

基于网络药理学和实验验证白藜芦醇治疗类风湿性关节炎的作用机制

龙晨, 杨硕, 潘彬, 袁峰*

徐州医科大学附属医院 脊柱外科, 江苏 徐州 221006

摘要: **目的** 通过网络药理学、分子动力学模拟探讨白藜芦醇对类风湿性关节炎的治疗作用及潜在机制, 并进行实验验证。**方法** 使用 TCMSP、Batman-TCM、SwissTarget Prediction 数据库预测白藜芦醇的作用靶点; 使用 GeneCards 和 OMIM 数据库预测类风湿性关节炎的潜在治疗靶点; 使用 STRING 和 Cytoscape3.8.0 构建蛋白相互作用 (PPI) 网络, 并进行 MCC 分析、MCODE 分析、基因本体 (GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析, 对 KEGG 通路和靶点之间绘制网络图; 使用分子对接和分子动力学模拟方法对核心靶点与白藜芦醇进行模拟; 构建类风湿性关节炎大鼠模型, Western blotting 法检测 p-磷脂酰肌醇 3-激酶 (p-PI3K)、p-蛋白激酶 B1 (p-Akt1) 和 p-细胞外信号调节激酶 (p-ERK) 1/2 的表达水平。**结果** 白藜芦醇有 310 个靶点, 与类风湿性关节炎有 207 个交集靶点, MCC 分析发现 *Akt1*、*PIK3CA*、*PIK3CB*、促分裂原活化蛋白激酶 (*MAPK*) 1、*MAPK3*、信号传导与转录激活因子 3 (*STAT3*) 是其中核心基因。GO 和 KEGG 富集分析发现, 癌症通路、糖尿病并发症中的晚期糖基化终末产物 - 晚期糖基化终末产物受体 (AGE-RAGE) 信号通路、细胞凋亡和 PI3K/Akt 信号通路可能是白藜芦醇影响类风湿性关节炎的关键通路; 分子对接和分子动力学模拟也发现 *Akt1*、*PIK3CA* 和 *MAPK1* 与白藜芦醇之间有很强的结合能力。动物实验发现, 与对照组相比, 模型组大鼠关节炎指数明显增加, 而给予白藜芦醇后大鼠的关节炎指数明显下降; p-PI3K、p-AKT 表达明显上升, p-ERK1/2 的表达明显下降 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 白藜芦醇能改善类风湿性关节炎大鼠的关节炎指数, 并可能通过 *Akt1*、*PIK3CA* 和 *MAPK1* 等靶点和 PI3K/Akt 信号通路来发挥关键治疗作用。

关键词: 白藜芦醇; 类风湿性关节炎; 分子动力学; 磷脂酰肌醇 3-激酶; 蛋白激酶 B1; 促分裂原活化蛋白激酶

中图分类号: R681

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2024)06-1425-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.06.008

Mechanism of action of resveratrol in treatment of rheumatoid arthritis through network pharmacology and experimental validation

LONG Chen, YANG Shuo, PAN Bin, YUAN Feng

Department of Spine Surgery, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221006, China

Abstract: **Objective** To explore the therapeutic effects and potential mechanisms of resveratrol in rheumatoid arthritis through network pharmacology, molecular dynamics simulations and animal experiments, and experimental verification was carried out. **Methods** The TCMSP, Batman-TCM, and SwissTargetPrediction databases were used to predict the targets of action of resveratrol. GeneCards and OMIM databases were used to predict the potential therapeutic targets of rheumatoid arthritis. PPI networks were constructed using STRING and Cytoscape 3.8.0, and MCC analysis, MCODE analysis, GO and KEGG enrichment analysis, and target network mapping between KEGG pathways and targets were performed. Using molecular docking and molecular dynamics simulation methods to simulate the core targets with resveratrol. Constructing a rheumatoid arthritis rat model, and detecting the expression levels of p-PI3K, p-Akt, and p-ERK1/2 by Western blotting. **Results** A total of 310 targets of resveratrol and 207 intersecting targets with rheumatoid arthritis. MCC analysis found that *Akt1*, *PIK3CA*, *PIK3CB*, *MAPK1*, *MAPK3*, and *STAT3* are the core genes among them. GO and KEGG enrichment analysis found that pathways in cancer, AGE-RAGE signaling pathways in cancer, apoptosis, PI3K-Akt signaling pathway may be the key pathways of resveratrol affecting rheumatoid arthritis. Molecular docking and molecular dynamics simulation also found that *Akt1*, *PIK3CA*, and *MAPK1* have strong binding ability with resveratrol. Animal experiments revealed that

收稿日期: 2024-01-27

基金项目: 江苏省卫生健康委员会重点项目 (ZD2022064); 江苏省中医药科技发展项目 (MS2021102)

作者简介: 龙晨, 硕士, 主要从事骨科工作。E-mail: 1104546399@qq.com

*通信作者: 袁峰, 博士, 教授, 主任医师, 主要从事脊柱外科研究。E-mail: xzmuyf@163.com

compared with the control group, the arthritis index of the model group was significantly increased, but the arthritis index in the resveratrol group was significantly decreased. The expression of p-PI3K and p-Akt was significantly increased, while the expression of p-ERK1/2 was significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Resveratrol can improve arthritis index of rheumatoid arthritis rats, and may play a key therapeutic role through the targets of Akt1, PIK3CA, and MAPK1 and the PI3K/Akt signaling pathway.

Key words: resveratrol; rheumatoid arthritis; molecular dynamics; PI3K; Akt; MAPK

类风湿性关节炎是一种常见的炎症性关节炎, 具有自身免疫性, 主要表现为关节炎症、骨损伤和软骨破坏、关节功能障碍和畸形以及关节外器官损害。我国约有 500 万人患病, 同时由类风湿性关节炎导致残疾占残疾的几率高达 61.3%^[1-2]。类风湿性关节炎的主要特征是炎症途径导致的关节滑膜细胞增殖, 形成的血管翳可能导致软骨的破坏和骨质的侵蚀, 促炎因子大量产生更加促进了这一过程的发生^[3]。目前主要通过抗炎药物以及抗风湿药物进行治疗, 缓解和减轻关节炎症来保护关节, 进而抑制病情的发展^[4-5]。在类风湿性关节炎患者治疗中, 2 种或 2 种以上的抗风湿药物联合治疗比单药治疗更有效, 但是 2 种以上的生物制剂的使用会带来很大的不良反应的风险^[6]。

白藜芦醇是一种酚类化合物, 具有重要的抗氧化特性^[7], 其存在于多种植物中, 如决明子、黑藜芦、虎杖、葡萄、大豆和坚果, 具有多种药理作用, 并且在葡萄酒中含量很高, 很容易获取和摄入^[8]。白藜芦醇还有强大的抗炎、抗癌和抗衰老的作用, 但白藜芦醇的作用机制是复杂且多效性的^[9]。白藜芦醇通过沉默信息调节因子 (SIRT1)、雌激素受体 α 和环氧合酶等靶点作用于各种细胞, 而且能作用于磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) /蛋白激酶 B (Akt) /哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 来治疗炎症性疾病^[10-11]。白藜芦醇可以通过诱导非经典自噬通路和降低 p14 的表达来抑制滑膜组织细胞的增殖^[12]。

