

瑶药四方藤小复方对类风湿性关节炎大鼠的作用及机制研究和 Q-marker 预测

梁健钦, 严炯艺, 冯茵怡, 黎芳, 谢谭芳, 奉建芳*, 方雪湾*

广西中医药大学, 广西 南宁 530200

摘要: **目的** 研究瑶药四方藤小复方对类风湿性关节炎(RA)大鼠的抗炎作用,并分析四方藤小复方的作用机制,预测其质量标志物(Q-marker)。**方法** SD大鼠随机分为对照组、模型组、雷公藤多苷片阳性对照组以及四方藤小复方提取物高、低剂量(28.7、7.2 g/kg)组,每组8只。除对照组外,其余各组均采用II型胶原蛋白-完全弗氏佐剂法诱导RA大鼠模型,各给药组在造模期间ig给予相应药物,连续28 d。实验期间观察大鼠足趾红肿程度并评分,实验末采用ELISA法测定血清白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平。通过TCMSP和Drugbank数据库搜索并筛选四方藤小复方的化学成分以及预测作用靶点,采用TTD数据库搜索RA疾病靶点。通过String数据库和Cytoscape软件构建和可视化靶点互作网络,通过MCODE插件聚类分析。利用String数据库进行GO和KEGG富集分析。最后结合化学成分的有效性、可测性,预测四方藤小复方的Q-marker。**结果** 与模型组比较,四方藤小复方提取物高、低剂量组及雷公藤多苷片组大鼠足趾肿胀程度明显减轻($P<0.01$),血清IL-1 β 和TNF- α 水平均显著降低($P<0.01$)。RA的疾病靶点有89个,发病机制与细胞因子-受体作用通路、RA通路异常有关。四方藤小复方中筛选得到31个化学成分、化学成分的作用靶点119个,其中12个属于疾病靶点,参与刺激反应调节、细胞增殖调节、细胞代谢过程调节、细胞内信号转导的调控等1112个生物学过程,以及调控RA通路、TNF通路等113条信号通路,最终发挥治疗RA的作用。同时预测得到岩白菜素、白藜芦醇、氯化两面针碱、蛇床子素、芳樟醇、欧前胡素、乙氧基白屈菜红碱、芹菜素、黄连碱、橙皮苷、芝麻素11个成分可作为四方藤小复方的Q-marker。**结论** 四方藤小复方可显著减轻RA大鼠的急性炎症,其可能通过白藜芦醇等多种成分作用于以PTGS2为主的多个靶点,参与调控RA通路、TNF通路等多条炎症免疫通路。岩白菜素、白藜芦醇、氯化两面针碱、蛇床子素、芳樟醇、欧前胡素、乙氧基白屈菜红碱、芹菜素、黄连碱、橙皮苷、芝麻素可作为用于四方藤小复方质量控制的Q-marker。

关键词: 四方藤小复方; 类风湿性关节炎; 网络药理学; 质量标志物; 岩白菜素; 白藜芦醇; 氯化两面针碱; 蛇床子素; 芳樟醇; 欧前胡素; 乙氧基白屈菜红碱; 芹菜素; 黄连碱; 橙皮苷; 芝麻素

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)19-4705-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.19.024

Effect and mechanism of YAO medicine compound containing *Cissus pteroclada* on rheumatoid arthritis in rats and its Q-marker prediction

LIANG Jian-qin, YAN Jiong-yi, FENG Yin-yi, LI Fang, XIE Tan-fang, FENG Jian-fang, FANG Xue-wan

Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, China

Abstract: Objective To evaluate the anti-rheumatism effect, and predict the mechanism and Q-marker of YAO medicine compound containing *Cissus pteroclada* (Sifangteng in Chinese, SFT) in the treatment of rheumatoid arthritis (RA) in rats. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, model group, tripterygium glycosides group and SFT high/low dose (28.7, 7.2 g/kg) groups with eight rats in each group. Except the control group, the RA models in rats induced by Collagen II collagen were established. The SFT group and the tripterygium glycosides group were given corresponding drugs by intragastric administration during the modeling period, while the other two groups were given the same volume of saline once daily for 28 d. The degree of foot swelling was measured

收稿日期: 2019-08-09

基金项目: 广西中医药大学 2018 年广西一流学科建设项目 (2018XK029); 广西中医药大学 2018 年广西一流学科建设项目 (05019042); 国家自然科学基金资助项目 (81560674); 广西自然科学基金项目 (2017GXNSFAA198078); 2019 年广西高校中青年教师科研基础能力提升项目 (2019KY0319)

作者简介: 梁健钦 (1977—), 男, 广西南宁人, 副教授, 博士, 研究方向为新药新产品开发。Tel: 15977775577 E-mail: 80004622@qq.com

