

# 基于网络药理、分子对接及实验验证探究补骨脂总黄酮治疗类风湿关节炎的机制研究

向雨虹<sup>1,2</sup>, 李亚萍<sup>1,2</sup>, 刘艳<sup>2</sup>, 郭丛<sup>2</sup>, 刘安<sup>2</sup>, 杨爱红<sup>1\*</sup>, 许青霞<sup>2\*</sup>

1. 天津中医药大学, 天津 301617

2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700

**摘要:** **目的** 探讨补骨脂总黄酮治疗类风湿关节炎的药效及作用机制。**方法** 采用极性分步提取制备补骨脂总黄酮, 并进行 HPLC 分析及含量测定; 通过网络药理学与分子对接筛选核心靶点与通路; 以胶原诱导型关节炎小鼠观察补骨脂总黄酮的体内抗炎及关节保护作用, 以细胞实验考察其对类风湿关节炎滑膜成纤维 (RA-FLS) 细胞增殖、迁移、侵袭的影响; 采用 Western blotting 检测磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt)、Akt、磷酸化糖原合成酶激酶-3 $\beta$  (p-GSK-3 $\beta$ )、GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 的表达水平。**结果** 补骨脂总黄酮主要含有新补骨脂异黄酮、补骨脂二氢黄酮甲醚和异补骨脂查尔酮等 8 种成分; 网络药理学预测得到补骨脂总黄酮和类风湿关节炎的 48 个共同靶点, 筛选得到肿瘤坏死因子 (TNF)、白细胞介素 (IL)-6、Akt1 等关键靶点, 基因本体论 (GO) 分析和京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析结果显示, 补骨脂总黄酮可能作用于 PI3K/Akt、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、低氧诱导因子-1 (HIF-1) 和 TNF 等通路; 分子对接显示主要成分与 Akt1 对接亲和力良好。体内实验表明补骨脂总黄酮可显著降低模型小鼠关节炎评分、足肿胀度及关节病理损伤 ( $P < 0.05, 0.01$ ); 体外实验显示, 补骨脂总黄酮显著抑制 RA-FLS 增殖、迁移及侵袭 ( $P < 0.05, 0.001$ ), 补骨脂总黄酮 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组 p-Akt/Akt、p-GSK-3 $\beta$ /GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -catenin 的蛋白表达水平明显下调 ( $P < 0.05, 0.01$ )。**结论** 补骨脂总黄酮可通过抑制 Akt/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin 通路, 减轻滑膜炎与异常增殖, 缓解关节损伤, 发挥抗类风湿关节炎作用。

**关键词:** 补骨脂总黄酮; 类风湿关节炎; 新补骨脂异黄酮; 补骨脂二氢黄酮甲醚; 异补骨脂查尔酮; 蛋白激酶 B1; 糖原合成酶激酶-3 $\beta$ ;  $\beta$ -连环蛋白

中图分类号: R285; R287.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2026)06-1570-13

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.06.006

## Mechanism of total flavonoids from *Psoralea corylifolia* in treatment of rheumatoid arthritis based on network pharmacology, molecular docking and experimental verification

XIANG Yuhong<sup>1,2</sup>, LI Yaping<sup>1,2</sup>, LIU Yan<sup>2</sup>, GUO Cong<sup>2</sup>, LIU An<sup>2</sup>, YANG Aihong<sup>1</sup>, XU Qingxia<sup>2</sup>

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

**Abstract: Objective** To explore the efficacy and action mechanism of total flavonoids from *Psoralea corylifolia* in treatment of rheumatoid arthritis. **Methods** Total flavonoids from *Psoralea corylifolia* was prepared by stepwise extraction with polar solvents and analyzed by HPLC for content determination. Network pharmacology and molecular docking were used to screen core targets and pathways. The anti-inflammatory and joint-protective effects of total flavonoids from *Psoralea corylifolia* *in vivo* were observed in collagen-induced arthritis mice, and its effects on the proliferation, migration and invasion of RA-FLS cells were investigated *in vitro*. The expression levels of p-Akt, Akt, p-GSK-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ , and  $\beta$ -catenin were detected by Western blotting. **Results** Total flavonoids from *Psoralea corylifolia* mainly contains 8 major constituents such as neobavaisoflavone, bavachin, and isobavachalcone. Network

收稿日期: 2026-04-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82374179); 中国中医科学院中药研究所人才引进项目 (ZXKT22057); 中国中医科学院优秀青年科技人才培养专项 (ZZ17-YQ-024); 中国中医科学院基本科研业务费新入职科研人员启动资金专项 (ZZ16-XRZ-070)

作者简介: 向雨虹, 女, 硕士, 从事中药药理活性与机制研究。E-mail: 1324592645@qq.com

\*通信作者: 许青霞, 博士, 助理研究员, 从事中药药效物质与机制研究。E-mail: qxXu@icmm.ac.cn

杨爱红, 博士, 教授, 从事中药化学方面研究。E-mail: yah408@163.com

pharmacology predicted 48 common targets of total flavonoids from *Psoralea corylifolia* and rheumatoid arthritis, and key targets such as TNF, IL-6, and Akt1 were screened. GO analysis and KEGG pathway enrichment analysis showed that total flavonoids from *Psoralea corylifolia* may act on pathways such as PI3K/Akt, MAPK, HIF-1, and TNF. Molecular docking showed that the main constituents had good binding affinity with Akt1. *In vivo* experiments showed that total flavonoids from *Psoralea corylifolia* could significantly reduce the arthritis score, paw swelling degree and joint pathological damage in model mice ( $P < 0.05, 0.01$ ). *In vitro* experiments showed that total flavonoids from *Psoralea corylifolia* significantly inhibited the proliferation, migration and invasion of RA-FLS ( $P < 0.05, 0.001$ ), and significantly down-regulated the protein expression levels of p-Akt/Akt, p-GSK-3 $\beta$ /GSK-3 $\beta$ , and  $\beta$ -catenin ( $P < 0.05, 0.01$ ). **Conclusion** Total flavonoids from *Psoralea corylifolia* can exert anti-rheumatoid arthritis effects by inhibiting the Akt/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin pathway, reducing synovial inflammation and abnormal proliferation, and alleviating joint damage.

**Key words:** total flavonoids of *Psoralea corylifolia*; rheumatoid arthritis; neobavaisoflavone; bavachin; isobavachalcone; Akt; GSK-3 $\beta$ ;  $\beta$ -catenin

类风湿关节炎是以慢性滑膜炎症、滑膜细胞异常增殖、血管翳生成及关节软骨与骨进行性破坏为核心的自身免疫性疾病，致残率高，严重影响患者生活质量<sup>[1]</sup>。全球患病率为 0.5%~1.0%，女性高发，已成为重要公共卫生问题<sup>[2]</sup>。目前临床以非甾体抗炎药、糖皮质激素、传统合成改善病情抗风湿药及生物制剂为主，但长期用药易引发胃肠道损伤、肝肾功能异常、感染风险升高等不良反应<sup>[3]</sup>。

中医药治疗“骨痹”“骨痿”历史悠久，凭借多成分、多靶点、整体调节的核心特点，在类风湿关节炎治疗中优势显著，可通过抗炎、调节免疫、保护关节软骨与骨组织等多条途径干预病程进展<sup>[4-7]</sup>，已成为新型抗类风湿关节炎药物研发的重要方向。补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 是一种中国传统的中草药，在《开宝本草》等古典医籍中有记载，具有温肾助阳、纳气平喘之功效<sup>[8]</sup>。补骨脂在民间验方及历代经典中医方剂中被应用于风湿痹证所致的腰膝冷痛等症<sup>[9]</sup>。现代药理证实，补骨脂成分具有抗炎、免疫调节及骨保护作用<sup>[10-11]</sup>，这些药效特征与类风湿关节炎的关键病理环节高度吻合，表明补骨脂治疗类风湿关节炎具有较好的开发价值。

补骨脂所含补骨脂酚、补骨脂素和异补骨脂素等成分具有潜在肝肾毒性<sup>[12]</sup>，补骨脂黄酮类成分药理作用广泛且安全性较好，具有抗炎、抗氧化、调节免疫、抑制异常增殖及调控代谢等活性<sup>[13-14]</sup>。补骨脂二氢黄酮可通过调控维生素 D 受体通路及减少相关钙沉积缓解类风湿关节炎<sup>[15]</sup>；异补骨脂查耳酮通过磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) /蛋白激酶 B1 (Akt) 和 Janus 激酶 (JAK) /信号转导和转录激活蛋白 (STAT) 信号通路调节细胞增殖和存活，发挥抗类风湿关节炎作用<sup>[16]</sup>。本研究采用极性分步提取

制备补骨脂总黄酮并测定含量，经网络药理学与分子对接预测核心靶点及通路，构建胶原诱导型关节炎小鼠模型，观察补骨脂总黄酮对关节肿胀、炎症评分及病理损伤的影响，通过细胞实验考察补骨脂总黄酮对类风湿关节炎滑膜成纤维 RA-FLS 细胞增殖、迁移、侵袭及炎性因子分泌的影响，最后通过 Western blotting 验证对 Akt/糖原合成酶激酶-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) / $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 通路的影响，明确抗类风湿关节炎机制，为开发安全高效的补骨脂抗类风湿关节炎候选药物提供实验依据。

