

基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS/MS 结合网络药理学和分子对接探讨矮陀陀治疗类风湿性关节炎的作用机制

章玲¹, 张宏燕¹, 隋静怡¹, 王思蕊¹, 苏万佰¹, 郁阳^{1,2}, 刘劲松^{1,2}, 孙云鹏^{1,2*}, 王国凯^{1,2*}

1. 安徽中医药大学 药学院 中药功效物质组分重点实验室, 安徽 合肥 230012

2. 安徽省活性天然产物重点实验室, 安徽 合肥 230012

摘要: 目的 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS/MS 技术鉴定矮陀陀 *Munronia henryi* 中的化学成分, 并运用网络药理学分析, 结合分子对接技术, 深入研究民族药矮陀陀改善类风湿性关节炎的潜在靶点与作用机制。方法 采用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS/MS 技术分析鉴定矮陀陀化学成分。将化合物结构输入 Swiss 数据库进行类药性筛选和靶点预测; 使用 OMIM、TTD、Gene Cards 数据库检索类风湿性关节炎相关靶点, 并对化合物靶点和疾病靶点进行交集处理; 应用 Cytoscape 技术来建立靶点相互作用网络; 运用微信生信平台对关键靶点进行基因本体 (GO) 和京都基因和基因百科全书 (KEGG) 信号通路分析; 采用 AutoDockTools 1.5.7 软件对化合物和核心靶点进行分子对接模拟。结果 质谱分析从矮陀陀二氯甲烷部位鉴定出 63 个化合物。其中 42 个化合物通过类药性筛选, 有 37 个化合物可预测到靶点。共筛选出 338 个药物靶点、1 889 个疾病靶点和 154 个交集靶点。通过 GO 分析和 KEGG 分析可知矮陀陀中的柠檬苦素可能通过多条信号通路与生物途径发挥治疗类风湿性关节炎的作用。分子对接结果显示, 矮陀陀中的柠檬苦素可以能够与类风湿性关节炎的关键治疗靶点稳定结合。结论 矮陀陀中富含的柠檬苦素成分可能通过多靶点、多通路的方式发挥抗类风湿性关节炎作用, 为后续疾病的研究和药物研发提供了参考依据。

关键词: 矮陀陀; 类风湿性关节炎; 网络药理学; 分子对接; 质谱; 柠檬苦素

中图分类号: 285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)12-3049-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.12.007

Mechanism of action of *Munronia henryi* Harms in treatment of rheumatoid arthritis based on UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS/MS combined with network pharmacology and molecular docking

ZHANG Ling¹, ZHANG Hongyan¹, SUI Jingyi¹, WANG Sirui¹, SU Wanbai¹, YU Yang^{1,2}, LIU Jinsong^{1,2}, SUN Yunpeng^{1,2}, WANG Guokai^{1,2}

1. Key Laboratory for Functional Substances in Chinese Medicine, School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China

2. Anhui Province Key Laboratory of Bioactive Natural Products, Hefei 230012, China

Abstract: **Objective** Based on UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS/MS technology to identify the chemical components of *Munronia henryi* Harms, combining network pharmacology and molecular docking technology to study the mechanism of *Munronia henryi* Harms in treating rheumatoid arthritis. **Methods** UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS/MS technology was used to identify the chemical components of *Munronia henryi* Harms. Using the Swiss database to screen and predict targets, obtain disease targets through databases such as Gene Cards, OMIM, TTD. Take the intersection of the two targets, constructing a target interaction network using Cytoscape. Using the Online bioinformatics analysis and visualization cloud platform for GO and KEGG analysis. AutoDockTools 1.5.7 software was used to simulate the molecular docking between the compound and the core target. **Results** 63 Compounds were derived, 42

收稿日期: 2024-09-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32400324); 安徽省高等学校科学研究重点项目 (2022AH050489); 安徽省高校学科 (专业) 带头人培育项目 (DTR2023026); 中药研究与开发安徽省重点实验室开放课题 (AKLPDCM202305)

作者简介: 章玲, 女, 硕士, 主要从事天然药物活性成分研究。E-mail: 19965140649@163.com

*通信作者: 孙云鹏, 男, 讲师, 研究方向为天然药物活性成分的研究。E-mail: sunyp@ahtcm.edu.cn

王国凯, 男, 教授, 研究方向为天然药物活性成分的研究。E-mail: wanggk@ahtcm.edu.cn

compounds were screened, and 37 compounds were predicted to target. 338 drug targets, 1 889 disease targets, and 154 intersection targets were screened out. GO analysis and KEGG analysis indicate that *Munronia henryi* Harms can exert therapeutic effects on rheumatoid arthritis through multiple biological pathways and pathways. Molecular docking shows that *Munronia henryi* Harms can stably bind to targets targeting rheumatoid arthritis. **Conclusion** *Munronia henryi* Harms can treat rheumatoid arthritis through multiple targets and pathways, providing a reference basis for subsequent disease research and drug development.

Key words: *Munronia henryi* Harms; rheumatoid arthritis; network pharmacology; molecular docking; mass spectrum; limonoids

类风湿性关节炎是一种全身性自身免疫性疾病, 临床表现为滑膜炎症和不可逆性骨关节破坏, 可导致进行性残疾、全身并发症和早期死亡, 是最常见的自身免疫性疾病之一, 影响全球约 1% 的人口^[1-2]。类风湿性关节炎的早期症状以滑膜炎症为主, 正常的滑膜组织主要由成纤维样滑膜细胞和巨噬细胞样滑膜细胞组成, 类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞则表现为一种侵袭性表型, 能够导致滑膜增生、关节软骨及骨的破坏。作为我国最常见的慢性疾病之一, 类风湿性关节炎不仅给患者带来痛苦, 也给社会的发展造成了负担。目前类风湿性关节炎的病理机制尚不明确, 但多数学者认为其主要与炎症细胞、巨噬细胞、淋巴细胞以及成纤维样滑膜细胞有关^[3-4]。

矮陀陀 *Munronia henryi* Harms 又名滇黔地黄连, 为楝科地黄连属植物, 在我国西南地区常用以治疗风湿痹痛、跌打损伤, 疗效显著^[5]。现代研究表明, 矮陀陀提取物具有显著的镇痛抗炎和抗肿瘤活性^[6]。目前矮陀陀化学成分研究较少, 仅从中分离鉴定了 62 个化合物, 其中大部分为柠檬苦素类成分, 以及少量神经酰胺、甾体等类型化合物^[7-11]。柠檬苦素类化合物作为矮陀陀的主要化学成分, 具有显著的抗炎活性, 对多种因素引起的关节炎有治疗作用^[12-14]。因此矮陀陀可能对类风湿性关节炎有效, 并且其中的柠檬苦素类成分可能是关键活性物质。前期课题组对矮陀陀提取物水部位、二氯甲烷部位、石油醚部位的一氧化氮 (NO) 生成抑制活性进行评价, 发现二氯甲烷部位在 50 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下抑制率为 $(58.43 \pm 0.79)\%$, 阳性药 *N*-甲基-*L*-精氨酸的抑制率为 $(53.75 \pm 1.28)\%$, 因此矮陀陀的二氯甲烷部位具有较好的体外抗炎活性。本课题通过 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS/MS 技术深入解析矮陀陀抗炎活性部位的化学组成, 并通过网络药理学和分子对接技术探讨矮陀陀治疗类风湿性关节炎潜在的有效成分和作用机制, 为后续研究及临床应用提供参考。