***通信作者** 奉建芳, 教授。Tel: 13817588549 E-mail: fengjianfang@vip.163.com

方雪湾 Tel: 18276192289 E-mail: 794844945@qq.com

and scored during the experiment. The levels of TNF- α and IL-1 β in serum were measured by ELISA at the end of the experiment. SFT chemical components and predicting targets were searched and screened through TCMSP and Drugbank databases. The target of RA disease was searched by TTD database. The protein interaction network was constructed and visualized by String database and Cytoscape software, cluster analysis was analyzed by MCODE. GO and KEGG enrichment analysis was carried out using String database. Finally, combined with the validity and measurability of chemical components, the Q-marker of SFT was predicted. **Results** Compared with the model group, the foot swelling of rats in SFT high and low dose groups and positive group was significantly reduced ($P < 0.01$), and the serum levels of IL-1 β and TNF- α were significantly decreased ($P < 0.01$). There were 89 disease targets of RA. The pathogenesis of RA was related to abnormal cytokine-receptor pathway and RA pathway. A total of 31 components in SFT were screened and its 119 target proteins were predicted, 12 of them belong to disease targets were involved in 1 112 biological processes, such as regulation of stimulation response, regulation of cell proliferation, regulation of cell metabolism, regulation of intracellular signal transduction, and regulation of 113 signaling pathways, such as RA pathway and TNF pathway, which ultimately play a role in the treatment of RA. At the same time, 11 components were predicted to be Q-markers of SFT, including apigenin, resveratrol, bergenin, nitidine, osthol, linalool, ammidin, ethoxychelerythrine, coptisine, hesperidin, and sesamin. **Conclusion** SFT can significantly reduce acute inflammation in RA rats. SFT may act on PTGS2-based targets through resveratrol and other components, and participate in regulation of RA pathway, TNF pathway and other inflammatory and immune pathways. Apigenin, resveratrol and bergenin, nitidine, osthol, linalool, ammidin, ethoxychelerythrine, coptisine, hesperidin, sesamin can be used as Q-markers for SFT quality control.

Key words: *Cissus pteroclada* Hayata; rheumatoid arthritis; network pharmacology; Q-marker; bergenin; resveratrol; nitidine; osthol; linalool; ammidin; ethoxychelerythrine; apigenin; coptisine; hesperidin; sesamin

类风湿性关节炎(RA)是一种常见的以关节滑膜慢性炎症及系统性血管炎为特征的慢性自身免疫功能障碍性疾病^[1],其发病机制复杂,与免疫失调、遗传因素、环境有关^[2-4]。四方藤小复方是广西大瑶山区瑶族人民在瑶医药理论指导下治疗风湿痹痛常用瑶药验方中挖掘得到的由瑶药四方藤、买麻藤、两面针和中药独活、千年健组成的小复方。为更好开发瑶医药资源,本课题组对该方进行深入研究,拟开发成具有抗RA作用、质量可控的医疗机构制剂。本课题组前期对该复方中四方藤单味药材进行研究,证实四方藤对RA大鼠具有显著治疗作用,其机制可能与下调滑膜组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、核转录因子- κ B(NF- κ B)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的表达有关^[5],本研究进一步考察四方藤小复方对RA大鼠的抗炎作用,并借助网络药理学技术分析RA的靶点,揭示RA的发病机制,分析四方藤小复方的主要作用成分、作用靶点和作用通路,揭示四方藤小复方的多成分、多靶点、多通路的作用机制,并预测四方藤小复方的质量标志物(Q-marker),为四方藤小复方质量控制提供参考与依据。

1 材料

1.1 仪器

EL104型电子分析天平(梅特勒公司);Infinite 200 PRO多功能酶标仪(瑞士TECAN公司);-80℃

超低温冰箱(中国美菱低温科技有限责任公司);冷冻高速离心机(赛默飞世尔有限公司)。

1.2 药品与试剂

雷公藤多苷片(浙江得恩德制药有限公司,批号1809126B);完全弗氏佐剂(Sigma公司);白细胞介素-1 β (IL-1 β)、TNF- α 酶联免疫吸附测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);牛II型胶原蛋白(Sigma公司,批号C7806);四方藤小复方提取物(广西中医药大学中药制剂共性技术研发重点实验室提供);四方藤、买麻藤、两面针、独活、千年健药材均购自南宁市万药堂药业有限公司,由广西中医药大学韦松基教授鉴定四方藤为葡萄科植物翼茎白粉藤*Cissus pteroclada* Hayata的干燥藤茎、买麻藤为买麻藤科植物买麻藤*Gnetum montanum* Markgr.的干燥藤茎、两面针为芸香科植物两面针*Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC.的干燥根、独活为伞形科植物重齿毛当归*Angelica pubescens* Maxim. f. *biserrata* Shan et Yuan的干燥根,千年健为天南星科植物千年健*Homalomena occulta* (Lour.) Schott的干燥根茎。

1.3 软件及数据库

TTD数据库(<http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/>)、Drugbank数据库(version 5.1.1, <https://www.drugbank.ca/>)、TCMSP数据库(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)、UniProt数据库(<https://>

www.uniprot.org/), String 数据库 (version 10.5, <https://string-db.org/>), Cytoscape (version 3.7.1)。

1.4 动物

SD 大鼠, SPF 级, 雄性, 体质量 120~150 g, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物许可证号 SCXK (湘) 2016-0002。

2 方法与结果

2.1 四方藤小复方提取物对 RA 大鼠的急性炎症的作用

2.1.1 四方藤小复方提取物的制备 称取四方藤 600 g、买麻藤 400 g、两面针 200 g、千年健 200 g、独活 200 g, 煎煮 3 次, 每次加 8 倍水、0.5 h, 滤过, 合并滤液, 减压浓缩成每毫升相当于生药 1.4 g 的清膏, 4 °C 保存备用。经 HPLC 法测定, 清膏中含岩白菜素 7.22 mg/g。

