

网络药理学结合实验验证研究冯了性风湿跌打药酒治疗类风湿关节炎的作用机制研究

曲彤¹, 刘小妹², 李宁¹, 任慧¹, 鲁文静¹, 崔小敏¹, 胡静¹, 陈志永^{1*}

1. 陕西省中医药研究院, 陕西 西安 710003

2. 中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院 药剂科, 甘肃 兰州 730050

摘要: **目的** 运用网络药理学结合实验验证研究冯了性风湿跌打药酒治疗类风湿关节炎的作用机制。**方法** 借助前期研究中超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用技术分析冯了性风湿跌打药酒的活性成分, 通过 TC MSP 数据库、Swiss Target Prediction 数据库筛选活性成分靶点, Drugbank、OMIM、GeneCards、TTD、Disgenet 数据库检索类风湿性关节炎的疾病靶点。利用 STRING 数据库绘制蛋白相互作用 (PPI) 网络图, 分析冯了性风湿跌打药酒治疗类风湿性关节炎的核心靶点。通过 DAVID 数据库进行基因本体 (GO) 功能注释和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 预测其富集的信号通路并进行可视化展示。利用 AutoDockTools 1.5.6 软件进行分子对接。利用牛 II 型胶原乳剂诱导建立类风湿性关节炎大鼠模型, 进行关节炎评分, 组织病理学检查, PCR 分析关键基因 mRNA 表达水平, ELISA 法检测低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 和白细胞介素-6 (IL-6) 水平。**结果** 冯了性风湿跌打药酒中 46 个核心化学成分对应靶点 661 个, 搜索收集获得疾病靶点 2 604 个, 两者交集后获得 283 个冯了性风湿跌打药酒治疗类风湿性关节炎的潜在靶点。分析得到蛋白激酶 B1 (Akt1)、肿瘤蛋白 p53 (TP53)、血管内皮生长因子 A (VEGFA) 等 10 个核心靶点, 10 条 GO 相关条目及 15 条 KEGG 通路, 关键通路包括丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路、磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) /Akt 信号通路、Ras 信号通路、Rap1 信号通路、HIF-1 信号通路等。分子对接结果表明, 秦皮乙素、5,7-二羟基香豆素、东莨菪苷核心成分与 Akt1、HIF-1 α 核心靶点均具有良好的结合能力。动物实验结果显示, 冯了性风湿跌打药酒可以缓解类风湿性关节炎大鼠的关节肿胀, 降低关节指数, HE 染色结果显示冯了性风湿跌打药酒减轻滑膜增生、软骨退化, PCR 结果表明冯了性风湿跌打药酒显著降低 HIF-1 α mRNA 水平, ELISA 实验结果显示冯了性风湿跌打药酒显著降低 IL-6、HIF-1 α 水平。**结论** 利用网络药理学分析, 初步揭示了冯了性风湿跌打药酒可能作用于 Akt1、PI3K 等靶点干预类风湿性关节炎的疾病进程, 结合药效学实验, 发现冯了性风湿跌打药酒可能是通过降低 IL-6、HIF-1 α , 对类风湿性关节炎起到治疗作用。

关键词: 冯了性风湿跌打药酒; 网络药理学; 实验验证; 作用机制; 秦皮乙素; 5,7-二羟基香豆素; 东莨菪苷

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)11-2679-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.11.005

Mechanism of Fengliaoqing Fengshi Dieda Yaojiu in treatment of rheumatoid arthritis based on network pharmacology combined with experimental verification

QU Tong¹, LIU Xiao-mei², LI Ning¹, REN Hui¹, LU Wen-jing¹, CUI Xiao-min¹, HU Jing¹, CHEN Zhi-yong¹

1. Shaanxi Academy of Tradition Chinese Medicine, Xi'an 710003, China

2. Department of Pharmacy, NO.940 Hospital of the Joint Logistics Support Force of the Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730050, China

Abstract: Objective To explore the material basis and potential mechanism of Fengliaoqing Fengshi Dieda Yaojiu in treatment of rheumatoid arthritis by network pharmacology and experimental verification. **Methods** Ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole/electrostatic field orbital trap high resolution mass spectrometry (UHPLC-Q Exactive Focus MS/MS) was

收稿日期: 2023-08-23

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81973419); 陕西省重点研发计划一般项目 (2022SF-315); 陕西省中医药研究院“苗圃计划”一搬项目 (2021-26)

作者简介: 曲彤, 女, 主管中药师, 硕士, 主要从事中药质量控制与活性成分研究。E-mail: 328127279@qq.com

*通信作者: 陈志永, 男, 副研究员, 博士, 主要从事中药质量控制与活性成分研究。E-mail: 18829014325@163.com

developed to rapidly analyze and identify the chemical components in the Fengliaoqing Fengshi Dieda Yaojiu. The active components and targets of Fengliaoqing Fengshi Dieda Yaojiu and rheumatoid arthritis disease targets were obtained through network pharmacology-related database and analysis platform. The protein-protein (PPI) interaction map was drawn by STRING database and core targets of Fengliaoqing Fengshi Dieda Yaojiu in treatment of rheumatoid arthritis were analyzed. DAVID database was used to perform GO and KEGG enrichment analysis on the intersection targets. Molecular docking was performed using AutoDockTools 1.5.6 software. A rat model of rheumatoid arthritis induced by bovine type II collagen emulsion was established. The degree of arthritis was assessed by visual scoring. Histopathology examination to detect joint changes, PCR analysis to detect key protein mRNA expression level, ELISA to detect HIF-1 α and IL-6 levels. **Results** A total of 46 active components were obtained by UHPLC-Q Exactive Focus MS/MS of Fengliaoqing Fengshi Dieda Yaojiu, which corresponded to 661 targets and 2 604 disease targets were screened. After the intersection of two targets, 283 potential targets of Fengliaoqing Fengshi Dieda Yaojiu in the treatment of rheumatoid arthritis were obtained. Ten core targets such as Akt1, TP53, and VEGFA were obtained by topological analysis. A total of 10 GO-related items and 15 KEGG pathways, mainly involving MAPK signaling pathway, PI3K/Akt signaling pathway, Ras signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, Rap1 and other signaling pathways were gained by enrichment analysis. The results of molecular docking showed that the core components such as esculetin, 5,7-dihydroxycoumarin, scopolin had good binding ability to core targets such as Akt1 and HIF-1 α . The results of animal experiments proved that Fengliaoqing Fengshi Dieda Yaojiu can alleviate joint swelling in the mice with rheumatoid arthritis. The results of ELISA showed that Fengliaoqing Fengshi Dieda Yaojiu lowered the levels of IL-6 and HIF-1 α . PCR showed that Fengliaoqing Fengshi Dieda Yaojiu down-regulated the mRNA level of HIF-1 α . **Conclusion** Through network pharmacological analysis, it was preliminarily revealed that Fengliaoqing Fengshi Dieda Yaojiu may improve the disease process of rheumatoid arthritis by acting on Akt1, PI3K, and other targets. Combined with pharmacodynamic experiments, it was found that Fengliaoqing Fengshi Dieda Yaojiu may play a therapeutic role in rheumatoid arthritis by reducing IL-6 and HIF-1 α .