本研究为探索白藜芦醇治疗类风湿性关节炎的潜在机制。通过网络药理学^[13]结合分子对接和分子动力学来预测白藜芦醇对类风湿性关节炎的潜在靶点和作用机制, 并建立大鼠类风湿性关节炎模型来对关键靶点进行验证, 为临床上药物开发和白藜芦醇的使用提供基础指导。

1 网络药理学预测

1.1 白藜芦醇和类风湿性关节炎靶点的预测

使用中药系统药理学数据库和分析平台 TCMSP (<https://old.tcmsp-e.com/index.php>)、BATMAN-TCM ([http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/index](http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/index.php)

[php](http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/index.php)) 和 Swiss Target Prediction (www.swisstargetprediction.ch) 数据库预测白藜芦醇的靶点。将这 3 个药理学数据库得到的靶点合并去重, 得到白藜芦醇的预测靶点。以 “rheumatoid arthritis” 为关键词在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 和 OMIM (<https://omim.org/>) 数据库中查找类风湿性关节炎的相关靶点。此外, 查阅了相关文献报道^[3]以更好地寻找靶点, 以避免遗漏相关靶点信息。将以上药理学数据库筛选与文献查阅的相关靶点合并去重后对这些靶点用 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 进行校正, 得到类风湿性关节炎的靶点。

1.2 蛋白质相互作用 (PPI) 网络的构建

将白藜芦醇和类风湿性关节炎的交集靶点上传到 STRING 数据库 (<https://www.string-db.org/>) 构建 PPI 网络, 对关键靶点进行筛选和分析。将评分条件设置为 >0.90 , 并选定的目标蛋白仅限于智人。将 STRING 在线数据库的结果输入到 CYTOSCAPE 3.8 软件中, 进行下一步分析。

1.3 核心基因筛选

Cytoscape 中的 cytoHubba 主要用于通过其网络功能对网络中的节点进行排名, 其中 MCC 被认为是最好的筛选方法, 能更好的预测核心基因^[14]。利用 Cytohubba 中的 MCC 筛选算法^[14]和靶点网络图中筛选 degree 值排名靠前的靶基因。同时将交集靶点上传至 Matescape (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/>) 进行 MCODE 分析便于更好理解 PPI 网络。

1.4 基因本体 (GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析及 “通路 - 靶点” 网络图的构建

使用 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 进行 GO 富集分析和 KEGG 富集分析, 其中 GO 富集分析包括生物过程 (BP)、分子功能 (MF)、细胞成分 (CC)。KEGG 富集分析是用于系统分析相关靶点所存在的通路。将 KEGG 中前 20 个通路及相关通路靶点上传至 CYTOSCAPE 3.8 软件中来构建 “通路 - 靶点” 网络。

1.5 分子对接

对接使用的蛋白晶体结构从 PDB 数据库中下载获得；白藜芦醇的 3D 结构从 PubChem 数据库下载获得，并在 MMFF94 力场下进行能量最小化。采用 AutoDock Vina 1.1.2 软件^[15]，对接前对所有受体蛋白进行去除水分子等操作。设置对接盒子，并进行分子对接。通过对接评分来筛选结合活性较好的靶点，其中得分越低越表明对接活性越强。将对接分数最低的蛋白结构，进行分子动力学模拟。

1.6 分子动力学模拟

全原子分子动力学模拟使用 AMBER 18 软件进行。模拟之前，小分子的电荷通过 antechamber 模块和 gaussian 09 软件的 Hartree - Fock (HF) SCF/6-31G* 计算所得^[16]。首先添加氢原子，在体系 10 Å (1 Å=0.1 nm) 距离处添加截断的八面体 TIP3P 溶剂盒^[17]，并在体系中添加 Na⁺/Cl⁻用于平衡体系电荷。在模拟之前，对体系进行能量优化 (2 500 步的最陡下降法和 2 500 步的共轭梯度法)。采用在固定体积和恒定升温速度下，对体系进行 200 ps 的升温，使体系温度缓慢地从 0 K 升到 298.15 K。在体系维持温度 298.15 K 的条件下，进行 500 ps 的等温等体 (NVT) 系宗模拟，使溶剂分子进一步均匀的分布在溶剂盒子中。最后，等温等压 (NPT) 的情况下，对整个体系进行 500 ps 的平衡模拟。最后进行 100 ns 的 NPT 系宗模拟。模拟时，非键的截断距离设为 10 Å，Particle Mesh Ewald (PME) 方法被用于计算长程的静电作用^[18]，SHAKE 方法用于氢原子键长得限制^[19]，Langevin 算法用于温控^[20]，其中碰撞频率 γ 设为 2 ps⁻¹。体系压强为 1 atm，积分步长为 2 fs，每隔 10 ps 保存轨迹用于后续分析。

所有体系的蛋白和配体间结合自由能通过分子力学泊松玻尔兹曼表面积 (MM/GBSA) 方法计算^[21-22]。长时间的分子动力学模拟可能不利于 MM/GBSA 计算的准确性^[21]，故本研究采用 90~100 ns 的分子动力学 (MD) 轨迹用作计算，具体公式如下：

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{complex}} - (\Delta G_{\text{receptor}} + \Delta G_{\text{ligand}}) \\ = \Delta E_{\text{internal}} + \Delta E_{\text{VDW}} + \Delta E_{\text{elec}} + \Delta G_{\text{GB}} + \Delta G_{\text{SA}}$$

$\Delta E_{\text{internal}}$ 表示内能、 ΔE_{VDW} 表示范德华作用以及 ΔE_{elec} 表示静电相互作用。其中内能包括键能 (E_{bond})、角能 (E_{angle})、和扭转能 (E_{torsion})； ΔG_{GB} 和 ΔG_{SA} 统称溶剂化自由能。其中 G_{GB} 为极性溶剂化自由能、 G_{SA} 为非极性溶剂化自由能。对于 ΔG_{GB} ，

本研究采用 Nguyen 等^[23]开发得 GB 模型进行计算 ($igb=2$)。非极性溶剂化自由能 (ΔG_{SA}) 则基于表面张力 (γ) 与溶剂可及性表面积 (SA) 的乘积计算得到， $\Delta G_{\text{SA}}=0.0072 \times \Delta \text{SASA}$ ^[24]。熵变由于高耗计算资源与低精度，在本研究中被忽略不计。

2 实验验证

2.1 动物和材料

8 周龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 24 只，体质量 180~220 g，由徐州医科大学动物实验中心提供，许可证号 SCXK (苏) 2020-0011，饲养于徐州医科大学动物实验中心，予普通动物饲料喂养，在恒定环境下 [(22±2) °C，湿度为 40%，12 h 光/暗循环] 适应 1 周后进行实验。实验已遵循了徐州医科大学动物实验中心所制定的有关实验动物保护和使用的指南，并经徐州医科大学动物实验中心实验动物伦理委员会批准 (审批号 L20210226440)。牛 II 型胶原蛋白 (货号 20022) 购自 Chondrex 公司，不完全弗氏佐剂 (IFA，货号 F5881) 购自 Sigma 公司。

