点击 over-representation analysis, 数据类型选 gene symbol (HGNC symbol), 选 KEGG 通路分析, 设置 minimum overlap with input list: 2, p -value cutoff: 0.05, 最后通过 Analysis Report Page 将结果可视化。

1.3.5 “药对-成分-直接靶标-间接靶标-相关通路-类风湿性关节炎”分析网络的构建 在 Excel 表格中分别按照两列构建“雷公藤-成分”、“甘草-成分”“成分-直接靶标”、“直接靶标-间接靶标”、“全部靶标-相关通路”的列表, 并将其分别导入 Cytoscape Version 3.7.1 软件, 构建网络。再采用软件的 Merge 功能, 并利用 Layout 功能进行数据的可视化分析, 从而构建“药对-成分-直接靶标-间接靶标-相关通路-类风湿性关节炎”的分析网络。

2 结果

2.1 雷公藤配伍甘草化学成分库的构建及靶标预测

基于 TCMSP、BATMAN-TCM 化学成分数据库

及文献, 共搜集了雷公藤配伍甘草 424 个化合物, 其中雷公藤的化学成分有 144 个, 甘草的化学成分有 280 个。通过阈值筛选, 共有 140 个化合物符合筛选条件。由于雷公藤中的雷公藤红素为活性成分, 故另外纳入为候选化合物^[16]; 还将文献中报道过的有效成分甘草酸、甘草次酸和异甘草苷纳入候选化合物^[17]。然后, 基于 DRAR-CPI、BATMAN-TCM 等相关在线预测网站, 共发现 590 个化学成分对应的作用靶标作为药物的潜在靶标。

2.2 “类风湿性关节炎-靶标”

以“类风湿性关节炎 (Rheumatoid arthritis, RA)”为关键词, 在 CTD 数据库中找到 188 个标记有“marker/mechanism”的疾病靶标, TTD 数据库中找到 15 个疾病靶点, 随后通过 Uniprot 数据库的 UniProt KB 搜索功能将蛋白名转化为标准基因靶点, 合并去重后共得到 191 个疾病作用靶标。将得到的药物潜在靶标和疾病作用靶标进行比对, 得到两者的交集靶标。其中, 33 个化学成分被认为是治疗 RA 的潜在药效物质基础, 27 个靶标被认为是雷公藤配伍甘草治疗 RA 的相关作用靶标。通过 GeneMANIA 数据库, 获取靶标对相互作用关系, 找到间接靶标 20 个。筛选出的化学成分见表 2, 作用靶标见表 3。

表 2 雷公藤配伍甘草治疗 RA 的化学成分基本信息

Table 2 Basic information on chemical constituents of Tw combined with GR in the treatment of RA

化合物编号	化合物名称	OB/%	DL	来源
MOL000296	hederagenin	36.91	0.75	雷公藤
MOL003187	triptolide	51.29	0.68	雷公藤
MOL003189	wilforlide A	35.66	0.72	雷公藤
MOL003192	triptonide	67.66	0.70	雷公藤
MOL003196	tryptophenolide	48.50	0.44	雷公藤
MOL003206	canin	77.41	0.33	雷公藤
MOL003208	celafurine	72.94	0.44	雷公藤
MOL003210	celapanine	30.18	0.82	雷公藤
MOL003217	isoxanthohumol	56.81	0.39	雷公藤
MOL003222	salazinic acid	36.34	0.76	雷公藤
MOL003225	hypodioid A	76.13	0.49	雷公藤
MOL003229	triptinin B	34.73	0.32	雷公藤
MOL003231	triptoditerpenic acid B	40.02	0.36	雷公藤
MOL003232	triptofordin B1	39.55	0.84	雷公藤
MOL003245	triptonoditerpenic acid	42.56	0.39	雷公藤
MOL003278	salaspermic acid	32.19	0.63	雷公藤
MOL003280	triptonolide	49.51	0.49	雷公藤
MOL000422	kaempferol	41.88	0.24	雷公藤, 甘草
MOL003656	lupiwighteone	51.64	0.37	甘草

(续表2)

化合物编号	化合物名称	OB/%	DL	来源
MOL004814	isotrifoliol	31.94	0.42	甘草
MOL004856	gancaonin A	51.08	0.40	甘草
MOL004882	licocoumarone	33.21	0.36	甘草
MOL004903	liquiritin	65.69	0.74	甘草
MOL004904	licopyranocoumarin	80.36	0.65	甘草
MOL004907	glyzaglabrin	61.07	0.35	甘草
MOL004948	isoglycyrol	44.70	0.84	甘草
MOL004949	isolicoflavonol	45.17	0.42	甘草
MOL000497	licochalcone A	40.79	0.29	甘草
MOL004974	3'-methoxyglabridin	46.16	0.57	甘草
MOL003186	celastrol	17.84	0.78	雷公藤
MOL004876	glycyrrhizic acid	19.62	0.11	甘草
MOL004804	glycyrrhetic acid	22.05	0.74	甘草
MOL004951	isoliquiritin	8.61	0.60	甘草

表3 雷公藤配伍甘草治疗RA的成分作用靶标信息

Table 3 Target information of components and effects of Tw combined with GR in the treatment of RA

序号	基因	Uniprot ID	靶标	频率	类型
1	HSD11B1	P28845	Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 1	27	直接靶标
2	ANXA3	P12429	Annexin A3	25	直接靶标
3	CD2	P06729	T-cell surface antigen CD2	21	直接靶标
4	GC	P02774	Vitamin D-binding protein	19	直接靶标
5	JAK3	P52333	Tyrosine-protein kinase JAK3	16	直接靶标
6	IL10	P22301	Interleukin-10	16	直接靶标
7	LCN2	P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	15	直接靶标
8	NR3C1	P04150	Glucocorticoid receptor	12	直接靶标
9	PON1	P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1	12	直接靶标
10	DHFR	P00374	Dihydrofolate reductase	11	直接靶标
11	AKR1B1	P15121	Aldose reductase	8	直接靶标
12	CTSD	P07339	Cathepsin D	8	直接靶标
13	DHODH	Q02127	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone), mitochondrial	7	直接靶标
14	F2	P00734	Prothrombin	5	直接靶标
15	MIF	P14174	Macrophage migration inhibitory factor	4	直接靶标
16	ALOX5	P09917	Arachidonate 5-lipoxygenase	4	直接靶标
17	TNF	P01375	Tumor necrosis facto	3	直接靶标
18	ATIC	P31939	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	3	直接靶标
19	PADI4	Q9UM07	Protein-arginine deiminase type-4	2	直接靶标
20	PTGS2	P35354	Prostaglandin G/H synthase 2	2	直接靶标
21	PTGS1	P23219	Prostaglandin G/H synthase 1	2	直接靶标
22	MTHFR	P42898	Methylenetetrahydrofolate reductase	1	直接靶标
23	GDF5	P43026	Growth/differentiation factor 5	1	直接靶标
24	STS	P08842	Steryl-sulfatase	1	直接靶标
25	CALD1	Q05682	Caldesmon	1	直接靶标
26	BMP4	P12644	Bone morphogenetic protein 4	1	直接靶标
27	GART	P22102	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	1	直接靶标
28	CD36	P16671	Platelet glycoprotein 4	-	间接靶标

(续表3)

序号	基因	Uniprot ID	靶标	频率	类型
29	COTL1	Q14019	Coactosin-like protein	-	间接靶标
30	RBKS	Q9H477	Ribokinase	-	间接靶标
31	DDT	P30046	D-dopachrome decarboxylase	-	间接靶标
32	TKFC	Q3LXA3	Triokinase/FMN cyclase	-	间接靶标
33	TLL2	Q9Y6L7	Tolloid-like protein 2	-	间接靶标
34	TYMS	P04818	Thymidylate synthase	-	间接靶标
35	GGA3	Q9NZ52	ADP-ribosylation factor-binding protein GGA3	-	间接靶标
36	GREM2	Q9H772	Gremlin-2	-	间接靶标
37	GZMM	P51124	Granzyme M	-	间接靶标
38	IARS2	Q9NSE4	Isoleucine--tRNA ligase, mitochondrial	-	间接靶标
39	IL19	Q9UHD0	Interleukin-19	-	间接靶标
40	IL20	Q9UHF4	Interleukin-20 receptor subunit alpha	-	间接靶标
41	LMLN	Q96KR4	Leishmanolysin-like peptidase	-	间接靶标
42	LPP	P69776	Major outer membrane prolipoprotein Lpp	-	间接靶标
43	MRI1	Q9BV20	Methylthioribose-1-phosphate isomerase	-	间接靶标
44	PAICS	P22234	Multifunctional protein ADE2	-	间接靶标
45	PFAS	O15067	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	-	间接靶标
46	PROZ	P22891	Vitamin K-dependent protein Z	-	间接靶标
47	PSAP	P07602	Prosaposin	-	间接靶标