Key words: Fengliaoqing Fengshi Dieda Yaojiu; network pharmacology; experimental verification; mechanism of action; esculetin; 5,7-dihydroxycoumarin; scopolin

类风湿性关节炎是一种慢性、以炎性滑膜炎为主的系统性疾病^[1]。其以手、足小关节的多关节、对称性、侵袭性关节炎为特征，常伴有关节畸形及功能丧失。Yamamoto 等^[2]研究发现，机体的免疫网络失衡，成纤维样滑膜细胞的类肿瘤样增殖和细胞内大量分泌金属蛋白酶和促炎性细胞因子等，是造成类风湿性关节炎关节内炎性细胞聚集，滑膜组织增生，骨及软骨降解和破坏的主要因素。目前用于类风湿性关节炎的药物从整体上可以划分为中药和西药 2 种类型。西药主要有非甾体抗炎药 (NSAIDs)、慢作用抗风湿药物 (SAARDs)、糖皮质激素、生物制剂^[3]。随着药物研究的快速发展与提升，部分临床用药在疗效显著提升的同时，不良反应也逐渐暴露，临床用药的安全性受到一定影响。而中医药治疗类风湿性关节炎有其独特的优势，具有辩证分型、整体调节、不良反应小的特点，近年来越来越受到人们的重视，成为临床研究的热点。

《中国药典》2020 年版收载的冯了性风湿跌打药酒由丁公藤、麻黄、桂枝等 27 味中药组成。丁公藤祛风湿为方中主药，配以桂枝、麻黄、羌活、蚕沙、白芷发散风寒、祛风湿、舒筋络，香附、木香、厚朴、枳壳、陈皮、苍术、苦杏仁、猪牙皂行气燥湿化痰，茴香、当归、川芎、乳香、没药、五灵脂、

牡丹皮温经活血祛瘀，白术、山药、补骨脂、黄精、菟丝子、泽泻补肝肾、强腰膝。临床上常用于风寒湿痹（包括现代医学的风湿、类风湿等疾病），瘀滞肿痛，跌打损伤诸症，应用广泛，疗效确切^[4-5]。基于冯了性风湿跌打药酒治疗风寒湿痹型类风湿关节炎药效物质研究较少及作用机制尚未阐明这两个科学问题，本研究拟通过网络药理学及动物实验验证研究其药效物质，揭示冯了性风湿跌打药酒治疗类风湿性关节炎可能的作用机制。

1 网络药理学预测

1.1 冯了性风湿跌打药酒成分、潜在靶点的获取

本课题组前期研究中采用高分辨质谱解析技术从冯了性风湿跌打药酒中鉴定出 59 种化学成分，从 PubChem 中检索出各化学成分的 SMILES 号或下载化合物的 2D 结构，保存为 SDF 文件，导入 TCMSP (<https://tcmspw.com/tcmsp.php>)、Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)，依据上传的成分的 2D 结构进行在线靶点预测，归纳筛选结果剔除评分值为 0 的预测靶点，筛选出活性成分相关的靶点。

1.2 构建“药材-化合物-靶点”网络图

将筛选所得的冯了性风湿跌打药酒中活性成分对应的靶点、药材整理成 Excel 属性文件，将数

据文件导入 Cytoscape 3.7.2 (<http://www.cytoscape.org/>) 软件中, 构建“药材-化合物-靶点”的网络图, 并进行相关拓扑学分析。

1.3 类风湿性关节炎相关疾病靶点及药物-疾病共同靶点的获取

以“rheumatoid arthritis”为检索词在 Drugbank (<https://www.drugbank.ca/>)、OMIM (<https://omim.org/>)、GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、TTD (<http://db.idrblab.net/ttd/>)、Disgenet (<https://www.disgenet.org/>) 在线数据库检索相应的疾病靶点, 将筛选结果归纳到一起, 去除重复合并后得到类风湿性关节炎的相关疾病靶点。

1.4 构建蛋白相互作用(PPI)网络图

将冯了性风湿跌打药酒潜在靶点与类风湿性关节炎疾病靶点导入 Venny 2.1.0 平台 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny>), 获得两者的交集靶点。将交集靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>), 物种设置为“Homo sapiens”, 构建 PPI 网络图。通过 Cytoscape 3.7.2 软件分析 degree 值, 取前 10 个定义为冯了性风湿跌打药酒治疗类风湿性关节炎的核心作用靶点。

1.5 基因本体(GO)与京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析

为了进一步观察分析作用靶点的生物学功能以及在信号通路中的作用, 先求得成分、疾病靶点蛋白的交集靶点, 将筛选得到的交集靶点蛋白导入 DAVID 6.8 在线数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>), 选择“OFFICIAL_GENE_SYMBOL”“Gene List”通过输入名称列表并限定物种为“Homo sapiens”, 之后选择“Pathways”下的“KEGG_PATHWAY”进行 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 信号通路富集分析, 选取符合条件的前 15 个条目, 将前 15 条 KEGG 信号通路转换并保存为 Excel 文件格式, 上传至在线网站工具微生信 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>), 将其结果进行可视化处理, 绘制成条形图与气泡图。以 P 值作为参数, 按基因数从大到小的顺序进行排列。

1.6 分子对接

借助 Cytoscape 3.7.2 软件“药物-活性成分-靶点”网络图数据信息, 将交集靶点导入 Cytoscape 3.7.2 软件中, 取与交集靶点相连的网络成分, 新建交集靶点网络可视化图, 根据 degree 大小排序得到排名靠前的小分子配体。借助 PPI 网络图, 根据

degree 排名, 得到排名靠前的的大分子受体。在 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载相应的蛋白的 PDB 文件, TCMSP 数据库 (<https://tcmssp-e.com/>) 下载相关化合物的 mol2 格式文件, 运用 PyMOL 2.4.0 软件对受体蛋白进行去水、去配体等操作, AutoDock Tools 1.5.6 软件对蛋白进行加氢以及计算电荷处理等处理, 将受体蛋白和配体小分子分别转化为 pdbqt 格式, 利用插件“autogrid”及“autodock”进行活性位点对接, 对接过程中使用 La-marckian genetic algorithm (LGA) 算法。计算结合能来评估成分小分子与蛋白之间的结合活性, 一般小于 -5.0 kJ/mol 的对接结合能被认为具有良好的结合相互作用。最后运用 PyMOL 2.4.0 软件、Discovery studio 展示其结构模式。

2 实验验证

2.1 材料

2.1.1 动物 雄性 SPF 级 SD 大鼠, 体质量 $180 \sim 220$ g, 购自西安交通大学实验动物中心, 动物使用许可证号 SYXK2020-005, 饲养于陕西省中医药研究院中药研究所实验动物中心, 温度为 $(22 \pm 1)^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 $(65 \pm 5)\%$, 光/暗循环 12 h/12 h, 自由摄食饮水。适应性饲养 1 周后进行实验。动物饲养及实验操作符合相关管理要求并通过陕西省中医药研究院实验动物伦理委员会审批, 许可证号 AF/SL-01/01.2 和 AF/SC-05/01.2。