## 1 网络药理学分析<sup>[17]</sup>

**1.1 补骨脂总黄酮部位成分和类风湿关节炎靶点的筛选** 首先筛选补骨脂总黄酮候选活性成分，通过 TCMSP、TCMID 数据库检索补骨脂黄酮类成分，结合 HPLC 分析和补骨脂吸收入血成分结果<sup>[18]</sup>，确定候选成分集。随后从 PubChem 获取成分结构文件，提交至 SwissTargetPrediction (概率  $\geq 0.5$ )、TCMSP、BATMAN 数据库进行靶点搜索与预测，经 UniProt 校准基因名称、限定人源后，剔除重复无效靶点，获得补骨脂成分相关靶标。同时，以“rheumatoid arthritis”为关键词，检索 GeneCards、DisGeNET 数据库，收集类风湿关节炎相关靶标。将两类靶点导入 Venny 2.1 进行交集分析，获得核心交集靶标，导出后用于后续蛋白相互作用 (PPI) 及富集分析。

**1.2 “补骨脂总黄酮 - 类风湿关节炎 - 靶点”网络构建与核心靶点筛选** 将交集靶点导入 STRING 数据库构建 PPI 网络，导入 Cytoscape 后用 MCODE 模块进行聚类分析。采用 Cytohubba 插件的 MCC 算法筛选核心靶点，同时构建“补骨脂总黄酮 - 类风湿关节炎 - 靶点”可视化网络，结合拓扑参数完

成核心靶点筛选。

**1.3 基因本体(GO)与京都基因和基因组百科全书(KEGG)富集分析** 将筛选得到的核心潜在靶点导入 Metascape, 进行 GO 功能富集与 KEGG 通路富集分析。设置相应筛选阈值, 对生物学过程、细胞组分、分子功能及相关信号通路进行富集统计, 完成生物功能与作用通路的注释与分析。

**1.4 分子对接** 使用 Chembiodraw 3D 获取 PTF 的 8 个主要成分补骨脂定、补骨脂宁、新补骨脂异黄酮、补骨脂黎酚 A、补骨脂二氢黄酮、补骨脂二氢黄酮甲醚、异补骨脂查尔酮、4'-甲氧基补骨脂查尔酮化合物结构 mol2 格式, 下载 Akt1 (3MVH) 的 PDB 文件。使用 Autodock Vina 进行分子对接, 使用 Discovey Studio 绘图。

## 2 实验验证

### 2.1 材料

**2.1.1 仪器** ME204T/02 型万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); Agilent1260 高效液相色谱仪; TG16-WS 型台式高速离心机(长沙湘仪仪器有限公司); Rebel 创新型正倒置电子一体显微镜; OLYMPUS CKX53 显微镜。

**2.1.2 药物与试剂** 本次实验所用的补骨脂药材收集于云南省临沧市耿马县, 经北京大学杨秀伟教授鉴定为豆科补骨脂属植物补骨脂的干燥成熟果实; 甲氨蝶呤(规格: 50 mg, 批号 A26GB158913, 上海源叶生物科技有限公司, 货号 B25455); 牛 II 型胶原溶液(美国 Chondrex 公司, 货号 20022); 完全弗氏佐剂(CFA)、弗氏不完全佐剂(IFA)(美国 Chondrex 公司, 货号 7027、7002); DMEM-F12(美国 Gibco 公司, 货号 11330032); 胎牛血清(美国 Gibco 公司, 货号 A2849314CP); 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ , Proteintech 公司, 货号 031825); 细胞增殖活性检测-8(CCK-8)试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司, 货号 C0043); Akt、p-Akt(美国 Cell Signaling 公司, 货号 4691s、4060s); p-GSK-3 $\beta$ 、GSK-3 $\beta$ (美国 Cell Signaling 公司, 货号 5558S、12456P);  $\beta$ -catenin(英国 Abcam 公司, 货号 ab32572); 辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司, 货号 ZB-2301)。

**2.1.3 细胞和动物** RA-FLS 细胞购于赛百慷(上海)生物技术股份有限公司, 取培养至 3~12 代的细胞进行实验研究。7~8 周龄 SPF 级 DBA/1 小鼠

20 只, 体质量(16 $\pm$ 2) g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号 SCXK(京)2022-0052, 饲养于中国中医科学院中药研究所动物实验中心。实验开始前适应性喂养 3 d, 自由进食饮水, 12 h 明暗交替, 湿度 55%, 室温 24  $^{\circ}$ C。所有实验操作均通过实验动物伦理委员会批准, 实验动物伦理编号为 2024B289, 并按相关要求严格执行。

### 2.1.4 补骨脂总黄酮的制备和含量测定

**(1) 补骨脂总黄酮的制备:** 补骨脂干燥果实, 粉碎, 第 1 次加入 10 倍量 70%乙醇水回流提取 2 h, 第 2、3 次加入 8 倍量 70%乙醇水回流提取 2 h, 合并滤液, 减压回收溶剂, 得 70%乙醇补骨脂总提取物。称取 70%乙醇补骨脂提取物, 加入质量体积比为 1 g:100 mL 的石油醚超声提取 0.5 h, 离心, 抽滤, 重复 2 次, 之后滤渣加入质量体积比为 1 g:100 mL 的醋酸乙酯超声提取 0.5 h, 离心, 抽滤, 重复 2 次, 合并 2 次醋酸乙酯滤液, 通过减压浓缩回收溶剂得干燥物, 即为补骨脂总黄酮。采用 70%乙醇加热回流提取补骨脂总提取物, 经石油醚脱脂去除补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚等毒性成分, 再以乙酸乙酯萃取得到补骨脂总黄酮, 实现了活性黄酮的富集与毒性成分的去。

**(2) 补骨脂总黄酮的含量测定:** 取适量补骨脂总黄酮干燥物, 加甲醇溶解配置成 1 mg/mL 的溶液; 称取适量新补骨脂异黄酮、补骨脂黎酚 A、补骨脂宁、补骨脂二氢黄酮、补骨脂二氢黄酮甲醚、异补骨脂查尔酮、4'-甲氧基补骨脂查尔酮和补骨脂定对照品, 配置成混合标准品溶液。样品和标准品溶液经 HPLC 分析, 色谱条件如下: 色谱柱 Agilent C18 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m), 流动相: 乙腈(A), 水-乙酸(B; 100:0.1); 流动相梯度: 0 min (40% A)  $\rightarrow$ 15 min (50% A)  $\rightarrow$ 35 min (60% A)  $\rightarrow$ 45 min (70% A)  $\rightarrow$ 55 min (80% A); 检测波长 245 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10  $\mu$ L。

HPLC 分析显示, 补骨脂总黄酮主要含新补骨脂异黄酮、补骨脂二氢黄酮、补骨脂宁、补骨脂定、异补骨脂查尔酮、补骨脂二氢黄酮甲醚、补骨脂黎酚 A、4'-甲氧基补骨脂查尔酮共 8 种黄酮类成分, 8 种成分总含量达 50%以上, 其中异补骨脂查尔酮(150.26 $\pm$ 1.38)  $\mu$ g/mg、补骨脂二氢黄酮甲醚(139.91 $\pm$ 1.10)  $\mu$ g/mg、新补骨脂异黄酮(108.40 $\pm$ 0.90)  $\mu$ g/mg、补骨脂二氢黄酮(104.64 $\pm$ 0.90)  $\mu$ g/mg、补骨脂定(89.97 $\pm$ 0.71)  $\mu$ g/mg 为含量较高的核心

成分, 其余 3 种成分含量相对较低。

## 2.2 动物实验

**2.2.1 小鼠模型建立与分组** 造模方式参照文献方法<sup>[19-20]</sup>, 从适应性饲养的 20 只小鼠中随机选取 15 只小鼠进行类风湿关节炎造模, 剩余 5 只小鼠作为对照组。初次免疫: 尾根部 sc 100  $\mu$ L 完全弗氏佐剂与牛 II 型胶原 1:1 混合乳剂免疫, 21 d 依照上述方法和剂量注射 100  $\mu$ L 不完全弗氏佐剂与牛 II 型胶原 1:1 混合乳剂加强免疫。加强免疫后将胶原免疫的 15 只小鼠随机分为模型组、甲氨蝶呤组、补骨脂总黄酮组, 每组 5 只。加强免疫后 7 d 开始连续 ig 24 d, 甲氨蝶呤组每 3 天 ig 2 mg/kg 甲氨蝶呤混悬液<sup>[21]</sup>, 补骨脂总黄酮组每天 ig 75 mg/kg<sup>[22]</sup>补骨脂总黄酮混悬液, 对照组和模型组每天给予等体积溶剂。在给药 24 d 后处理小鼠, 处死小鼠后自膝关节以下取小鼠足爪去除皮肤和肌肉组织, 放入 4%多聚甲醛溶液, 另取小鼠的脾脏, 胸腺放入液氮中保存。

**2.2.2 小鼠体质量、足爪厚度检测** 治疗期间, 每 3 天测量 1 次小鼠体质量。每 3 天观察小鼠后足关节形态与肿胀程度, 使用游标卡尺测量足爪厚度。为精简图表, 正文仅展示每 6 天代表性检测数据。

**2.2.3 关节炎指数(AI)评分** AI 评分标准<sup>[23]</sup>见表 1, 以两前爪和两后足评分累计为总分, 总分 16 分。

表 1 AI 评分标准

Table 1 AI scoring criteria

评分	标准
0	关节正常, 无肿胀
1	足趾关节或踝关节轻度肿胀
2	踝关节至跖关节或掌关节轻度肿胀
3	踝关节至跖关节或掌关节中度肿胀
4	踝关节至跖关节或掌关节重度肿胀