2.1.2 动物模型制备、分组和给药 取 40 只 SD 大鼠适应性喂养 3 d 后, 随机分为对照组、模型组、雷公藤多苷片阳性药组 (1.5 mg/kg) 和四方藤小复方提取物组 (根据该方临床单日用量 80 g 为标准, 按大鼠与人等效剂量换算, 确定四方藤小复方提取物高、低剂量分别为大鼠与人等效剂量的 4、1 倍, 即四方藤小复方提取物高、低剂量折合成生药的给药剂量分别为 28.7、7.2 g/kg)。除对照组外, 其余各组大鼠均于第 1 天后足掌皮内注射 II 型胶原蛋白-完全弗氏佐剂乳剂 0.1 mL 进行初次免疫, 第 7 天尾根部再次注射同剂量造模剂加强免疫, 建立 RA 大鼠模型。自造模第 1 天起, 雷公藤多苷组和四方藤小复方提取物高、低剂量组分别 ig 给予相应药物, 对照组和模型组 ig 给予等体积生理盐水, 1 次/d, 连续 28 d。

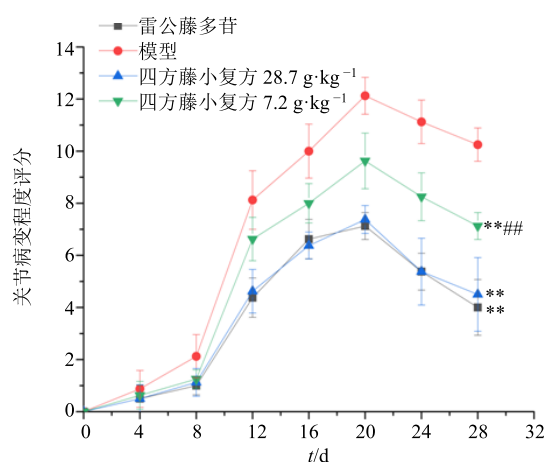
2.1.3 大鼠关节病变程度评分 采用关节炎评分法 (4 级评分法) [5-6]。0 分: 无红肿; 1 分: 足小趾关节红肿; 2 分: 趾关节、足趾均红肿; 3 分: 距关节以下均红肿; 4 分: 包括距关节, 全部红肿。每 1 个足趾关节最高评分为 4 分, 累计四肢关节评分最高为 16 分。每 4 天评分 1 次, 到 28 d 为止。结果显示, 从致炎第 8 天开始, 各组大鼠足部均出现不同程度的肿胀, 模型组在致炎第 20 天炎症反应最为严重, 大鼠距关节全部红肿并出现溃烂。第 28 天, 与模型组比较, 四方藤小复方提取物组、雷公藤多苷组大鼠足部红肿症状得到明显改善。关节病变程度评分-时间曲线图见图 1。

2.1.4 血清 IL-1 β 、TNF- α 水平的测定 在末次给

药 1 h 后, 腹主动脉取血 5 mL, 分取血清, 按试剂盒说明测定血清中 IL-1 β 、TNF- α 的水平。与对照组比较, 模型组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 的水平显著升高 ($P<0.01$), 说明模型大鼠出现急性炎症; 与模型组比较, 四方藤小复方提取物高、低剂量组和雷公藤多苷组大鼠血清中 IL-1 β 和 TNF- α 的水平明显下降 ($P<0.01$), 结果见表 1。

2.2 四方藤小复方提取物对 RA 大鼠作用机制的网络药理学分析

2.2.1 化学成分及其靶点的收集和筛选 通过文献检索和查询 TCMSP 数据库搜索处方中药材的化学成分, 以口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 且类药性 (DL) ≥ 0.18 为标准筛选得到的化学成分以及文献报



与模型组比较: ** $P<0.01$; 与雷公藤多苷组比较: ### $P<0.01$

** $P<0.01$ vs model group; ### $P<0.01$ vs tripterygium glycosides group

图 1 四方藤小复方提取物对 RA 大鼠关节红肿程度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 1 Effect of SFT on joint redness and swelling in RA rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

表 1 各组大鼠血清中 IL-1 β 和 TNF- α 的水平 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Levels of IL-1 β and TNF- α in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	IL-1 β /(ng·L ⁻¹)	TNF- α /(ng·L ⁻¹)
对照	—	24.34 $\pm$ 2.31	16.18 $\pm$ 3.44
模型	—	118.65 $\pm$ 17.33**	112.30 $\pm$ 15.08**
雷公藤多苷	0.001 5	43.03 $\pm$ 10.93**###	42.03 $\pm$ 13.13**###
四方藤小复方提取物	28.7	56.27 $\pm$ 13.85**###	57.08 $\pm$ 12.24**###
	7.2	86.20 $\pm$ 14.33**###	81.20 $\pm$ 12.52**###

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

道有活性的化合物作为四方藤小复方提取物的化学成分。然后通过 TCMSP 数据库和 Drugbank 数据库查询四方藤小复方提取物化学成分对应的靶点，删除重复靶点，经 UniProt 数据库标准化靶点名称。本研究共筛选出 7 个 $OB \geq 30\%$ 且 $DL \geq 0.18$ 的化学成分，加上通过文献报道^[7-10]筛选得到 24 个活性成分(表 2)，共 31 个化学成分可作用于 119 个靶点。