2.3 超高效液相色谱-飞行时间质谱结果 在雷公藤配伍甘草后,通过UPLC-Q-TOF/MS均能
实验结果显示,筛选出来的33种潜在活性成分 检出,具体情况见表4、图1。

表4 雷公藤配伍甘草治疗RA的活性成分鉴定结果

Table 4 Mass spectrometry data and identification results of Tw combined with GR in treatment of RA

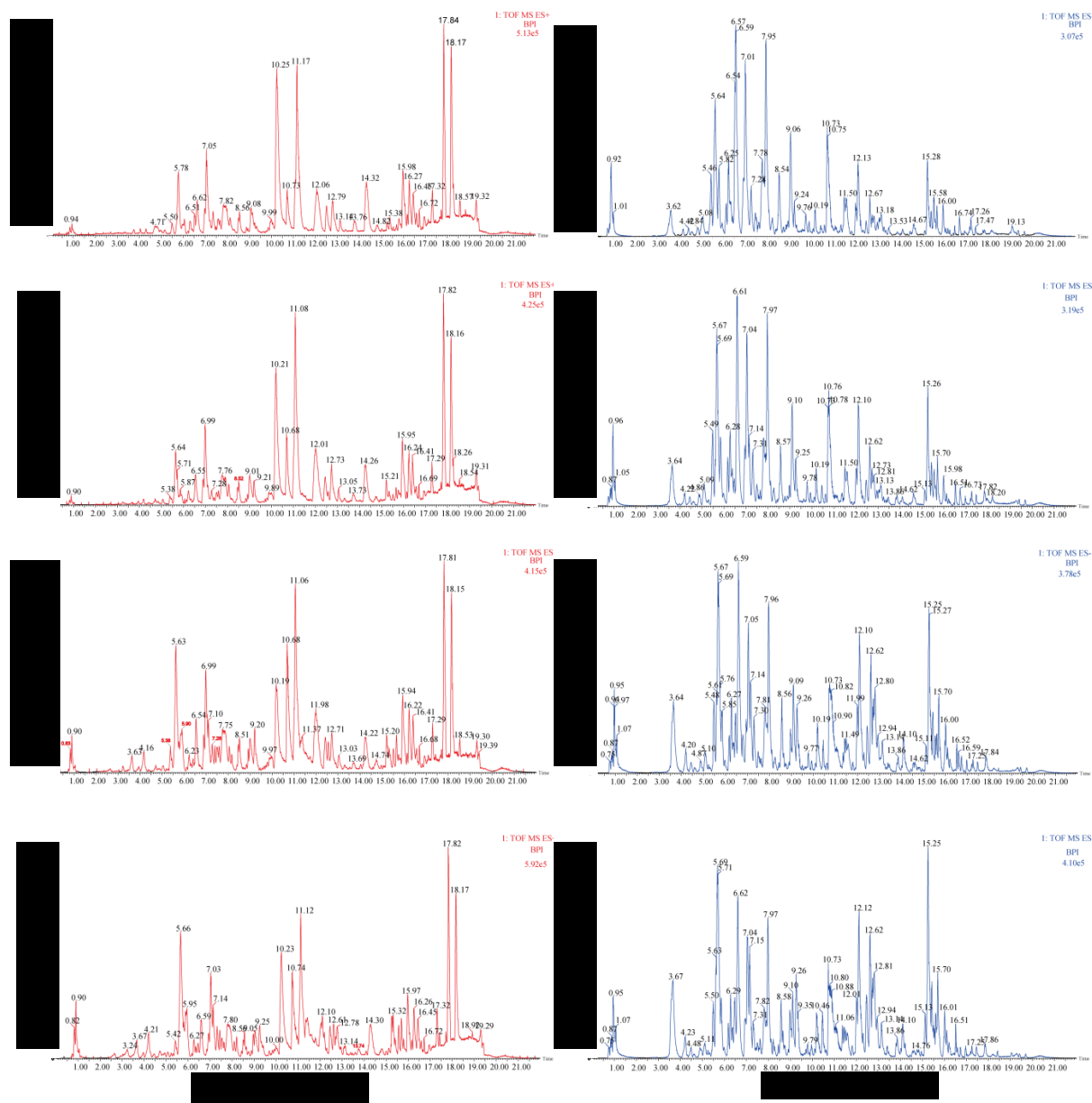
序号	保留时间	ESI	化合物	分子式	计算分子量	实测分子量	误差	MS/MS
1	6.033	[M+H] ⁺	triptolide	C ₂₀ H ₂₄ O ₆	361.165 1	361.165 4	0.83	361.1[M+H] ⁺ 343.1[M+H-H ₂ O] ⁺ 345.0[M+H-CH ₄] ⁺ 279.0[M+H-3H ₂ O-CO] ⁺ 303.0[M+H-CO-CH ₂ O] ⁺ 251.0[M+H-C ₆ H ₆ O ₂] ⁺ 249.1[M+H-C ₆ H ₆ O ₂ -H ₂] ⁺
2	11.779	[M-H] ⁻	triptonolide	C ₂₀ H ₂₂ O ₄	325.144 0	325.145 1	3.38	325.1[M-H] ⁻ 309.2[M-H-CH ₄] ⁻ 297.1[M-H-CO] ⁻ 281.0[M-H-CO ₂] ⁻ 267.0[M-H-C ₂ H ₂ O] ⁻ 265.1[M-H-CH ₄ -CO ₂] ⁻ 251.0[M-H-CH ₄ -C ₂ H ₂ O ₂] ⁻
3	7.078	[M+H] ⁺	triptonoditerpenic acid	C ₂₁ H ₂₈ O ₄	345.206 6	345.204 3	-6.6	313.0156 [M+H-CH ₃ OH] ⁺ 327.1224[M+H-H ₂ O] ⁺ 235.0739[M+H-C ₆ H ₆ O ₂] ⁺
4	17.362	[M-H] ⁻	wilforlide A	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	453.336 9	453.338 3	3.09	453.3383[M-H] ⁻ 409.3[M-H-CO ₂] ⁻ 435[M-H-H ₂ O] ⁻ 208.0[M-H-C ₁₆ H ₂₂ O ₂] ⁻

(续表4)

