

• 药理与临床 •

分子对接结合网络药理学研究桂枝芍药知母汤治疗类风湿关节炎的分子作用机制

张青¹, 徐月⁴, 彭伟¹, 刘佳¹, 李若兰¹, 邓婷¹, 高永翔³, 蒲旭峰^{1,2*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137
2. 成都市食品药品检验研究院, 四川 成都 610000
3. 成都中医药大学基础医学院, 四川 成都 611137
4. 成都中医药大学附属医院, 四川 成都 610072

摘要: 目的 利用分子对接和网络药理学的方法预测桂枝芍药知母汤治疗类风湿关节炎的主要活性成分和作用靶点, 结合中医方解配伍理论对其多成分-多靶点-多通路的作用进行分析。方法 在 TCMSP、TCM-Datebase@Taiwan、PubChem Compound 数据库收集桂枝芍药知母汤中 9 味中药(桂枝、芍药、知母、甘草、麻黄、生姜、白术、防风、附子)的主要化学成分。通过 DrugBank、TTD 数据库查找与类风湿关节炎治疗相关的蛋白靶点, 并上传到 String 在线数据库, 构建蛋白相互作用网络关系。在 PDB 数据库下载合适的蛋白靶点晶体结构, 采用 Discovery studio 4.5.0 软件进行化合物与靶点的分子对接, 利用 Cytoscape 3.6.1 软件, 构建药物-化合物-靶点可视化网络, 阐释桂枝芍药知母汤抗类风湿关节炎的主要作用机制。结果 分子对接结果显示桂枝芍药知母汤中存在 316 个潜在的抗关节炎活性成分, 作用于 26 个靶点, 其中 MAPK1、ZADH2、P38、AKR1C2、DHODH、CA2、MMP3、MMP9、RANKL 等蛋白是主要作用靶点。生物功能和通路分析提示, 桂枝芍药知母汤的作用机制主要涉及骨吸收(28%)、组蛋白激酶活性(20%)、肽基酪氨酸磷酸化(20%)、前列腺素代谢过程(12%)等生物过程。作用通路主要是破骨细胞的分化(94.12%)。结论 采用分子对接结合网络药理学的方法, 从多靶点多途径的角度研究桂枝芍药知母汤治疗类风湿关节炎的药效物质基础及分子机制, 为更好的临床用药提供参考和依据。

关键词: 桂枝芍药知母汤; 类风湿关节炎; 分子对接; 网络药理学; 作用机制; 作用靶点; 桂枝; 芍药; 知母; 甘草; 麻黄; 生姜; 白术; 防风; 附子

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)18-4673-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.18.010

Molecular docking combined with network pharmacology to study molecular mechanism of Guizhi Shaoyao Zhimu Decoction in treatment of rheumatoid arthritis

ZHANG Qing¹, XU Yue⁴, PENG Wei¹, LIU Jia¹, LI Ruo-lan¹, DENG Ting¹, GAO Yong-xiang³, PU Xu-feng^{1,2}

1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China
2. Chengdu Municipal Institute for Food and Drug Control, Chengdu 610000, China
3. School of Basic Medical Sciences, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China
4. Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China

Abstract: Objective To predict the active constituents and targets of Guizhi Shaoyao Zhimu Decoction (GSZD) in the treatment of rheumatoid arthritis by using molecular docking and network pharmacology, and to analyze the effect of multi component-multi target-multi pathway combined with the theory of compatibility of TCM prescriptions. **Methods** The main chemical constituents of

收稿日期: 2019-07-12

基金项目: 国家科技重大专项课题 (2018ZX09721004-009-002)

作者简介: 张青 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂质量评价。E-mail: zhangqcducm@163.com

*通信作者 蒲旭峰 (1963—), 男, 博士生导师, 研究方向中药品质和安全性评价研究。E-mail: Pxf68@263.net

nine kinds of Chinese herbal medicines (*Cinnamomi Ramulus*, *Paeoniae Radix Alba*, *Anemarrhenae Rhizoma*, *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, *Ephedrae Herba*, *Zingiberis Rhizoma Recens*, *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*, *Saposhnikoviae Radix* and *Aconiti Lateralis Radix Praeparata*) were collected from TCMSP, TCM-Datebas@Taiwan and PubChem Compound database. The protein targets to the treatment of rheumatoid arthritis are found through DrugBank and TTD databases and uploaded to the String online database to build the network relationship of protein interaction. Appropriate crystal structures of protein targets were downloaded from PDB database, and molecular docking between compounds and targets was performed by using Discovery studio 4.5.0 software. A drug-compound-target visualization network was constructed by using Cytoscape 3.6.1 software to elucidate the main mechanism of GSZD against rheumatoid arthritis. **Results** The results of molecular docking showed that there were 316 potential anti-arthritis active components in GSZD, acting on 26 targets, among which MAPK1, ZADH2, P38, AKR1C2, DHODH, CA2, MMP3, MMP9, RANKL, and other proteins were the main targets. Biological function and pathway analysis indicated that the mechanism of GSZD mainly involved in bone absorption (28%), histone kinase activity (20%), peptide tyrosine phosphorylation (20%), prostaglandin metabolism (12%), and other biological processes. The main pathway was osteoclast differentiation (94.12%). **Conclusion** In this study, molecular docking combined with network pharmacology was used to study the pharmacodynamic material basis and molecular mechanism of GSZD in the treatment of rheumatoid arthritis from the perspective of multi-target and multi-approach, providing reference and basis for better clinical use.