**2.2.4 染色观察踝关节组织病理学变化** 处死小鼠后取后足踝关节, 使用 4%多聚甲醛固定, 10% EDTA 脱钙, 采用梯度乙醇干燥, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 常规苏木素-伊红(HE)染色、封片、光镜下观察, 并拍照收集相关影像资料。

石蜡切片经脱蜡、水化后, 依次进行固绿染色、乙酸分化、番红-O 复染, 随后经乙醇梯度脱水、二甲苯透明及中性树脂胶封固。结果软骨呈红色, 骨骼等背景组织呈绿色, 光镜下观察, 并拍照收集相关影像资料。按照表 2 的关节炎动物模型病理 HE 评分标准<sup>[20]</sup>进行评分。

表 2 关节炎动物模型病理 HE 评分标准

Table 2 Pathological HE scoring criteria for arthritis animal models

观察指标	分级	评分
滑膜增生, 软骨处炎细胞浸润	轻度	1
	重度	2
血管翳	轻度	1
	重度	2
关节周围腔隙消失, 骨组织与周围结缔组织黏连, 部分骨组织结构破坏	轻度	1
	重度	2
关节腔部分消失, 部分骨组织破坏、融合	轻度	1
	重度	2
踝关节纤维化		1
炎症累及骨髓		2

## 2.3 细胞实验验证

**2.3.1 细胞培养** RA-FLS 细胞使用 10% DMEM-F12 培养基, 置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中培养, 待细胞融合度达到 80%后, 使用 0.25% 胰蛋白酶进行传代, 消化时间 1 min, 传代比例为 1:2。

**2.3.2 CCK-8 检测补骨脂总黄酮对 RA-FLS 细胞毒性检测** 将 RA-FLS 细胞按每孔约  $3 \times 10^4$  个/mL 接种于 96 孔板, 设置对照组、甲氨蝶呤 (5.0  $\mu$ mol/L) 组、补骨脂总黄酮 (0.5、1.0、2.0  $\mu$ g/mL) 组。每个组包含 3 个复孔。铺板 24 h 后每组加入相应药物孵育 24 h, 然后加 10  $\mu$ L 10% DMEM-F12 完全培养基。12 h 后, 每孔中加入 10  $\mu$ L CCK-8 试剂。孵育 2 h 后, 用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度 (A) 值。

$$\text{细胞活力} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

**2.3.3 CCK-8 检测补骨脂总黄酮对 TNF- $\alpha$  诱导的 RA-FLS 细胞增殖的影响** 将 RA-FLS 细胞按每孔约  $3 \times 10^4$  个/mL 接种于 96 孔板, 设置对照组、模型组、甲氨蝶呤 (5.0  $\mu$ mol/L) 组、补骨脂总黄酮 (0.5、1.0、2.0  $\mu$ g/mL) 组。每个组包含 3 个复孔。铺板 24 h 后每组加入相应药物预保护 24 h, 然后加入 TNF- $\alpha$  造模, 终浓度为 10 ng/mL。造模作用 12 h 后, 每孔中加入 CCK-8 试剂。孵育 2 h 后, 用酶标仪在 450 nm 处测定 A 值。

$$\text{细胞增殖率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{模型}} - A_{\text{对照}})$$

**2.3.4 划痕愈合实验检测补骨脂总黄酮对 TNF- $\alpha$  诱导的 RA-FLS 细胞迁移的影响** 将 RA-FLS 细胞以  $10 \times 10^4$  个/mL 的密度接种于 12 孔板中。相应给药组[甲氨蝶呤 (5.0  $\mu$ mol/L)、补骨脂总黄酮 (0.5、

1.0、2.0  $\mu\text{g/mL}$  ]预保护 24 h, 当细胞生长至 90% 以上时, 用 200  $\mu\text{L}$  枪头划伤每孔底部, 并保持每孔划伤位置一致。划痕后清洗漂浮细胞, 向每孔中加入基础培养基, TNF- $\alpha$  造模, 终浓度为 10  $\text{ng/mL}$ , 同时再加入相应药物浓度处理细胞 12 h, 每个组包含 3 个复孔。分别于划痕后 0、12 h 在显微镜下采集图像。采用 Image J 软件测量分析划痕区域面积变化。

**2.3.5 Transwell 实验检测补骨脂总黄酮对 TNF- $\alpha$  诱导的 RA-FLS 细胞侵袭的影响** 用 60  $\mu\text{L}$  200  $\mu\text{g/mL}$  鼠尾胶原包被 Transwell 小室底部膜的上室面 1 h。相应给药组细胞使用药物预保护 24 h。包被的 Transwell 小室加入使用 200  $\mu\text{L}$  无血清 DMEM-F12 培养基重悬的密度为  $25 \times 10^4$  个/mL 的细胞悬液、甲氨蝶呤 (5.0  $\mu\text{mol/L}$ )、补骨脂总黄酮 (0.5、1.0、2.0  $\mu\text{g/mL}$ )。下室加入 500  $\mu\text{L}$  含 10% FBS 的 DMEM-F12 培养基, TNF- $\alpha$  造模, 终浓度为 10  $\text{ng/mL}$ , 再加入相应药物浓度处理细胞。侵袭 12 h 后, 润湿棉签拭去小室内未迁移细胞, 4%多聚甲醛固定, 结晶紫试剂染色用电子一体式显微镜观察侵袭到膜下的细胞, 每个组包含 3 个复孔, 每孔随机选取 3 个视野拍照并计数。

**2.3.6 Western blotting 检测相关蛋白表达** 结合网络药理学富集的 PI3K/Akt 核心通路, 及分子对接显示主要成分与 Akt1 高亲和力结合, 进一步选取 Akt 下游关键分支 Akt/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin 进行 Western blotting 验证, 明确通路层级关系。细胞处理方法同 2.3.3 项下。采用强效 RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。加入 5 $\times$  上样缓冲液后煮沸变性, 通过 10% SDS-PAGE 进行电泳分离, 随后转膜至 PVDF。室温下以 5%脱脂牛奶封闭 1 h, 继而于 4  $^{\circ}\text{C}$  下与  $\beta$ -actin (1 : 5 000)、p-Akt (1 : 1 000)、Akt (1 : 1 000)、p-GSK-3 $\beta$  (1 : 1 000)、GSK-3 $\beta$  (1 : 1 000)、 $\beta$ -catenin (1 : 1 000) 一抗孵育过夜。TBST 洗膜 3 次后, 于室温下与相应二抗 (1 : 2 000) 孵育 1 h, 采用 ECL 化学发光试剂盒显影, 并用凝胶成像系统扫描和分析条带。采用 Image J 软件进行蛋白条带灰度值分析, 以  $\beta$ -actin 为内参校正上样误差, 分别计算 p-Akt/Akt、p-GSK-3 $\beta$ /GSK-3 $\beta$  比值及  $\beta$ -catenin 相对内参的表达量, 确定各蛋白相对表达水平。

## 2.4 统计学分析

采用 Graphpad Prism 9 统计软件对收集数据进行统计分析, 计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用  $t$  检验或单

因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行组间的差异比较。

## 3 结果

### 3.1 网络药理学分析

**3.1.1 网络药理学预测补骨脂总黄酮治疗类风湿关节炎的潜在靶标及机制** 通过 TCMSP、TCMID 数据库检索补骨脂黄酮类成分, 结合 HPLC 分析和补骨脂吸收入血成分结果确定候选成分集, 见表 3。将补骨脂黄酮类成分导入 TCMSP 和 BATMAN 数据库搜索靶标, 以及 SwissTargetPrediction 数据库预测潜在靶标, 获得 288 个补骨脂黄酮类成分相关靶标。在 GeneCards 和 DisGeNET 数据库收集到 813 个类风湿关节炎相关靶标。通过 Venny 获得 48 个类风湿关节炎和药物的交集靶标 (图 1A)。随后将交集靶标导入 STRING 数据库进行 PPI 分析 (图 1B)。PPI 分析结果导入 Cytoscape 软件, 使用 MCODE 模块获得 2 个 Cluster modules (图 1C、1D)。使用 Cytohubba 和 MCC 筛选出 2 个 Cluster 的靶标 (图 1E), degree 值排名前 18 位为的靶标分别为 TNF、白细胞介素 (IL) -6、Akt1、肿瘤蛋白 p53 (TP53) 等 (图 1F)。对以上 18 个补骨脂黄酮类成分治疗类风湿关节炎的潜在靶标进行 GO 富集和 KEGG 通路分析 (图 2)。KEGG 通路富集分析排在前 15 位的信号通路中, 与类风湿性关节炎相关的通路有 PI3K/Akt、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、低氧诱导因子-1 (HIF-1)、TNF, 涉及滑膜炎、增生、凋亡和破骨细胞分化等生物过程。因此, 推测补骨脂黄酮类成分通过以上通路, 缓解滑膜炎、增生和骨侵蚀来治疗类风湿性关节炎。