序号	保留时间	ESI	化合物	分子式	计算分子量	实测分子量	误差	MS/MS
5	16.003	[M-H] ⁻	tryptophenolide	C ₂₀ H ₂₄ O ₃	311.164 7	311.166 4	5.46	311.1664[M-H] ⁻ 295.0[M-H-CH ₄] ⁻ 283.1[M-H-CO] ⁻ 267.0[M-H-CO ₂] ⁻ 265.0[M-H-CO-H ₂ O] ⁻ 253.1[M-H-CO-CH ₃ O] ⁻ 251.0[M-H-CH ₄ -CO ₂] ⁻ 237.0[M-H-CH ₄ -C ₂ H ₂ O ₂] ⁻ 201.0[M-H-C ₆ H ₆ O ₂] ⁻ 199.0[M-H-C ₆ H ₆ O ₂ -H ₂] ⁻
6	11.196	[M-H] ⁻	licopyranocoumarin	C ₂₁ H ₂₀ O ₇	383.113 1	383.112 5	-1.57	383.1125[M-H] ⁻ 366.1[M-H-OH] ⁺ 368.0[M-H-CH ₃] ⁺
7	7.597	[M-H] ⁻	kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.039 9	285.039 2	-2.45	285.0392[M-H] ⁻ 256.0[M-H-CO] ⁻ 228.0[M-H-2CO] ⁻ 210.0[M-H-HCOOH] ⁻ 184.0[M-H-C ₄ H ₄ O ₃] ⁻ 168.0[M-H-C ₄ H ₄ O ₄] ⁻ 150.0[M-H-C ₄ H ₄ O ₄ -H ₂ O] ⁻
8	16.046	[M-H] ⁻	glycyrrhetic acid	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	469.331 8	469.333 3	3.20	469.3333[M-H] ⁻ 425.2[M-H-HCOOH] ⁻
9	5.692	[M-H] ⁻	liquiritin or isoliquiritin	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	417.118 6	417.118 1	-1.20	417.1181[M-H] ⁻ 255.0[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ 135.0[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₇ H ₄ O ₂] ⁻
10	7.150	[M-H] ⁻	liquiritin or isoliquiritin	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	417.118 6	417.118 6	0	417.1186[M-H] ⁻ 255.0[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ 135.0[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₇ H ₄ O ₂] ⁻
11	10.726	[M-H] ⁻	glycyrrhizic acid	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	821.396 0	821.394 7	-1.58	821.3947[M-H] ⁻ 645.2[M-H-C ₆ H ₈ O ₆] ⁻ 469.3 [M-H-2C ₆ H ₈ O ₆] ⁻
12	8.202	[M+H] ⁺	hederagenin	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	473.363 1	473.362 5	-1.27	473.3625[M+H] ⁺ 455.3[M+H-H ₂ O] ⁺ 437.3[M+H-2H ₂ O] ⁺ 419.1[M+H-3H ₂ O] ⁺ 329.1[M+H-C ₉ H ₄ O ₂] ⁺
13	15.689	[M+H] ⁺	isoglycyrol	C ₂₁ H ₁₈ O ₆	367.118 2	367.117 2	-2.7	367.1172[M+H] ⁺ 311.0527 339.1217
14	7.540	[M+H] ⁺	triptonide	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	359.149 5	359.148 0	-4.17	359.1480[M+H] ⁺ 341.1 [M+H-H ₂ O] ⁺ 331.1 [M+H-CO] ⁺ 313.1[M+H-CO-H ₂ O] ⁺
15	16.948	[M+H] ⁺	triptinin B	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	315.196 0	315.194 8	-3.8	243.1 219.1 205.2

(续表4)

序号	保留时间	ESI	化合物	分子式	计算分子量	实测分子量	误差	MS/MS
16	17.118	[M+H] ⁺	hypodioid A	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	319.227 3	319.229 1	5.6	319.2291[M+H] ⁺ 255.1, 131.0
17	12.944	[M+H] ⁺	licochalcone A	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	339.159 6	339.158 2	-4.13	339.1582[M+H] ⁺ 307.0[M+H-CH ₃ OH] ⁺ 283.1[M+H-C ₄ H ₈] ⁺ 271.0[M+H-C ₅ H ₈] ⁺
18	9.083	[M+H] ⁺	lupiwighteone	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	339.123 2	339.122 5	-2.06	147.0[M+H-C ₁₁ H ₁₂ O ₃] ⁺ 119.0[M+H-C ₁₂ H ₁₂ O ₄] ⁺
19	7.832	[M+H] ⁺	licocoumarone	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	341.138 9	341.138 2	-2.05	353.1, 284.0 216.0, 182.0
20	5.726	[M+Na] ⁺	celastrol	C ₂₉ H ₃₈ O ₄	473.266 8	473.263 7	-6.5	473.2637[M+Na] ⁺ 405.2[M+H-HCOOH] ⁺ 257.0 [M+H-C ₁₂ H ₁₉ O ₂] ⁺ 201.0 [M+H-C ₁₆ H ₂₇ O ₂] ⁺
21	7.683	[M-H] ⁻	canin	C ₁₅ H ₁₈ O ₅	277.107 6	277.107 5	-0.36	277.1075[M-H] ⁻ 259.0[M-H-H ₂ O] ⁻
22	11.217	[M+Na] ⁺	celafurine	C ₂₁ H ₂₇ N ₃ O ₃	392.195 0	392.193 7	-3.31	392.1937[M+Na] ⁺ 374.0[M+Na-H ₂ O] ⁺ 325.1[M+Na-C ₄ H ₃ O] ⁺
23	5.841	[M-H] ⁻	celapanine	C ₃₀ H ₃₅ NO 10	568.218 3	568.216 4	-3.67	568.2164[M-H] ⁻ 553.1[M-H-CH ₃] ⁻ 523.1[M-H-HCOO] ⁻
24	12.589	[M+H] ⁺	isoxanthohumol	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	355.154 5	355.153 1	-3.9	355.1531[M+H] ⁺ 338.1[M+H-OH] ⁺ 337.1[M+H-H ₂ O] ⁺ 340.1[M+H-CH ₃] ⁺
25	12.034	[M+Na] ⁺	salazinic acid	C ₁₈ H ₁₂ O ₁₀	411.032 8	411.034 5	4.14	411.0345[M+Na] ⁺ 394.1[M+Na-OH] ⁺
26	15.889	[M+K] ⁺	triptoditerpenic acid B	C ₂₁ H ₂₈ O ₃	367.167 6	367.164 1	-9.5	367.1641[M+K] ⁺ 321.0[M+K-HCOOH] ⁺
27	18.265	[M-H] ⁻	triptofordin B1	C ₂₉ H ₃₄ O ₆	477.227 7	477.227 9	0.42	477.2279[M-H] ⁻
28	8.209	[M+H] ⁺	salaspermic acid	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	473.363 1	473.363 3	0.42	473.3633[M+H] ⁺ 427.1[M+H-HCOOH] ⁺
29	12.738	[M+H] ⁺	isotrifoliol	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	299.055 6	299.055 4	-0.67	299.0554[M+H] ⁺ 282.0[M+H-OH] ⁺
30	11.487	[M+H] ⁺	gancaonin a	C ₂₁ H ₂₀ O ₅	353.138 9	353.137 9	-2.83	353.1379[M+H] ⁺ 336.1[M+H-OH] ⁺ 338.1[M+H-CH ₃] ⁺
31	12.710	[M+H] ⁺	glyzaglabrin	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	299.055 6	299.055 5	-0.33	299.0555[M+H] ⁺ 282.0[M+H-OH] ⁺
32	12.454	[M+H] ⁺	isolicoflavonol	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	355.118 2	355.118 0	-0.56	355.1180[M+H] ⁺ 338.1[M+H-OH] ⁺
33	12.582	[M+H] ⁺	3'-methoxyglabridin	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	355.154 5	355.153 6	-2.53	355.1536[M+H] ⁺ 338.1[M+H-OH] ⁺ 340.0[M+H-CH ₃] ⁺



A1-ESI⁺: 雷公藤:甘草(45:5); A2-ESI⁺: 雷公藤:甘草(60:9); A3-ESI⁺: 雷公藤:甘草(3:1); A4-ESI⁺: 雷公藤:甘草(15:7.5); B1-ESI⁻: 雷公藤:甘草(45:5); B2-ESI⁻: 雷公藤:甘草(60:9); B3-ESI⁻: 雷公藤:甘草(3:1); B4-ESI⁻: 雷公藤:甘草(15:7.5)
A1-ESI⁺: Tw:GR(45:5); A2-ESI⁺: Tw:GR(60:9); A3-ESI⁺: Tw:GR(3:1); A4-ESI⁺: Tw:GR(15:7.5); B1-ESI⁻: Tw:GR(45:5); B2-ESI⁻: Tw:GR(60:9); B3-ESI⁻: Tw:GR(3:1); B4-ESI⁻: Tw:GR(15:7.5)

图1 雷公藤配伍甘草UPLC-Q-TOF/MS的基峰色谱图
Fig. 1 BPI of Tw combined with GR UPLC-Q-TOF/MS

2.4 靶标蛋白互作网络的构建与分析

将上述47个作用靶蛋白导入String蛋白互作数据库,限定来源为Homo sapiens,得到靶标对相互作用关系,保存其TSV格式文件,导入Cytoscape3.7.1软件进行互作网络的拓扑学分析,共涉及41个节点(不包括6个孤立节点),83条边,见表5和图2。