Key words: Guizhi Shaoyao Zhimu Decoction; rheumatoid arthritis; molecular docking; network pharmacology; mechanism of action; target of action; *Cinnamomi Ramulus*; *Paeoniae Radix Alba*; *Anemarrhenae Rhizoma*; *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; *Ephedrae Herba*; *Zingiberis Rhizoma Recens*; *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*; *Saposhnikoviae Radix*; *Aconiti Lateralis Radix Praeparata*

桂枝芍药知母汤 (Guizhi-Shaoyao-Zhimu Decoction, GSZD) 又名桂芍知母汤, 始载于《金匮要略》, 书中记载“诸肢节疼痛, 身体尪羸, 脚肿如脱, 头眩短气, 温温欲吐, 桂枝芍药知母汤主之”^[1]。古代医家常对 GSZD 进行加减化裁, 以治疗寒热错杂证及历节痛风等痹症, 现代中医临床上也将 GSZD 作为治疗类风湿关节炎 (RA) 的首选方和基础方^[2-4]。现代药理学研究也证实 GSZD 在抗炎镇痛、抑制滑膜增生和减少血管翳形成等方面均表现出良好的药理活性^[5-6]。中药治疗疾病具有多成分、多靶点的特点, 疗效确切, 不良反应相对较少, 同时价格低廉, 越来越受药学工作者的关注。然而, 也正是中药具有的多成分多靶点特点, 使其作用机制的研究遭遇瓶颈, 影响其在全世界范围的应用和推广。目前大量的研究报道证明运用分子对接、网络药理学等计算机模拟方法, 可以成功预测中药活性成分、作用靶点及作用机制, 节约药物开发成本, 也为中医药物质基础和机制研究提供了新策略^[7]。尽管 GSZD 的临床疗效得到现代中医的认可, 但目前的研究主要集中在其临床研究、化学成分等方面, GSZD 治疗 RA 的药效物质基础及分子作用机制的研究报道很少, 限制了 GSZD 的进一步开发和利用。因此, 本研究基于分子对接结合网络药理学的策略, 分析 GSZD 的主要活性成分和潜在靶标, 以期阐释其可能的药效物质基础和分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 数据库及软件

中药系统药理学分析数据库 TCMSP (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>); TCM-Datebase@Taiwan 数据库 (TCMD, <http://tcm.cmu.edu.tw>); PubChem Compound 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>); NCBI 数据库; Chemicalbook 数据库; DrugBank 数据库 (<http://www.drugbank.ca>); Treatment Targets Database 数据库 (TTD, <http://bidd.nus.edu.sg>); PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org>); UniProt 数据库 (<http://www.rcsb.org>); String 在线数据库 (<https://string-db.org>); Discovery studio 4.5.0 软件 (DS); ChemDraw 15.0 软件; Cytoscape 3.6.1 软件。

1.2 建立 GSZD 小分子化合物数据库

通过搜索 TCMSP、TCMD、PubChem 等数据库, 寻找 GSZD 中 9 味中药材 (桂枝、芍药、知母、甘草、麻黄、生姜、白术、防风、附子) 的小分子化合物, 同时进行了文献挖掘和补充, 保证检索的科学性和完整性。最终共得到了 577 个小分子化合物, 所有化合物的结构式均在 NCBI、PubChem、Chemicalbook 进行检索下载, 或使用 Chemdraw 软件进行绘制, 所有文件均保存为 .mol 格式文件。将所有化合物的 .mol 文件导入 DS 软件中, 利用软件中的 Filter 模块对化合物进行初步筛选, 过滤成药性和类药性较差的化合物, 最终筛选得到活性较