1 药材与试剂

矮陀陀于 2022 年 11 月采自云南省文山州, 由安徽中医药大学杨青山副教授鉴定为楝科地黄连属植物矮陀陀 *Munronia henryi* 全草, 凭证标本 (20221101) 存放于安徽中医药大学中药与天然药物化学系; LC-MS 级色谱纯甲醇 (天津市永大化学试剂有限公司)、乙腈 (TEDIA 公司)、娃哈哈纯净水、二氯甲烷、石油醚 (天津市永大化学试剂有限公司); Orbitrap Exploris 120 四级杆-静电场轨道阱质谱仪 (美国 Thermo Fisher 公司)。

2 方法与结果

2.1 矮陀陀样品的制备

矮陀陀干燥全草 200 g, 粉碎后加入 500 mL 甲醇超声提取 3 次, 每次 30 min。滤过, 减压浓缩得总提浸膏。将浸膏和水混合, 等体积二氯甲烷萃取后经石油醚反萃, 得到反萃后的二氯甲烷和石油醚萃取部位。取二氯甲烷部位适量, 干燥后加入 0.5 mL 甲醇溶解, 取上清液过滤, 备用。

2.2 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS/MS 分析及质谱图采集

2.2.1 色谱条件与质谱条件 色谱条件: 色谱柱 Waters ACQUITY UPLC (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm), 以乙腈 (A) - 甲酸水 (B) 系统梯度洗脱 (0~15 min, 10%~100% A), 体积流量 0.2 mL/min, 进样量 1 μL 。质谱条件: 加热电喷雾离子源 (H-ESI); 正、负离子模式喷雾电压分别为 3.5、2.5 kV; 离子源温度和毛细管温度各为 350、325 $^{\circ}\text{C}$; 鞘气流速为 50 arb; 辅助气流为 10 arb; 反吹气流为 1 arb。一级全扫方式是正负离子交替扫描; 自动增益控制进入轨道阱区的离子数目 (AGC 目标) 是标准的; 扫描范围为 m/z 50~1 500、母离子扫描分辨率达 60 000。数据相关二级扫描 (ddMS2) 参数: 扫描分辨率为 15 000; 碰撞能量标准化为 20%、40%、60%; 隔离窗口为 m/z 2.0。

2.2.2 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS/MS 质谱图采集 运用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS/MS 技术

采集数据后,得到矮陀陀提取物二氯甲烷部位正离子模式下的总离子流图 (TIC),见图 1。

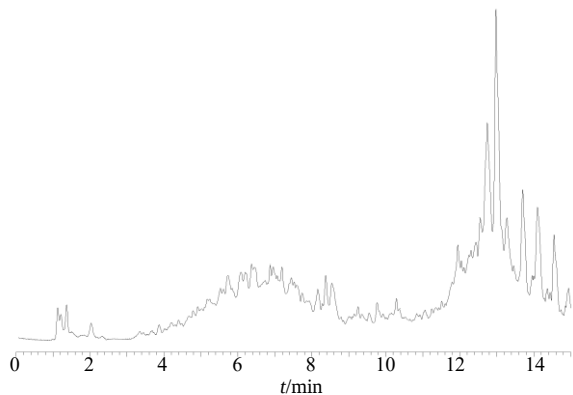


图 1 正离子模式下矮陀陀样品的 TIC 图

Fig. 1 TIC plots of *Munronia henryi* samples in positive ion mode

2.3 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS/MS 数据处理

经 Xcalibur 平台来处理和分析 MS 数据,获取化学成分的保留时间、质谱准分子离子峰和碎片离子峰等信息,自动匹配片段信息,再结合矮陀陀文献报道,分析质谱裂解规律,推导出 63 个化合物,见表 1。

2.4 网络药理学分析

2.4.1 靶点获取 将上述化学成分分析部分得到的化合物以及文献报道的化合物进行 Swiss ADME,以同时满足高胃肠吸收 (GI) 和类药性 (DL) 5 个条件中 2 个 “yes” 为标准进行筛选,其中 42 个化合物通过了 Swiss ADME 的筛选,能预测到靶点的化合物有 37 个,文献补充 2b,3b,4b-trihydroxypregnan-16-one、scopoletin、4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde、4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid^[11, 24], 见表 2。

表 1 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS/MS 对比结果

Table 1 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS/MS comparison results