2.5 分子对接模拟分析

通过对47个靶蛋白互作网络的构建及拓扑学分析,选择“度”排名前3的靶蛋白:TNF、IL10和

PTGS2做进一步分析,在PDB在线数据库中获得其PDB三维结构。基于系统对接在线软件对3个关键靶蛋白与33个潜在的活性成分进行分子对接,结果见表6、7、8。结果以分数值判决配体与受体结合的程度。分数值一般从0到10(即从弱到强的结合),结果分数>4.25认为有一定的结合活性,大于5有较好的结合活性,>7具有强烈的结合活性。分子对接表明,除甘草酸和靶蛋白没有明确的对接结果,其余潜在活性化合物与重要靶点结合结果均较好。

Table 5 Topological parameter analysis of protein-protein interaction

靶标	度	BC	CC	TC	靶标	度	BC	CC	TC
TNF	17	0.556 7	0.555 6	0.143 1	IARS2	3	0.000 7	0.274 0	0.733 3
IL10	12	0.122 4	0.454 5	0.200 0	IL19	2	0.000 0	0.367 0	0.805 6
PTGS2	9	0.114 0	0.476 2	0.237 0	BMP4	2	0.050 0	0.231 2	0.500 0
GART	9	0.074 6	0.360 4	0.412 7	HSD11B1	2	0.050 0	0.289 9	0.500 0
PAICS	8	0.042 2	0.367 0	0.421 9	GC	2	0.000 0	0.303 0	0.666 7
ATIC	8	0.066 5	0.384 6	0.402 8	PROZ	2	0.000 0	0.303 0	0.666 7
DHFR	8	0.049 7	0.360 4	0.425 0	PON1	2	0.000 0	0.396 0	0.568 2
MTHFR	8	0.178 0	0.449 4	0.285 7	CD2	2	0.000 0	0.367 0	0.805 6
TYMS	6	0.003 2	0.350 9	0.522 2	GDF5	2	0.184 6	0.388 3	0.500 0
F2	6	0.101 9	0.425 5	0.333 3	COTL1	1	0.000 0	0.283 7	0.000 0
DHODH	6	0.001 0	0.303 0	0.611 1	IL20	1	0.000 0	0.274 0	0.000 0
PFAS	5	0.004 0	0.296 3	0.618 2	PSAP	1	0.000 0	0.272 1	0.000 0
ALOX5	5	0.050 0	0.392 2	0.442 1	TLL2	1	0.000 0	0.188 7	0.000 0
MIF	5	0.080 3	0.425 5	0.375 0	RBKS	1	0.000 0	0.266 7	0.000 0
PTGS1	4	0.000 0	0.388 3	0.537 5	DDT	1	0.000 0	0.300 8	0.000 0
NR3C1	4	0.097 4	0.396 0	0.487 5	CD36	1	0.000 0	0.226 0	0.000 0
AKR1B1	4	0.075 3	0.416 7	0.358 7	DAK	1	0.000 0	0.296 3	0.000 0
LCN2	3	0.002 6	0.373 8	0.561 4	GZMM	1	0.000 0	0.228 6	0.000 0
CTSD	3	0.050 0	0.370 4	0.392 2	LMLN	1	0.000 0	0.315 0	0.000 0
JAK3	3	0.050 0	0.373 8	0.537 0	PADI4	1	0.000 0	0.360 4	0.000 0
GREM2	3	0.144 9	0.294 1	0.333 3	IARS2	3	0.000 7	0.274 0	0.733 3

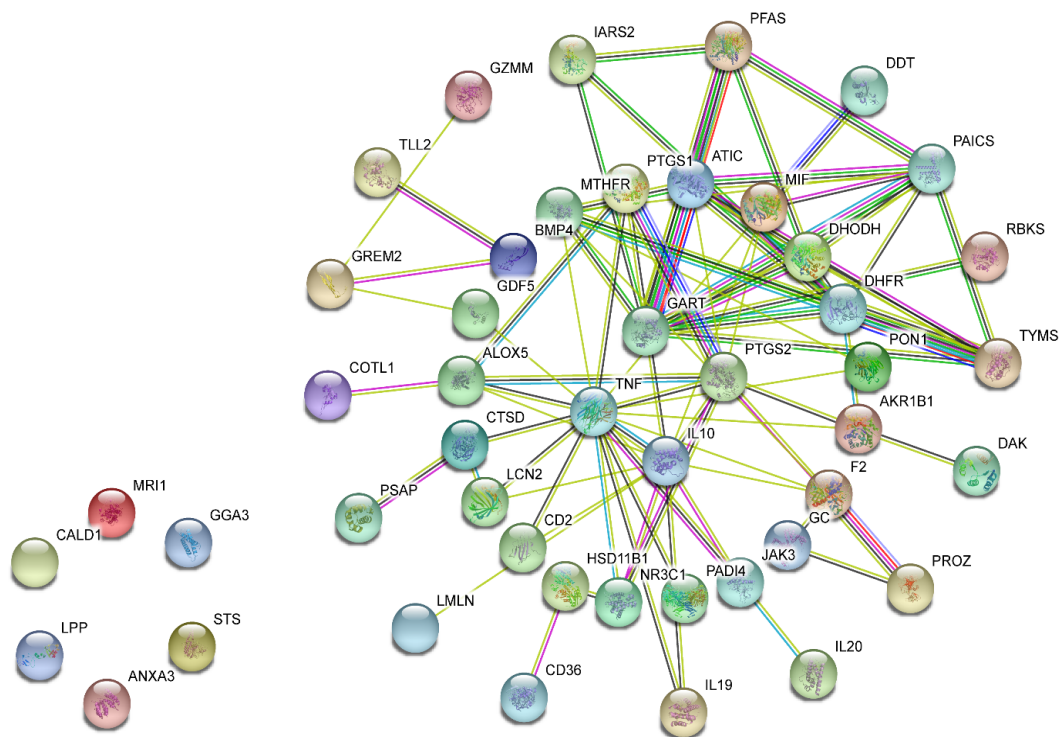


图2 雷公藤配伍甘草治疗RA的靶标的网络互作图

Fig.2 Network interaction map of targets of Tw and GR in treatment of RA

表6 化合物与TNF对接结果

Table 6 Results of docking of compounds with TNF

序号	化合物名称	得分	活性	来源
1	hederagenin	5.103	较好	雷公藤
2	triptolide	5.499	较好	雷公藤
3	wilforlide A	4.937	有	雷公藤
4	triptonide	5.480	较好	雷公藤
5	tryptophenolide	5.821	较好	雷公藤
6	canin	5.275	较好	雷公藤
7	celafurine	6.122	较好	雷公藤
8	celapanine	5.692	较好	雷公藤
9	isoxanthohumol	6.929	较好	雷公藤
10	salazinic acid	4.823	有	雷公藤
11	hypodiolide A	4.912	有	雷公藤
12	triptinin B	5.022	较好	雷公藤
13	triptoditerpenic acid B	4.980	有	雷公藤
14	triptofordin B1	5.035	较好	雷公藤
15	triptonoditerpenic acid	6.332	较好	雷公藤
16	salaspermic acid	5.066	较好	雷公藤
17	triptonolide	5.697	较好	雷公藤
18	kaempferol	5.831	较好	雷公藤, 甘草
19	lupiwighteone	6.732	较好	甘草
20	isotrifoliol	5.186	较好	甘草
21	gancaonin A	6.622	较好	甘草
22	licocoumarone	6.664	较好	甘草
23	liquiritin	5.564	较好	甘草
24	licopyranocoumarin	6.577	较好	甘草
25	glyzaglabrin	5.223	较好	甘草
26	isoglycyrol	5.303	较好	甘草
27	isolicoflavonol	6.703	较好	甘草
28	licochalcone A	6.277	较好	甘草
29	3'-methoxyglabridin	7.392	强烈	甘草
30	celastrol	5.906	较好	雷公藤
31	glycyrrhizic acid	-	-	甘草
32	glycyrrhetic acid	5.099	较好	甘草
33	isoliquiritin	5.556	较好	甘草