2.1.2 药物及试剂 牛 II 型胶原(美国 Chondrex 公司, 批号 20021); 弗氏不完全佐剂(美国 Sigma 公司, 批号 210144); 冯了性风湿跌打药酒(佛山冯了性药业有限公司, 规格 500 mL/瓶, 批号 170908); 甲氨蝶呤片(上海信宜药业有限公司, 规格 2.5 mg/片, 批号 H31020644); 白细胞介素-6 (IL-6, 货号 ER0042)、低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α , 货号 ER0191) 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 试剂盒均购自武汉菲恩生物科技有限公司; RNA 提取液(武汉塞维尔生物科技有限公司, 批号 G3013); Servicebio® RT First Strand cDNA (武汉塞维尔生物科技有限公司, 批号 G3330); 2 $\times$ SYBR Green qPCR Master Mix (Low ROX) (武汉塞维尔生物科技有限公司, 批号 G3321); 引物(武汉塞维尔生物科技有限公司); 三氯甲烷(批号 10006818)、异丙醇(批号 80109218)、无水乙醇(批号 10009218)均购自国药集团化学试剂有限公司。

2.1.3 仪器 台式高速冷冻型微量离心机(北京

DragonLab 公司); 荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-rad 公司); 超净工作台 (苏净安泰公司); 超微量分光光度计 (赛默飞世尔科技公司); 标准试剂型纯水仪, 青岛富勒科技有限公司; Multiskan SkyHigh 酶标仪, ThermoFisher Scientific 公司。

2.2 分组和方法

2.2.1 分组、造模、给药 将 48 只雄性 SD 大鼠随机分为 6 组, 即对照组、模型组、甲氨蝶呤组, 以及冯了性风湿跌打药酒 (0.1、0.2、0.4 g/kg) 组。给药体积为 10 mL/kg, 冯了性风湿跌打药酒的出膏率为 5% 左右, 根据临床给药剂量以人体质量 70 kg 换算冯了性风湿跌打药酒大鼠等效剂量。

根据文献报道^[6]造模方法将牛 II 型胶原蛋白溶于 0.1 mol/L 乙酸中, 浓度为 2 mg/mL, 在 4 °C 冰箱中放置过夜。之后与等体积弗氏不完全佐剂在冰浴中、无菌条件下混合乳化。在大鼠尾根部注射 0.2 mL 乳剂 (含胶原 200 μg), 从尾根部 2 cm 处插入针头, 直到针尖插入位置距尾根部 0.5 cm, 针尖插入皮下且每次注射后充分擦拭。初次注射 7 d 后, 在大鼠尾根部再次注射 0.2 mL 的乳剂 (含胶原 200 μg), 注射部位在尾根部 3 cm 处, 针尖插入皮下距鼠尾根部 1.5 cm 处。第 13 天, 冯了性风湿跌打药酒组大鼠分别 ig 0.1、0.2、0.4 g/kg, 每天 1 次, 连续 17 d; 甲氨蝶呤组 ig 1 mg/kg, 每 3 d 给药 1

次。对照组和模型组 ig 等量蒸馏水, 每天 1 次, 连续 17 d。

2.2.2 大鼠关节炎指数 (AI) 评分 所有大鼠从造模第 1 天开始, 每 7 天测定 1 次体质量, 每 4 天测定 1 次大鼠左后足踝关节周长。AI 评分每 4 天测定 1 次, 采用 5 分制的评分标准^[7]。评分标准: “0” 无肿胀; “1” 指关节肿胀; “2” 脚踝轻度肿胀; “3” 涉及整个爪子的严重炎症; “4” 关节畸形或僵直。每次记录 2 只后腿的关节炎指数分数之和, 单只最高分为 8 分。

2.2.3 组织病理学检查 每组大鼠取 4 只, 迅速剪去左腿踝关节, 剥离肌肉和组织, 生理盐水洗涤后置于 4% 多聚甲醛中固定备用。将组织脱钙、包埋、切片, 并进行苏木精 - 伊红 (HE) 染色, 显微镜下观察各组大鼠的关节处病理特征。

2.2.4 定量 PCR 分析 用 TRIzol 试剂从关节滑膜中提取 mRNA, 利用逆转录酶和 2 μg RNA 合成互补 DNA。本研究使用的引物如表 1 所示。扩增在 15 μL 反应体积中进行, 反应体积中含有 2 μL cDNA、1.5 μL 2.5 μmol/L 引物、7.5 μL qPCR 混合物和 4 μL ddH₂O。每个反应经过 40 个循环: 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 60 s。以磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 作为归一化对照。

2.2.5 ELISA 法检测 HIF-1α 和 IL-6 水平 第 29

表 1 各基因 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequences for each gene

基因名称	上游引物序列 (5'-3')	下游引物序列 (5'-3')
HIF-1α	ACCGTGCCCTACTATGTCG	GCCTTGATGGGAGCATTAACTT
PI3K	TGACAGGCACAACGACAACATC	AGGTAAGCCCTAACGCAGACAT
Akt	CTGGAGGACAACGACTATGGC	AGCCTCTGTGTAGGGTCCTTCTT
GAPDH	CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	GGTGAAGAATGGGAGTTGCT

天, 用戊巴比妥钠麻醉大鼠, 从腹主动脉采集血样。室温条件下静置 1~2 h, 3 000 r/min 离心 15 min, 分离收集上层血清, -20 °C 保存。按照 ELISA 试剂盒使用说明书对 HIF-1α 和 IL-6 进行检测。

2.2.6 统计学分析 使用 GraphPad Prism 9.4.1 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 检验方法为单因素方差检验。

3 结果

3.1 冯了性风湿跌打药酒候选活性成分的筛选

根据实验前期采用 UPLC-Q-Exactive 高分辨质谱对冯了性风湿跌打药酒化学成分的系統研究, 共鉴定得到 59 个活性成分^[8], 包括多种生物碱、黄酮

类、有机酸等。再将 59 个化合物的 SMILES 号或下载保存的 2D 结构, 导入 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), 搜索的结果经过筛选后共得到 661 个药物的潜在靶点。

3.2 中药 - 化合物 - 靶点相互作用网络

将上述 59 个药物活性成分与 661 个潜在靶点以 Excel 文件格式分别定义数据和属性文件, 通过 Cytoscape 3.7.2 软件进行数据编排, 得到冯了性风湿跌打药酒的中药 - 活性成分 - 靶点网络图 (图 1), 共得到 723 个节点, 1 319 条边。利用 Cytoscape 3.7.2 软件中的 degree 值进行拓扑分析, 获得冯了性风湿跌打药酒治疗类风湿性关节炎的 46 种活性

成分, 将活性成分信息进行汇总, 见表 2。

3.3 类风湿性关节炎疾病相关靶点

在 Drugbank、OMIM、Genecards、TTD、DisGeNET、DrugBank 数据库分别获得类风湿性关节炎疾病靶点, 进行合并、去重, 最终共获得 2 604

个类风湿性关节炎疾病靶点。

3.4 PPI 网络构建与分析

通过 Venny 2.1.0 平台共获得 283 个冯了性风湿跌打药酒 - 类风湿性关节炎交集靶点。将交集靶点导入 String 11.5 数据库, 获得靶点间相互作用关