鉴定成分	分子式	模式	理论值 m/z	实测值 m/z	误差值 m/z	t_R/min	二级碎片
munronin A ^[10]	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₀	[M+H] ⁺	529.206 8	529.208 3	2.8	6.51	511.197 8, 493.280 6
munronin G ^[7]	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₁	[M+Na] ⁺	571.215 0	571.214 2	-1.4	6.47	511.195 3, 407.182 3
munronin C ^[7]	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₂	[M+H] ⁺	603.243 6	603.246 4	4.6	6.38	543.224 6, 483.203 3
munronin B ^[7]	C ₃₃ H ₄₂ O ₁₁	[M+Na] ⁺	637.261 9	637.264 8	4.6	5.39	619.340 5, 601.268 0
munronin E ^[7]	C ₃₂ H ₄₂ O ₁₁	[M+Na] ⁺	625.261 9	625.264 1	3.5	7.16	607.290 4, 589.266 9
munronin D ^[7]	C ₃₂ H ₄₀ O ₁₂	[M+H] ⁺	617.259 3	617.262 3	4.9	7.20	557.239 7, 497.217 8
munronin H ^[8]	C ₃₀ H ₃₆ O ₉	[M+H] ⁺	549.233 0	549.235 9	5.3	5.53	481.187 0, 421.221 6
munronin Q ^[8]	C ₃₁ H ₃₈ O ₉	[M+H] ⁺	555.258 9	555.258 1	-1.4	8.99	494.326 7, 476.330 8
munronin P ^[8]	C ₃₄ H ₄₂ O ₁₀	[M+H] ⁺	611.285 1	611.287 8	4.4	9.48	551.227 8, 491.301 0
munronin I ^[7]	C ₃₂ H ₄₀ O ₁₁	[M+Na] ⁺	623.246 3	623.248 5	3.5	7.67	605.274 8, 589.266 4
munronin J ^[7]	C ₃₀ H ₄₀ O ₇	[M+H] ⁺	513.284 7	513.284 8	0.2	11.32	453.339 8, 393.211 2
munronin S ^[8]	C ₂₆ H ₄₂ O ₅	[M+Na] ⁺	457.292 5	457.294 7	4.8	11.58	439.359 1, 421.294 2
munronin O ^[8]	C ₂₉ H ₃₆ O ₆	[M+H] ⁺	481.258 5	481.258 7	0.4	8.70	463.268 3, 403.247 5
munronin F ^[7]	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₂	[M+H] ⁺	603.243 6	603.246 3	4.5	6.41	585.270 3, 567.222 3
munronin M ^[7]	C ₃₃ H ₄₂ O ₈	[M+H] ⁺	567.295 2	567.294 9	-0.5	10.19	549.343 0, 489.320 2
munronin N ^[7]	C ₃₂ H ₄₄ O ₈	[M+H] ⁺	557.310 9	557.310 9	0.0	7.84	539.229 5, 521.216 7
nymania-3 ^[9]	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₀	[M+H] ⁺	571.253 8	571.253 7	-0.2	6.22	553.243 7, 535.218 3
nymania-4 ^[8]	C ₃₃ H ₄₂ O ₁₂	[M+Na] ⁺	653.256 8	653.257 8	1.5	6.19	635.270 6, 575.250 6
amotsangin A ^[8]	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₀	[M+H] ⁺	613.300 7	613.301 2	0.8	7.20	553.300 8, 535.212 2
munronoid O ^[15]	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₁	[M+Na] ⁺	609.230 6	609.232 7	3.4	6.98	591.245 7, 531.296 3
mulavanin A ^[16]	C ₃₄ H ₄₂ O ₁₂	[M+Na] ⁺	665.256 9	665.259 6	4.1	8.29	647.336 7, 629.294 4
mulavanin B ^[16]	C ₃₄ H ₄₂ O ₁₂	[M+H] ⁺	643.274 9	643.277 5	4.0	7.03	625.227 8, 607.241 8
mulavanin C ^[16]	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₁	[M+K] ⁺	627.220 2	627.218 5	-2.7	7.10	609.233 0, 591.273 4
munropin C ^[17]	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₁	[M+K] ⁺	625.204 6	625.202 9	-2.7	6.93	607.332 1, 589.300 9
munropin D ^[17]	C ₂₉ H ₃₈ O ₁₀	[M+H] ⁺	547.253 8	547.255 8	3.7	5.08	529.208 4, 511.197 6
munropin E ^[17]	C ₂₉ H ₃₈ O ₁₁	[M+Na] ⁺	585.230 6	585.233 3	4.6	7.57	567.263 2, 549.209 8
mulavanin E ^[16]	C ₃₅ H ₄₄ O ₁₁	[M+H] ⁺	641.295 6	641.297 7	3.3	8.28	623.248 7, 605.127 6
munropin F ^[17]	C ₃₃ H ₄₄ O ₁₁	[M+Na] ⁺	639.277 6	639.279 2	2.5	8.52	621.267 2, 561.378 4
mufolinoid C ^[18]	C ₃₁ H ₄₀ O ₉	[M+H] ⁺	557.274 5	557.276 5	3.6	8.51	539.129 8, 479.245 3
1,3-diacetyl vilasinin ^[15]	C ₃₀ H ₄₀ O ₇	[M+H] ⁺	513.284 7	513.284 3	-0.8	11.31	495.274 1, 477.284 6
mufolinoid H ^[18]	C ₂₈ H ₃₆ O ₆	[M+H] ⁺	469.258 5	469.259 8	2.8	8.37	409.163 4, 391.247 0
munrolin K ^[19]	C ₃₃ H ₄₄ O ₈	[M+H] ⁺	569.310 9	569.311 1	0.4	10.68	509.289 7, 491.243 3

表 1 (续)