表 2 四方藤小复方中主要化学成分
Table 2 Main chemical constituents of SFT

化学成分	OB/%	DL	筛选依据	药材归属
齐墩果酸	29.02	0.76	抗病毒、降血糖、抗肿瘤	四方藤
岩白菜素	14.11	0.34	抗炎	四方藤
白藜芦醇	19.07	0.11	抗癌、抗炎、抑菌	四方藤、买麻藤
没食子酸	31.69	0.04	抗炎、抑菌	四方藤
胡萝卜苷	2.72	0.60	抗菌	四方藤
异单叶大黄素	81.62	0.15	抗癌、抗炎、抗病毒	买麻藤
高北美圣草素	2.21	0.27	抗氧化、调血脂、降血糖	买麻藤
芹菜素	23.06	0.21	抗癌、抗炎、抗病毒	买麻藤
葫芦巴碱	60.07	0.03	抗肿瘤、降血糖	买麻藤
银松素	60.67	0.09	镇痛抗炎	买麻藤
黄连碱	30.67	0.86	符合 $OB \geq 30$ 且 $DL \geq 0.18$	两面针
乙氧基白屈菜红碱	62.21	0.88	符合 $OB \geq 30$ 且 $DL \geq 0.18$	两面针
血根碱	37.81	0.86	符合 $OB \geq 30$ 且 $DL \geq 0.18$	两面针
芝麻素	56.55	0.83	符合 $OB \geq 30$ 且 $DL \geq 0.18$	两面针
氯化两面针碱	18.58	0.81	抗肿瘤、抗真菌	两面针
木兰花碱	0.48	0.55	抗氧化、抗炎、诱导免疫耐受	两面针
牡荆素	3.05	0.71	抗炎、促进成骨分化	两面针
德卡林碱	9.42	0.73	抑菌	两面针
地奥司明	12.70	0.66	改善微循环	两面针
橙皮苷	13.33	0.67	抗炎、抗菌、调节免疫	两面针
欧前胡素	34.55	0.22	符合 $OB \geq 30$ 且 $DL \geq 0.18$	独活
异欧前胡素	45.46	0.23	符合 $OB \geq 30$ 且 $DL \geq 0.18$	独活
异紫花前胡内酯	50.28	0.18	符合 $OB \geq 30$ 且 $DL \geq 0.18$	独活
佛手苷内酯	42.21	0.13	抗菌、抗炎、镇痛、提高免疫	独活
异紫花前胡苷	15.48	0.69	抗炎、抗过敏、抗氧化	独活
补骨脂素	33.06	0.10	抗病毒、抗肿瘤	独活
东莨菪内酯	27.77	0.08	抗炎、抗过敏、抗骨质疏松	独活
蛇床子素	38.75	0.13	抗炎、抗肿瘤	独活
β -蒎烯	46.25	0.05	抑菌、抗肿瘤、镇痛	千年健
R-芳樟醇	39.80	0.02	抑菌、抗肿瘤、镇痛	千年健
β -松油醇	47.89	0.03	抑菌、抗肿瘤、镇痛	千年健

2.2.2 RA 疾病靶点及发病机制分析 以“rheumatoid arthritis”为关键词检索 TTD 数据库，共得到 89 个 RA 疾病靶点。GO 分析显示，RA 涉及细胞因子调控、免疫反应、多细胞组织过程的正调控等 812 个生物学过程，涉及细胞因子受体结合、细胞因子活性、信号受体活性等 34 个分子功能，与膜侧、细胞外间隙、细胞表面等 19 个条目相关。KEGG 富集分析，显示 RA 与细胞因子-受体作用通

路、RA 通路、破骨细胞化通路等 78 条通路相关。

2.2.3 “药材-化学成分-作用靶点”网络构建及药物作用机制分析 为了更好地寻找化学成分靶点、疾病靶点的相互作用关系,将它们导入 String 数据库获得靶点间的作用关系,将该作用关系导入 Cytoscape 软件建立靶点互作网络图,并通过 Cytoscape 自带 MCODE 插件进行聚类分析(K-Core=2,其他参数为默认值),筛选靶点互作网络中关键的靶点集(亦即核心化学成分靶点、核心疾病靶点)。本研究对 119 个化学成分靶点、89 个疾病靶点进行分析,重复靶点有 12 个,亦即药物可以直接作用于 12 个疾病靶点。将 196 个靶点导入 String,去除无相互作用的靶点,得到由 191 个节点、2 491 条边组成的网络(网络密度为 0.609,平均节点度为 26.1)。将该网络经聚类分析,提取得到一个含有 74 个靶点的与 RA 密切相关的网络(1 452 条边,网络密度为 0.766,平均节点度为 39.2),其中核心化学成分靶点 42 个、核心疾病靶点 44 个,其中共同靶点 12 个,见图 2。取该网络进行 GO 富集分析显示,四方藤小复方中化学成分主要影响刺激反应调节、细胞增殖调节、细胞代谢过程调节、细胞内信号转导的调控等 1 112 个生物学过程,调节蛋白/受体/酶/细胞因子/生长因子的结合、MAP 激酶活性、信号受体活性等 52 个分子功能,并与细胞质膜、细胞间隙、细胞组分等 25 个细胞组成有关。KEGG 富集分析显示,四方藤小复方中化学成分调控 113 条信号通路,排名靠前的通路是细胞因子-细胞因子-受体相互作用通路、RA 通路、TNF 信号通路等,见图 3(Y 轴代表通路名称,X 轴代表富集因子,气泡面积大小代表目标基因集中属于这个通路的基因数量,气泡颜色代表富集显著性,即 P 值的大小)。