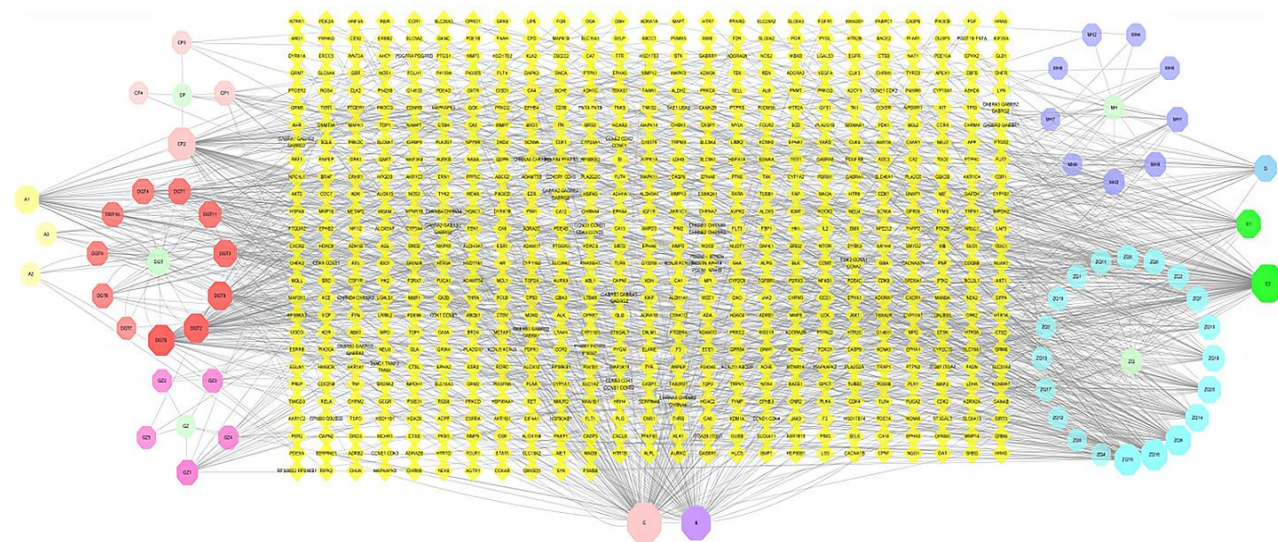


图 1 中药 - 成分 - 靶点网络图

Fig. 1 Traditional Chinese medicine - component - target network diagram

表 2 冯了性风湿跌打药酒活性成分

Table 2 Active ingredients of Fenglixiao Fengshi Dieda Yaojiu

ID 编号	化合物名称	英文名称	分子式	OB/%	DL	归属药材
A1	新绿原酸	neochlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	10.65	0.33	丁公藤、麻黄
A2	绿原酸	chlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	13.61	0.31	丁公藤、麻黄
A3	隐绿原酸	cryptochlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	24.50	0.33	丁公藤
B	原儿茶酸	protocatechuic acid	C ₇ H ₆ O ₄	25.37	0.04	麻黄
C	柚皮素	naringenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	59.29	0.21	麻黄、枳壳
CP1	2-甲氧基-4-乙烯基苯酚	4-hydroxy-3-methoxystyrene	C ₉ H ₁₀ O ₂	38.39	0.03	陈皮、枳壳
CP2	乙酸香叶酯	acetic acid geranyl ester	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	25.94	0.04	陈皮
CP3	川陈皮素	naringin	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	24.38	0.55	陈皮、枳壳
CP4	3'-甲氧基葛根素	3'-methoxypuerarin	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	11.73	0.78	陈皮
D	橙皮苷	hesperidin	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	13.33	0.67	麻黄
DGT10	异绿原酸 C	isochlorogenic acid C	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	1.78	0.69	丁公藤
DGT11	咖啡酸乙酯	ethyl 3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylate	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	103.85	0.07	丁公藤
DGT2	秦皮乙素	6,7-dihydroxycoumarin	C ₉ H ₆ O ₄	22.97	0.07	丁公藤
DGT3	东莨菪苷	scopolin	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	22.91	0.39	丁公藤
DGT4	伞形花内酯	7-hydroxycoumarin	C ₉ H ₆ O ₃	25.36	0.05	丁公藤
DGT5	东莨菪内酯	scopoletin	C ₁₀ H ₈ O ₄	27.77	0.08	丁公藤
DGT6	异绿原酸 B	isochlorogenic acid B	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	1.78	0.69	丁公藤
DGT7	异绿原酸 A	isochlorogenic acid A	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	1.79	0.69	丁公藤
DGT8	N-反式对羟基苯乙基香豆酰胺	N-p-trans-coumaroyltyramine	C ₁₇ H ₁₇ NO ₃	112.90	0.20	丁公藤
DGT9	N-反式对羟基苯乙基阿魏酰胺	N-trans-feruloyltyramine	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	86.71	0.26	丁公藤
E1	柚皮苷	naringin	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	6.92	0.78	枳壳
E2	橙皮素	hesperetin	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	70.31	0.27	麻黄
GZ1	苯乙醛	phenylacetaldehyde	C ₈ H ₈ O	38.65	0.02	桂枝
GZ2	苯乙酮	acetophenone	C ₈ H ₈ O	48.19	0.02	桂枝
GZ3	愈创木酚	guaiacol	C ₇ H ₈ O ₂	51.60	0.02	桂枝

续表 1

ID 编号	化合物名称	英文名称	分子式	OB/%	DL	归属药材
GZ4	3-羟基苯甲醛	3-hydroxybenzaldehyde	C ₇ H ₆ O ₂	30.97	0.02	桂枝
GZ5	丁香醛	syringaldehyde	C ₉ H ₁₀ O ₄	67.06	0.05	桂枝
MH1	去甲基麻黄碱	(-)-norephedrine	C ₉ H ₁₃ NO	66.05	0.03	麻黄
MH2	去甲基伪麻黄碱	(-)-norpseudoephedrine	C ₉ H ₁₃ NO	66.05	0.03	麻黄
MH3	麻黄碱	L-(-)-ephedrine	C ₁₀ H ₁₅ NO	43.35	0.03	麻黄
MH4	伪麻黄碱	pseudoephedrine	C ₁₀ H ₁₅ NO	52.25	0.03	麻黄
MH5	甲基麻黄碱	(-)-N-methylephedrine	C ₁₁ H ₁₇ NO	44.08	0.04	麻黄
MH9	肉桂酸	cinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₂	19.68	0.03	麻黄
ZQ1	精氨酸	L-arginine	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	47.64	0.03	枳壳
ZQ11	圣草枸橼苷	neoeiocitrin	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	3.93	0.73	枳壳
ZQ12	野漆树苷	rhoifolin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	6.68	0.77	枳壳
ZQ14	橙皮内酯	meranzin	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	26.03	0.17	枳壳
ZQ15	独活内酯	heraclenin	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	43.60	0.29	枳壳
ZQ16	黄柏酮	obacunone	C ₂₆ H ₃₀ O ₇	43.29	0.77	枳壳
ZQ17	花椒毒酚	xanthotoxol	C ₁₁ H ₆ O ₄	29.21	0.12	枳壳
ZQ18	3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮	3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone	C ₂₂ H ₂₄ O ₉	23.91	0.58	枳壳
ZQ2	缬氨酸	valine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	53.33	0.01	枳壳
ZQ20	橙皮油内酯	auraptene	C ₁₉ H ₂₂ O ₃	25.62	0.24	枳壳
ZQ4	氨基苯甲酸	anthranilic acid	C ₇ H ₇ NO ₂	60.35	0.03	枳壳
ZQ5	哌啶甲酸	pipecolic acid	C ₆ H ₁₁ NO ₂	66.14	0.02	枳壳
ZQ9	5,7-二羟基香豆素	5,7-dihydroxycoumarin	C ₉ H ₆ O ₄	56.93	0.07	枳壳