2.2 大鼠类风湿性关节炎制备及分组

参照文献报道方法^[25]，在冰浴条件下使用牛 II 型胶原 (2 g/L) 与弗氏完全佐剂 (3.5 g/L) 等体积反复乳化混匀。在大鼠背部、尾根部及右后足掌皮内注射胶原乳化液各 0.1 mL，总计 0.3 mL。在初次免疫动物 1 周后进行加强免疫，给予大鼠尾根部皮内注射含有牛 II 型胶原的胶原乳化液 0.3 mL/只，建立类风湿性关节炎大鼠模型^[26]。

随机将所有大鼠分为对照组、模型组、白藜芦醇组，每组 8 只。白藜芦醇组于造模后第 2 天开始每天 ig 30 mg/kg 白藜芦醇，共 42 d；对照组和模型组大鼠给予等体积生理盐水。最后利用异氟烷吸入麻醉进行大鼠滑膜组织取材。实验过程中无动物死亡；建模成功标准：经由关节炎指数显示模型大鼠的趾端到踝关节区域见红肿现象，同时关节炎指数在 4 分以上^[27]。

2.3 关节炎指数检测

通过检测关节炎指数对模型进行评价，依照大鼠多发性关节炎全身 5 级评分法进行评分，正常 0 分，足趾关节红肿 1 分，多个足趾关节红肿 2 分，裸关节以下的足爪肿胀 3 分，部分足爪肿胀 4 分^[26]。累积四肢关节炎积分为关节炎指数值。在造模后第 1、2、6 周进行检测。

2.4 Western blotting 检测蛋白表达量

动物试验结束后，称取大鼠滑膜组织 10 mg，

在低温条件下用碾磨器搅碎后,加入蛋白裂解液,4 ℃ 离心 15 min (12 000 r/min,离心半径为 8 cm),吸取蛋白上清,采用 BCA 试剂盒进行蛋白浓度测定。用 12% 的 SDS-PAGE 凝胶进行电泳,然后将其转到 PVDF 膜。将条带转移至对应的 p-PI3K (1:1 000)、p-Akt1 (1:1 000)、p-细胞外信号调节激酶 (ERK) 1/2 (1:1 000) 及 β -actin (1:10 000) 一抗溶液中,4 ℃ 恒温过夜,使用 HRP 标记的二抗 (稀释比 1:10 000、37 ℃、1 h),TBST 洗膜 3 次 (10 min) 后加入 ECL 显影液,并进行曝光。

2.5 统计学分析

使用 Graph Prism 9.0 软件进行图形的绘制和统计,多组之间的比较使用单因素方差分析进行统计;对多个因素多水平的比较使用双因素方差。所有结果使用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 白藜芦醇和类风湿性关节炎的靶点的筛选

使用 Swiss Target Prediction、TCMSP 和 Batman-TCM 数据库收集白藜芦醇的靶点,删除重复靶点、标准统一化名称后得到 310 个靶点。使用 GeneCards 和 OMIM 数据库中删除重复靶点、标准统一化名称后得到类风湿性关节炎 4 882 个靶点,二者取交集得到 207 个靶点,见图 1。

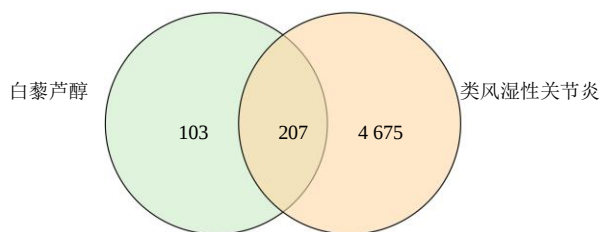


图 1 白藜芦醇和类风湿性关节炎靶点的 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of resveratrol and rheumatoid arthritis targets

3.2 PPI 网络的构建与分析

将 3.1 项下 207 个交集靶点上传到 STRING 数据库,得到 PPI 网络,见图 2。PPI 网络中有 207 个节点和 1 087 条边。通过 Cytoscape 中的 MCC 聚类方法^[14],将交集靶点按重要性进行排序,如图 3 所示,促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 1、MAPK3、信号传导与转录激活因子 3 (STAT3)、V-Rel 网状内皮增生病毒癌基因同源物 A (RELA)、雌激素受体 1 (ESR1)、转录因子 AP-1 (JUN)、fos 原癌基因蛋白 (FOS)、原癌基因 MYC、低氧诱导因子-1A

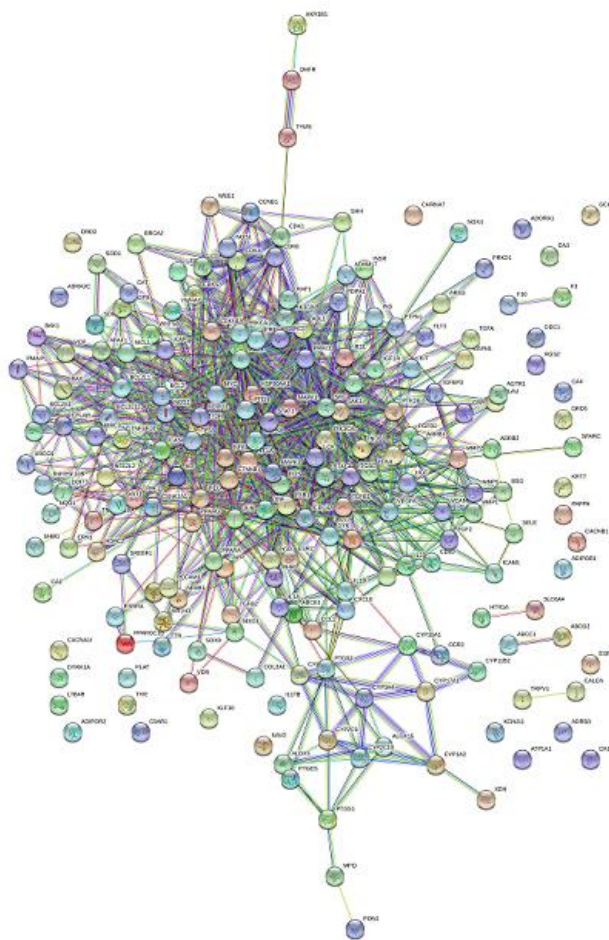


图 2 PPI 网络图

Fig. 2 PPI network diagram

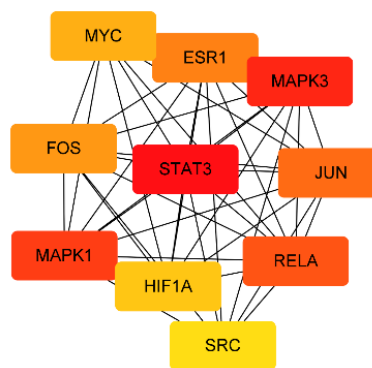


图 3 交集靶点 MCC 分析

Fig. 3 MCC analysis of intersection targets

(HIF-1A) 和非受体酪氨酸激酶 (SRC) 为其中关键靶点。同时使用 Metascope 中的 MCODE 组块进行 PPI 网络的分析,见图 4、表 1,发现交集靶点能富集到多种生物学过程和通路中。因此,推测白藜芦醇可能通过 MAPK1、MAPK3、STAT3、RELA、ESR1、JUN、FOS、MYC、HIF-1A、SRC 等关键靶点在类风湿性关节炎的治疗中发挥作用。