进一步通过 Cytoscape 构建“药材-化学成分-作用靶点”网络图(图 4,三角形代表药材,四边形代表化学成分,圆形代表化学成分靶点),网络中节点越大表示度值(degree 值)越大,说明与其连接的节点越多,提示该节点在 RA 治疗中的重要性越大。由图 4 可见,买麻藤有 5 个化学成分作用于 33 个关键靶点,四方藤有 4 个化学成分作用于 26 个关键靶点,两面针有 9 个化学成分作用于 9 个关键靶点,独活有 6 个化学成分作用于 4 个关键靶点,千年健有 1 个化学成分作用于 3 个关键靶点,提示药材的重要性排序为买麻藤>四方藤>两面针>独活>千年健。四方藤小复方中 24 个化学成分与治疗

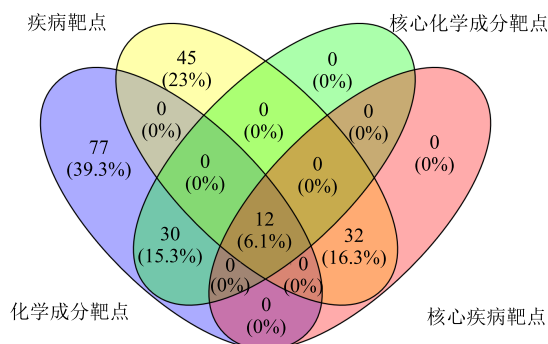


图 2 靶点的韦恩图

Fig. 2 Wynn diagram of targets

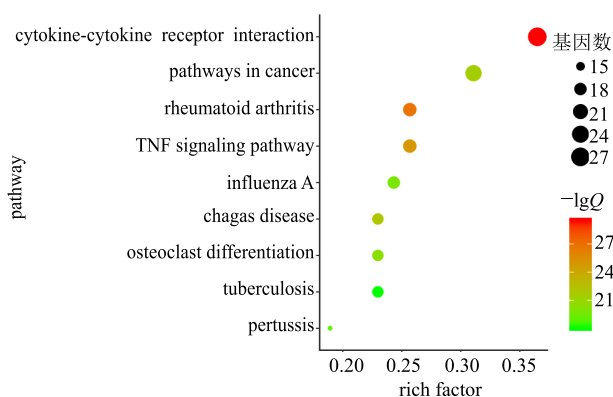


图 3 通路富集分析气泡图

Fig. 3 Bubble diagram of path enrichment

RA 有关,其中包括黄酮类(橙皮苷、地奥司明、牡荆素、芹菜素)、生物碱类(乙氧基白屈菜红碱、葫芦巴碱、黄连碱、木兰花碱、血根碱、氯化两面针碱)、香豆素类(东莨菪内酯、欧前胡素、蛇床子素、岩白菜素、异欧前胡素、异紫花前胡苷、异紫花前胡内酯)、挥发油(R-芳樟醇)、多酚类(白藜芦醇)、酚酸类(没食子酸)、木脂素类(芝麻素)、芪类(异丹叶大黄素、银松素)、三萜类(齐墩果酸),其中白藜芦醇、芹菜素、蛇床子素等成分最为重要。在作用靶点方面,四方藤小复方中的部分化学成分可作用于多个靶点,其中 PTGS2、ESR1、PIK3CG、F2、VEGFA 等靶点最为重要。

2.3 Q-marker 的预测

由图 4 网络药理学分析结果可知,白藜芦醇、芹菜素、没食子酸、黄连碱、乙氧基白屈菜红碱、橙皮苷、欧前胡素、异紫花前胡苷、异紫花前胡内酯、蛇床子素、R-芳樟醇、芝麻素、异丹叶大黄素、木兰花碱、东莨菪内酯等 24 个成分与 RA 密切相关^[11-12],可作为四方藤小复方治疗 RA 的潜在 Q-marker。中