鉴定成分	分子式	模式	理论值 m/z	实测值 m/z	误差值 m/z	t_R/min	二级碎片
1-O-tigloyl-1-O-debenzoyl ohchinal ^[19]	C ₃₃ H ₄₂ O ₈	[M+H] ⁺	567.295 2	567.295 4	0.4	9.94	507.200 1, 489.359 4
munrolin C ^[19]	C ₃₂ H ₄₂ O ₉	[M+H] ⁺	571.290 2	571.290 5	0.5	6.80	511.290 6, 493.282 1
munrolin M ^[19]	C ₃₃ H ₄₄ O ₈	[M+H] ⁺	569.310 9	569.311 1	0.4	10.62	551.358 8, 533.347 2
munronoid J ^[20]	C ₃₂ H ₄₂ O ₉	[M+H] ⁺	571.290 2	571.290 2	0.0	6.99	553.245 3, 535.305 4
mufolinoid F ^[18]	C ₃₆ H ₅₀ O ₁₃	[M+Na] ⁺	713.314 4	713.317 0	3.6	8.81	695.306 7, 677.261 3
mufolinoid O ^[18]	C ₃₁ H ₄₄ O ₉	[M+H] ⁺	561.308 1	561.306 1	-3.6	6.15	501.213 4, 483.202 9
munronin A ^[7]	C ₃₇ H ₅₀ O ₁₄	[M+Na] ⁺	741.309 3	741.308 2	-1.5	7.10	723.323 3, 705.313 8
mufolinoid N ^[18]	C ₃₂ H ₄₂ O ₁₁	[M+Na] ⁺	625.261 9	625.264 2	3.7	8.10	565.245 5, 505.281 1
munronoid C ^[20]	C ₃₀ H ₄₀ O ₉	[M+H] ⁺	545.274 5	545.276 6	3.9	7.27	485.328 4, 425.253 1
munronoid I ^[20]	C ₃₀ H ₄₀ O ₇	[M+H] ⁺	535.266 6	535.268 1	2.8	8.81	475.317 0, 415.241 9
munronoid I ^[20]	C ₃₀ H ₄₀ O ₇	[M+H] ⁺	513.284 7	513.286 2	2.9	8.46	453.169 4, 393.265 5
mufolinoid S ^[18]	C ₃₀ H ₄₂ O ₇	[M+H] ⁺	515.300 3	515.300 0	-0.6	10.83	455.355 1, 305.332 4
mufolinoid G ^[18]	C ₃₀ H ₃₈ O ₇	[M+H] ⁺	511.269 0	511.269 5	1.0	8.73	451.268 4, 391.362 6
chisocheton F ^[7]	C ₂₈ H ₃₈ O ₅	[M+H] ⁺	455.279 2	455.279 0	-0.4	9.34	395.279 0, 377.231 8
mufolinin B ^[21]	C ₃₀ H ₃₈ O ₇	[M+H] ⁺	511.269 0	511.270 0	2.0	8.87	451.268 3, 391.248 6
munronoid D ^[20]	C ₃₀ H ₄₀ O ₈	[M+Na] ⁺	529.279 6	529.280 2	1.1	6.86	469.241 7, 409.257 7
mufolinin C ^[18]	C ₂₈ H ₃₆ O ₆	[M+Na] ⁺	491.240 4	491.241 8	2.8	9.17	473.365 4, 413.269 3
mufolinoid I ^[18]	C ₂₈ H ₃₄ O ₆	[M+K] ⁺	505.198 7	505.200 5	3.6	3.88	445.112 2, 427.177 3
munronoid G ^[20]	C ₃₀ H ₃₈ O ₈	[M+H] ⁺	527.263 9	527.264 4	0.9	8.36	467.208 9, 407.242 3
mufolinoid U ^[18]	C ₂₈ H ₃₈ O ₆	[M+Na] ⁺	493.256 1	493.257 7	3.2	10.67	475.326 1, 457.234 2
mufolinoid T ^[18]	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	[M+H] ⁺	517.316 0	517.317 5	2.9	10.57	457.369 8, 397.214 7
mufolinin D ^[21]	C ₃₀ H ₄₀ O ₈	[M+H] ⁺	529.279 6	529.279 9	0.6	6.85	469.334 5, 409.257 8
munronoid H ^[20]	C ₃₀ H ₄₀ O ₈	[M+Na] ⁺	551.261 5	551.259 1	-4.4	12.02	491.300 9, 431.278 7
mufolinin A ^[21]	C ₃₀ H ₃₈ O ₈	[M+Na] ⁺	549.245 9	549.247 8	3.5	9.56	531.333 2, 471.348 9
munrolin A ^[19]	C ₃₀ H ₄₀ O ₈	[M+H] ⁺	529.279 6	529.280 2	1.1	6.75	469.187 7, 409.221 5
mufolinoid V ^[18]	C ₃₀ H ₃₈ O ₈	[M+H] ⁺	527.263 9	527.266 2	4.4	8.03	467.208 4, 449.253 1
trichilinin ^[18]	C ₃₀ H ₄₀ O ₈	[M+H] ⁺	529.279 6	529.281 1	2.8	6.89	511.234 3, 493.281 4
munrolin L ^[18]	C ₃₀ H ₄₀ O ₈	[M+H] ⁺	529.279 6	529.279 3	-0.2	6.87	511.234 6, 451.176 5
munrolin G ^[19]	C ₃₀ H ₄₀ O ₉	[M+H] ⁺	545.274 5	545.274 8	0.6	7.79	485.291 1, 425.252 4
zapharinin P ^[22]	C ₃₂ H ₄₂ O ₁₂	[M+Na] ⁺	641.256 9	641.258 9	3.1	6.46	623.270 9, 605.253 4
protoxylocarpin H ^[23]	C ₃₂ H ₄₆ O ₆	[M+H] ⁺	517.258 4	517.256 6	-3.5	11.24	499.321 5, 439.047 2

使用 Swiss Target Prediction 共预测 338 个药物潜在靶点; Gene Cards、TTD、OMIM 等数据库对类风湿性关节炎相关靶点进行了预测, 排除重复出现的靶点, 经过数据分析与研究之后构建疾病靶点的数据库。将以上的疾病靶点和药物靶点相匹配, 获得矮陀陀 154 个抗类风湿性关节炎相关的共有靶点, 见图 2。

2.4.2 蛋白相互作用 (PPI) 网络构建 为了观察矮陀陀化合物靶点和类风湿性关节炎疾病靶点之间的联系, 利用 Cytoscape 3.10.1 软件构建“成分-靶点”相互作用网络, 用不同颜色和形状分别标记化合物与疾病靶点以及它们之间的相互关系, 见图 3。如图 4 所示, 矮陀陀治疗类风湿性关节炎的 PPI 网络图中包含 154 个节点和 2 092 条边, 平均节点 degree 值为 27。其中肿瘤坏死因子 (TNF)、胱天蛋白酶 3 (CASP3)、非受体酪氨酸激酶 (SRC)、基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、表皮生长因子受体 (EGFR)

等靶点的 degree 值较大, 可能重点参与了矮陀陀治疗类风湿性关节炎的过程, 见表 3。

2.4.3 基因本体 (GO) 和京都基因和基因百科全书 (KEGG) 富集分析 将交集靶点导入至 David 数据库中, 在微生信在线作图数据平台中对交集靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, 并进行可视化处理, 见图 5、6。

GO 功能富集分析得到生物过程 (BP)、细胞组分 (CC)、分子功能 (MF) 条目数分别为 119、34、40 个。BP 主要通过对异源性的刺激反应、MAP 激酶活性的正调控、血管新生等发挥对类风湿性关节炎的治疗作用; CC 主要通过调控质膜、质膜组成部分、受体复合体等来发挥治疗类风湿性关节炎的作用; MF 主要通过调节蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性、ATP 结合等发挥治疗类风湿性关节炎的作用。

KEGG 通路富集分析共富集到 165 条信号通路

表 2 37 个化合物基本信息	
Table 2 Basic information on the 37 compounds	
编号	化合物
Z1	munronin A
Z2	munronin C
Z3	munronin D
Z4	munronin F
Z5	munronin J
Z6	munronin O
Z7	2b,3b,4b-trihydroxypregnan-16-one
Z8	scopoletin
Z9	4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde
Z10	4-hydroxy-3,5-dimethoxy benzoic acid
Z11	munronoid D
Z12	munronoid I
Z13	mufolinoid S
Z14	mufolinoid G
Z15	mufolinin B
Z16	chisocheton F
Z17	mufolinin C
Z18	mufolinoid I
Z19	1,3-diacetyl vilasinin
Z20	mufolinoid H
Z21	munronoid G
Z22	mufolinoid U
Z23	mufolinoid T
Z24	mufolinin D
Z25	munrolin K
Z26	1-O-tigloyl-1-O-debenzoylohchinal
Z27	munronoid H
Z28	munrolin C
Z29	munrolin M
Z30	mufolinin A
Z31	munronoid J
Z32	munrolin A
Z33	mufolinoid V
Z34	trichilinin
Z35	protoxylocarpin H
Z36	munrolin L
Z37	munrolin G