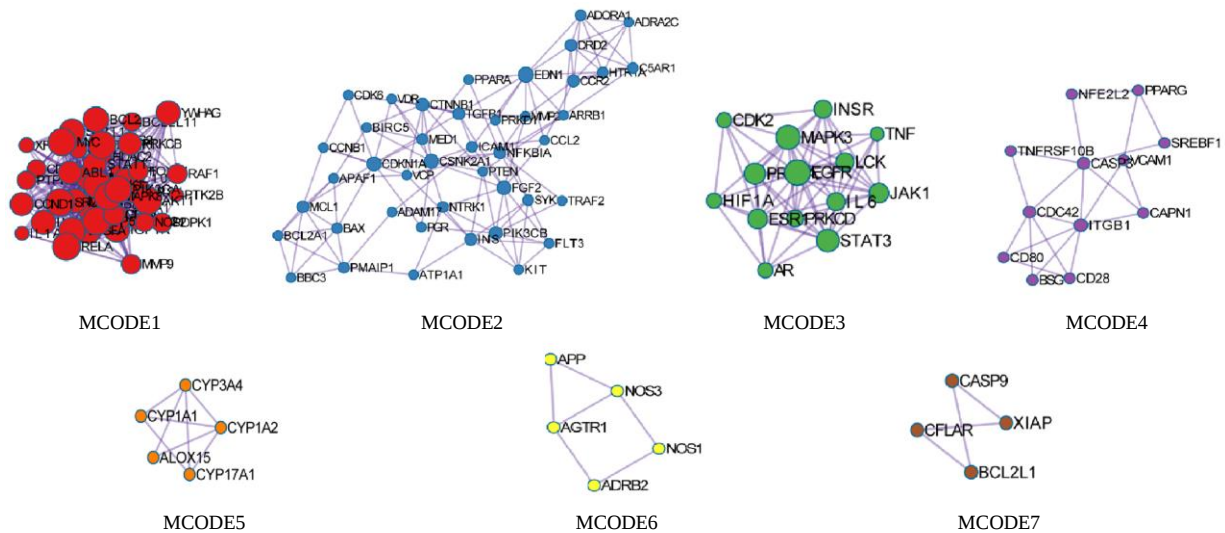


图 4 交集靶点 MCODE 分析
Fig 4 Intersection target MCODE analysis

表 1 MCODE 分析
Table 1 MCODE analysis

MCODE	生物过程	lgP
MCODE1	pathways in cancer	-38.4
	positive regulation of phosphorus metabolic process	-27.3
	positive regulation of phosphate metabolic process	-27.3
MCODE2	pathways in cancer	-21.6
	apoptosis	-19.2
	regulation of apoptotic signaling pathway	-15.1
MCODE3	proteoglycans in cancer	-24.7
	proteoglycans in cancer	-24.7
	pancreatic cancer	-22.8
MCODE4	apoptosis	-11.2
	p53 signaling pathway	-10.2
	intrinsic apoptotic signaling pathway	-8.5
MCODE5	steroid hydroxylase activity	-11.7
	olefinic compound metabolic process	-11.6
	long-chain fatty acid biosynthetic process	-11.5
MCODE6	arachidonic acid metabolic process	-8.2
	arachidonic acid metabolism	-8.1
	arachidonic acid metabolism	-8.1
MCODE7	negative regulation of blood pressure	-8.4
	regulation of systemic arterial blood pressure	-7.5
	adenylate cyclase-activating G protein-coupled receptor signaling pathway	-7.0