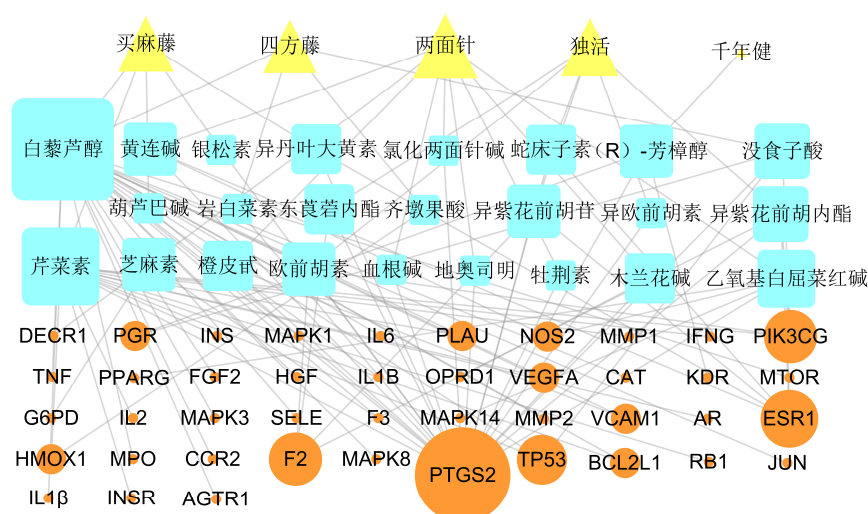


图 4 药材-化学成分-作用靶点网络图

Fig. 4 Network diagram of medicinal materials-components-targets

药 Q-marker 具有可测性、有效性、特有性、传递与溯源性、处方配伍 5 个基本特征, 本研究以化学成分的可测性和有效性为依据, 从 24 个潜在 Q-marker 中进一步筛选。

根据潜在 Q-marker 的有效性进行筛选。网络药理学分析得到 24 种化学成分均可作用于 RA 相关靶点, 通过多成分-多靶点-多通路发挥治疗 RA 的作用, 这与文献关于白藜芦醇、芹菜素、两面针生物碱、欧前胡素、蛇床子素、芳樟醇具有多种有利于治疗 RA 的药效活性的报道一致^[9,13-17], 但是银松素、葫芦巴碱等节点度低, 可考虑去除。

根据潜在 Q-marker 的可测性进行筛选。除银松素、异丹叶大毒素、异紫花前胡苷、异紫花前胡内酯、木兰花碱 5 种成分因没有对照品无法定量外, 其余成分均可以作为四方藤小复方的 Q-marker, 其中岩白菜素、氯化两面针碱、蛇床子素、芳樟醇分别是四方藤、两面针、独活、千年健药材的指标成分^[18], 白藜芦醇、欧前胡素、乙氧基白屈菜红碱是相应药材中含量较高的可测性成分^[19-21]。综合考虑 Q-marker 的有效性、可测性^[22-24]以及成分的丰度, 去掉 degree 值靠后的以及无法定量的成分后, 本研究将岩白菜素、白藜芦醇、氯化两面针碱、蛇床子素、芳樟醇、欧前胡素、乙氧基白屈菜红碱、芹菜素、黄连碱、橙皮苷、芝麻素共 11 个化学成分作为四方藤小复方治疗 RA 的 Q-marker。

3 讨论

3.1 四方藤小复方的主要作用靶点是 PTGS2

RA 中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 促进小分子炎症介质的释放, 抑制各种生长因子对软骨细胞的促有丝分裂作用, 最终导致软骨破坏。IL-10 是促炎细胞因子的负调节因子, 可减少促炎细胞因子释放^[25]。TNF- α 是 RA 病理生理学的核心细胞因子, 具有促炎作用, 它在 RA 中的关键作用已通过用 TNF 抑制剂治疗 RA 患者的临床试验结果得到证实^[26]。JUN 与成骨细胞增殖和破骨细胞的分化、成熟及功能密切相关, 对骨形成和骨吸收的动态平衡的维持有重要作用。趋化因子 CCL2 则通过使炎性细胞迁移至病变的关节滑膜而参与 RA 的病态形成过程。MMPs 是一组蛋白水解酶家族, 被激活的 MMPs 会引起细胞外基质的降解导致组织破坏, 炎症、肿瘤的浸润、转移、血管新生以及其他炎症反应, 证实在 RA 大鼠滑膜组织中 MMP-1、MMP-2、MMP-9 等 MMPs 家族含量较高^[27-28]。PTGS2 即环氧合酶 (COX-2), 是前列腺素合成的主要限速酶, 可被多种炎性介质及细胞因子诱导大量表达, 参与组织炎症过程及细胞的分化增殖过程。本研究结果证实四方藤小复方提取物降低 RA 大鼠血清 IL-1 β 和 TNF- α 水平, 网络药理学预测四方藤小复方中部分已知的化学成分可作用于 MAPK1、MAPK3、MAPK8、IL1B、IL2、IL6、IL10、TNF、VEGFA、PTGS2、CCL2、JUN、MMP1、MMP2、MMP9 等 74 个靶点。值得注意的是, 四方藤小复方中 24 个关键药效成分中有 23 个

成分作用于 PTGS2, 是众多靶点中最重要的一个。综合上述, 提示四方藤小复方中的化学成分可作用于 PTGS2 为主的多个靶点, 有利于减少前列腺素的生成, 控制关节炎症的发展和关节的破坏^[29], 这一点在 RA 大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 水平得到了验证。