好的 373 个小分子化合物。筛选出的 373 个化合物进行加氢，质子化，能量最小化等优化处理，生成有效的单一三维构象，即为自行构建的小分子化合物库。

1.3 建立类风湿关节炎蛋白靶点数据库

利用“类风湿关节炎”“关节炎”“ICD10: M10”等关键词在 DrugBank、TTD 数据库中寻找与 RA 治疗相关的蛋白靶点。同样，通过文献检索和挖掘对蛋白靶点库进行验证和补充，确保找到的靶点都有相关文献报道，保证靶点的科学合理和完整，蛋白的标准名称通过 UniProt 数据库确定。最后，根据蛋白质的物种来源，是否存在 protein-ligand 复合物，以及晶体结构测定方法等信息在 PDB 数据库中下载 26 个带有配体的人源蛋白复合物晶体结构。

1.4 分子对接

将下载的蛋白靶点导入 DS 软件，首先利用软件中 Clean Protein 模块优化蛋白：去除蛋白结构的水分子，对蛋白分子进行加氢，对非标准名称、非完整的氨基酸及某一残基同时存在多个构象等一系列问题进行矫正。以靶点的原型配体所在位置为中心定义为活性对接口袋位点，口袋大小设为 1.0 nm，其他参数选择系统默认值。将小分子数据库导入 DS 软件中，利用 Ligand Docking 模块，进行分子对接，靶点蛋白自带配体 Docking 评分设置为阈值。

1.5 药物-成分-靶点网络的建立

根据分子对接结果，Docking 评分高于阈值的小分子视为该靶点的可能活性分子，将最终得到的分子-靶蛋白数据对导入 Cytoscape 软件中，构建中药-分子-蛋白靶点互作网络。在网络中，节点表示中药，化合物和靶蛋白，边缘表示化合物与靶蛋白、中药之间的相互作用。通过 network analyzer 插件对网络结构进行分析，并计算网络参数，包括网络度 (degree)、介数以及紧密中心度，得到 GSZD 中主要的活性成分及其主要作用靶点等信息，进一步科学合理的阐释其治疗 RA 的分子作用机制。

1.6 靶点通路分析

将蛋白靶点信息导入 Cytoscape 软件中，利用 ClueGO+CluePedia 插件，对所有蛋白进行 GO 生物功能和 KEGG 信号通路富集分析。

1.7 建立 PPI 蛋白互作网络

将下载的 26 个蛋白导入 String 在线数据库，限定物种来源为人源，其他设置为默认，既得到这些靶点间的互作网络关系 (PPI)。

2 结果与分析

2.1 活性化合物

通过数据库检索和文献挖掘，总共收集到 GSZD 中 577 个化合物，其中桂枝 73 个、白芍 50 个、知母 69 个、甘草 63 个、麻黄 79 个、生姜 66 个、白术 71 个、防风 37 个、附子 69 个。通过 DS 软件进行类药性和成药性筛选，最终确定 373 个化合物作为候选化合物。此外，本实验还计算了各候选化合物的相对分子质量 (M_w)、脂水分配系数 (AlogP)、氢键供体数 (HBD)、氢键受体数 (HAD)、可旋转键数 (NRB) 和极性表面积 (PSA) 等参数，分析结果表明所有筛选后保留的化合物具有良好的类药属性，具有良好的成药性 (表 1)。

表 1 潜在活性成分的主要分子参数

Table 1 Main molecular parameters of potential active components

分子参数	平均值	最小值	最大值	中位值
M_w	236.47	103.12	568.31	250.29
AlogP	2.12	-2.41	8.28	2.19
HBD	2.02	0.00	6.00	1.00
HAD	3.28	0.00	10.00	3.00
NRB	2.27	0.00	10.00	2.00
PSA/nm ²	0.37	0.00	1.51	0.48

2.2 药物-分子-靶点网络分析

根据分子对接结果，保留 Docking 评分高于靶点晶体的原型配体评分的化合物并将其视为 GSZD 的可能活性分子。最终共得到 1 867 个分子-靶点数据对，其中包括 316 个化合物 (桂枝 34 个、白芍 17 个、知母 33 个、甘草 43 个、麻黄 40 个、生姜 30 个、白术 53 个、防风 29 个、附子 37 个)，26 个蛋白靶点。将数据对导入 Cytoscape 软件中，得到药物-成分-靶点的网络图，结果见图 1。所有蛋白信息见表 2，化合物信息见表 3 (表 3 仅列出 degree ≥ 10 的活性化合物)。图 1 中圆形节点代表化合物，菱形节点代表药物，三角形节点代表的是蛋白靶点，节点的大小和颜色深浅表示度的大小。通过分析发现 GSZD 的活性成分主要作用 ZADH2、P38、AKR1C2、DHODH、CA2、MMP3、MMP9、RANKL 等靶点，部分对接结果见图 2 (仅选取 degree ≥ 180 的靶点及其中 docking 评分最高的化合物)，对接分数最高的小分子化合物几乎完全包裹于活性口袋中。同时可以看出同一个成分可以作用多个靶点，