3.3 GO 和 KEGG 富集分析

DAVID 数据库用于对 207 个交集靶点进行 GO

富集分析，包括 BP、CC、MF 3 个方面。前 10 名的结果按照 P 值从小到大排序后输出，见图 5。

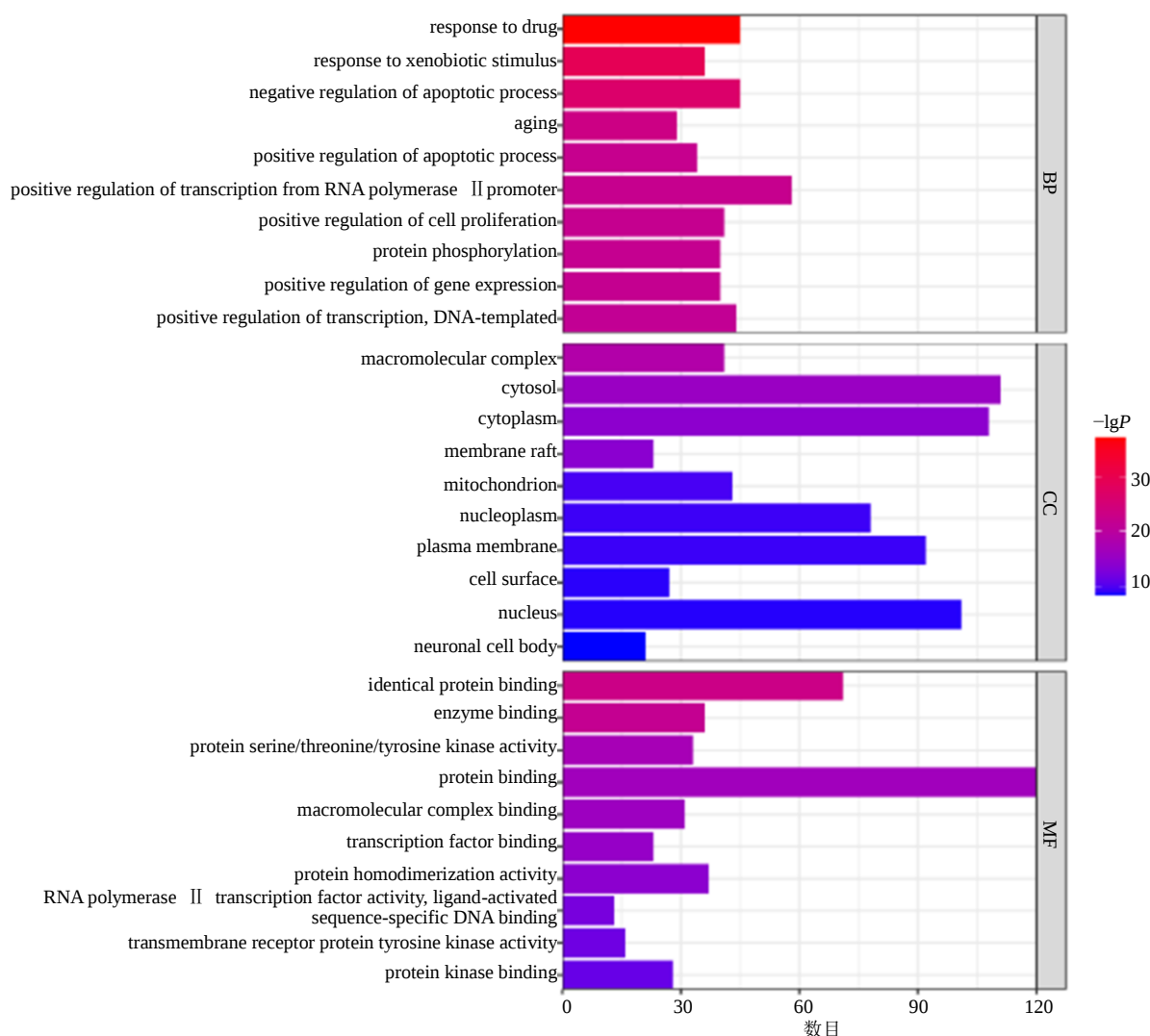


图 5 GO 功能分析

Fig. 5 GO function analysis

KEGG 富集分析结果显示, 交集靶点涉及 154 个通路。根据 P 值从大到小选择前 20 名进一步分析, 由图 6 可见白藜芦醇与类风湿性关节炎之间的靶点主要富集在癌症通路、糖尿病并发症中的糖尿病并发症中的晚期糖基化终末产物 - 晚期糖基化终末产物受体 (AGE-RAGE) 信号通路、细胞凋亡和 PI3K/Akt 信号通路等通路中富集。通过“通路 - 靶点”网络图 (图 7) 发现 Akt1、磷脂酰肌醇-3-激酶催化亚基 α (PIK3CA)、PIK3CB、MAPK1、MAPK3 是影响这些重要通路的关键蛋白。

3.4 分子对接

将核心基因 Akt1、PIK3CA、PIK3CB、MAPK1、MAPK3、STAT3 与白藜芦醇进行分子对接, 根据阈值得到 6 组配体 - 受体对接结果, 其中 Akt1、

PIK3CA、MAPK1 基因与白藜芦醇具有很好的结合力, 其结合位点三维图见表 2、图 8。

3.5 分子动力学模拟

分子动力学模拟能反应小分子和蛋白之间结合能力的强弱。分子动力学模拟的均方根偏差 (RMSD) 用来反映复合物的运动过程, RMSD 越大以及波动越剧烈代表运动剧烈。均方根波动 (RMSF) 可以反映分子动力学模拟的过程中蛋白的柔性。氢键为最强的非共价结合作用之一, 数目越多表示结合越好。如图 9 所示, 白藜芦醇与 Akt1、MAPK1、PIK3CA 3 个复合物体系在前 10 ns 模拟期间运动逐渐收敛, 并且在模拟中后期保持相对稳定的波动。RMSD 维持在 1.5~3 Å, 意味着白藜芦醇和 3 个蛋白都能稳定结合。白藜芦醇结合后 Akt1、

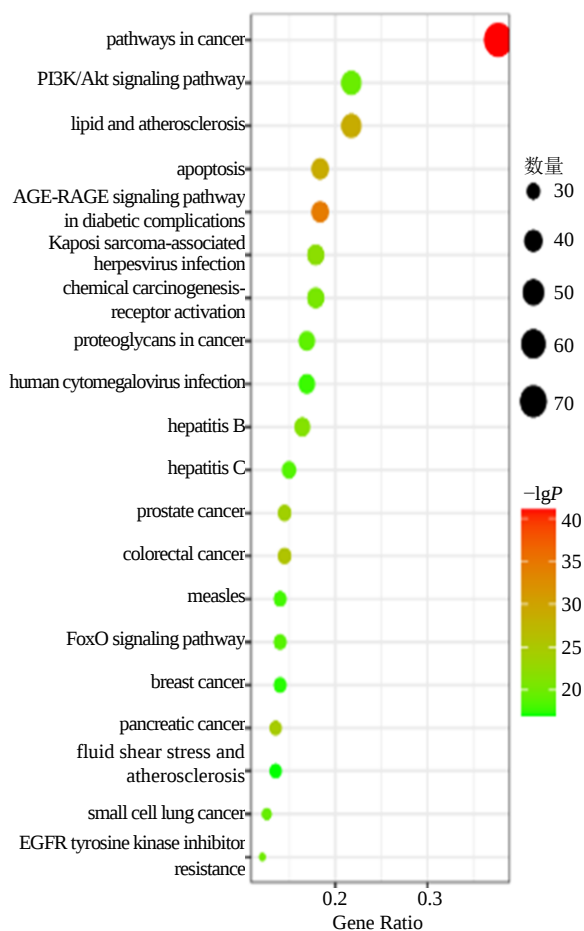


图 6 KEGG 通路分析

Fig. 6 KEGG path analysis

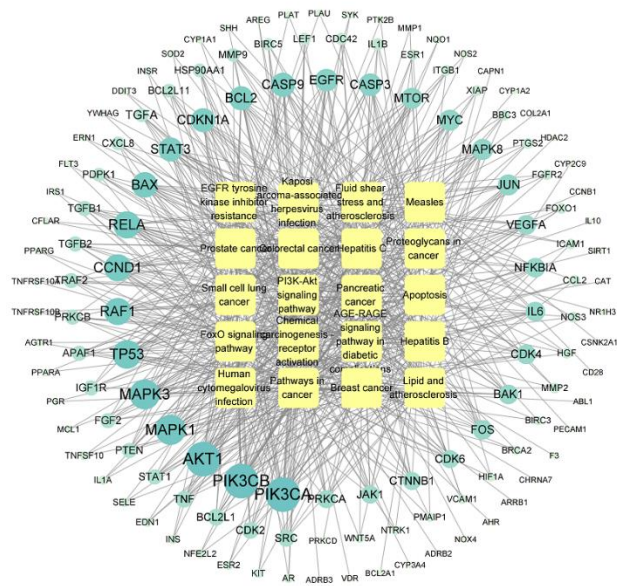


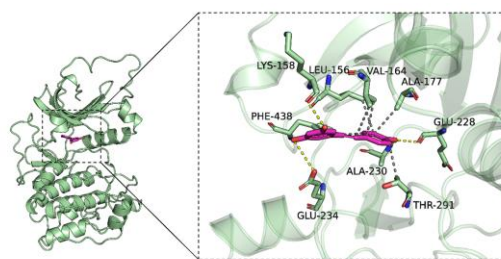
图 7 “通路 - 靶点”网络图

Fig. 7 “Pathway - target” network diagram

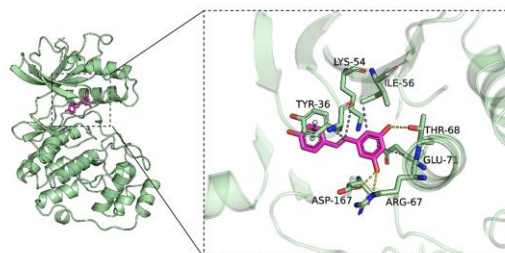
表 2 白藜芦醇与核心靶点分子对接结合能

Table 2 Molecular docking binding energy of resveratrol and core target

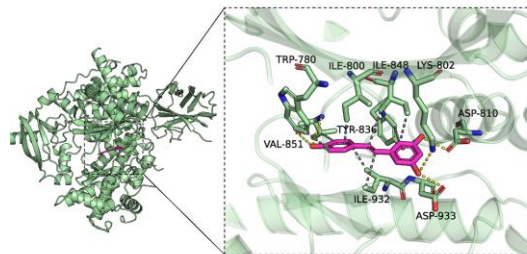
靶点	结合能/(kcal·mol ⁻¹)
Akt1	-4.71
PIK3CA	-5.95
PIK3CB	-4.80
MAPK1	-5.93
MAPK3	-4.75
STAT3	-5.07