系,保存为 TSV 文件。进一步将数据导入 Cytoscape 3.7.2 软件,其中节点共有 99 个,共有 1 226 条线将其连接,根据 degree 值对靶点进行排序,构建 PPI 网络图,见图 2。利用 Cytoscape 3.7.2 软件中的 degree 值进行拓扑分析,获得冯了性风湿跌打药酒治疗类风湿性关节炎的蛋白激酶 B1 (Akt1)、磷脂酰肌醇激酶-3 催化亚单位 α 基因 (PIK3CA)、低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、FYN、HRAS、类固醇受体共激活因子 (SRC)、热休克蛋白 90 α 家族 A 类成员 1 (HSP90AA1)、肿瘤蛋白 p53 (TP53)、表皮生长因子受体 (EGFR)、有丝分裂原活化蛋白激酶 8 (MAPK8) 等 10 个核心靶点,见表 3。这些靶点为冯了性风湿跌打药酒治疗类风湿性关节炎的核心靶点,可能发挥着重要作用。选取影响关节滑膜环境的 Akt1、PIK3CA、HIF-1 α 作为关键靶点进行后续研究。

3.5 GO 与 KEGG 通路分析

利用 DAVID 6.8 在线数据库 (<https://david.ncicrf.gov/>),将 3.4 项下的 283 个交集靶点上传进行 GO 富集分析,获得生物过程 (BP) 996 条、细胞组成 (CC) 126 条、分子功能 (MF) 231 条。根据富集基因数量降序排序,选取每个类别的前 10 条绘制条形图进行可视化分析,见图 3。

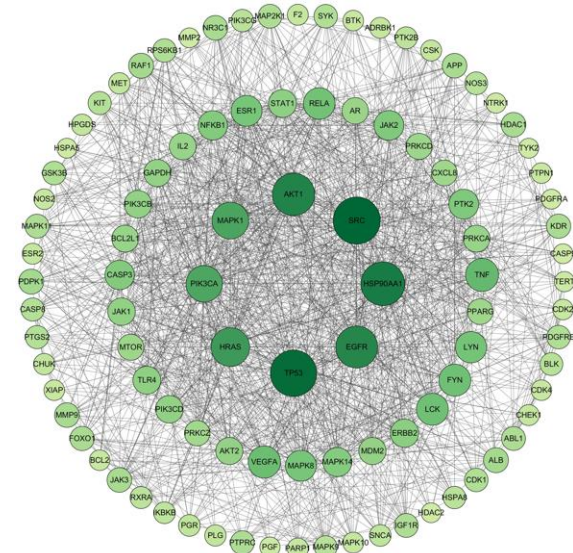


图 2 PPI 网络图

Fig. 2 PPI network diagram

对冯了性风湿跌打药酒治疗类风湿性关节炎进行 KEGG 信号通路的生物学富集分析,见图 4。KEGG 通路富集分析筛选得到 172 条 ($P < 0.05$) 结果,排出掉一些不相关的途径,如“癌症”“前列腺癌”“胰腺癌”“乙肝”等,按 P 值从小到大的顺序筛选出富集靶点最多的前 15 条通路,这些信号通路大部分都参与炎症反应,如磷脂酰肌醇-3-激酶

表 3 主要核心靶点

Table 3 Main core target

靶点	degree	紧密中心性	介数中心性
SRC	598.933 4	0.753 9	66
Akt1	521.190 0	0.725 9	61
HSP90AA1	543.300 0	0.720 6	60
TP53	513.157 4	0.715 3	59
EGFR	447.292 1	0.710 1	58
MAPK1	317.757 6	0.671 2	51
HRAS	206.279 1	0.671 2	50
PIK3CA	197.292 3	0.657 7	47
FYN	101.718 7	0.624 2	40
MAPK8	145.445 8	0.628 2	40

(PI3K) /Akt 信号通路、Ras 信号通路、Rap1 信号通路、HIF-1 信号通路、Chemokine 信号通路、肿瘤坏死因子 (TNF) 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路等。再将上述信号通路上传至在线网站工具微生信平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>), 进行可视化处理, 其中气泡的大小代表该通路的基因数量, 颜色代表富集显著性, 见图 4。

3.6 分子对接结果分析

将排名前 3 位的核心靶点 Akt1、PIK3CA、HIF-1 α 与排名前 3 位的活性成分秦皮乙素、5,7-二羟基香豆素、东莨菪苷进行分子对接, 结果显示分子对接的结合能均小于-5.0 kJ/mol, 提示结合较好, 见表 4。将结合较好的活性成分与关键靶点进行可视化, 见图 5。

3.7 足肿胀和 AI 评分结果

实验过程中, 观察记录大鼠左后踝关节周长、AI 评分, 结果见图 6。在造模第 13 天, 模型组较对照组左后足肿胀和 AI 评分显著升高 ($P<0.01$), 表明造模成功。在造模第 17 天, 与模型组相比, 冯了性风湿跌打药酒 0.2、0.4 g/kg 组关节肿胀程度显著降低 ($P<0.05$ 、0.1); 在造模第 21 天, 与模型组相比, 冯了性风湿跌打药酒 0.1、0.2 g/kg 组显著降低左后足肿胀程度 ($P<0.05$ 、0.01); 在造模 29 天, 与模型组相比, 冯了性风湿跌打药酒 0.2、0.4 g/kg 组能显著降低关节肿胀和 AI 评分 ($P<0.05$ 、0.01)。