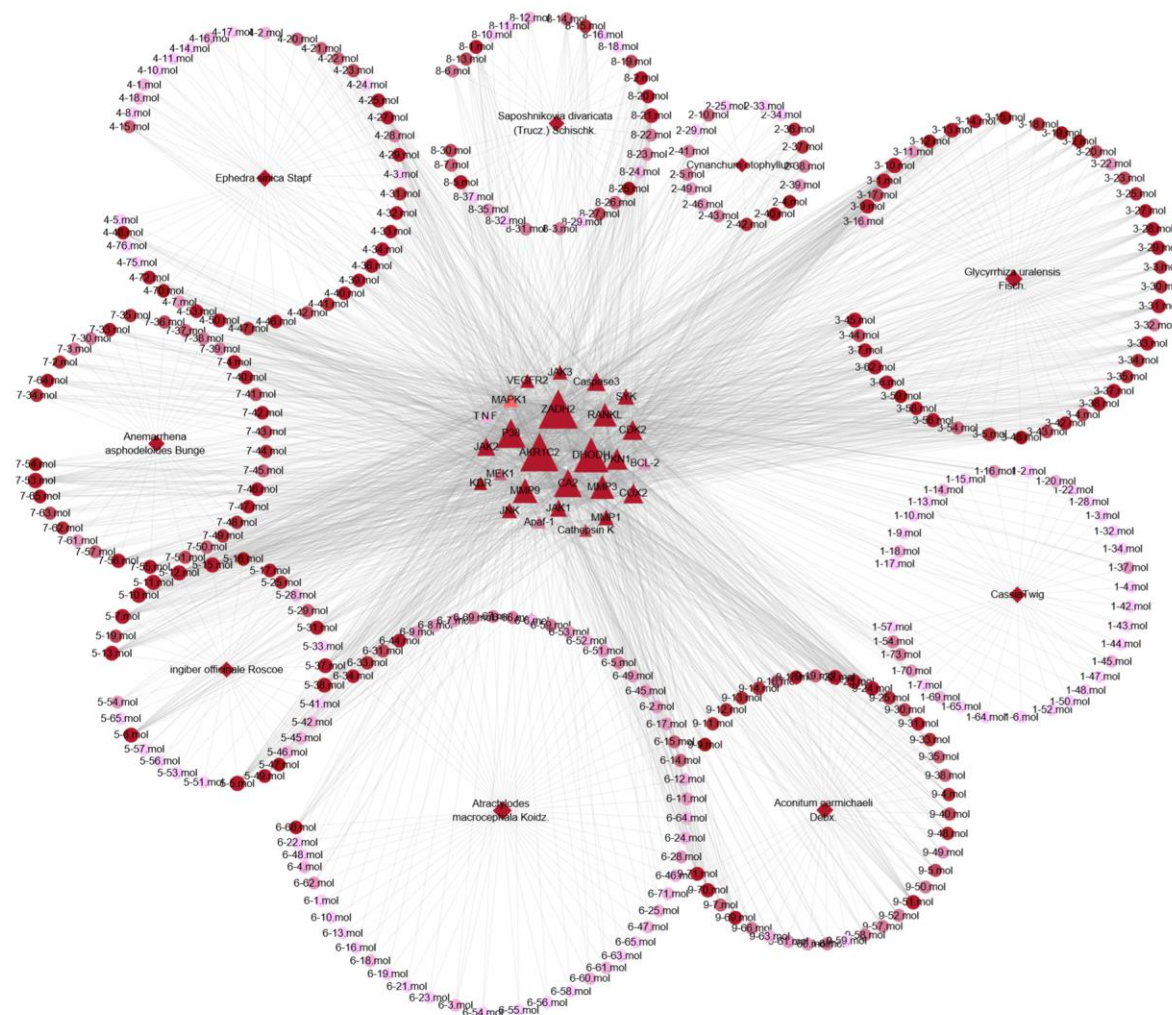


图1 药物-分子-靶点网络

Fig. 1 Herbal-molecular-target network

提示 GSZD 可以通过多成分, 多靶点来实现改善 RA 患者病情。

2.3 生物功能和通路分析

利用 ClueGO+Clue 对靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 通路分析, 结果见图 3。GO 分析结果显示 GSZD 的活性成分作用的相关蛋白基因主要富集到 3 个分子功能和 22 个生物学过程, 主要涉及骨吸收 (28%)、组蛋白激酶活性 (20%)、肽基酪氨酸磷酸化 (20%)、前列腺素代谢过程 (12%) 等生物过程, 表明 GSZD 可以通过参与多种生物学过程来发挥抗 RA 的作用 (表 4)。KEGG 通路富集分析共得到 17 条有显著意义的通路 ($P \leq 0.05$, $FDR < 0.05$), 主要相关疾病是 RA (5.88%), 可能的作用通路是破骨细胞的分化 (94.12%)。同时, 我们还发现 GSZD 的活性成分也参与了乙型肝炎、Th1 和 Th2 细胞分化、IL-17 信号通路、前列腺癌、Th17 细胞分化等