白藜芦醇 - Akt1



白藜芦醇 - MAPK1

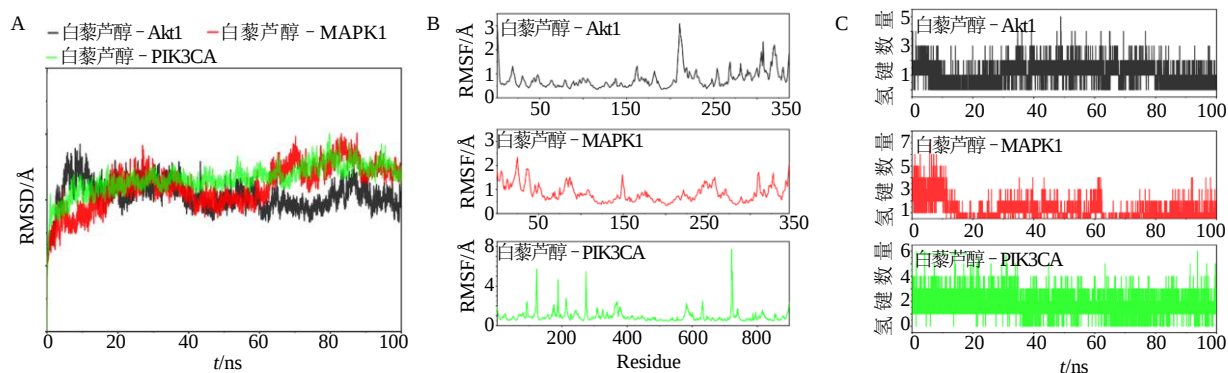


白藜芦醇 - PIK3CA

图 8 分子对接结果

Fig. 8 Molecular docking results

MAPK1、PIK3CA 蛋白在整体氨基酸序列上表现出较低的 RMSF, 表明白藜芦醇可以抑制蛋白柔性, 达到影响蛋白功能的效果。低 RMSF 可以使得激酶失去原本的通过高柔性相互作用发生的磷酸化激活功能。白藜芦醇与 Akt1、MAPK1、PIK3CA3 组在模拟过程都存在一定数目的氢键。表明在动力学模拟过程中氢键对小分子和蛋白的结合起到作用, 其中 Akt1、MAPK1 与白藜芦醇在模拟中后期含 0~4 氢键; PIK3CA 与白藜芦醇在模拟中后期含 0~6 个



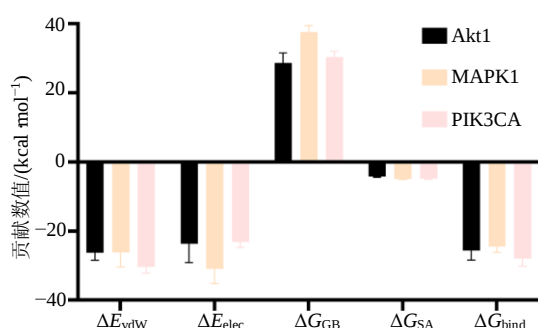
A-RMSD; B-RMSF; C-氢键的数量。
A-RMSD; B-RMSF; C-number of hydrogen bonds.

图 9 分子动力学模拟

Fig. 9 Molecular dynamics simulation

氢键，表明氢键作用对 PIK3CA 与白藜芦醇结合贡献更强。

此外，本研究对结合自由能进行了 MM/GBSA 分析，发现 Akt1、MAPK1、PIK3CA 与白藜芦醇的结合能分别为 (-25.69 ± 2.72) 、 (-24.58 ± 1.64) 、 (-27.98 ± 2.21) kcal/mol ($1 \text{ cal} = 4.2 \text{ J}$)。数值为负数表明该分子与目标蛋白具结合亲和力，数值越低表示结合越强。说明 Akt1、MAPK1、PIK3CA 与白藜芦醇具备结合潜力（图 10）。通过能量分解，可以看出 Akt1、MAPK1、PIK3CA 与白藜芦醇结合的主要贡献能为范德华能和静电能，贡献数值都在 -20 kcal/mol 以上，其次是非极性溶剂化自由能贡



ΔE_{vdW} : 范德华力; ΔE_{elec} : 静电能; ΔG_{GB} : 静电对溶解自由能的贡献; ΔG_{SA} : 对溶解的非极性贡献; ΔG_{bind} : 结合自由能。
 ΔE_{vdW} : van der Waals energy; ΔE_{elec} : electrostatic energy; ΔG_{GB} : electrostatic contribution to solvation; ΔG_{SA} : non-polar contribution to solvation; ΔG_{bind} : binding free energy.

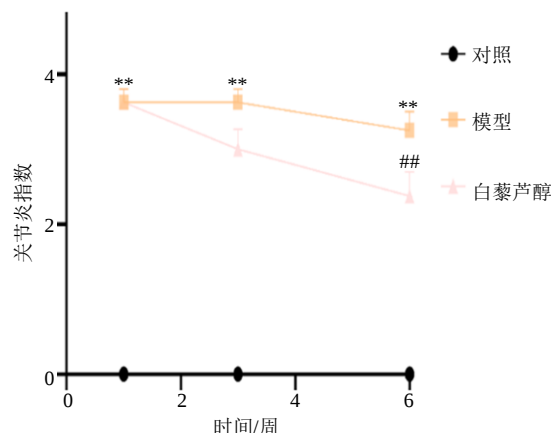
图 10 MM/GBSA 预测的结合自由能和能量成分

Fig. 10 Predicted binding free energy and energy components by MM/GBSA

献。暗示氢键作用以及疏水作用维持这些复合物的稳定结合。

3.6 大鼠关节炎指数改变

对照组大鼠关节炎指数均为 0；相比于对照组，模型组关节炎指数明显增大 ($P < 0.01$)；与模型组相比，在第 6 周时，白藜芦醇组关节炎指数显著降低 ($P < 0.01$)，见图 11。



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group.