**3.1.2 分子对接分析主要活性成分与 Akt1 的结合作用** 以补骨脂总黄酮的 8 个主要成分为配体, Akt1 为靶点受体进行分子对接, 结合能均小于 -8  $\text{kJ/mol}$  (1  $\text{cal}=4.2 \text{ J}$ ), 表明这些成分与 Akt1 均有较好的亲和力, 其中补骨脂定的结合能最低, 主要与 ALA-A230、MET-A281、ALA-A177、VAL-A164、PHE-A438 和 PHE-A44 等氨基酸产生氢键、范德华、Pi-Alkyl 等相互作用。此外异黄酮成分的结合能均小于 -10  $\text{kJ/mol}$ , 均能较好的结合 Akt1, 其次是查尔酮成分和二氢黄酮类成分, 见图 3 和表 4。以上结果表明, 补骨脂总黄酮的主要成分与 Akt1 的结合作用均较强。

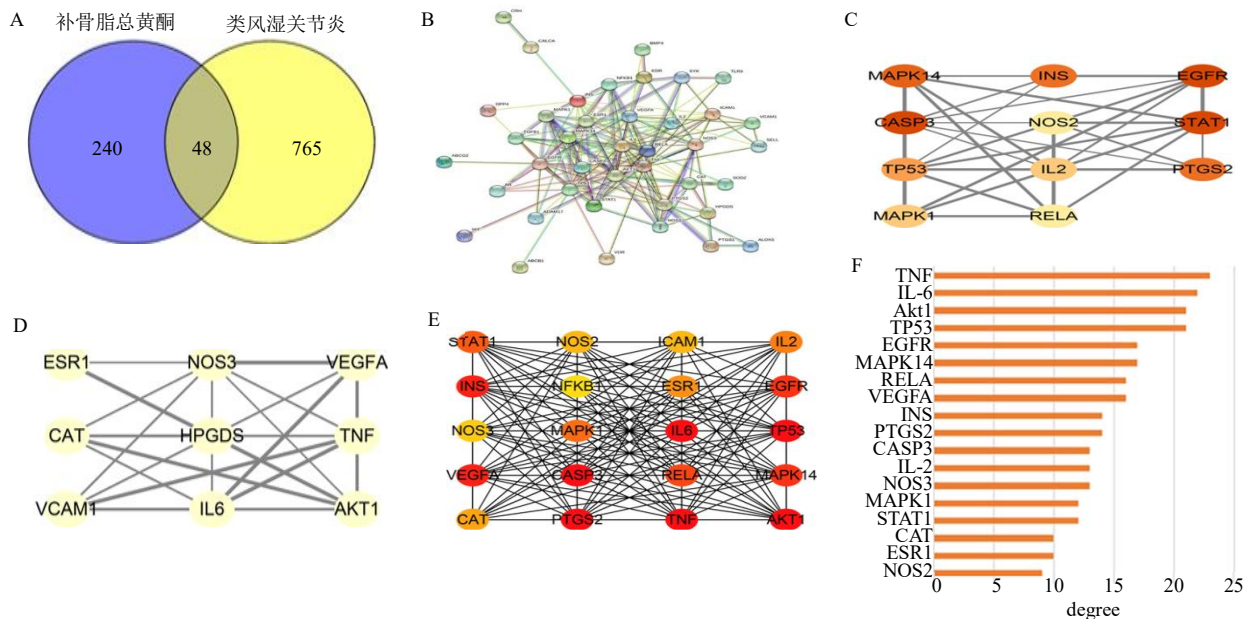
### 3.2 补骨脂总黄酮对模型小鼠的影响

#### 3.2.1 补骨脂总黄酮对类风湿关节炎模型小鼠的

表 3 候选成分

Table 3 Candidate component

序号	英文名	中文名	序号	英文名	中文名
1	psoralidin	补骨脂定	19	(S)-6-((R)-2,3-dihydroxy-3-methylbutyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-7-methoxychromen-4-one	(2S)-6-[(2'R)-2'',3''-二羟基-3''-甲基丁基]-7-甲氧基-二氢黄酮
2	bavaisoflavone G	补骨脂异黄酮 G	20	bavachinin	补骨脂二氢黄酮甲醚
3	bavaisoflavone K	补骨脂异黄酮 K	21	psorachalcone C	补骨脂查耳酮 C
4	bavaisoflavone M	补骨脂异黄酮 M	22	bakuchalcone	巴库查尔酮
5	corylifol E	补骨脂黎酚 E	23	brosimacutins G	补骨脂查耳酮 C
6	psoralenol	补骨脂酮醇	24	licoagrochalcone A	甘草发根菌查耳酮 A
7	hydroxypsoralenol A	羟基补骨脂酮醇 A	25	psorachromene	补骨脂色烯查耳酮
8	hydroxypsoralenol B	羟基补骨脂酮醇 B	26	4-hydroxylonchocarpin	4-羟基合生果素
9	corylin	补骨脂宁	27	xanthoangelol	黄当归醇
10	neobavaisoflavone	新补骨脂异黄酮	28	psorachalcone A	补骨脂查耳酮 A
11	daidzein	大豆苷元	29	3',4'-(3-hydroxy-2,2-dimethyl dihydropyrano)-4,2'-dihydroxychalcone	3',4'-(3-羟基-2,2-二甲基二氢吡喃)-4,2'-二羟基查耳酮
12	3'-methoxy daidzein	4'-甲氧基大豆苷元	30	artonin ZA	波罗蜜宁 ZA
13	bakuisoflavone	补骨脂异黄酮	31	isobavachalcone	异补骨脂查尔酮
14	corylifol A	补骨脂黎酚 A	32	4'-methoxy bavachalcone	4'-甲氧基补骨脂查耳酮
15	bavachinone E	补骨脂酮 E	33	bavachromone A	补骨脂色烯 A
16	7,8-dihydro-8-(4-hydroxyphenyl)-2,2-dimethyl-2H,6H-[1,2-b:5,4-b']dipyrano-6-one	7,8-二氢-8-(4-羟基苯基)-2,2-二甲基-2H,6H-[1,2-b:5,4-b']二吡喃-6-酮	34	bavachromone C	补骨脂色烯 C
17	isobavachin	异补骨脂二氢黄酮			
18	bavachin	补骨脂二氢黄酮			



A-补骨脂总黄酮和类风湿关节炎潜在靶点的 Venn 图; B-交集靶标的 PPI 网络; C-cluster 1; D- cluster 2; E-PPI 网络核心靶标; F-18 个核心靶标 degree 柱状图。

A-Venn plots of potential targets of *Psoralea corylifolia* L. total flavonoids and rheumatoid arthritis; B-PPI network of intersecting targets; C- cluster 1; D-cluster 2; E- hub targets; F-degree bar chart of hub targets.

图 1 补骨脂总黄酮治疗类风湿关节炎的网络药理分析

Fig. 1 Network pharmacological analysis of total flavonoids of *Psoralea corylifolia* in treatment of rheumatoid arthritis

体质量、关节炎评分和足肿胀度的影响 与模型组相比, 甲氨蝶呤组及补骨脂总黄酮组体质量不同程度上升, 其中补骨脂总黄酮组体质量回升更为平稳, 见表 5。表明补骨脂总黄酮可缓解模型小鼠的

炎症性体质量消耗。

与模型组相比, 补骨脂总黄酮组给药 12 d 后 AI 评分显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 见表 6。表明补骨脂总黄酮可有效控制模型小鼠关节炎进展。

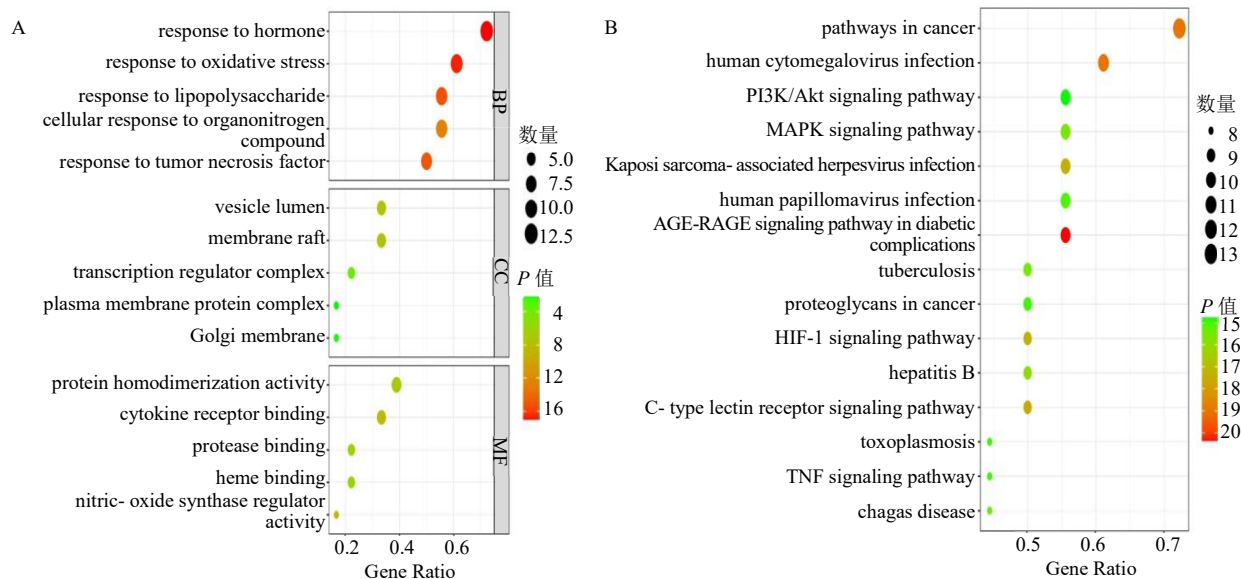


图 2 GO 富集分析 (A)、KEGG 通路分析 (B)  
Fig. 2 GO enrichment (A) and KEGG pathway analysis (B)