信号通路, 提示 GSZD 还存在治疗其他疾病的活性潜力 (表 5)。

2.4 蛋白靶点的及蛋白互作网络

根据最初的检索策略, 本实验共得到 342 个与 RA 相关的蛋白靶点, 但根据筛选条件, 只在 PDB 数据库下载了 26 个蛋白晶体结构, 相关信息见表 2。将这些靶点导入 String 数据库中, 得到蛋白互作网络 (某些蛋白与其它蛋白无相互作用未在网络中显示), 见图 4。图节点代表蛋白, 边代表蛋白之间的相互关系。互作网络共包含 22 个节点, 88 条边, 所有的靶点均为彩色的, 提示这些靶点存在直接的相互关系, 同时边的粗细表示数据证据支撑的强度。

3 讨论

RA 是一种慢性、侵袭性的免疫系统疾病, 其发病原因复杂, 具体机制尚不明确。RA 会导致关节畸形和功能退化, 严重者完全丧失劳动能力, 被

表 2 蛋白靶点信息
Table 2 Protein target information

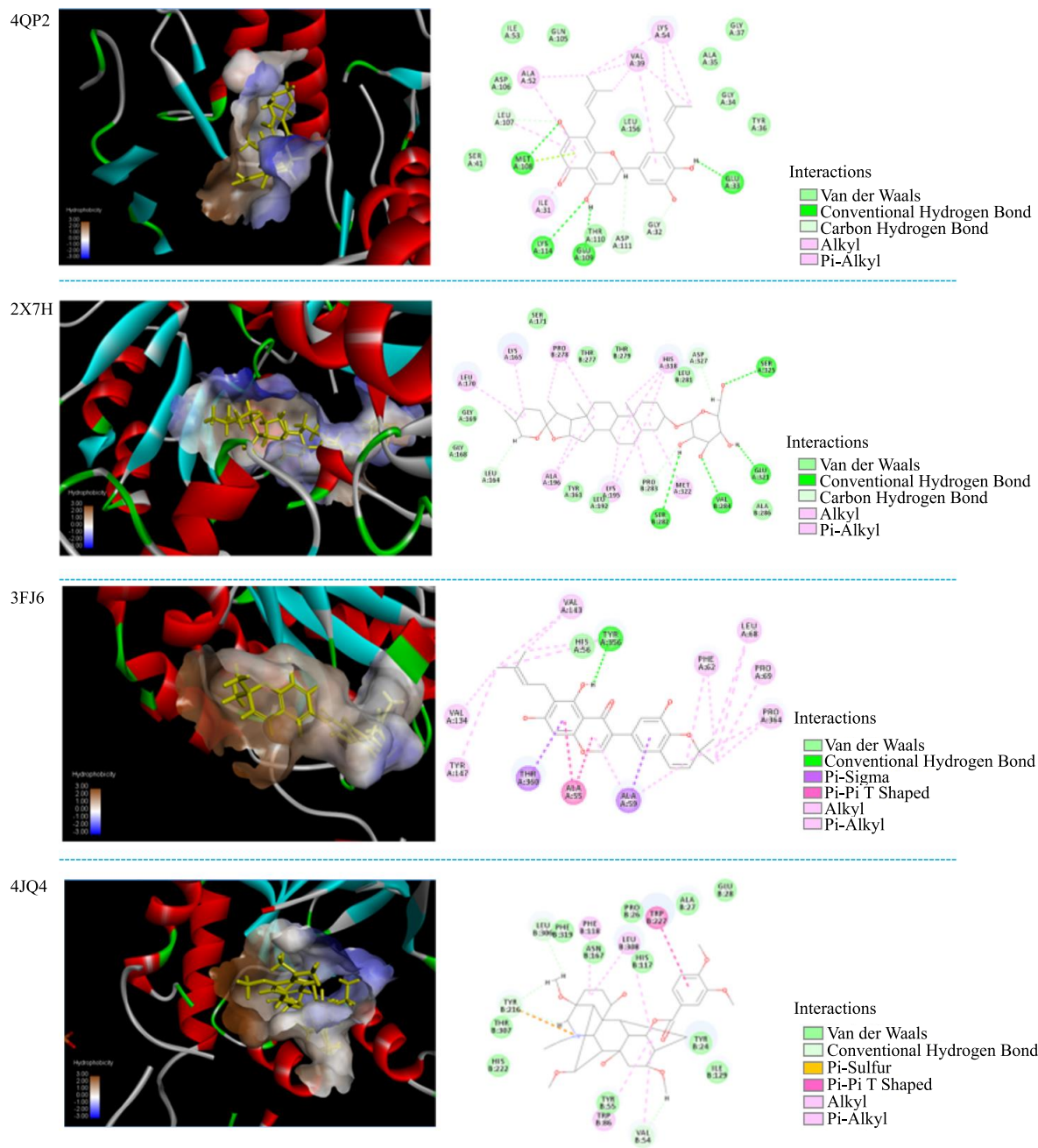
Uniport ID	PDB ID	蛋白靶点	缩写	度	介数	紧密中心性
Q8N4Q0	2X7H	前列腺素还原酶 3	ZADH2	219	0.160 794	0.605 536
P35968	4ASE	血管内皮生长因子受体 2	VEGFR2	14	0.000 191	0.350 701
P1375	2AZ5	肿瘤坏死因子	TNF- α	2	0.000 001	0.340 467
P43405	3SRV	酪氨酸受体激酶 SYK	SYK	31	0.001 193	0.364 583
Q14788	3URF	肿瘤坏死因子配体超家族成员 11	RANKL	91	0.064 886	0.419 664
Q16512	4OTI	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 N1	PKN1	72	0.010 343	0.400 458
Q15759	1OUY	丝裂原激活蛋白激酶 11	P38	137	0.044 582	0.469 169
P14780	1GKC	基质金属蛋白酶 9	MMP9	101	0.023 431	0.427 873
P8254	4G9L	基质金属蛋白酶 3	MMP3	93	0.016 352	0.420 673
P3956	3AYK	基质金属蛋白酶 1	MMP1	25	0.000 734	0.359 343
Q2750	1S9J	双特异性丝裂原激活蛋白激酶激酶 1	MEK1	5	0.000 011	0.341 131
P28482	4QP2	丝裂原激活蛋白激酶 1	MAPK1	236	0.413 462	0.643 382
P35968	4JQ4	血管内皮生长因子受体 2	KDR	8	0.000 107	0.345 850
P45983	3PTG	丝裂原激活蛋白激酶 8	JNK	25	0.000 774	0.359 343
P52333	3PJC	酪氨酸受体激酶	JAK3	18	0.000 387	0.353 535
O60674	4BBE	酪氨酸受体激酶	JAK2	48	0.003 889	0.379 610
P23458	3EYG	酪氨酸受体激酶	JAK1	37	0.001 831	0.369 198
Q2127	3FJ6	二氢乳清酸脱氢酶	DHODH	182	0.087 760	0.536 810
P403	5KIR	细胞色素 c 氧化酶	COX2	62	0.005 979	0.390 625
P24941	1PYE	细胞周期蛋白依赖性激酶 2	CDK2	61	0.006 647	0.390 625
P43235	4DMY	组织蛋白酶 K	Cathepsin K	6	0.000 034	0.345 168
P42574	2XYG	半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3	Caspase3	49	0.004 185	0.380 435
P918	2AW1	碳酸酐酶 2	CA2	126	0.035 978	0.456 919
P10415	6GL8	细胞凋亡调节受体	BCL-2	3	0.000 009	0.341 797
O14727	1Z6T	凋亡蛋白酶活化因子 1	Apaf-1	4	0.000 012	0.341 131
P52895	4JQ4	醛酮还原酶家族 1 成员	AKR1C2	212	0.135 746	0.591 216