3.2 四方藤小复方可能通过调控 RA 通路、TNF 通路缓解 RA 炎症

RA 通路包含 T 细胞受体信号通路、Toll 受体信号通路、VEGF 信号通路及破骨细胞分化和 Th17 细胞分化均与调节免疫和炎症相关。其中, T 细胞介导的免疫反应异常是 RA 的主要发病机制, 在病变的滑膜组织中, 血管周围聚集着大量激活状态的 T 淋巴细胞, 活化的 T 淋巴细胞与滑膜巨噬细胞直接作用, 分泌细胞因子, 刺激滑膜细胞释放胶原酶和蛋白酶, 造成软骨和骨损害; Toll 受体信号通路在识别病原微生物的基础上直接触发胞内杀菌机制或者诱导免疫炎症因子产生以扩大非特异性防御, 研究提示 RA 患者病变组织中 Toll 受体表达增加^[30]; 滑膜炎中最早观察到的现象之一是新生血管形成, VEGF 是参与调控血管新生的关键分子, 血管生成可以促进炎症细胞渗入关节导致滑膜增生和进行性骨破坏^[31]; VEGF 信号通路在关节炎中抑制细胞因子的表达, 减少胶原蛋白的产生、抑制滑膜细胞增殖、减弱侵袭能力等。此外, RA 的发生和发展与 TNF 信号通路中 IL6、IL1 β 、TNF 和 PTGS2 的异常表达有关。从本研究结果可见, 四方藤小复方参与调控的主要的信号通路有细胞因子-细胞因子受体相互作用通路、RA 通路、TNF 通路等, 其中以炎症信号通路为主, 提示四方藤小复方通过炎症通路缓解 RA。

3.3 岩白菜素、白藜芦醇等 11 种化合物可作为四方藤小复方的 Q-marker

中药复方具有多成分、多途径、多靶点协同作用的特点, 中药整体性作用的特性使得中药复方的作用机制、药效成分尚不清楚, 中药制剂质量难以准确评价、控制。中药 Q-marker 是存在于中药材、饮片、提取物以及中药制剂中的与功效密切有关的成分, 是可以溯源、定性和定量的关键药效物质^[32]。网络药理学技术的发展, 便于研究者更有效地通过复杂的“中药成分-疾病”网络, 筛选出治疗疾病的核心药效成分, 阐明复方的作用机制, 同时也能通过成分关联药效, 预测 Q-marker。白藜芦醇属于多酚类物质, 是买麻藤和四方藤共有成分, 能够减缓炎症因子对关节滑膜的侵害、抑制滑膜细胞增殖、

促进滑膜细胞凋亡、保护骨和关节软骨, 也具有抗氧化和免疫抑制作用^[33]。买麻藤中芹菜素除抗炎、抗氧化作用外还能调节 Th1 与 Th2 细胞之间的动态平衡^[34], 维持机体正常的免疫功能。两面针生物碱类的抗炎、抗肿瘤效果显著, 与两面针活血化瘀、解毒消肿相关^[35]。香豆素类则是独活治疗 RA 的药效物质基础, 比如欧前胡素通过抑制炎症因子和影响外周的致痛因子发挥抗炎镇痛作用^[36], 异紫花前胡内酯可下调 COX-2^[37], 蛇床子素具有调节免疫系统作用^[20]。芳樟醇是千年健挥发油成分之一, 具有抗炎、镇痛、抗肿瘤作用^[38], 与其祛风湿、壮筋骨相关。本研究从 Q-marker 的有效性、可测性以及成分的丰度, 去掉 degree 值靠后的以及无法定量的成分后, 得到 11 个化学成分可作为四方藤小复方治疗 RA 的 Q-marker, 是合理的, 但是需要进一步开展 11 种 Q-marker 的相关验证研究。

RA 为慢性炎性自身免疫性疾病, 发病机制复杂。本研究结果提示该病与多靶点、RA 通路为主的多信号通路异常有关, 发病机制具有多靶点、多通路的特点。在一定程度上解释了临床上针对疾病单一靶点的治疗无良好效果的现象。中药治疗疾病则具有多成分、多靶点、多通路的作用特点与优势, 在中药中寻找治疗 RA 的药物是研究热点。在中药复方的质量控制方面, 进行合理、准确的质量控制是难点。本研究发现四方藤小复方具有良好的减轻 RA 炎症水平的作用, 采用网络药理学技术发现, 四方藤小复方可能是通过白藜芦醇等 24 种化学成分, 作用于 PTGS2 为主的 89 个靶点, 通过调节 RA 通路、TNF 通路, 减少 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等促炎因子的释放, 提高内源性抗炎物质的产生, 抑制基质金属蛋白酶、蛋白激酶和趋化因子的表达从而限制炎症损伤, 调节组织修复。同时, 还预测了岩白菜素、白藜芦醇等 11 种成分可作为四方藤小复方的 Q-marker。本研究结果体现了四方藤小复方治疗 RA 的多成分、多靶点、多通路的作用机制与优势, 并为四方藤小复方的质量控制及新药开发提供了依据。

参考文献

- [1] Smolen J S, Aletaha D, McInnes I B. Rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2016, 388(10055): 2023-2038.
- [2] McInnes I B, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *New Engl J Med*, 2011, 365(23): 2205-2219.
- [3] Bartok B, Firestein G S. Fibroblast-like synoviocytes: Key effector cells in rheumatoid arthritis [J]. *Immunol Rev*, 2010, 233(1): 233-255.