表7 化合物与IL10对接结果

Table 7 Results of docking of compounds with IL10

序号	化合物名称	得分	活性	来源
1	hederagenin	4.911	有	雷公藤
2	triptolide	5.130	较好	雷公藤
3	wilforlide A	4.847	有	雷公藤
4	triptonide	5.065	较好	雷公藤
5	tryptophenolide	7.858	强烈	雷公藤
6	canin	4.987	有	雷公藤
7	celafurine	6.245	较好	雷公藤
8	celapanine	5.090	较好	雷公藤
9	isoxanthohumol	7.692	强烈	雷公藤
10	salazinic acid	4.410	有	雷公藤
11	hypodiolide A	4.687	有	雷公藤
12	triptinin B	4.979	有	雷公藤
13	triptoditerpenic acid B	4.846	有	雷公藤
14	triptofordin B1	4.728	有	雷公藤
15	triptonoditerpenic acid	6.637	较好	雷公藤
16	salaspermic acid	4.860	有	雷公藤
17	triptonolide	7.999	强烈	雷公藤
18	kaempferol	7.171	强烈	雷公藤, 甘草
19	lupiwighteone	8.005	强烈	甘草
20	isotrifoliol	7.361	强烈	甘草
21	gancaonin A	7.960	强烈	甘草
22	licocoumarone	7.870	强烈	甘草
23	liquiritin	5.222	较好	甘草
24	licopyranocoumarin	7.787	强烈	甘草
25	glyzaglabrin	7.219	强烈	甘草
26	isoglycyrol	7.571	强烈	甘草
27	isolicoflavonol	7.981	强烈	甘草
28	licochalcone A	7.751	强烈	甘草
29	3'-methoxyglabridin	7.182	强烈	甘草
30	celastrol	6.411	较好	雷公藤
31	glycyrrhizic acid	-	-	甘草
32	glycyrrhetic acid	4.820	有	甘草
33	isoliquiritin	5.499	较好	甘草

2.6 GO生物分析与KEGG通路分析

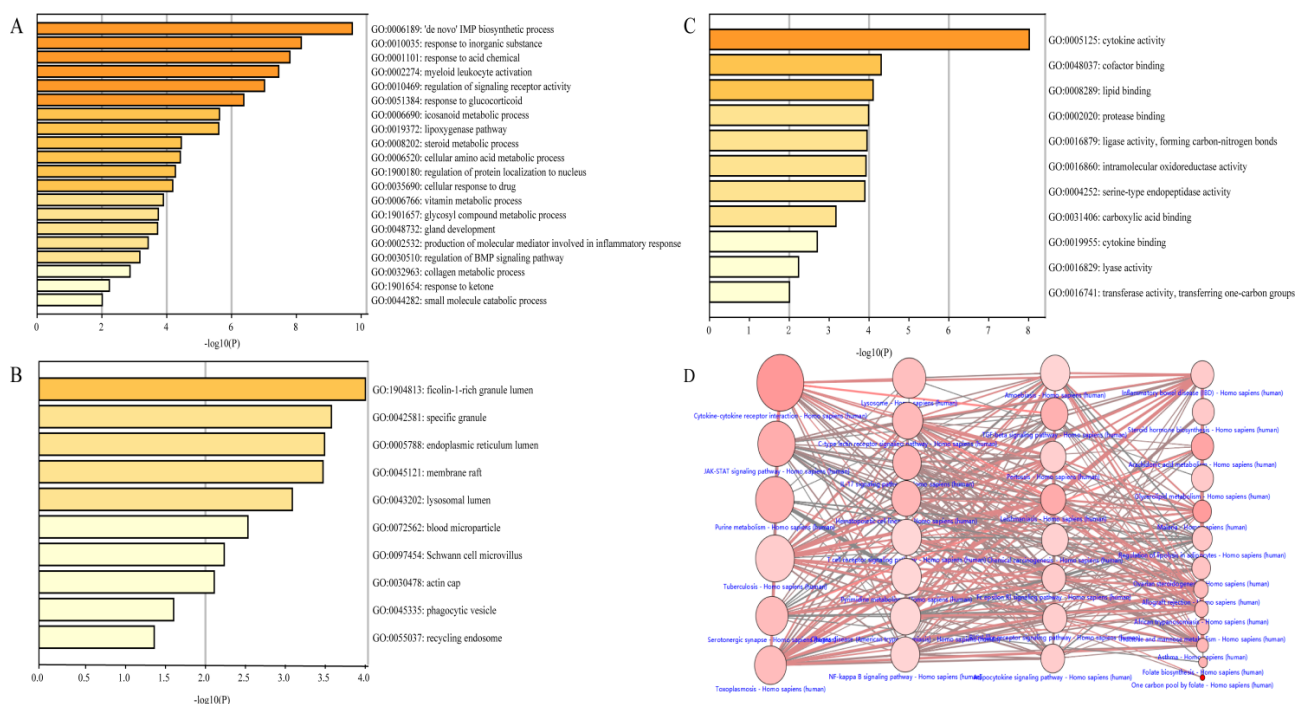
基于Metascape和CPDB两个在线数据库进行GO生物分析与KEGG通路分析。在GO分析中,生物途径共得到20个Go-terms,主要涉及“de novo IMP biosynthetic process”、“response to inorganic substance”和“response to acid chemical”相关作用途径;细胞组分共富集得到10个Go-terms,主要参与“ficolin-1-rich granule lumen”、“specific granule”和“endoplasmic reticulum lumen”等途径;分子功能

共捕获11个Go-terms,主要与“cytokine activity”、“cofactor binding”和“lipid binding”较为密切;KEGG共发现相关通路35条,主要涉及“Arachidonic acid metabolism”、“IL-17 signaling pathway”、“NF- κ B signaling pathway”等与炎症相关的通路,以及“JAK-STAT signaling pathway”“Purine metabolism”等相关通路可能参与了药对治疗疾病过程。雷公藤配伍甘草治疗RA的GO和KEGG富集分析见图3,KEGG通路分析见表9。

表8 化合物与PTGS2对接结果

Table 8 Results of docking of compounds with PTGS2

序号	化合物名称	得分	活性	来源	序号	化合物名称	得分	活性	来源
1	hederagenin	8.319	强烈	雷公藤	18	kaempferol	6.375	较好	雷公藤, 甘草
2	triptolide	7.099	强烈	雷公藤	19	lupiwighteone	6.903	较好	甘草
3	wilforlide A	8.278	强烈	雷公藤	20	isotrifoliol	6.524	较好	甘草
4	triptonide	6.854	较好	雷公藤	21	gancaonin A	6.975	较好	甘草
5	tryptophenolide	6.413	较好	雷公藤	22	licocoumarone	6.428	较好	甘草
6	canin	6.929	较好	雷公藤	23	liquiritin	6.542	较好	甘草
7	celafurine	5.482	较好	雷公藤	24	licopyranocoumarin	6.908	较好	甘草
8	celapanine	8.194	强烈	雷公藤	25	glyzaglabrin	5.859	较好	甘草
9	isoxanthohumol	7.000	强烈	雷公藤	26	isoglycyrol	6.553	较好	甘草
10	salazinic acid	6.117	较好	雷公藤	27	isolicoflavonol	7.035	强烈	甘草
11	hypodioidide A	7.491	强烈	雷公藤	28	licochalcone A	6.234	较好	甘草
12	triptinin B	4.988	有	雷公藤	29	3'-methoxyglabridin	5.822	较好	甘草
13	triptoditerpenic acid B	4.953	有	雷公藤	30	celastrol	6.838	较好	雷公藤
14	triptofordin B1	8.372	强烈	雷公藤	31	glycyrrhizic acid	—	—	甘草
15	triptonoditerpenic acid	5.950	较好	雷公藤	32	glycyrrhetic acid	8.160	强烈	甘草
16	salaspermic acid	8.299	强烈	雷公藤	33	isoliquiritin	6.682	较好	甘草
17	triptonolide	5.984	较好	雷公藤					