表 3 活性化合物信息
Table 3 Active compound information

编号	名称	来源	度	介数	紧密中心性
7-53	aurantiamide	知母	24	0.011 345	0.510 949
3-10	gancaonin E	甘草	23	0.000 131	0.393 701
5-10	3,5-dihydroxy-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)heptane	生姜	22	0.003 228	0.436 954
5-15	1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) hept-4-en-3-one	生姜	22	0.001 071	0.484 094
5-5	5-hydroxy-1-(3,4-dihydroxy-5-methoxyphenyl)-7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)heptan-3-one	生姜	22	0.006 829	0.506 512
5-11	5-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(3,4-dihydroxyphenyl)heptan-3-one	生姜	21	0.007 086	0.507 983
5-12	hexahydrocurcumin	生姜	21	0.001 459	0.488 145
3-1	3'-(γ,γ -dimethylallyl)-kieveitone	甘草	20	0.003 219	0.430 504
3-45	glabrol	甘草	20	0.002 259	0.495 050
5-13	3-acetoxy-1,5-epoxy-1-(3,4-dihydroxy-5-methoxyphenyl)-7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)heptane	生姜	19	0.001 718	0.490 884
5-6	5-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(3,4-dihydroxy-5-methoxyphenyl)heptan-3-one	生姜	19	0.005 394	0.496 454
5-7	1,5-epoxy-3-hydroxy-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)heptane	生姜	19	0.006 151	0.506 512