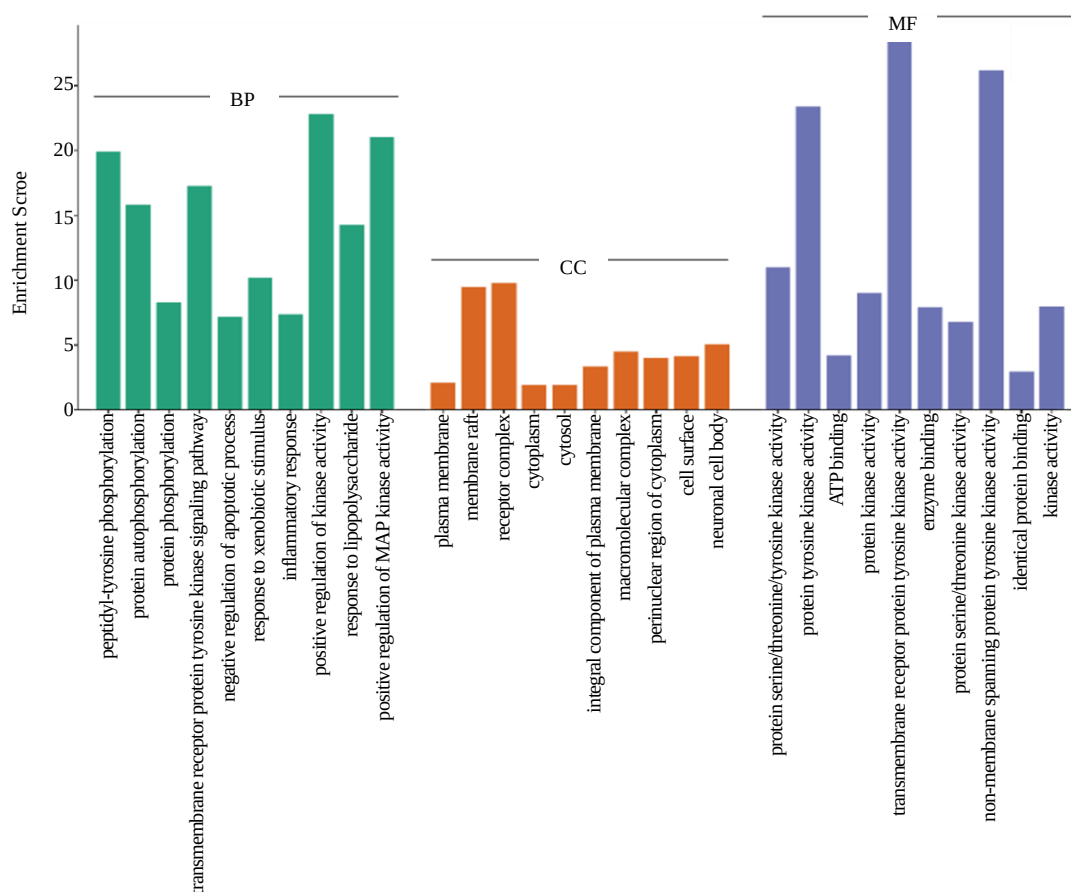


图 3 交集靶点 GO 富集分析

Fig. 3 GO enrichment analysis of intersection targets

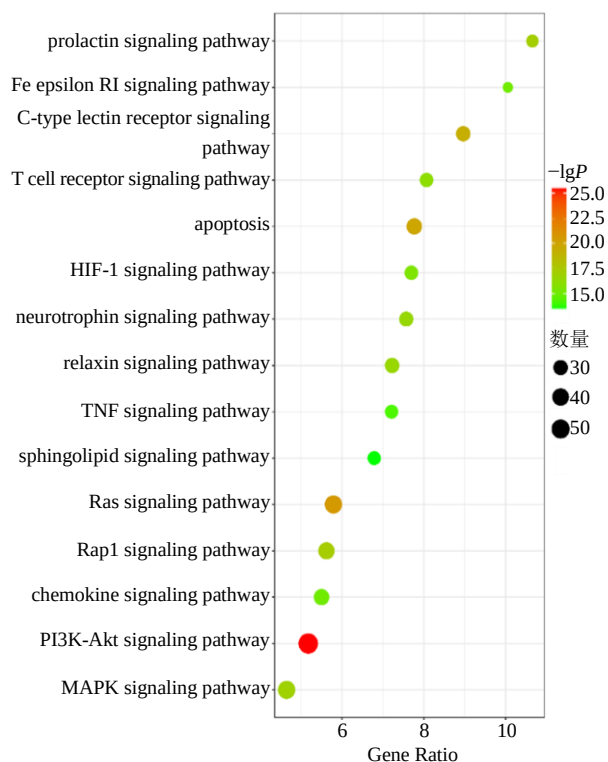


图 4 KEGG 信号通路气泡图

Fig. 4 Bubble diagram of KEGG signaling pathway

表 4 关键活性成分与关键靶点的分子对接

Table 4 Molecular docking between key active chemical components and key targets

活性成分	结合能/(kJ mol ⁻¹)		
	Akt1	HIF-1 α	PIK3CA
秦皮乙素	-7.3	-5.8	-7.3
5,7-二羟基香豆素	-7.3	-6.3	-7.3
东莨菪苷	-9.5	-6.9	-8.5

3.8 大鼠踝关节组织的组织学观察

由图 7 可见,对照组小鼠大鼠踝关节结构完整,无炎症浸润,属于正常滑膜组织;模型组大鼠关节腔内可见大量炎性细胞浸润,滑膜血管翳增生明显,堵塞关节腔,关节软骨结构破坏,关节间隙变小;冯了性风湿跌打药酒组干预后,踝关节炎性细胞浸润减少,滑膜血管翳增生减轻,关节软骨结构完整,滑膜增生和软骨退化显著减轻。

3.9 定量 PCR 分析结果

如图 8 所示,与对照组相比,模型组 *HIF-1 α* mRNA 显著升高, *Akt*、*PI3K* mRNA 显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001);与模型组相比,冯了性风湿跌打药酒 0.4 g/kg 组能显著升高 *PI3K* mRNA 表达量 ($P < 0.05$),冯了性风湿跌打药酒 0.2、0.4 g/kg 组能显著