- [4] 贾冬梅, 何小鹏, 姜 淼, 等. 基于网络药理学预测独活治疗类风湿关节炎的分子机制 [J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(10): 1838-1841.
- [5] 罗 远, 叶 云, 赵晓芳, 等. 瑶药四方藤提取物对类风湿关节炎模型大鼠滑膜组织的影响 [J]. 中药材, 2013, 36(12): 2000-2003.
- [6] 白洪宇. 大鼠类风湿性关节炎实验模型的建立与评价 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2009.
- [7] 池翠云, 王 锋, 雷 婷, 等. 瑶药四方藤化学成分研究 [J]. 中药材, 2010, 33(10): 1566-1568.
- [8] 文 屏, 李加福, 高咏莉, 等. 两面针中白屈菜红碱等成分的抗炎活性研究 [J]. 今日药学, 2018, 28(4): 217-232.
- [9] 赵美荣. 藏药独活中蛇床子素的提取分离及抑菌活性研究 [D]. 兰州: 中国科学院研究生院近代物理研究所, 2014.
- [10] 何 丹. 千年健质量标准、药效物质及作用机理研究 [D]. 成都: 电子科技大学, 2018.
- [11] 白隆博, 马逍遥, 常念伟, 等. 基于整合网络药理学和化学物质组学的灯台叶片的抗炎作用机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(16): 3861-3867.
- [12] 刘妍如, 唐志书, 宋忠兴, 等. 多元统计及“成分-靶点-疾病”在线关联分析脑心通胶囊中质量标志物 [J]. 中草药, 2018, 49(12): 2775-2785.
- [13] 汪陶荣, 张 晔, 曹 威, 等. 白藜芦醇通过下调 MnSOD 诱导类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(4): 489-494.
- [14] 鄂裘恺, 谢焕松, 周鸣鸣. 芹菜素镇痛消炎作用研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(7): 145-146.
- [15] 秦舒琴, 李海云, 宋静茹, 等. 氯化两面针碱的提取分离、全合成及药理活性的研究进展 [J]. 广西植物, 2018, 38(9): 1248-1260.
- [16] 胡 荣. 白芷中欧前胡素提取分离及主要药效学研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2010.
- [17] 姜冬梅, 朱 源, 余江南, 等. 芳樟醇药理作用及制剂研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(18): 3530-3533.
- [18] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [19] 罗 培, 黄华奎, 黄 俊, 等. HPLC 法测定四方藤中岩白菜素和白藜芦醇的含量 [J]. 广西师范大学学报, 2014, 32(1): 91-94.
- [20] 顿珠次仁, 朱根华, 邹志琴, 等. 液-质联用测定不同产地独活中蛇床子素和欧前胡素的含量 [J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26(1): 105-108.
- [21] 何丽丽, 夏祥华, 陈乾平, 等. 基于液质联用的栽培两面针不同部位生物碱成分的比较分析 [J]. 当代化工, 2018, 47(12): 2568-2575.
- [22] 刘昌孝. 发展中药质量标志物 (Q-marker) 理论方法和策略, 研究提升中药科学技术水平 [J]. 药学学报, 2019, 54(2): 185-186.
- [23] 张铁军, 白 钢, 刘昌孝. 中药质量标志物的概念、核心理论与研究方法 [J]. 药学学报, 2019, 54(2): 187-196.
- [24] 郭 锐, 苏 瑾, 李志雄, 等. 基于网络药理学及 ADME 预测分析血脂灵片治疗血脂异常的 Q-marker [J]. 中成药, 2019, 41(1): 63-69.
- [25] Saxena A, Khosraviani S, Noel S, *et al.* Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy [J]. *Cytokine*, 2015, 74(1): 27-34.
- [26] Noack M, Miossec P. Selected cytokine pathways in rheumatoid arthritis [J]. *Semin Immunopathol*, 2017, 39(4): 365-383.
- [27] 黄同列. CYR61 介导 DDR2 过分泌 MMP1 的分子机制及其在 RA 滑膜细胞侵袭中的作用研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2015.
- [28] 曾 肆, 谭 谦, 童 妍. 汝无糯鸡抗类风湿性关节炎的机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(2): 146-151.
- [29] Lee C M, Gupta S, Wang J, *et al.* Epithelium-specific Ets transcription factor-1 acts as a negative regulator of cyclooxygenase-2 in human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. *Cell Biosci*, 2016, 6(1): 43-54.
- [30] 姚茹冰, 王圆圆, 蔡 辉. Toll 样受体与类风湿关节炎相关性研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(9): 1287-1289.
- [31] Elshabrawy H A, Chen Z, Volin M V, *et al.* The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis [J]. *Angiogenesis*, 2015, 18(4): 433-448.
- [32] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [33] Torre E. Molecular signaling mechanisms behind polyphenol-induced bone anabolism [J]. *Phytochem Rev*, 2017, 16(6): 1183-1226.
- [34] 张 洁, 刘 巍, 朱新辉, 等. 针刺配合芹菜素治疗对胶原诱导性关节炎小鼠 Th1/Th2 细胞亚群的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(5): 1353-1355.
- [35] Li C, Wang M H. Potential biological activities of magnoflorine: A compound from *Aristolochia debilis* Sieb. et Zucc [J]. *Korean J Plant Res*, 2014, 27(3): 223-228.
- [36] 胡 荣. 白芷中欧前胡素提取分离及主要药效学研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2010.
- [37] 张 芬, 王颖楠. 异紫花前胡内酯对妊娠糖尿病大鼠主动脉血管收缩及 AT1R、AT2R、COX-1、COX-2 表达的影响 [J]. 中国药师, 2019, 22(4): 649-655.
- [38] 周 诚, 麦惠环. 越南产千年健挥发油成分分析 [J]. 中药材, 2002, 25(10): 719-720.