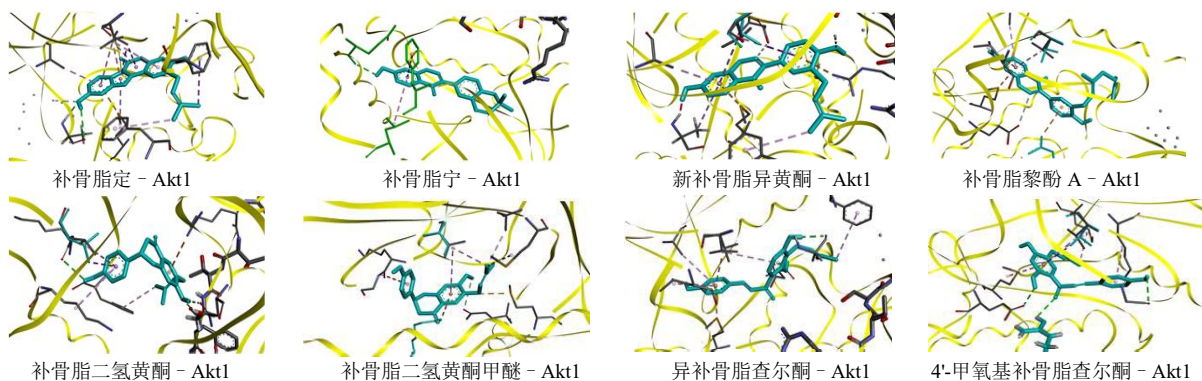


图 3 补骨脂总黄酮与 Akt1 分子对接示意图

Fig. 3 Schematic diagram of total flavonoids of *Psoralea corylifolia* docking with Akt1 molecule

表 4 补骨脂总黄酮成分与 Akt1 的结合能

Table 4 Binding energy of *Psoralea corylifolia* with Akt1

化合物	结合能/(kJ·mol <sup>-1</sup> )
补骨脂定	-11.1
补骨脂宁	-10.0
新补骨脂异黄酮	-10.7
补骨脂黎酚 A	-10.3
补骨脂二氢黄酮	-8.8
补骨脂二氢黄酮甲醚	-9.6
异补骨脂查尔酮	-9.6
4'-甲氧基补骨脂查尔酮	-9.9

与模型组相比,补骨脂总黄酮组给药 18d 时足爪厚度显著降低 ( $P < 0.05$ ),见表 7。表明补骨脂总黄酮可有效抑制模型小鼠关节肿胀。

大体形态照片直观显示,对照组小鼠足爪形态正常,无红肿变形;模型组小鼠足爪红肿、关节变形严重;甲氨蝶呤组及补骨脂总黄酮组小鼠关节肿胀、畸形程度均得到明显改善,见图 4。

**3.2.2 补骨脂总黄酮对类风湿关节炎小鼠踝关节组织病理形态的影响** HE 染色结果显示,与模型组相比,甲氨蝶呤组及补骨脂总黄酮组小鼠踝关节炎性浸润和滑膜增生得到抑制,关节腔内未出现滑膜侵袭现象。番红固绿染色结果显示,与模型组相比,甲氨蝶呤组及补骨脂总黄酮组软骨组织面积增加。病理评分结果表明,与模型组相比,补骨脂总黄酮组病理评分均显著降低 ( $P < 0.05$ ),见图 5、6。以上结果表明,补骨脂总黄酮能够显著改善模型小鼠的踝关节病理损伤。

表 5 补骨脂总黄酮对小鼠体质量变化的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )Table 5 Effect of total flavonoids of *Psoralea corylifolia* on body weight change in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	体质量/g				
		给药 0 d	给药 6 d	给药 12 d	给药 18 d	给药 24 d
对照	—	22.96 ± 1.24	23.18 ± 2.03	23.22 ± 1.55	23.26 ± 1.60	23.26 ± 2.10
模型	—	22.08 ± 1.56	21.50 ± 1.89	20.23 ± 1.87**	20.96 ± 2.41	21.72 ± 2.32
甲氨蝶呤	2	22.12 ± 1.48	22.54 ± 2.05	21.04 ± 1.57	21.20 ± 2.10	21.62 ± 1.69
补骨脂总黄酮	75	22.66 ± 1.98	22.78 ± 2.30	22.34 ± 1.90	22.00 ± 2.45	22.04 ± 1.45

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ 。\*\* $P < 0.01$  vs control group.表 6 补骨脂总黄酮对小鼠 AI 评分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )Table 6 Effect of on total flavonoids of *Psoralea corylifolia* on AI score in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	AI 评分				
		给药 0 d	给药 6 d	给药 12 d	给药 18 d	给药 24 d
对照	—	0	0	0	0	0
模型	—	4.17 ± 1.23	4.50 ± 2.36**	5.00 ± 1.48***	6.14 ± 0.46***	6.33 ± 0.38***
甲氨蝶呤	2	2.83 ± 1.45	3.17 ± 2.23	4.00 ± 1.36	4.80 ± 1.60	4.70 ± 1.49 <sup>#</sup>
补骨脂总黄酮	75	2.00 ± 1.27 <sup>###</sup>	2.80 ± 1.78	3.25 ± 1.30 <sup>#</sup>	4.33 ± 1.37 <sup>#</sup>	3.83 ± 1.70 <sup>##</sup>

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>###</sup> $P < 0.01$ 。\*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>###</sup> $P < 0.01$  vs model group.表 7 补骨脂总黄酮对小鼠足爪厚度的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )Table 7 Effect of total flavonoids of *Psoralea corylifolia* on paw thickness of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	足爪厚度/mm				
		给药 0 d	给药 6 d	给药 12 d	给药 18 d	给药 24 d
对照	—	2.15 ± 0.13	2.14 ± 0.17	2.14 ± 0.11	2.12 ± 0.05	2.14 ± 0.08
模型	—	2.41 ± 0.48	2.44 ± 0.59	2.50 ± 0.39*	2.50 ± 0.27*	2.44 ± 0.40
甲氨蝶呤	2	2.28 ± 0.37	2.31 ± 0.25	2.40 ± 0.15	2.40 ± 0.26 <sup>#</sup>	2.38 ± 0.24
补骨脂总黄酮	75	2.29 ± 0.16	2.30 ± 0.24	2.29 ± 0.31	2.31 ± 0.22 <sup>#</sup>	2.27 ± 0.16

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ 。\* $P < 0.05$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group.

图 4 小鼠踝关节大体形态

Fig. 4 General morphology of the mouse ankle joint

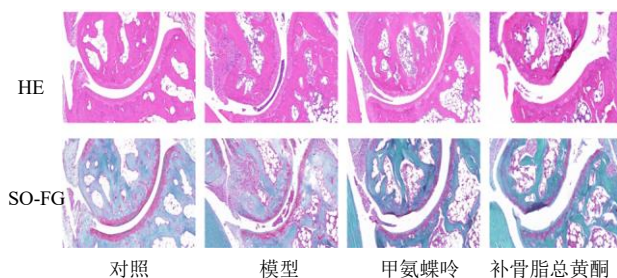
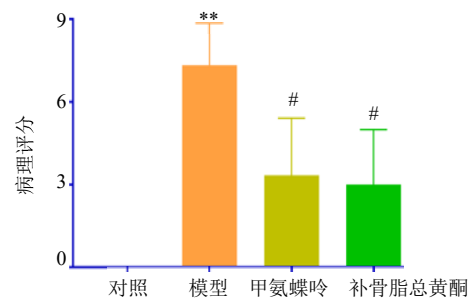


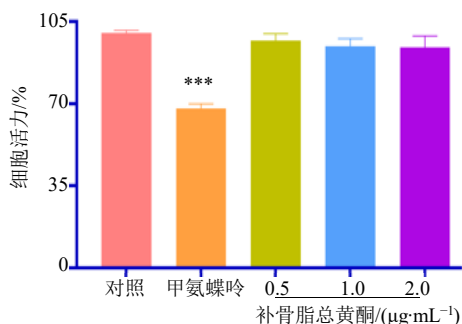
图 5 补骨脂总黄酮对小鼠踝关节组织病理形态的影响(×10)

Fig. 5 Effect of total flavonoids of *Psoralea corylifolia* on pathological morphology of ankle joint in mice (×10)与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ 。\*\* $P < 0.01$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group.图 6 补骨脂总黄酮对小鼠关节病理评分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )Fig. 6 Effect of total flavonoids of *Psoralea corylifolia* on joint pathological scores in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

### 3.3 补骨脂总黄酮对 TNF- $\alpha$ 诱导的 RA-FLS 增殖、迁移、侵袭的影响

3.3.1 补骨脂总黄酮对 RA-FLS 细胞活力的作用与对照组相比, 甲氨蝶呤组可显著抑制 RA-FLS 细胞活力 ( $P < 0.001$ ); 补骨脂总黄酮 0.5、1.0、2.0

μg/mL 组对 RA-FLS 细胞活力无显著影响, 表明实验浓度下补骨脂总黄酮对正常 RA-FLS 无明显细胞毒性, 安全性良好, 见图 7。

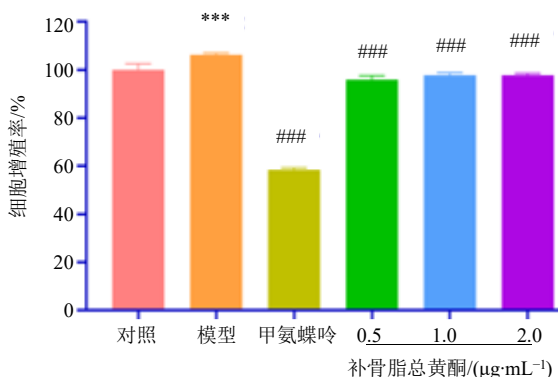


与对照组比较: \*\*\* $P < 0.001$ 。  
\*\*\* $P < 0.001$  vs control group.