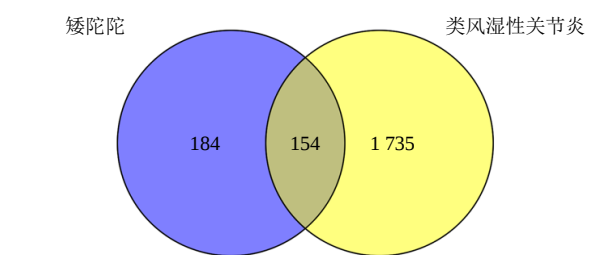


图 2 药物与疾病交集靶点

Fig. 2 Intersection of drug and disease targets

($P<0.05$)。在微生信平台中将其中最显著的 10 条通路绘制成柱状图进行可视化处理。其中包括癌症

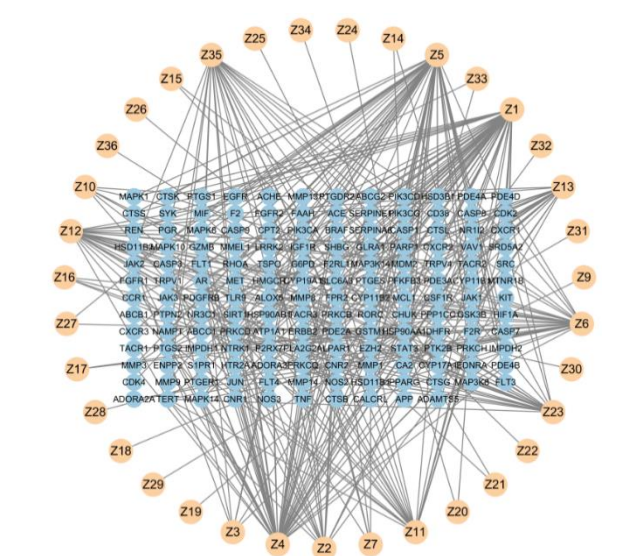


图 3 “成分 - 靶点” 相互作用网络图

Fig. 3 “Compound-target” interaction network diagram

通路、前列腺癌、脂质和动脉粥样硬化、磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3K) /蛋白激酶 B1 (Akt) 信号通路、细胞凋亡等通路。

为深入分析药物与疾病靶点以及相关通路之间的作用关系，取 KEGG 富集分析中最显著的 10 条信号通路做“药物 - 靶点 - 通路”相互作用网络，见图 7。

2.4.4 分子对接 选择 degree 值较大的 5 个关键靶点与对应化合物进行分子对接。首先对化合物进行能量优化处理。在 PDB 数据库中获取关键靶点蛋白数据 (pdb 格式)，利用 Pymol 软件将靶点蛋白进行去水、去配体处理，处理后的靶点蛋白导入 AutoDock Tools 1.5.7 软件中进行加氢、计算电荷并保存成 pdbqt 格式。设置小分子配体结合的活性口袋位点为受体蛋白对接位点。利用 PyMOL 软件对结果进行可视化处理。如表 4 所示，化合物与靶点蛋白的结合能越小，说明结合能力越强，结合越稳定。对接结果说明矮陀陀中的柠檬苦素成分与类风湿性关节炎受体蛋白的结合能均小于-5 kcal/mol (1 cal=4.2 J)，可以稳定结合，见图 8。

由对接 3D 图的结果看出：munronoid I 和 1A8M 结合，2,3 位的酯羰基与 TYR-115 氨基酸形成氢键、6 位和 7 位的乙酰基分别与 ASN-137 以及 THR-77 氨基酸形成氢键、3 位酮羰基与 LYS-90、SER-81 两个氨基酸形成氢键；munronin F 和 1GFW 结合，23 位的内酯与 HIS-121 氨基酸形成氢键、11 位和 12

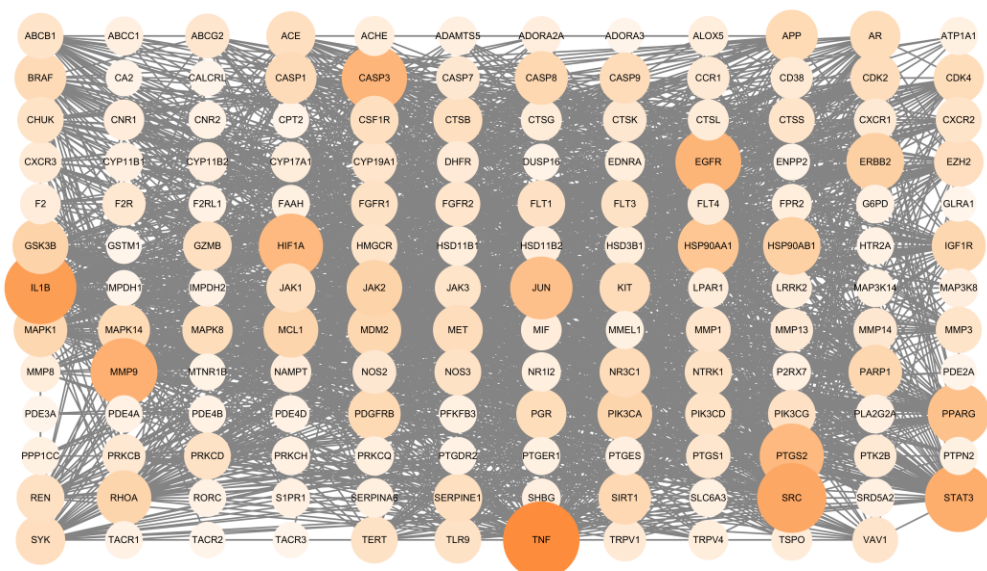


图 4 矮陀陀治疗类风湿性关节炎的 PPI 网络图

Fig. 4 PPI network diagram of *Munronia henryi* in treatment of rheumatoid arthritis

表 3 矮陀陀治疗类风湿性关节炎的关键靶点信息
Table 3 Information on key targets of *Munronia henryi* in the treatment of rheumatoid arthritis

靶点	Uniprot ID	degree 值
TNF	P01375	109
CASP3	P42574	80
SRC	P12931	90
MMP9	P50282	84
EGFR	P00533	81

位的乙酰基与 THR-62、ARG-207 氨基酸形成氢键；munronin F 和 1A07 结合，23 位酯羰基与 GLN-147 氨基酸形成氢键、13 位乙酰基与 SER-145 氨基酸形成氢键、7 位甲氧基与 LYS-209 氨基酸形成氢键；munronin J 和 1ITV 结合，3 位酯羰基与 ASP-434、GLY-438 两个氨基酸形成氢键；munronin J 和 1MI4 结合，13 位乙酰基与 ASP-831 氨基酸形成氢键。从