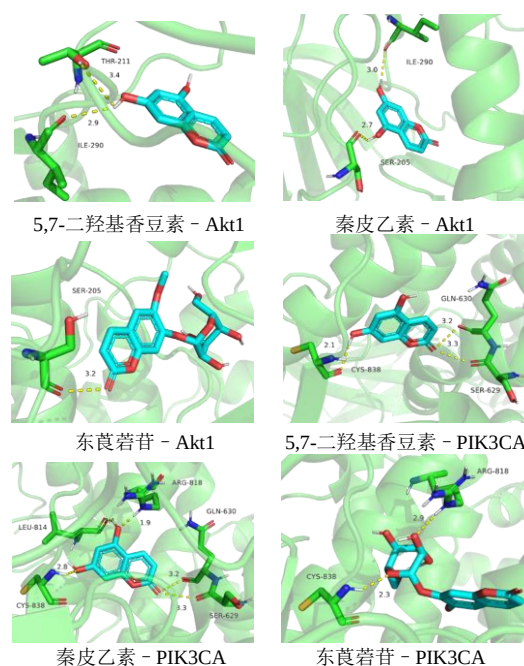


图 5 核心化合物与核心靶点结合示意图

Fig. 5 Molecular docking diagram of key compounds to targets

降低 *HIF-1 α* mRNA 表达量 ($P < 0.001$)。

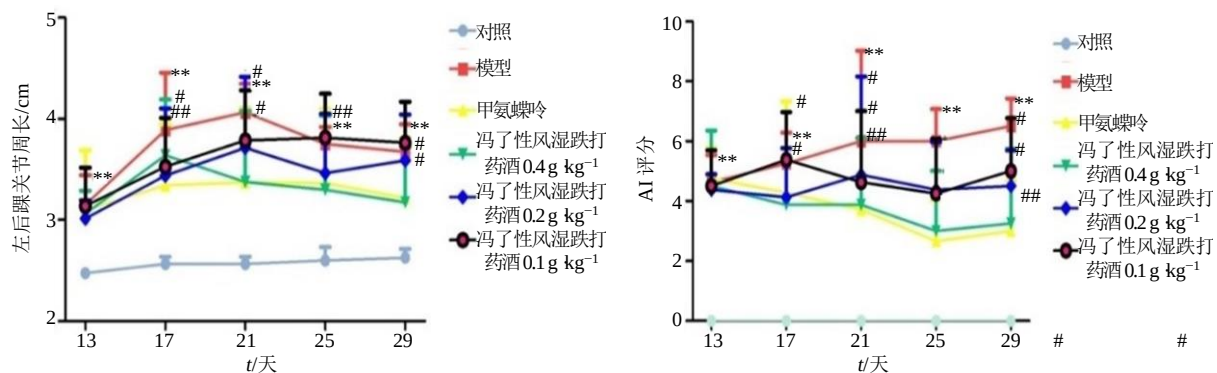
3.10 ELISA 法检测 HIF-1 α 和 IL-6 水平

如图 9 所示,模型组大鼠血清中 *HIF-1 α* 、IL-6 的水平显著高于对照组 ($P < 0.01$),冯了性风湿跌打药酒 0.4 g/kg 组大鼠血清中 *HIF-1 α* 水平显著低于模型组 ($P < 0.01$)。冯了性风湿跌打药酒各剂量组大鼠血清中 IL-6 水平显著低于模型组 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

4 讨论

中药复方的治疗疾病机制尚不完全清楚,君、臣、佐、使间的相互配伍规律,使得药物通过多分子、多靶点、多途径作用于疾病,而起到一定的治疗效果。网络药理学的提出为中药复方作用于疾病的研究提供了一种新的思路,它是基于大数据时代背景下的一种整体联系微观的,从各层面系统分析分子作用机制的科学,这与中医整体观及辨证论治思想相统一^[9]。冯了性风湿跌打药酒临床上用于风寒湿痹(包括现代医学的风湿、类风湿等疾病)历史悠久,疗效确切。因此本研究借助网络药理学、体内动物实验,同时收集整理文献资料,对冯了性风湿跌打药酒防治类风湿性关节炎的潜在作用机制进行初步探讨。

IL-6 是类风湿性关节炎的关键细胞因子,它对



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group

图 6 各组大鼠关节周长、关节指数评分比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 6 Comparison on ankle circumference and arthritis index ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

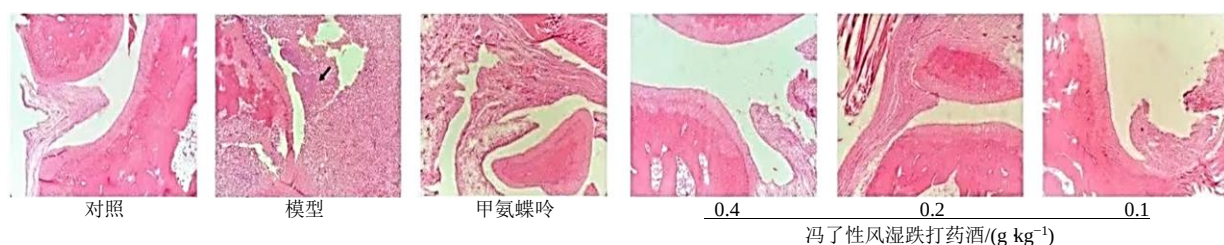
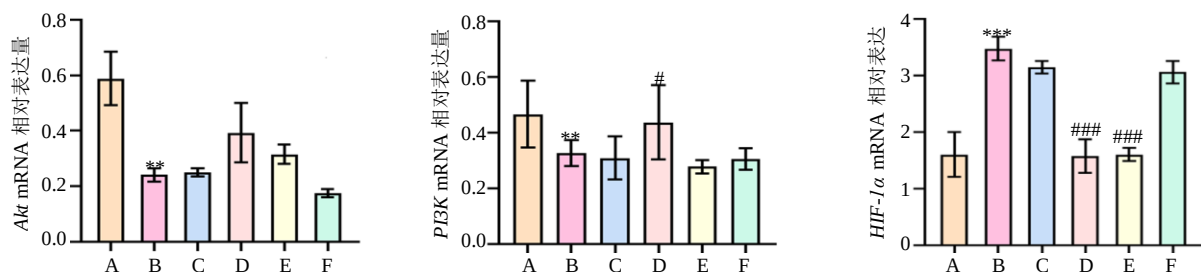


图 7 踝关节组织病理学检查 ($\times 100$)

Fig. 7 Histopathological examination of ankle joints ($\times 100$)



A-对照 B-模型 C-甲氨蝶呤 D-冯了性风湿跌打药酒 0.4 g kg⁻¹ E-冯了性风湿跌打药酒 0.2 g kg⁻¹ F-冯了性风湿跌打药酒 0.1 g kg⁻¹ 与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$

A-control B-model C-methotrexate D-Fengliaoxing Fengshi Dieda Yaojiu 0.4 g kg⁻¹ E-Fengliaoxing Fengshi Dieda Yaojiu 0.2 g kg⁻¹ F-Fengliaoxing Fengshi Dieda Yaojiu 0.1 g kg⁻¹ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs model group

图 8 冯了性风湿跌打药酒对 Akt、PI3K、HIF-1α mRNA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 8 Effects of Fengliaoxing Fengshi Dieda Yaojiu on mRNA levels of AKT, PI3K, and HIF-1α ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

类风湿性关节炎的主要致病作用包括促进炎症相关的 B 细胞和 Th17 细胞的分化以及急性期蛋白的合成; 诱导破骨细胞分化, 造成关节损伤; 与 IL-1 共同诱导基质金属蛋白酶的产生, 从而破坏关节软骨^[10-12]。活化的 CD4⁺T 细胞可以浸润关节滑膜, 而关节中某些内源性物质也会活化 CD4⁺T 细胞, 从而导致炎症反应, IL-1β 和 IL-6 可以促进 CD4⁺T 细胞

的分化, 从而分泌大量的炎症因子, 加重类风湿性关节炎病情^[13-14]。HIF-1α 是组织参与缺氧调控的重要核转录因子, 在低氧条件下, 胞内 HIF-1α 蛋白大量积聚, 并从胞浆进入细胞核内参与调控下游靶基因血管内皮生长因子 A (VEGFA) 的转录过程, 使 VEGFA 表达上调, 促进炎症细胞因子分泌、增加血管通透性、加速血管内皮细胞增殖, 导致血管畸形

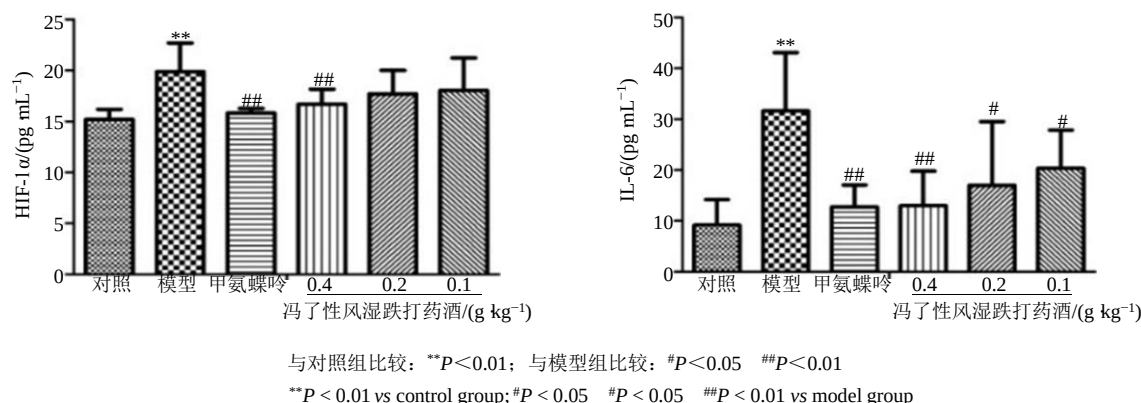


图 9 冯了性风湿跌打药酒对各组大鼠血清 HIF-1 α 、IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 9 Effect of Fenglixiao Fengshi Dieda Yaojiu on HIF-1 α and IL-6 levels in collagen-induced arthritis rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