续表 3

编号	名称	来源	度	介数	紧密中心性
5-37	curcumin	生姜	18	0.000 209	0.413 223
5-38	1,5-epoxy-3-hydroxy-1-(3,4-dihydroxy-5-methoxyphenyl)-7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)heptane	生姜	18	0.000 209	0.413 223
8-21	marmesin	防风	18	0.000 421	0.401 837
3-13	gancaonins H	甘草	17	0.000 976	0.478 796
3-62	licoflavone C	甘草	17	0.000 788	0.401 837
3-31	licoricidin	甘草	16	0.001 298	0.425 273
3-33	licorisoflavan A	甘草	16	0.000 764	0.476 190
4-36	nebrodenside A	麻黄	16	0.000 879	0.477 490
9-22	14- <i>O</i> -cinnamoylneoline	附子	16	0.001 273	0.478 796
9-51	aconicarchamine B	附子	16	0.000 523	0.472 335
3-37	l-methoxyficifolino	甘草	15	0.000 764	0.476 190
3-9	gancaonin D	甘草	15	0.000 397	0.471 063
7-56	<i>n-trans</i> -feruloyltyramine	知母	15	0.002 568	0.497 866
9-70	episesamin	附子	15	0.001 644	0.484 094
3-29	lcoisoflavanone	甘草	14	0.001 122	0.485 437
3-38	lupiwighteone	甘草	14	0.002 806	0.430 504
9-23	14- <i>O</i> -anisoylneoline	附子	14	0.000 908	0.476 190
9-24	14- <i>O</i> -veratroylneoline	附子	14	0.000 121	0.392 817
3-56	licorice chalcone D	甘草	13	0.000 397	0.398 180
3-28	licocoumaron	甘草	12	0.001 464	0.426 309
5-31	6 β -hydroxystigmast-4-en-3-one	生姜	12	0.003 717	0.502 152
7-4	timosaponin AI	知母	12	0.000 490	0.472 335
7-55	<i>n-p</i> -coumaroyltyramine	知母	12	0.001 942	0.493 653
8-5	ledebouriellol	防风	12	0.000 230	0.455 137
9-71	isolariciresinol	附子	12	0.000 259	0.395 480
3-6	γ -sitosterol	甘草	11	0.000 331	0.397 276
3-7	gancaonin B	甘草	11	0.000 987	0.477 490
4-25	feruloylhistamine	麻黄	11	0.000 045	0.312 221
4-50	nebrodenside B	麻黄	11	0.000 376	0.468 541
7-40	2'- <i>O</i> -methylphlorethin	知母	11	0.001 748	0.492 264
8-1	3'- <i>O</i> -angeloyhamaudol	防风	11	0.001 582	0.484 094
9-69	sesamin	附子	11	0.001 609	0.426 309
3-14	gancaonin I	甘草	10	0.000 133	0.391 061
4-29	geranyl- β - <i>D</i> -glucopyranoside	麻黄	10	0.001 196	0.481 431
4-34	dihydroquercetin	麻黄	10	0.001 196	0.481 431
4-53	3',4',5,7-tetrahydroxyflavanone	麻黄	10	0.001 019	0.480 110
4-72	(+)-leucocyanidin	麻黄	10	0.000 072	0.398 180
5-17	(3 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-[6]-gingerdiol	生姜	10	0.000 209	0.413 223
5-49	cianidanol	生姜	10	0.000 064	0.394 589
6-44	stigmasterol	白术	10	0.000 418	0.471 063
7-65	oxy- <i>cis</i> -hinokiresinol	知母	10	0.001 581	0.490 884
8-20	(3' <i>S</i>)-hydroxydeltoin	防风	10	0.000 230	0.455 137



4QP2: MAPK1 与甘草宁-E 2X7H: ZADH2 与知母皂苷 AI 3FJ6: DHODH 与甘草宁 H 4JQ4: KDR 与 14-O-藜芦酮
4QP2: MAPK1 and gancaonin E 2X7H: ZADH2 and timosaponin AI 3FJ6: DHODH and gancaonin H 4JQ4: KDR and 14-O-veratroylneoline

图 2 部分靶点对接结果
Fig. 2 Partial target docking results

称为“不死的癌症”，同时给患者家庭和社会带来严重的负担。目前，临床上治疗 RA 的药物主要包括：非甾类抗炎药、抗风湿药（DMARDs）、糖皮质激素、免疫抑制剂及生物制剂等。但是这些现有的化学和生物药物存在一定的副作用，患者容易出现耐受性，或价格昂贵，增加患者的经济负担，难以实现长期使用^[8-10]。中药作为一种天然的替代药物用