图 7 补骨脂总黄酮对 RA-FLS 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 7 Effect of total flavonoids of *Psoralea corylifolia* on RA-FLS cells viability ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

3.3.2 补骨脂总黄酮对 RA-FLS 细胞增殖的影响与模型组相比, 补骨脂总黄酮 0.5、1.0、2.0 μg/mL 组均可显著抑制 TNF-α 诱导的细胞增殖 ( $P < 0.001$ ), 结果表明补骨脂总黄酮能有效抑制 RA-FLS 细胞增殖, 见图 8。



与对照组比较: \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较: ### $P < 0.01$ 。  
\*\*\* $P < 0.001$  vs control group; ### $P < 0.001$  vs model group.

图 8 补骨脂总黄酮对 TNF-α 诱导的 RA-FLS 细胞增殖率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 8 Effects of total flavonoids of *Psoralea corylifolia* on the proliferation rate of RA-FLS cells induced by TNF-α ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

3.3.3 补骨脂总黄酮对 RA-FLS 细胞迁移、侵袭的影响 与模型组相比, 补骨脂总黄酮 0.5、1.0、2.0 μg/mL 组细胞迁移率、细胞侵袭率均显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.001), 结果表明补骨脂总黄酮能有效抑制

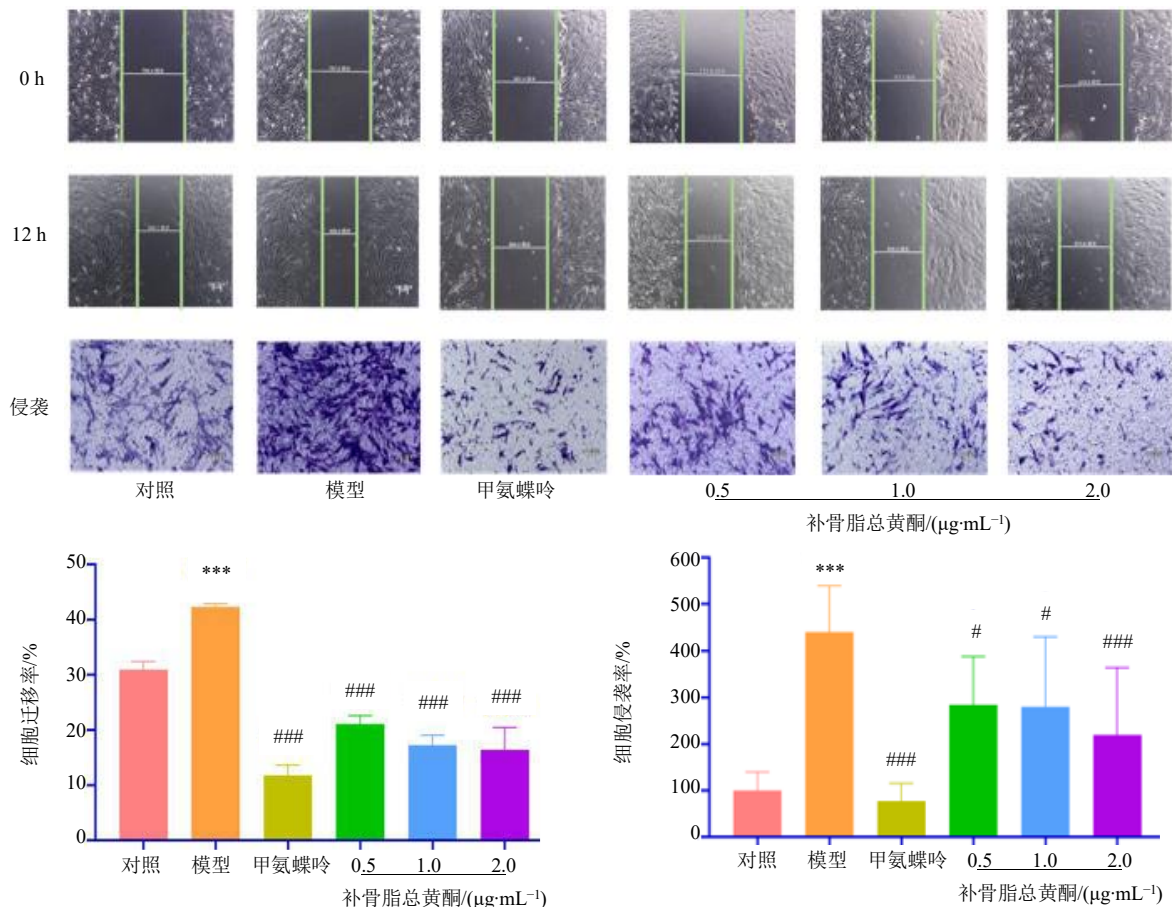
TNF-α 诱导的 RA-FLS 细胞迁移和侵袭, 见图 9。

3.3.4 补骨脂总黄酮对 RA-FLS 细胞相关蛋白表达影响 基于网络药理学预测 PI3K/Akt 为核心通路, 且分子对接证实补骨脂总黄酮主要成分与 Akt1 结合稳定, 因此针对性检测 Akt/GSK-3β/β-catenin 通路, 验证该通路在补骨脂总黄酮抗类风湿关节炎中的关键作用。与模型组比较, 补骨脂总黄酮 1.0、2.0 μg/mL 组 p-Akt/Akt 的表达水平明显下调 ( $P < 0.01$ ), 补骨脂总黄酮 2.0 μg/mL 组 p-GSK-3β/GSK-3β、β-catenin 的表达水平明显下调 ( $P < 0.05$ ), 见图 10。结果提示, 补骨脂总黄酮通过调控 Akt/GSK-3β/β-catenin 通路发挥抗类风湿关节炎作用。

#### 4 讨论

类风湿关节炎以滑膜异常增殖、炎症失控与软骨破坏为核心病理特征<sup>[24]</sup>, 临床现有药物疗效有限且不良反应突出, 亟待开发安全高效的天然替代药物。中医药在类风湿关节炎防治中具有整体调节、多靶点干预的独特优势, 补骨脂作为温肾壮骨、治疗骨痹的经典中药, 对类风湿关节炎相关炎症与骨损伤具有明确干预潜力<sup>[25]</sup>, 但其固有成分制约了临床安全应用<sup>[26]</sup>。补骨脂黄酮类成分药理作用广泛, 具有抗炎、抗氧化、调节免疫等多种活性且不良反应少, 安全性高, 具有良好的成药性与临床应用潜力<sup>[27]</sup>。本研究采用极性分步提取策略制备补骨脂总黄酮, 在富集黄酮类活性成分的同时降低毒性成分含量, 实现药效与毒性分离, 为其安全应用提供了基础。

首先通过加热回流和超声提取补骨脂总黄酮, HPLC 分析显示补骨脂总黄酮在富集黄酮成分的同时, 显著降低了毒性成分补骨脂酚、补骨脂素和异补骨脂的含量<sup>[28]</sup>。基于网络药理学分析, 发现补骨脂总黄酮可能通过作用于 TNF、IL-6、Akt1、TP53 等关键靶点, 影响 PI3K/Akt、MAPK、HIF-1、TNF 信号通路发挥作用。在上述通路中, PI3K/Akt 通路是调控滑膜细胞异常增殖、侵袭及炎症反应的核心通路, 与类风湿关节炎发生发展的关键病理环节高度契合。这些通路共同构成了复杂的调控网络: PI3K/Akt 通路作为细胞存活和增殖的核心信号轴, 其异常激活与 RA-FLS 的抗凋亡特性密切相关<sup>[29]</sup>; MAPK 信号通路参与炎症因子产生和滑膜细胞活化<sup>[30]</sup>; HIF-1 通路在滑膜缺氧微环境形成和血管翳发生中发挥关键作用<sup>[31]</sup>; TNF 信号通路则是类风湿关节炎炎症反应的核心驱动力<sup>[32]</sup>。分子对接技术是



与对照组比较: \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ### $P < 0.01$ .  
 \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; # $P < 0.05$  ### $P < 0.001$  vs model group.