成, 影响类风湿性关节炎的发病和病情进展^[15-16]。

通过研究获得了冯了性风湿跌打药酒的 59 种主要活性成分, 661 个潜在靶点, 283 个与类风湿性关节炎重叠的靶点, 涉及 996 个生物过程、126 类细胞组分、231 种分子功能和 172 个 KEGG 相关信号通路。根据构建“药物-活性成分-靶点”网络图推测出冯了性风湿跌打药酒治疗类风湿性关节炎的主要活性成分包括秦皮乙素、东莨菪苷、异牡荆素-6'-O- α -L-鼠李糖苷等, 其中秦皮乙素的 degree 值最高。根据 PPI 网络与 KEGG 通路富集分析得出冯了性风湿跌打药酒治疗类风湿性关节炎涉及 Akt1、VEGFA、IL-6、HIF-1 α 、基质金属蛋白酶 9 (MMP9) 等多个核心靶点以及 PI3K/Akt、Ras、HIF-1、MAPK 等多条信号通路。PI3K/Akt 信号通路、Ras 信号通路、HIF-1 信号通路、MAPK 信号通路等是和免疫反应、炎症反应相关的信号通路^[17-18], 说明冯了性风湿跌打药酒对调节免疫、消除炎症具有一定的作用。本研究建立了类风湿性关节炎常用的胶原诱导性 (CIA) 模型进行体内实验。研究结果显示, 冯了性风湿跌打药酒干预后的大鼠关节炎评分明显降低, 其关节肿胀度明显改善, HE 组织切片染色显示冯了性风湿跌打药酒干预后, 大鼠踝关节炎性细胞浸润减少, 滑膜血管翳增生减轻, 关节软骨结构完整, 显著改善了滑膜增生和软骨退化。此外, ELISA 实验结果显示, 类风湿性关节炎大鼠关节滑膜组织中 HIF-1 α 、IL-6 水平表达明显升高, 给予冯了性风湿跌打药酒干预后, 大鼠滑膜 HIF-1 α 、IL-16 水平显著下降, 减少炎症因子分泌、对下游靶基因 VEGF 的激活效应减弱, 使 VEGFA 表达降低, 抑制新生血管的生成, 缓解关节炎大鼠的骨破坏, 减轻关节的损伤, 对类风湿性关节炎起到治疗作用。

综上所述, 本研究借助网络药理学分析冯了性风湿跌打药酒作用于类风湿性关节炎的潜在分子机制, 结果显示, 冯了性风湿跌打药酒治疗类风湿性关节炎是通过多成分、多靶点、多通路来发挥作用, 但网络药理学只是基于大数据时代背景下新兴的学科, 多种数据库资料没有实时更新, 且冯了性风湿跌打药酒及类风湿性关节炎在不同数据库下所得出的结果与最新前沿知识仍有些许差别。因此, 本课题组将进一步对筛选出来的相关基因及蛋白进行验证, 通过细胞因子检测、病理切片等信号通路调控类风湿性关节炎的作用机制。从分子层面明确冯了性风湿跌打药酒的有效性, 为冯了性风湿跌打药酒治疗类风湿性关节炎的基础和临床研究以及中药组方的新药研制提供一定的理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] He Y F, Mai C T, Pan H D, *et al.* Targeting immunometabolism by active ingredients derived from traditional Chinese medicines for treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Chin Herb Med*, 2021, 13(4): 451-460.
- [2] Yamamoto A, Fukuda A, Seto H, *et al.* Suppression of arthritic bone destruction by adenovirus-mediated dominant-negative Ras gene transfer to synoviocytes and osteoclasts [J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(9): 2682-2692.
- [3] 叶敏, 万军, 王李俊, 等. 中药通过调节肠道菌群治疗类风湿关节炎的研究进展 [J]. *中草药*, 2022, 53(22): 7279-7284.
- [4] 谭珍, 曹颖珍, 王永健. 冯了性风湿跌打药酒真伪品及掺假品的鉴别 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2006(9): 56-57.
- [5] 姚血明, 马武开, 唐芳, 等. 中医外治法在痹证中的应用 [J]. *风湿病与关节炎*, 2014, 3(5): 73-75.

- [6] Wang Q, Ye C, Sun S, *et al.* Curcumin attenuates collagen-induced rat arthritis via anti-inflammatory and apoptotic effects [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 72: 292-300.
- [7] Cooray S. The pivotal role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signal transduction in virus survival [J]. *J Gen Virol*, 2004, 85(Pt 5): 1065-1076.
- [8] 刘小妹, 杨媛媛, 胡静, 等. 冯了性风湿跌打药酒的化学成分鉴定 [J]. 中国药房, 2020, 31(20): 2473-2480.
- [9] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [10] Pandolfi F, Franza L, Carusi V, *et al.* Interleukin 6 and rheumatoid arthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5238.
- [11] 李岩异, 张卫婷. IL-6: TNF- α 之后的类风湿关节炎治疗关键靶点 [J]. 生物工程学报, 2017, 33(1): 36-43.
- [12] Davies R, Williams J, Sime K, *et al.* The role of interleukin-6 trans-signalling on cardiovascular dysfunction in inflammatory arthritis [J]. *Rheumatology* (Oxford), 2021, 60(6): 2852-2861.
- [13] Müller-Ladner U, Pap T, Gay R E, *et al.* Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis [J]. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2005, 1(2): 102-110.
- [14] 展俊平, 孟庆良, 孟婉婷, 等. 补阳还五汤对类风湿关节炎小鼠 MPO, NE mRNA 表达及 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(24): 158-163.
- [15] 蒋雨晴, 赵小艳, 张鑫, 等. HIF-1 在 RA 发病机制中的作用 [J]. 按摩与康复医学, 2022, 13(17): 45-49.
- [16] Li Y, Liu Y, Wang C, *et al.* Succinate induces synovial angiogenesis in rheumatoid arthritis through metabolic remodeling and HIF-1 α /VEGF axis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 126: 1-14.
- [17] Kaplan F M, Kugel C H, Dadpey N, *et al.* SHOC2 and CRAF mediate ERK1/2 reactivation in mutant NRAS-mediated resistance to RAF inhibitor [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(50): 41797-41807.
- [18] 陈洪菊, 唐彬秩, 屈艺, 等. mTOR 信号通路调节 HIF-1 α 及 VEGF [J]. 生命的化学, 2011, 31(6): 838-843.

[责任编辑 高源]