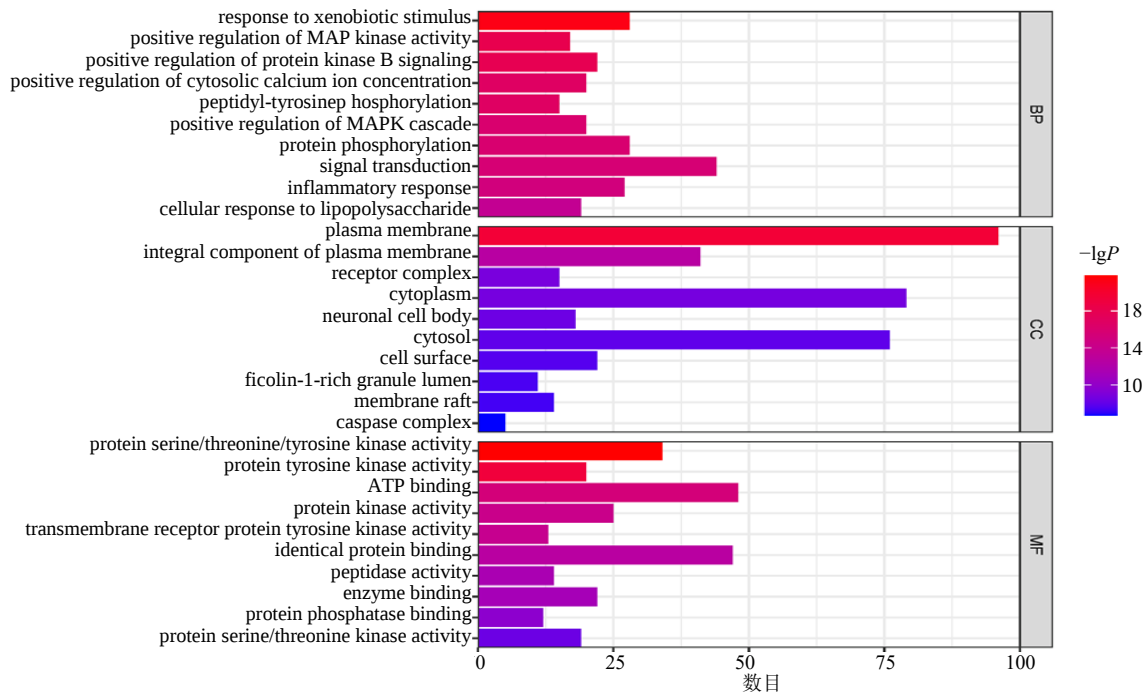


图 5 GO 富集分析

Fig. 5 GO enrichment analysis

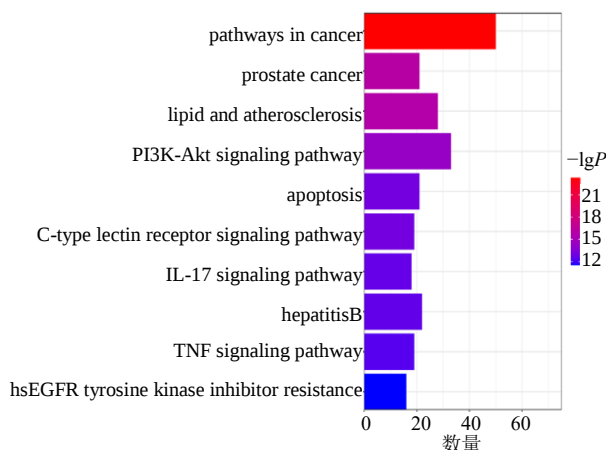


图 6 KEGG 通路富集分析

Fig. 6 KEGG pathway enrichment analysis

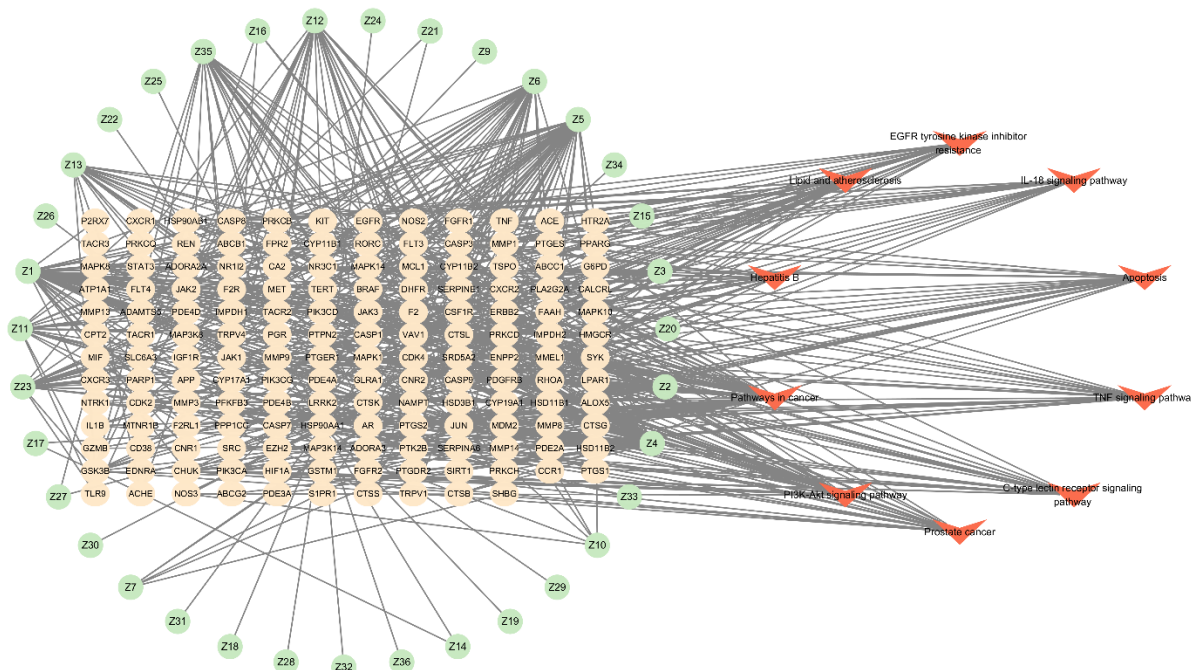


图 7 “药物 - 靶点 - 通路” 相互作用网络

Fig. 7 “Drug-target-pathway” interaction network diagram

表 4 分子对接结果

Table 4 Molecular docking results

靶点	PDB-ID	成分	结合能/(kcal·mol ⁻¹)
TNF	1A8M	munronoid I	-6.7
SRC	1A07	munronin F	-5.6
MMP9	1ITV	munronin J	-6.7
EGFR	1M14	munronin J	-8.5
CASP3	1GFW	munronin F	-7.6

的四环骨架有较完整的保留。环完整型和 A 环裂环型柠檬苦素具有显著的抗炎活性，如红椿中的 toonaolide K 和 toonaolide L 是 NLRP3 炎症小体的

对接结果来看，柠檬苦素与这些靶点的结合主要是靠乙酰基或羰基的氢键作用，因此 A 环内酯环的存在以及乙酰基的取代可能是柠檬苦素发挥抗类风湿性关节炎作用的关键基团。

3 讨论

通过 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS/MS 分析及查阅相关文献，从矮陀陀中鉴定得到 63 个化合物，其中有 42 个化合物是首次从矮陀陀中鉴定得到，共有 37 个化合物通过筛选，鉴定得到了 338 个药物作用靶点，1889 个疾病靶点，154 个疾病共有靶点被预测出来，构建了“成分 - 靶点”网络作用图。通过筛选的化合物主要为柠檬苦素类化合物，且这些柠檬苦素主要为环完整型和 A 环裂环型，降三萜