图 9 RA-FLS 细胞迁移和侵袭的影响 ( $\times 20$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 9 Effects of total flavonoids of *Psoralea corylifolia* on the migration and invasion of RA-FLS cell ( $\times 20$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

从分子层面阐释中药活性成分与靶点相互作用, 揭示药理作用机制的重要手段<sup>[33]</sup>。本研究结果显示, 补骨脂总黄酮中 8 个主要活性成分与核心靶点 Akt1 的结合能均低于  $-8 \text{ kJ/mol}$ , 提示各成分与 Akt1 具有良好的亲和活性, 其中补骨脂定结合能最低, 为潜在关键活性成分, 异黄酮类成分结合能均低于  $-10 \text{ kJ/mol}$ , 亦展现出优异的结合能力, 查尔酮、二氢黄酮类成分次之。分子对接结果证实, 补骨脂总黄酮所含 8 种主要黄酮成分与通路核心蛋白 Akt1 均具备良好的结合亲和力, 提示 Akt1 是补骨脂总黄酮发挥抗类风湿关节炎作用的重要分子靶点。

Akt1 作为一种丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶, 是 PI3K/Akt 信号通路的核心效应分子。在 PI3K 下游被激活后, Akt1 可磷酸化 Bad、NF- $\kappa$ B、mTOR 等多个关键靶点, 参与调控 RA-FLS 的增殖与凋亡失衡; 同时, 该激酶作为多种致炎因子的作用媒介,

正向调控类风湿关节炎的炎症级联反应<sup>[34]</sup>。抑制 Akt 可通过多重机制发挥作用: 首先, Akt 失活可激活下游促凋亡蛋白, 促进 RA-FLS 凋亡<sup>[35-36]</sup>; 其次, Akt 信号减弱可抑制 mTOR 通路活化, 减少细胞周期蛋白表达, 从而阻滞细胞周期进程<sup>[37]</sup>; 此外, Akt/NF- $\kappa$ B 轴的中断有助于降低炎症因子与基质金属蛋白酶 (MMP) 的表达, 减轻软骨侵蚀<sup>[38]</sup>。在信号通路的纵向调控上, Akt 可进一步作用于下游 GSK-3 $\beta$  与  $\beta$ -catenin。活化的 Akt 可通过磷酸化修饰使 GSK-3 $\beta$  失活; 当 Akt 活性受抑时, GSK-3 $\beta$  的抑制状态被解除。失活的 GSK-3 $\beta$  无法介导  $\beta$ -catenin 磷酸化降解, 进而造成  $\beta$ -catenin 在胞内蓄积并入核启动下游转录。在滑膜细胞与破骨细胞中, PI3K/Akt 通路过度激活会升高 GSK-3 $\beta$  磷酸化水平<sup>[39]</sup>, 进而促进 RA-FLS 增殖、抑制其凋亡, 推动类风湿关节炎病程进展<sup>[40]</sup>; 而 GSK-3 $\beta$  功能受抑

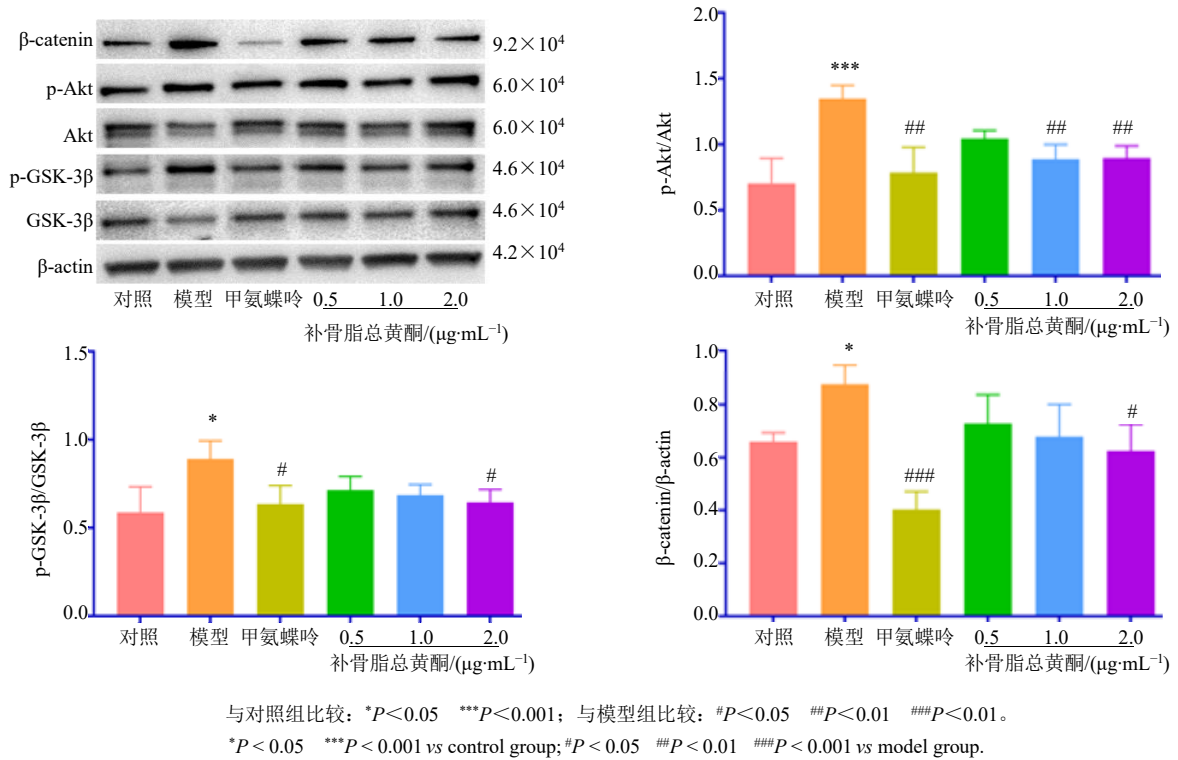


图 10 补骨脂总黄酮对 RA-FLS 细胞中 p-Akt/Akt、p-GSK-3β/GSK-3β 和 β-catenin 蛋白表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 10 Effects of total flavonoids of *Psoralea corylifolia* on the expression levels of p-Akt/Akt, p-GSK-3β/GSK-3β, and β-catenin proteins in RA-FLS cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

会阻断其对 β-catenin 的降解，促使 β-catenin 异常累积，进一步加剧滑膜细胞过度增殖、迁移与侵袭，并上调炎症因子释放，最终加重关节炎与软骨破坏<sup>[41-42]</sup>。因此，在类风湿关节炎病理背景下，Akt 的持续激活可通过“Akt→GSK-3β 失活→β-catenin 积累”这一轴，协同促进 FLS 增殖、存活及炎症破坏。基于上述预测与分子层面的验证依据，本研究针对性选取 Akt 下游关键效应分支—Akt/GSK-3β/β-catenin 通路开展实验验证，从而实现从通路预测到分子机制确证的紧密衔接，系统阐明补骨脂总黄酮治疗类风湿关节炎的核心机制。

通过模型小鼠验证补骨脂总黄酮的体内疗效，结果显示补骨脂总黄酮能显著减轻足爪肿胀、降低关节炎评分，并改善体质量下降趋势；组织病理学分析进一步证实，补骨脂总黄酮可有效抑制滑膜增生与炎性浸润，减少软骨破坏，保护关节结构完整性。在类风湿关节炎的疾病进展中，成纤维样滑膜细胞的异常活化与恶性行为是导致关节结构损伤的核心因素<sup>[43]</sup>。因此，靶向调控 RA-FLS 的增殖、迁移与侵袭行为，已成为类风湿关节炎治疗的重要研究方向。进一步通过细胞实验验证，TNF-α 可显

著促进 RA-FLS 的增殖、迁移与侵袭能力，而补骨脂总黄酮能抑制这些病理行为。尤其补骨脂总黄酮 2 μg/mL 组对细胞迁移与侵袭的抑制效果接近阳性对照药甲氨蝶呤，显示其具有较强的抗滑膜侵袭能力，提示其具有较强的抗滑膜侵袭活性。Western blotting 检测结果显示，经补骨脂总黄酮干预后，p-Akt/Akt、p-GSK-3β/GSK-3β、β-catenin 蛋白表达水平显著下降，表明补骨脂总黄酮可能通过抑制 Akt/GSK-3β/β-catenin 信号通路的活化，进而调控 RA-FLS 的生物学行为。

综上所述，本研究围绕补骨脂总黄酮治疗类风湿关节炎展开，采用“提取制备—网络预测—分子对接—体内外验证—机制阐明”的研究思路，系统揭示其抗类风湿关节炎药效与分子机制。通过极性分步提取补骨脂总黄酮，在富集黄酮类活性成分的同时显著降低肝肾毒性成分含量，安全性更高；可同时发挥抗炎、抑制滑膜细胞异常增殖、迁移、侵袭及关节保护多重作用；作用机制清晰，通过调控 Akt/GSK-3β/β-catenin 通路发挥抗类风湿关节炎作用，且体内外疗效确切。因此，补骨脂总黄酮具备高效低毒、作用全面、机制明确的开发优势，应用