A-GO生物途径;B-GO细胞组分;C-GO分子功能;D-KEGG通路分析

A-GO Biology Process; B-GO Cellular Components; C- GO Molecular Function; D-KEGG Pathway Analysis

图3 雷公藤配伍甘草治疗RA作用靶标的GO和KEGG富集分析

Fig. 3 Enrichment analysis of GO and KEGG of targets of Tw combined with GR in the treatment of RA

2.7 雷公藤配伍甘草治疗RA的“药对-成分-直接靶标-间接靶标-相关通路-类风湿性关节炎”的网络构建与分析

将雷公藤配伍甘草治疗RA的化学成分、作用

靶标、相关通路等信息导入Cytoscape软件中整合信息并进行网络的构建,结果见图4,该网络由124个节点,439条边组成,从图中可以看出雷公藤配伍甘草治疗RA具有多成分、多靶标、多通路协同作用的

表9 KEGG通路分析
Table 9 KEGG Pathway Analysis

序号	通路名称	P值	类型
1	Chagas disease (American trypanosomiasis)	0.048 6	disease
2	T cell receptor signaling pathway	0.047 7	immunity
3	Pyrimidine metabolism	0.047 7	metabolism
4	Amoebiasis	0.042 7	disease
5	NF-κ B signaling pathway	0.041 9	inflammation
6	Chemical carcinogenesis	0.032 7	disease
7	Pertussis	0.028 4	disease
8	RIG-I-like receptor signaling pathway	0.024 4	immunity
9	Adipocytokine signaling pathway	0.023 8	insulin resistance, inflammation, immunity
10	Tuberculosis	0.023 6	disease
11	Fc epsilon RI signaling pathway	0.022 5	immunity
12	Inflammatory bowel disease (IBD)	0.021 2	disease
13	Glycerolipid metabolism	0.018 9	metabolism
14	Steroid hormone biosynthesis	0.018 3	metabolism
15	Regulation of lipolysis in adipocytes	0.015 0	organismal systems
16	Ovarian steroidogenesis	0.012 4	metabolism
17	Lysosome	0.008 8	cellular processes, transport and catabolism
18	Allograft rejection	0.007 2	disease
19	Toxoplasmosis	0.007 0	disease
20	Serotonergic synapse	0.007 0	organismal systems
21	African trypanosomiasis	0.006 1	disease
22	Fructose and mannose metabolism	0.005 8	metabolism
23	C-type lectin receptor signaling pathway	0.005 5	immunity
24	Asthma	0.004 8	disease
25	Hematopoietic cell lineage	0.004 4	immunity
26	IL-17 signaling pathway	0.004 0	inflammation
27	Folate biosynthesis	0.003 6	metabolism
28	TGF-beta signaling pathway	0.003 2	fibrosis inflammation
29	Purine metabolism	0.003 0	metabolism
30	JAK-STAT signaling pathway	0.002 3	inflammation
31	Leishmaniasis	0.002 0	disease
32	Arachidonic acid metabolism	0.001 3	metabolism
33	Malaria	0.000 6	disease
34	Cytokine-cytokine receptor interaction	0.000 5	immunity, inflammation
35	One carbon pool by folate	5.91×10^{-9}	metabolism

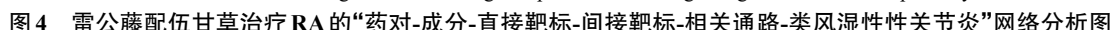
特点。

3 讨论

RA是一种临床多发的以关节及关节周围组织慢性炎症为主要表现的自身免疫性疾病。目前RA的发病机制被认为可能与细胞因子调节紊乱、滑膜过度增生、浸润及自身反应T细胞克隆过度生长而凋亡不足有关^[18]。

本研究通过反向筛选发现雷公藤配伍甘草中

33个潜在活性成分与治疗RA极为密切,并进一步作用于TNF、IL10、PTGS2等核心靶标,从而调节相关通路,抑制RA。基于系统药理学分析,得到雷公藤配伍甘草治疗RA的多个活性成分、作用靶蛋白和分子网络,每个分子网络调节多个生物功能,这些结果反映了中药多成分、多靶点、多作用途径的特点。47个潜在的作用蛋白靶点,涉及花生四烯酸代谢通路、IL-17信号通路、NF-κ B信号通路等炎症



从通路的角度分析,T 细胞受体(T cell receptor,TCR)信号转导通路是将与TCR结合的抗原信号传递至细胞内的重要途径。当有抗原刺激时,T细胞会发生自身免疫耐受崩溃进而产生滑膜免疫反应,滑膜内大量的炎症细胞会聚集在滑膜炎免疫反应的部位(如关节内),分泌大量细胞因

子、抗体和炎症介质,导致体内致炎性细胞因子(IL-1、IL-2等)作用增强,抗炎细胞因子[IL-4、IL-10、转化生长因子(TGF)- β 1等]含量下降,介导免疫性炎症,导致RA发生、滑膜炎产生、软骨与关节组织破坏^[28]。TNF- α 属肿瘤坏死因子,是一种促炎性细胞因子,主要由滑膜巨噬细胞产生,可加重中性粒细胞炎性反应,是RA滑膜炎产生和持续的关键因子^[29]。本研究发现雷公藤配伍甘草中的 canin、licochalcone A、triptoditerpenic acid B通过调节TNF靶蛋白表达从而达到抑制RA的作用,这与文献报道基本一致^[30-31]。此外还发现 celastrol、glycyrrhetic acid、hederagenin等16个成分可能通过调节IL10靶蛋白来减轻炎症。

花生四烯酸代谢(Arachidonic acid metabolism)通路是产生炎症介质的主要通路。花生四烯酸(arachidonic acid, AA)是环氧酶(COX)和脂氧酶(LOX)的重要底物,可催化生成炎症因子PGE2及白三烯类(leukotriene, LTs)^[32],进而使血管舒张、血管通透性增加、组织水肿,而且可以加强单核细胞和中性粒细胞的趋化作用、刺激淋巴细胞增殖和细胞因子的释放^[33]。环氧酶-1/2(COX-1/2)是PGE2产生的限速酶,抑制COX-1/2,能够减轻炎症反应。本研究发现雷公藤配伍甘草中的活性成分 glycyrrhetic acid、triptoditerpenic acid B作用于PTGS1(COX1)靶蛋白, glycyrrhetic acid、triptoditerpenic acid B作用于PTGS2(COX2)靶蛋白进而调节花生四烯酸代谢通路减少炎症介质的产生,已有文献对此进行了佐证^[34-35]。此外还发现, 3'-methoxyglabridin、isoglycyrol、isotrifoliol、licocoumarone这4个成分可能通过作用于ALOX5(LOX5)靶蛋白进而调节该通路,减少炎症介质的产生。

IL-17信号通路是细胞外信号引起细胞核内反应的通道之一。IL-17信号通路上的IL-17与靶细胞膜特异性受体IL17RA和IL17RC结合,通过胞内信号传导分子ACT1和TRAF6,最终激活NF- κ B,启动下游炎症反应^[36],诱导炎症性细胞因子(如IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-17等)、趋化因子(如IL-8/CXCL8、CXCL1等)和基质金属蛋白酶(如MMP-1、MMP-3等)的表达,继而促进RA滑膜细胞增殖和活化,参与并加重RA病情^[37],又能抑制基质合成,还可通过诱导RANKL的表达造成骨质的破坏^[38]。本研究发现雷公藤配伍甘草中的一些成分,如 glycyrrhetic acid、triptoditerpenic acid B可能通过

作用于PTGS2靶蛋白, glycyrrhetic acid、triptoditerpenic acid B等15个成分通过作用于LCN2靶蛋白调节该信号通路。还发现 canin、licochalcone A、triptoditerpenic acid B通过作用于TNF靶蛋白抑制炎症反应。这些成分可能针对其信号通路中的一些环节抑制其活化,调节炎症基因如TNF- α 等的表达,抑制RA关节炎的疾病进程。