选择性抑制剂，可通过阻断 NLRP3 炎症小体活化来改善细胞焦亡^[25]。Munronoid I 通过抑制 NLRP3 炎症小体的激活，可有效抑制 IL-1 β 的产生和释放，减轻炎症反应^[18]。经网络药理学分析，矮陀陀治疗类风湿性关节炎的关键靶点可能是 TNF、SRC、MMP9、EGFR、CASP3 等。TNF 是一种参与机体的免疫调节和炎症反应的细胞因子^[26-27]，TNF- α 能够维持骨和软骨结构完整性，并能加速组织损伤的修复^[28]。相关研究表明，EGFR 在类风湿性关节炎发病过程中发挥重要作用，其机制可能与其促血管内皮细胞增生、分泌炎症因子、抑制破骨细胞生成

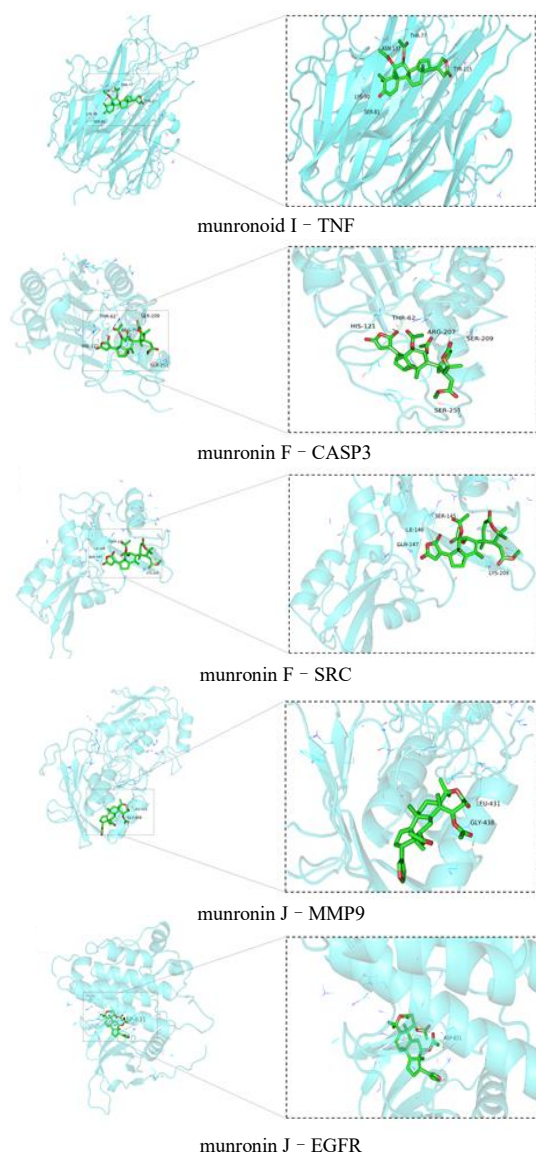


图 8 分子对接结果可视化图

Fig. 8 Visualization of molecular docking results

有关^[29]。已有研究证实, SRC 激酶有潜在的体内外抗关节炎作用^[30], SRC 激酶敲除的小鼠对炎症细胞的分泌及趋化的能力有一定的抑制作用。SRC 激酶抑制剂在软骨细胞中促进软骨基因的表达, 缓解膝关节软骨变性, 其在癌症通路、抗氧化应激、抗炎症以及在抑制潜在的致敏作用都有积极效果^[31]。MMP-9 是锌依赖性内肽酶家族的基质金属蛋白酶的一种, 可以通过降解胶原蛋白和蛋白多糖方式降解软骨基质, 导致软骨细胞凋亡, 与类风湿性关节炎的发病机制密切相关^[32-33]。CASP3 是 DNA 断裂和细胞凋亡所必需的, 可以调控 CASP3 量来调控细胞凋亡^[34]。

KEGG 富集分析通路发现, 矮陀陀治疗类风湿

性关节炎的主要途径包括前列腺癌、细胞凋亡、癌症通路、脂质及动脉粥样硬化、PI3K/Akt 信号通路。癌症通路包括 p53 信号通路、NF- κ B 信号通路、Wnt 信号通路等。其中 Wnt 信号通路为常见的癌症通路, 研究最多的 Wnt 通路是经典的 Wnt/ β -catenin 通路, 它通过调节转录共激活因子 β -catenin 蛋白的数量, 调控关键的发育基因表达, 是骨质破坏的关键途径^[35]。PI3K/Akt 通路涉及细胞代谢调控、生长因子和各种细胞因子的信号转导^[36], 这一信号通路受到 TRAI、SHIP、TNF- α 、TGF- β 、PTEN 等信号通路的调节。破骨细胞经 PI3K/Akt 信号通路向骨及软骨内迁移破坏, 引起关节发育异常, 加剧类风湿性关节炎发病^[37]。分子对接结果显示, 关键靶点与其相对应的化合物的结合能都低于 -5 kcal/mol。匹配的能量较低, 研究结果说明小分子与大分子结合的构象稳定, 具有很好的结合能力, 显示出较好的亲和力。

综上所述, 矮陀陀中富含的柠檬苦素成分可能通过多靶点、多通路的方式发挥抗类风湿性关节炎作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 蒋勇, 钟淑欣, 何升华, 等. 基于网络药理学探究防风中生物活性成分及对类风湿关节炎的作用机制 [J]. 中草药, 2023, 54(17): 5601-5618.
- [2] 杨艳妮, 袁培培, 冯敖梓, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨巴戟天治疗类风湿性关节炎的作用机制 [J]. 中草药, 2022, 53(5): 1463-1470.
- [3] Jang S, Kwon E J, Lee J J. Rheumatoid arthritis: Pathogenic roles of diverse immune cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(2): 905.
- [4] Tenshin H, Teramachi J, Ashtar M, *et al*. TGF- β -activated kinase-1 inhibitor LL-Z1640-2 reduces joint inflammation and bone destruction in mouse models of rheumatoid arthritis by inhibiting NLRP3 inflammasome, TACE, TNF- α and RANKL expression [J]. *Clin Transl Immunology*, 2022, 11(1): e1371.
- [5] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 (第 13 卷) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 42
- [6] 韦健全, 罗莹, 黄健, 等. 地黄连提取物镇痛抗炎作用及急性毒性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 160-163.
- [7] Yan Y, Zhang J X, Huang T, *et al*. Bioactive limonoid constituents of *Munronia henryi* [J]. *J Nat Prod*, 2015, 78(4): 811-821.
- [8] Yan Y, Yuan C M, Di Y T, *et al*. Limonoids from *Munronia henryi* and their anti-tobacco mosaic virus activity [J].