图 11 大鼠关节炎指数 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 11 Arthritis index of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.7 大鼠 p-PI3K、p-Akt 和 p-ERK1/2 的蛋白表达

结果表明，相比于对照组，模型组大鼠滑膜组织的 p-ERK1/2 蛋白表达水平明显升高，而 p-PI3K 和 p-Akt1 蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.01$)；与模型组相比，白藜芦醇组滑膜组织的 p-ERK1/2 蛋白表达水平降低，而 p-PI3K 和 p-Akt1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)，见图 12。

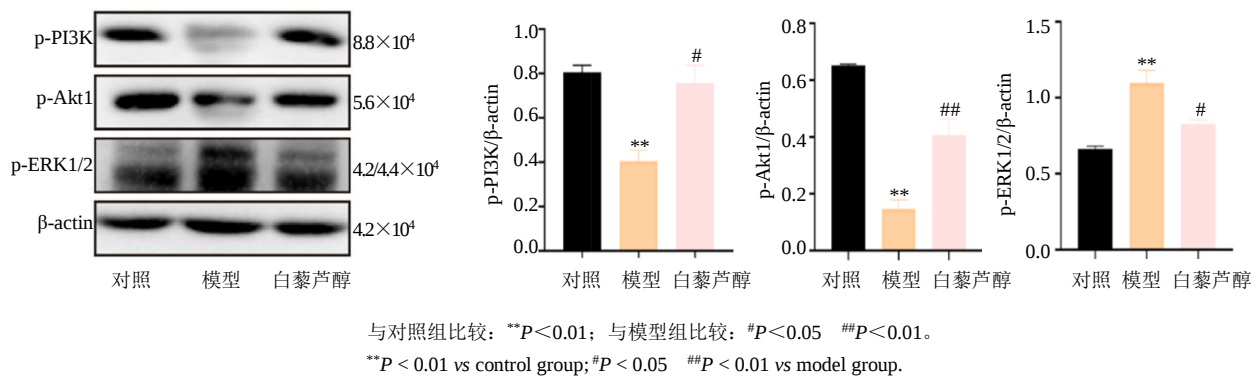


图 12 大鼠滑膜组织 p-PI3K、p-Akt1 和 p-ERK1/2 的蛋白相对表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 12 Relative protein expression levels of p-PI3K, p-Akt1, and p-ERK1/2 in synovial tissue of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

类风湿性关节炎是一种慢性全身性自身免疫性疾病,主要表现为关节病变,伴有高残疾和畸形率。其发病机制极为复杂,包括先天性和适应性免疫反应的激活以及对自身耐受性的破坏^[28]。临床上,治疗类风湿性关节炎的药物主要包括抑制炎症、氧化、凋亡等机制^[29]。近期研究表明,膳食中的多酚类物质对改善类风湿性关节炎具有显著效果^[30]。作为多酚类植物化合物的代表,白藜芦醇具有强大的抗炎、氧化、脂质代谢和抑制活性氧(ROS)生成等功能。研究发现,白藜芦醇通过调节炎症因子治疗膝骨关节炎^[31-32]。此外,白藜芦醇还通过影响 PI3K/Akt/mTOR 信号通路调控炎症因子^[33]。本研究结果发现,白藜芦醇能有效改善类风湿性关节炎大鼠的关节炎指数。Western blotting 结果也表明,与对照组相比,模型组大鼠 p-PI3K、p-Akt1 表达明显下降, p-ERK1/2 的表达明显增加,而给予白藜芦醇后 p-PI3K、p-Akt1 表达明显上升, p-ERK1/2 的表达明显下降。结果表明,白藜芦醇可能通过 PI3K/Akt 和 ERK 信号通路治疗类风湿性关节炎。

经初步筛选,获得了 310 个白藜芦醇的靶点和 207 个治疗类风湿性关节炎的靶点。通过 PPI 网络图分析发现 MAPK1、MAPK3、STAT3、RELA、ESR1、JUN、FOS、MYC、HIF-1A 和 SRC 可能是其中关键的核心靶点。通过 GO 和 KEGG 富集分析发现白藜芦醇治疗类风湿性关节炎的靶点主要富集在癌症通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、细胞凋亡和 PI3K/Akt 信号通路等,表明这些通路在治疗中发挥重要作用。“通路-靶点”图显示 Akt1、PIK3CA、PIK3CB、MAPK1、MAPK3 是影响这些重要通路的关键蛋白。

Akt1、PIK3CA 是 PI3K/Akt 信号通路的关键靶点,该通路通过介导生长因子信号传导参与葡萄糖稳态、脂质代谢、蛋白质合成、细胞增殖和存活等关键细胞过程^[34]。PI3K/Akt 信号通路不仅参与 FLS 细胞的异常增殖和滑膜炎,还调节破骨细胞的分化和生成^[35]。此外,破骨细胞迁移和通过 PI3K/Akt 信号通路破坏骨头和关节软骨,最终导致关节畸形,加重类风湿性关节炎的发展。MAPK1 和 MAPK3 在调控细胞增殖、分化和存活方面发挥关键作用,是 MAPK 信号通路的关键靶点^[36]。信号因子和各种因素激活细胞外信号调节激酶(MEK),随后导致 ERK1/2 的磷酸化,从而引起 MAPK 信号通路的异常激活,导致类风湿性关节炎的发生^[37]。此外,ERK1/2 通过调节脂多糖(LPS)刺激的巨噬细胞中 IL-6、IL-12、IL-23、TNF- α 的产生^[38]。STAT3 是 Janus 激酶(JAK)/STAT 通路的重要靶点之一,STAT 基因转录与持续炎症和类风湿性关节炎关节破坏的严重程度密切相关^[39]。促炎细胞因子的相互作用引起 JAK 磷酸化,并进一步激活 STAT 蛋白,导致 JAK/STAT 通路向细胞核转移,从而调节靶基因基质金属蛋白酶(MMPs)的表达,参与软骨病变^[40]。分子对接结果和分子动力学结果表明,白藜芦醇与 Akt1、PIK3CA 和 MAPK1 之间存在稳定的 RMSD 和 RMSF 值,而且氢键的结合状态也处于稳定的状态,这些结果表明,白藜芦醇与 Akt1、PIK3CA 和 MAPK1 的结合是稳定的,具有良好的结合能力,因此这 3 个蛋白可能是白藜芦醇治疗类风湿性关节炎的关键靶点。