NF- κ B信号通路是类风湿关节炎滑膜炎性反应发生、发展的一条重要炎症细胞信号转导途径^[39]。NF- κ B的活性主要通过释放P65、P50蛋白进入细胞核,发挥转录因子活性,调节炎症因子例如TNF、IL-1的表达,发挥致炎作用^[40]。本研究结果发现雷公藤配伍甘草中的活性成分 canin、licochalcone A、triptoditerpenic acid B通过作用于TNF靶蛋白,这与文献报道的基本相符^[41]。此外还发现成分 glycyrrhetic acid、triptoditerpenic acid B通过作用于PTGS2靶蛋白,这可能调节NF- κ B信号通路从而抑制IL-1 β 、TNF- α 的产生,起到抗炎与镇痛的作用。

C型凝集素受体(C-type lectin receptor, CLRS)信号通路是一条极为重要的调节免疫的信号通路。巨噬细胞诱导的CLRS是白念珠菌先天免疫应答的重要组成部分,CLRS可以识别真菌衍生的B-葡聚糖和高甘露糖型碳水化合物,与其结合后,CLRS刺激细胞内信号级联,诱导炎症细胞因子和趋化因子的产生,从而触发对病原体的先天性和适应性免疫^[42]。Dectin-1作为一种重要的CLR,可识别 β -葡聚糖后诱导各种细胞反应,包括呼吸爆发、磷脂酶A2(PLA2)和COX2的活化和调节,配体的摄取以及一些细胞因子和趋化因子包括TNF、巨噬细胞炎性蛋白2(MIP-2)、IL-2、IL-10、IL-6及IL-23的产生^[43]。本研究发现雷公藤配伍甘草中 celastrol、glycyrrhetic acid、hederagenin等16个成分通过作用于IL10靶蛋白, canin、licochalcone A、triptoditerpenic acid B通过作用于TNF靶蛋白调节其表达减缓RA疾病进程,这与文献报道的基本一致^[44]。此外还发现成分 glycyrrhetic acid、triptoditerpenic acid B可能通过作用于PTGS2靶蛋白,调节免疫,延缓疾病进程。

Janus激酶/信号转导子和转录激活子(JAK/STAT)途径是介导多种细胞因子信号转导的重要路径,对免疫细胞分化发育、机体免疫应答及炎症反应有重要作用。炎症因子可以激活JAK激酶、促使STAT磷酸化,从而引起炎症因子表达,造成细胞凋亡^[45]。JAK家族的JAK蛋白酪氨酸激酶JAK3是该

通路上的关键靶蛋白。本研究发现雷公藤配伍甘草中的 isoliquiritin、triptonoditerpenic acid 等 16 个活性成分通过作用于 JAK3 靶蛋白进而调节该通路,使过多免疫细胞凋亡,抑制细胞过度增殖。这与文献报道具有一致性^[46]。还发现 celastrol、glycyrrhethinic acid、hederagenin 等 16 个成分可能是通过作用于 IL10 靶蛋白,进而作用于 IL19、IL20 靶蛋白,减少炎症细胞因子转导,抑制炎症。

雷公藤是治疗 RA 效果确切,但其副作用应引起重视。肝脏是雷公藤损伤最严重的毒性靶器官之一,此外还会造成以肾小管损伤为主的肾毒性。而甘草配伍雷公藤可以缓解雷公藤对肝肾的毒性,扩大雷公藤的使用范围,更好的用于治疗 RA。曹玲娟等^[47]总结了雷公藤致肝损伤可能通过线粒体途径诱导细胞凋亡、机体形成复杂的氧化应激应答系统及激活肝中 Kupffer 细胞,释放大量的 TNF 和 NO 引起免疫介导性损伤有关。而复方甘草酸苷(SNMC)可能与稳定线粒体膜、抑制细胞色素 C 的释放及 caspase-3 的活化,从而阻断肝细胞凋亡;甘草黄酮类物质具有很好的抗氧化作用,可增强机体自由基清除能力,降低氧化损伤;甘草还能抑制肝脏 iNOS,抑制免疫损伤。本研究预测出的 TGF- β 信号通路与调控细胞的增殖、凋亡、分化和迁移等有关,而甘草中 glycyrrhethinic acid 可能通过作用于 BMP4 靶蛋白进而调节 TGF- β 信号通路抑制肝细胞凋亡; glycyrrhethinic acid 可能通过作用于 PTGS1 (COX1)、PTGS2 (COX2) 靶蛋白, 3'-methoxyglabridin、isoglycyrol、licocoumarone 通过作用于 ALOX5 (LOG5) 靶蛋白进而调节花生四烯酸代谢通路, glycyrrhethinic acid、liquiritin 等成分可能通过调节 IL10、TNF 靶蛋白作用于 IL-17 信号通路, glycyrrhethinic acid 可能通过作用于 PTGS2 (COX2) 靶蛋白调节 NF- κ B 信号通路等炎症通路来抗炎; glycyrrhethinic acid、liquiritin 等成分可能通过调节 IL10 作用于 TCR 信号通路、CLRS 信号通路及 Janus 激酶/信号转导子和转录激活子(JAK/STAT)途径等与免疫有关通路起到对雷公藤的解毒作用。

4 结论

本研究基于系统药理学建立了雷公藤配伍甘草治疗 RA 的“药对-成分-直接靶标-间接靶标-相关通路-类风湿性关节炎”网络,初步揭示了雷公藤配伍甘草治疗 RA 多成分、多靶点、多通路的作用特点。研究发现 33 个潜在活性成分、31 个作用靶标和 35 条相关通路与雷公藤配伍甘草治疗 RA 有密切关

系,并基于 UPLC-Q-TOF/MS 对配伍后的成分进行了验证。研究结果显示:以炎症为代表的花生四烯酸代谢通路、IL-17 信号通路、NF- κ B 信号通路和以免疫为代表的 T 细胞受体信号转导通路、C 型凝集素受体信号通路居于重要地位。

此外还发现甘草中 Glycyrrhethinic acid 等成分通过调节 TGF- β 信号通路抑制肝细胞凋亡;调控花生四烯酸代谢通路,作用于 IL10、TNF 靶蛋白调节 IL-17 信号通路, NF- κ B 信号通路等炎症通路来抗炎;通过作用于 TCR 信号通路、CLRS 信号通路及 JAK/STAT 途径等与免疫有关通路起到对雷公藤的解毒作用。

系统药理学可以全面、快速的初步揭示药物的作用网络,分析预测信号通路及作用机制,减少了中药活性成分及机制研究的盲目性,对中药活性成分和机制的研究具有一定的意义。本研究初步探讨了雷公藤配伍甘草治疗 RA 的作用机制,为后续分子药理学研究提供一定的参考。

参考文献

- [1] 朱光昭, 韩晓晨, 王翰洲, 等. 雷公藤治疗类风湿关节炎骨破坏的系统评价和 Meta 分析 [J/OL]. 中国中药杂志: 1-10 [2019-03-26]. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjc.m.20190305.004>.
- [2] Amalraj A, Varma K, Jacob J, et al. A novel highly bioavailable curcumin formulation improves symptoms and diagnostic indicators in rheumatoid arthritis patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled, two-dose, three-arm, and parallel-group study [J]. Journal of Medicinal Food, 2017, 20(10): 1022-1030.
- [3] 杨亚丽, 韩璐, 乔雪, 等. 传统中药及其活性成分治疗类风湿性关节炎现状 [J]. 亚太传统医药, 2018, 14(9): 100-103.
- [4] 王永华, 杨凌. 基于系统药理学的现代中药研究体系 [J]. 世界中医药, 2013, 8(7): 801-808.
- [5] 周文霞, 程肖蕊, 张永祥, 等. 网络药理学: 认识药物及发现药物的新理念 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(1): 4-9.
- [6] 刘志华, 孙晓波. 网络药理学: 中医药现代化的新机遇 [J]. 药学学报, 2012, 47(6): 696-703.
- [7] Zhang Y Q, Mao X, Guo Q Y, et al. Network pharmacology-based approaches capture essence of Chinese herbal medicines [J]. Chin Herb Med, 2016, 8(2): 107-116.
- [8] 解静, 高杉, 李琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展及应用策略 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2257-2265.