前景广阔。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Han Y L, Liu C Q, Chen S J, *et al.* Columbianadin ameliorates rheumatoid arthritis by attenuating synoviocyte hyperplasia through targeted vimentin to inhibit the VAV2/Rac-1 signaling pathway [J]. *J Adv Res*, 2025, 74: 609-620.
- [2] Li Y, Zhong S Q, Huang S C, *et al.* Application of metabolomics in the classification of traditional Chinese medicine syndromes in rheumatoid arthritis [J]. *Clin Rheumatol*, 2025, 44(4): 1493-1504.
- [3] Lin Y J, Anzaghe M, Schülke S. Update on the pathomechanism, diagnosis, and treatment options for rheumatoid arthritis [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 880.
- [4] 康熙宁, 徐林轩, 蔡余力. 单味中药治疗骨质疏松症的机理研究 [J]. *中医临床研究*, 2022, 14(8): 70-72.
- [5] Wang T, Wang Z D, Qi W X, *et al.* The role, targets and mechanisms of traditional Chinese medicine in regulating the balance of T helper type 17/regulatory T cells in rheumatoid arthritis [J]. *Int J Rheum Dis*, 2023, 26(4): 613-624.
- [6] Li Y Q, Yang C, Jia K X, *et al.* Fengshi Qutong capsule ameliorates bone destruction of experimental rheumatoid arthritis by inhibiting osteoclastogenesis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 282: 114602.
- [7] 王秀文, 张丛慧, 韦方娇, 等. 基于网络药理学和代谢组学探究荆防颗粒对类风湿关节炎的保护作用及机制 [J]. *中草药*, 2024, 55(23): 8067-8078.
- [8] 王霞霞, 安方玉, 颜春鲁, 等. 非编码 RNA 调控骨质疏松症骨重建机制及补肾壮骨类中医药治疗机制研究进展 [J]. *中国现代应用药学*, 2023, 40(17): 2462-2472.
- [9] 武文星, 郭盛, 尚尔鑫, 等. 基于数据挖掘的补骨脂药用源流及其配伍用药特点分析 [J]. *世界中医药*, 2022, 17(10): 1405-1414.
- [10] Zhai Y K, Wang Q F, Li Y Y, *et al.* The higher osteoprotective activity of psoralidin *in vivo* than coumestrol is attributed by its presence of an isopentenyl group and through activated PI3K/Akt axis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 102: 1015-1024.
- [11] Yu A X, Xu M L, Yao P, *et al.* Corylin, a flavonoid derived from *Psoralea Fructus*, induces osteoblastic differentiation via estrogen and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways [J]. *FASEB J*, 2020, 34(3): 4311-4328.
- [12] Wu Y L, Feng K R, Chen Y L, *et al.* Exploring the anti-inflammatory and immunomodulatory potential of licochalcone B against psoralidin-induced liver injury [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 335: 118600.
- [13] 张娜娜, 迟福荣, 刘德峰, 等. 补骨脂对骨质疏松症模型大鼠糖-骨代谢失衡的调节作用及对骨代谢的影响研究 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2025, 24(13): 1349-1353.
- [14] 张珍珍, 王凯燕, 刘莉, 等. 补骨脂主要活性成分抑制小鼠前列腺增生的作用研究 [J]. *山东中医杂志*, 2020, 39(5): 504-508.
- [15] Chakraborty D, Joshi L, Agnihotri P, *et al.* Unlocking the potential of bavachin in vitamin D receptor cascade modulation for rheumatoid arthritis [J]. *Mol Biol Rep*, 2025, 52(1): 429.
- [16] Wang S H, Du Q Y, Sun J Y, *et al.* Investigation of the mechanism of isobavachalcone in treating rheumatoid arthritis through a combination strategy of network pharmacology and experimental verification [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 294: 115342.
- [17] 何思巧, 蓝丹, 韦红杏, 等. 基于多组学探讨中药抗类风湿性关节炎作用机制的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2025, 48(11): 3368-3380.
- [18] Xu Q X, Li Y P, Chen L H, *et al.* Comprehensive studies of plasma pharmacokinetic and bone tissue distribution in rats to elucidate pharmacodynamic material basis of *Psoraleae Fructus* treating osteoporosis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2026, 360: 121145.
- [19] Pan D M, Guo Y, Liu Y, *et al.* Guizhi Shaoyao Zhimu Decoction alleviates rheumatoid arthritis by inhibiting inflammation by targeting SLPI [J]. *Phytomedicine*, 2025, 139: 156471.
- [20] 张玲玲, 刘云洁, 童彤, 等. DBA/1 小鼠胶原性关节炎模型建立方法及评价指标 [J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(8): 1108-1111.
- [21] 蒋勇. 别欧前胡素改善类风湿关节炎滑膜炎的作用机制研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2023.
- [22] 贾川, 张兴州, 王雨辰, 等. 补骨脂提取物对骨质疏松模型大鼠趋化因子配体 4、炎症反应及骨代谢的影响及机制研究 [J]. *北京中医药*, 2024, 43(10): 1138-1142.
- [23] Tu J J, Chen W L, Fang Y L, *et al.* PU.1 promotes development of rheumatoid arthritis via repressing FLT3 in macrophages and fibroblast-like synoviocytes [J]. *Ann Rheum Dis*, 2023, 82(2): 198-211.
- [24] Yu D, Wang D, Yu Y Q, *et al.* Platelet-derived exosomes *in situ* reprogramming macrophages for rheumatoid arthritis treatment [J]. *Cell Commun Signal*, 2025, 23(1): 471.
- [25] 郑慧兰, 陶庆文, 汪志伟, 等. 基于数据挖掘的补肾法治类风湿关节炎用药规律研究 [J]. *风湿病与关节炎*, 2023, 12(3): 13-19.
- [26] 许颖杰, 湛小燕, 柏兆方, 等. 从古今文献效/毒记载

- 演变探讨补骨脂安全性与安全合理用药对策 [J]. 药学学报, 2025, 60(2): 314-322.
- [27] 郝建宏, 袁一方. 中药补骨脂黄酮类成分相关专利现状 [J]. 中国科技信息, 2024(16): 22-24.
- [28] 徐博, 肖涟波. 补骨脂肝毒性及减毒研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34(1): 159-161.
- [29] Hassani S S, Farhadi E, Esmacili S A, *et al.* Deciphering the role of ERK and PI3K/Akt as crosstalk pathways between fibroblast-like synoviocytes and osteoclasts; novel therapeutic approach for rheumatoid arthritis [J]. *Mol Biol Rep*, 2025, 52(1): 662.
- [30] Chang C J, Chang T M, Sun Y S, *et al.* Lutein attenuates rheumatoid arthritis progression by suppressing MAPK/NF- $\kappa$ B signaling and MMP3 and MMP13 expression in fibroblast-like Synoviocytes [J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 164: 115360.
- [31] Li Y L, Li A Y, Teng Y, *et al.* Study on the effect of deer bone in improving rheumatoid arthritis based on the “drug-target-pathway” association network [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 346: 119684.
- [32] Guo S C, Liu J, Jiang T, *et al.* (5R)-5-Hydroxytryptolide (LLDT-8) induces substantial epigenetic mediated immune response network changes in fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 11155.
- [33] 朱锐灵, 沈悦, 马飞鸿, 等. 分子对接技术在中药抗炎活性成分筛选和作用机制研究中的应用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2018, 32(6): 497-506.
- [34] 刘琼, 李永乐, 董平, 等. PI3K/Akt 信号通路类风湿关节炎相关性探讨 [J]. 风湿病与关节炎, 2021, 10(3): 62-66.
- [35] Sun H N, Luo Y H, Meng L Q, *et al.* Cryptotanshinone induces reactive oxygen species-mediated apoptosis in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(2): 1067-1075
- [36] Li G Q, Liu Y, Meng F R, *et al.* Tanshinone II<sub>A</sub> promotes the apoptosis of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis by up-regulating lncRNA GAS5 [J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(5): BSR20180626.
- [37] Zhang Y M, Jin H Z, Jia W Y, *et al.* Ermiao San attenuating rheumatoid arthritis via PI3K/AKT/mTOR signaling activate HIF-1 $\alpha$  induced glycolysis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 345: 119615.
- [38] Ma J D, Jing J, Wang J W, *et al.* A novel function of artesunate on inhibiting migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients [J]. *Arthritis Res Ther*, 2019, 21(1): 153.
- [39] Tu Y B, Yue W D, Dai G Y, *et al.* Anti-resorptive dihydrophenanthrene coelonin alleviates arthritic bone destruction by inhibiting osteoclast formation and synovial inflammation through Src regulation [J]. *Phytomedicine*, 2025, 146: 157147.
- [40] 何宁, 唐长友, 周贤超. NR2F1-AS1 靶向 miR-212-3p/GSK-3 $\beta$  影响类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖和凋亡 [J]. 现代免疫学, 2023, 43(2): 122-128.
- [41] Zhou Y M, Gao Y Z, Sun J, *et al.* Aquaporin-1 stabilizes  $\beta$ -catenin to promote NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis in rheumatoid arthritis [J]. *Apoptosis*, 2026, 31(3): 74.
- [42] 包卓玛, 侯孜明, 江露, 等. 枫杨总黄酮调控类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖、迁移及凋亡的作用及机制 [J]. 中国组织工程研究, 2026, 30(4): 816-823.
- [43] Geng Q S, Jiao Y, Diao W Y, *et al.* A new N6-Methyladenosine inhibitor, celastrol, alleviates rheumatoid arthritis via targeting IGF2BP3 [J]. *MedComm*, 2025, 6(11): e70431.

[责任编辑 高源]