- Fitoterapia*, 2015, 107: 29-35.
- [9] Yan Y, Tang L, Hu J Q, *et al.* Munronin O, a potential activator for plant resistance [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2018, 146: 13-18.
- [10] Qi S H, Chen L, Wu D G, *et al.* Novel tetranortriterpenoid derivatives from *Munronia henryi* [J]. *Tetrahedron*, 2003, 59(23): 4193-4199.
- [11] Qi S H, Wu D G, Ma Y B, *et al.* The chemical constituents of *Munronia henryi* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2003, 5(3): 215-221.
- [12] Cui X, Wang R J, Bian P M, *et al.* Evaluation of antiarthritic activity of nimbolide against Freund's adjuvant induced arthritis in rats [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 3391-3398.
- [13] Conte F P, Ferraris F K, Costa T E, *et al.* Effect of gedunin on acute articular inflammation and hypernociception in mice [J]. *Molecules*, 2015, 20(2): 2636-2657.
- [14] Gou H X, Ye J, Wang Y R, *et al.* The anti-inflammatory activity of toonaciliatin K against adjuvant arthritis [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 9436280.
- [15] Ge Y H, Liu K X, Zhang J X, *et al.* The limonoids and their antitobacco mosaic virus (TMV) activities from *Munronia unifoliolata* Oliv [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(17): 4289-4295.
- [16] Lin B D, Chen H D, Liu J, *et al.* Mulavanins A-E: limonoids from *Munronia delavayi* [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(13): 1596-1601.
- [17] Yang X R, Tanaka N, Tsuji D, *et al.* Limonoids from the aerial parts of *Munronia pinnata* [J]. *Tetrahedron*, 2019, 75(52): 130779.
- [18] Sun Y P, Li Q R, Cui L T, *et al.* Diverse ring-*seco* limonoids from *Munronia unifoliolata* and their biological activities [J]. *Chin J Chem*, 2021, 40 (1): 123-136.
- [19] Sun Y P, Li Q R, Sun Y J, *et al.* Limonoids with diverse oxidation patterns of C-12 indicating a complete ring C-*seco* biogenetic pathway from *Munronia unifoliolata* [J]. *J Nat Prod*, 2021, 84(8): 2352-2365.
- [20] Ge Y H, Zhang J X, Mu S Z, *et al.* Munronoids A-J, ten new limonoids from *Munronia unifoliolata* Oliv [J]. *Tetrahedron*, 2012, 68(2), 566-572.
- [21] Sun Y P, Cui L T, Li Q R, *et al.* Mufolinin A, an unprecedented ring A-*seco* 10-ethylimonoid from *Munronia unifoliolata* [J]. *Chin Chem Lett*, 2022, 33: 516-518.
- [22] Zhang Y, Wang J S, Gu Y C, *et al.* Diverse prieurianin-type limonoid derivatives from the fruits of *Aphanamixis grandifolia* and their absolute configuration determination [J]. *Tetrahedron*, 2014, 70: 6594-6606.
- [23] Pudhom K, Sommit D, Nuclear P, *et al.* Protoxylocarpins F-H, protolimonoids from seed kernels of *xylocarpus granatum* [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72(12): 2188-2191.
- [24] Guo Z Y, Li P, Chen P. Chemical constituents of *Munronia henryi* [J]. *J Minzu Univ Chin*, 2014, 23(4), 57-59.
- [25] Shi Q Q, Zhang X J, Zhang Y, *et al.* Toonaolides A-X, limonoids from *Toona ciliata*: Isolation, structural elucidation, and bioactivity against NLRP3 inflammasome [J]. *Bioorg Chem*, 2020, 105: 104363.
- [26] 关春辉, 周占锋, 李沛. 益肾荣筋汤辅助胫骨高位截骨治疗膝关节炎疗效及对患者关节液内细胞因子表达水平的影响 [J]. 陕西中医, 2019, 40(5): 616-619.
- [27] 骆晓飞, 王金良, 魏瑄, 等. 血清及关节液 TNF- α 和 MMP-13 水平变化与膝骨性关节炎患者 K-L 分级的相关性 [J]. 中国卫生工程学, 2020, 19(1): 100-102.
- [28] 柯志鹏, 张新庄, 耿婷, 等. 基于网络药理学的七味通痹口服液治疗类风湿性关节炎作用机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(17): 4489-4497.
- [29] 孙建国, 李慧娟, 宝文萍, 等. 网络药理学、分子动力学和实验验证探究秦艽环烯醚萜苷抗类风湿性关节炎关键成分和作用机制 [J]. 中草药, 2024, 55(17): 5853-5866.
- [30] Yalçın Kehribar D, Özgen M, Yolbaş S, *et al.* The inhibition of Src kinase suppresses the production of matrix metalloproteinases in from synovial fibroblasts and inhibits MAPK and STATs pathways [J]. *Turk J Med Sci*, 2021, 51(4): 2142-2149.
- [31] 张浩, 赵琦, 李晓强, 等. SRC 家族激酶抑制剂 PP2 对大鼠膝关节炎的治疗作用 [J]. 右江民族医学院学报, 2023, 45(3): 373-378.
- [32] 霍新慧, 王延蛟, 李盼, 等. 刺山柑果风湿止痛贴结合艾灸治疗对类风湿性关节炎大鼠 TNF- α 、IL-1 β 、VEGF 和滑膜组织 MMP-9 表达的影响 [J]. 湖北中医药大学学报, 2021, 23(6): 17-21.
- [33] Wang S T, Gao Y J, Duan C C, *et al.* Effects of PTHrP on expression of MMP9 and MMP13 in sika deer antler chondrocytes [J]. *Cell Biol Int*, 2013, 37(12): 1300-1307.
- [34] Dadihanc T, Zhang Y, Li, G Q, *et al.* CircRNA SEC24A promotes osteoarthritis through miR-107-5p/CASP3 axis [J]. *Regen Ther*, 2024, 26: 60-70.
- [35] Ge Y L, Ding S C, Feng J B, *et al.* Diosgenin inhibits Wnt/ β -catenin pathway to regulate the proliferation and differentiation of MG-63 cells [J]. *Cytotechnology*, 2021, 73(2): 169-178.
- [36] Jafari M, Ghadami E, Dadkhah T, *et al.* PI3k/AKT signaling pathway: Erythropoiesis and beyond [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(3): 2373-2385.
- [37] Liu S, Ma H X, Zhang H, *et al.* Recent advances on signaling pathways and their inhibitors in rheumatoid arthritis [J]. *Clin Immunol*, 2021, 230: 108793.