- [9] Zheng C L, Wang J N, Liu J L, et al. System-level multi-target drug discovery from natural products with applications to cardiovascular diseases [J]. *Mol Divers*, 2014, 18(3): 621-635.
- [10] 马颖, 程紫嫣, 王博龙. 基于BATMAN-TCM在线分析平台研究牛黄药理机制 [J]. *邵阳学院学报: 自然科学版*, 2019, 16(1): 89-97.
- [11] 鄢海燕, 邹纯才. 瓜蒌中三萜及其苷类成分的网络药理学研究 [J]. *国际药学研究杂志*, 2018, 45(4): 288-294.
- [12] 杜佳林, 崔明昊, 苏忠伟, 等. 雷公藤与甘草配伍对大鼠生化指标的影响 [J]. *实用中医内科杂志*, 2008, 22(5): 71-72.
- [13] 马致洁, 章从恩, 唐进法, 等. 雷公藤配伍甘草降低肝毒性的代谢通路探讨 [J]. *药学报*, 2017, 52(7): 1077-1084.
- [14] 杨释岑, 刘志强, 刘和波, 等. 利用网络药理学方法研究交泰丸治疗糖尿病的作用机制 [J]. *中国药房*, 2018, 29(19): 2656-2661.
- [15] 杨欣, 李亚辉, 钱海兵, 等. 基于网络药理学及分子对接分析熊果酸抗类风湿性关节炎的分子机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(18): 207-214.
- [16] 宋雅迪, 赵瑜君, 陈上, 等. 雷公藤MCT基因RNAi对雷公藤萜类活性成分生物合成的影响 [J]. *药学报*, 2018, 53(8): 1209-1214.
- [17] 王元花, 阎芳, 金永生, 等. 甘草有效成分的提取及协同氟康唑抗真菌活性研究 [J]. *药学服务与研究*, 2017, 17(3): 218-222.
- [18] 刘继红, 李卫东, 滕慧玲, 等. 青藤碱治疗类风湿性关节炎免疫作用和机制 [J]. *药学报*, 2005, 40(2): 127-131.
- [19] Veldhoen M, Hocking R J, Atkins C J, et al. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells [J]. *Immunity*, 2006, 24(2): 179-189.
- [20] Mangan P R, Harrington L E, O'Quinn D B, et al. Transforming growth factor- β induces development of the TH₁₇ lineage [J]. *Nature*, 2006, 441(7090): 231-234.
- [21] Qiu D M, Kao P N. Immunosuppressive and anti-inflammatory mechanisms of triptolide, the principal active diterpenoid from the Chinese medicinal herb *Tripterygium wilfordii* Hook. f. [J]. *Drugs in R & D*, 2003, 4(1): 1-18.
- [22] 吕丽萍, 万军梅, 王凤娟, 等. 雷公藤内酯酮对炎症及免疫功能的影响 [J]. *中国医院药学杂志*, 2006, 26(6): 695-697.
- [23] 刘建群, 王卓, 徐金娣, 等. 甘草干预雷公藤内酯酮的代谢组学分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(19): 70-75.
- [24] Wang S F, Wang H Q, Liu Y N, et al. Rapid discovery and identification of anti-inflammatory constituents from traditional Chinese medicine formula by activity index, LC-MS, and NMR [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 31000.
- [25] Kao T C, Wu C H, Yen G C. Glycyrrhizic acid and 18 β -glycyrrhetinic acid recover glucocorticoid resistance via PI₃K-induced AP₁, CRE and NFAT activation [J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(3/4): 295-302.
- [26] 张明发, 沈雅琴. 甘草及其活性成分抗炎与抗炎机制的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2011, 26(4): 261-268.
- [27] Furusawa J I, Funakoshi-Tago M, Tago K, et al. Licochalcone A significantly suppresses LPS signaling pathway through the inhibition of NF- κ B p65 phosphorylation at serine 276 [J]. *Cellular Signalling*, 2009, 21(5): 778-785.
- [28] Santana M A, Rosenstein Y. What it takes to become an effector T cell: The process, the cells involved, and the mechanisms [J]. *J Cell Physiol*, 2003, 195(3): 392-401.
- [29] 舒碧莹, 蒋麒俊, 蔡枫. ANCA、IL-1、IL-6、TNF- α 四项检测诊断类风湿性关节炎的研究进展 [J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(4): 448-452.
- [30] Gao H C, Liu L, Zhao Y L, et al. Human IL-6, IL-17, IL-1 β , and TNF- α differently regulate the expression of pro-inflammatory related genes, tissue factor, and swine leukocyte antigen class I in porcine aortic endothelial cells [J]. *Xenotransplantation*, 2017, 24(2): e12291.
- [31] Abdollahzad H, Aghdashi M A, Asghari Jafarabadi M, et al. Effects of coenzyme Q10 supplementation on inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6) and oxidative stress in rheumatoid arthritis patients: a randomized controlled trial [J]. *Archives of Medical Research*, 2015, 46(7): 527-533.
- [32] Choi J H, Jeon H J, Park J G, et al. Anti-atherogenic effect of BHB-TZD having inhibitory activities on cyclooxygenase and 5-lipoxygenase in hyperlipidemic mice [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 212(1): 146-152.
- [33] 陈芳, 张波. 穿心莲内酯衍生物对花生四烯酸致炎抑制作用的研究 [J]. *中国新药杂志*, 2015, 24(22): 2622-2626.
- [34] Pivoraitė U, Jarmalavičiūtė A, Tunaitis V, et al. Exosomes from human dental pulp stem cells suppress carrageenan-induced acute inflammation in mice [J]. *Inflammation*, 2015, 38(5): 1933-1941.
- [35] Park I Y, Son K M, Kim H A. AB₀₀₉₆ PEP-1-FK₅₀₆BP₁₂ inhibits matrix metalloproteinase expression in human articular chondrocytes and in a mouse carrageenan-induced arthritis model [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74 (Suppl 2): 922-923.
- [36] Qian Y C, Liu C N, Hartupée J, et al. The adaptor Act1 is required for interleukin 17 - dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(3): 247-256.

- [37] 李东晓. 苗药金乌健骨方对类风湿关节炎患者滑膜细胞IL-17信号通路的影响 [D]. 贵阳: 贵阳中医学院, 2015.
- [38] Ju J H, Cho M L, Jhun J Y, et al. Oral administration of type-II collagen suppresses IL-17-associated RANKL expression of CD4⁺ T cells in collagen-induced arthritis [J]. Immunology Letters, 2008, 117(1): 16-25.
- [39] 高 骏, 刘旭光, 黄迪君, 等. HPAA在艾灸调控类风湿性关节炎大鼠滑膜组织NF- κ B信号通路中的作用 [J]. 针刺研究, 2010, 35(3): 198-203.
- [40] 石改绍, 武新峰, 王 飞, 等. TIPE2在类风湿性关节炎患者中的表达及其对NF- κ B信号通路的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(4): 34-37.
- [41] Kim S H, Bang J, Son C N, et al. Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates murine autoimmune arthritis through regulation of TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. Korean J Intern Med, 2018, 33(3): 612-621.
- [42] Wells C A, Salvage-Jones J A, Li X, et al. The macrophage-inducible C-type lectin, mincle, is an essential component of the innate immune response to candida albicans [J]. J Immunol, 2008, 180(11): 7404-7413.
- [43] 杨 婷, 唐 丽, 贺福初. C型凝集素受体CLRs与固有免疫 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2009, 25(5): 476-478.
- [44] Willment J A, Brown G D. C-type lectin receptors in antifungal immunity [J]. Trends in Microbiology, 2008, 16(1): 27-32.
- [45] 于子涵, 刘 英. JAK-STAT1信号通路及细胞因子信号转导抑制蛋白-1在类风湿关节炎中的研究进展 [J]. 风湿病与关节炎, 2014, 3(4): 66-69.
- [46] Migita K, Izumi Y, Torigoshi T, et al. Inhibition of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) signalling pathway in rheumatoid synovial fibroblasts using small molecule compounds [J]. Clin Exp Immunol, 2013, 174(3): 356-363.
- [47] 曹玲娟, 颜 苗, 李焕德, 等. 雷公藤致肝损伤及与甘草配伍减毒机制的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(13): 2537-2541.