总之,通过网络药理学、分子动力学模拟和动物实验对白藜芦醇治疗类风湿性关节炎的潜在作用机制进行分析,结果表明白藜芦醇与 Akt1、

PIK3CA、PIK3CB、MAPK1、MAPK3 等关键治疗靶点之间存在良好的结合活性,这可能说明了白藜芦醇可能通过介导 PI3K/Akt 和 MAPK 信号通路来治疗类风湿性关节炎,此外还发现了癌症通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、细胞凋亡和 PI3K/Akt 信号通路等通路。为今后研究白藜芦醇治疗类风湿性关节炎提供了研究基础,为类风湿性关节炎的治疗提供新的分子机制,促进其治疗药物的进展,并为以后的使用提供新的思路和方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张宗星, 江露, 刘道忠, 等. 中医治疗风寒湿痹型类风湿关节炎的研究进展 [J]. 中医临床研究, 2023, 15(27): 96-100.
- [2] 彭冰梅, 张艺, 沙永红. 湘西地区类风湿关节炎患者的诊疗现状及残疾情况分析 [J]. 中国社区医师, 2023, 39(1): 139-141.
- [3] 邓颖, 金璨, 段志豪, 等. 类风湿关节炎骨破坏的细胞网络调控及治疗研究进展 [J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(15): 62-68.
- [4] 温斌, 何春辉, 照日格图, 等. 中西医治疗类风湿性关节炎的临床进展 [J]. 新疆中医药, 2023, 41(2): 105-107.
- [5] 陈宏道, 丁一帆, 谢师旅, 等. 中医药治疗类风湿关节炎临床研究进展 [J]. 江西中医药, 2023, 54(4): 73-76.
- [6] 张懿. 两种联合药物方案治疗老年类风湿关节炎临床研究 [J]. 中国现代药物应用, 2018, 12(19): 124-125.
- [7] Liu X L, Wang Z G, Qian H, *et al.* Natural medicines of targeted rheumatoid arthritis and its action mechanism [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 945129.
- [8] Gaggini M, Fenizia S, Vassalle C. Sphingolipid levels and signaling via resveratrol and antioxidant actions in cardiometabolic risk and disease [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(5): 1102.
- [9] 陈倩雯, 何奕坤, 沈佳莹, 等. 白藜芦醇治疗类风湿关节炎研究进展 [J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42(10): 1266-1272.
- [10] 王玉娇, 李思玉, 李俊雄, 等. 白藜芦醇通过 PI3K/AKT 信号通路抑制脂多糖诱导的人牙齦成纤维细胞炎症 [J]. 川北医学院学报, 2022, 37(5): 561-566.
- [11] Nandave M, Acharjee R, Bhaduri K, *et al.* A pharmacological review on SIRT 1 and SIRT 2 proteins, activators, and inhibitors: Call for further research [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 242(Pt 1): 124581.
- [12] Fernández-Rodríguez J A, Almonte-Becerril M, Ramil-Gómez O, *et al.* Autophagy activation by resveratrol reduces severity of experimental rheumatoid arthritis [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2021, 65(2): e2000377.
- [13] 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.
- [14] Mahmud S M H, Al-Mustanjid M, Akter F, *et al.* Bioinformatics and system biology approach to identify the influences of SARS-CoV-2 infections to idiopathic pulmonary fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease patients [J]. *Brief Bioinform*, 2021, 22(5): bbab115.
- [15] Trott O, Olson A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *J Comput Chem*, 2010, 31(2): 455-461.
- [16] Wang J M, Wang W, Kollman P A, *et al.* Antechamber: An accessory software package for molecular mechanical calculations [J]. *J Am Chem Soc*, 2001, 222: U403.
- [17] Mark P, Nilsson L. Structure and dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E water models at 298 K [J]. *J Phys Chem A*, 2001, 105(43): 9954-9960.
- [18] Sagui C, Darden T A. Molecular dynamics simulations of biomolecules: long-range electrostatic effects [J]. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1999, 28: 155-179.
- [19] Krätzer V, van Gunsteren W F, Hünenberger P H. A fast SHAKE algorithm to solve distance constraint equations for small molecules in molecular dynamics simulations [J]. *J Comput Chem*, 2001, 22(5): 501-508.
- [20] Larini L, Mannella R, Leporini D. Langevin stabilization of molecular-dynamics simulations of polymers by means of quasisymplectic algorithms [J]. *J Chem Phys*, 2007, 126(10): 104101.
- [21] Hou T J, Wang J M, Li Y Y, *et al.* Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 1. The accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics simulations [J]. *J Chem Inf Model*, 2011, 51(1): 69-82.
- [22] Genheden S, Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2015, 10(5): 449-461.
- [23] Nguyen H, Roe D R, Simmerling C. Improved generalized born solvent model parameters for protein simulations [J]. *J Chem Theory Comput*, 2013, 9(4): 2020-2034.
- [24] Weiser J, Shenkin P S, W. Still C. Approximate atomic surfaces from linear combinations of pairwise overlaps (LCPO) [J]. *J Comput Chem*, 1999, 20(2): 217-230.
- [25] Li Bo W, Ding M F, Chen C, *et al.* *Bifidobacterium longum subsp. infantis* B6MNI alleviates collagen-induced arthritis in rats via regulating 5-HIAA and pim-1/JAK/STAT3 inflammation pathways [J]. *J Agric Food Chem*,

- 2023, 71(46): 17819-17832.
- [26] 马天越, 方宜梅, 郭甘霖, 等. 二四汤对牛 II 型胶原诱导大鼠类风湿关节炎的干预机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(5): 38-45.
- [27] 赵青青, 安阳, 张军, 等. 松萝提取物对胶原诱导性关节炎大鼠 HMGB1-RAGE 通路及自噬相关基因的影响 [J]. 重庆医学, 2023, 52(21): 3220-3226.
- [28] Xu Y Y, Zhao M, Cao J X, *et al.* Applications and recent advances in transdermal drug delivery systems for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13(11): 4417-4441.
- [29] 罗丰, 袁雪梅, 杨孝余, 等. 侗族医学治疗类风湿关节炎的研究进展 [J]. 中医药导报, 2023, 29(2): 79-82.
- [30] Behl T, Mehta K, Sehgal A, *et al.* Exploring the role of polyphenols in rheumatoid arthritis [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022, 62(19): 5372-5393.
- [31] 任伟亮, 焦永伟, 张健, 等. 白藜芦醇对膝骨关节炎模型大鼠关节液中氧化应激和炎症因子的调控作用 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(32): 5154-5158.
- [32] 陈琳珊, 冯甜, 陆震丰, 等. 白藜芦醇调节 PI3K/Akt/mTOR 信号通路对急性牙髓炎大鼠炎症反应的影响 [J]. 中国中医急症, 2023, 32(7): 1150-1153.
- [33] 杨萍. 白藜芦醇通过调控信号通路治疗膝骨关节炎的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(4): 1311-1320.
- [34] Sun K, Luo J, Guo J, *et al.* The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in osteoarthritis: A narrative review [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2020, 28(4): 400-409.
- [35] Hayer S, Pundt N, Peters M A, *et al.* PI3Kgamma regulates cartilage damage in chronic inflammatory arthritis [J]. *FASEB J*, 2009, 23(12): 4288-4298.
- [36] Liu F F, Yang X T, Geng M Y, *et al.* Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8(4): 552-562.
- [37] Sujitha S, Rasool M. MicroRNAs and bioactive compounds on TLR/MAPK signaling in rheumatoid arthritis [J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 473: 106-115.
- [38] Lu N, Malemud C J. Extracellular signal-regulated kinase: A regulator of cell growth, inflammation, chondrocyte and bone cell receptor-mediated gene expression [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(15): 3792.
- [39] Rosillo M A, Sánchez-Hidalgo M, Sánchez-Fidalgo S, *et al.* Dietary extra-virgin olive oil prevents inflammatory response and cartilage matrix degradation in murine collagen-induced arthritis [J]. *Eur J Nutr*, 2016, 55(1): 315-325.
- [40] Lou L X, Zhou J W, Liu Y J, *et al.* Chlorogenic acid induces apoptosis to inhibit inflammatory proliferation of IL-6-induced fibroblast-like synoviocytes through modulating the activation of JAK/STAT and NF- κ B signaling pathways [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(5): 2054-2060.

[责任编辑 高源]