于疾病治疗越来越受到社会各界的接受和关注，并且在慢性炎症性疾病治疗中具有很好的疗效。

在传统中医中，RA 属于“痹证”范畴，其临床表现与古典医书记载的“历节病”“白虎历节”“骨痹”“顽痹”“鹤膝风”等类似^[11]。GSZD 由桂枝、白芍、知母、甘草、麻黄、生姜、白术、防风、附子 9 味药材配伍组成，在临床上常被现代中医作为

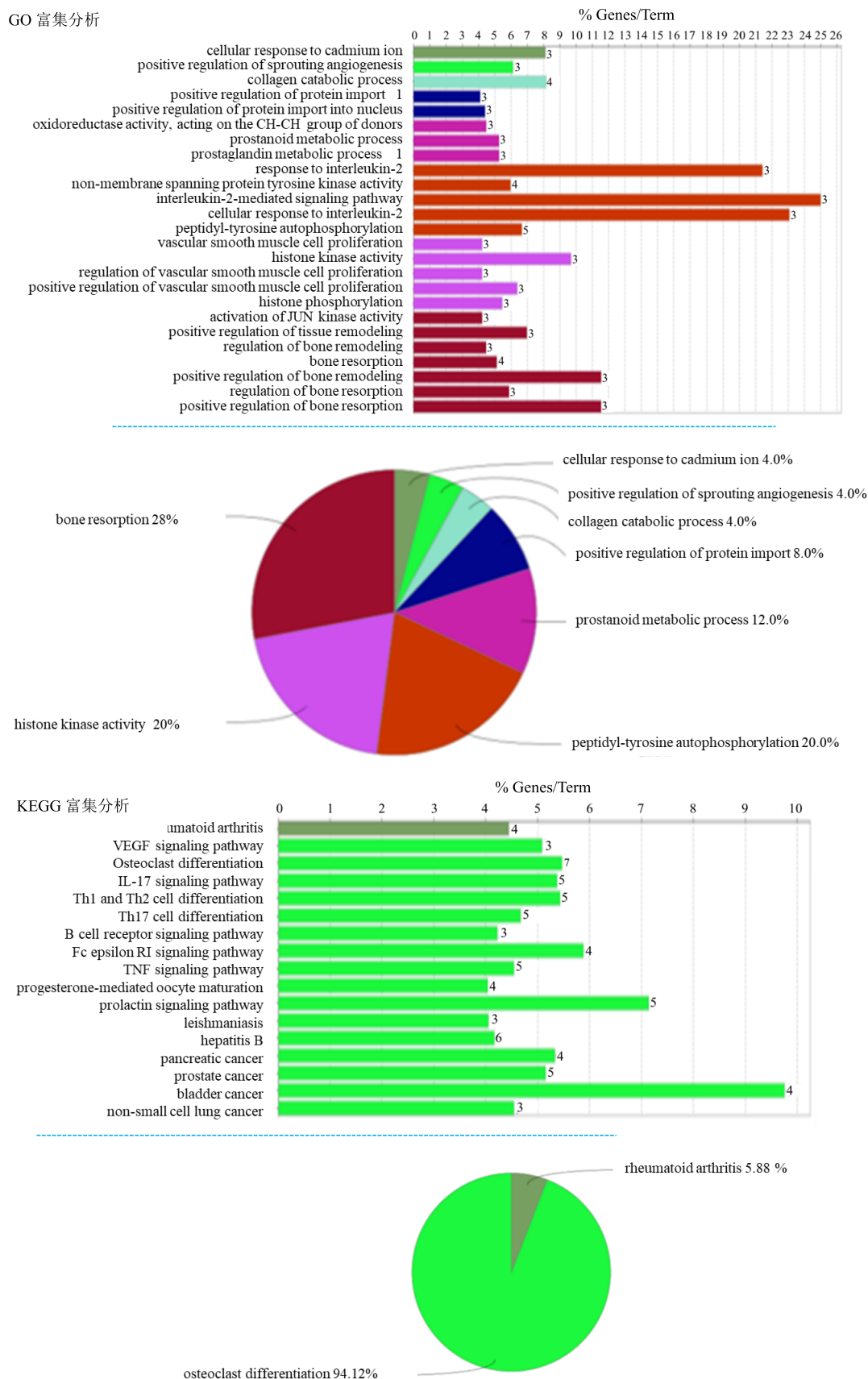


图 3 GO 富集分析和 KEGG 富集分析

Fig. 3 GO enrichment analysis and KEGG enrichment analysis

表 4 GO 富集分析结果
Table 4 GO enrichment analysis results

GO 编号	名称	主要过程	相关基因	相关基因数
GO:0035173	histone kinase activity	molecular function	CDK2, JAK2, PKN1	3
GO:0004715	non-membrane spanning protein tyrosine kinase activity	molecular function	JAK1, JAK2, JAK3, SYK	4
GO:0016627	oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors	molecular function	AKR1C2, DHODH, ZADH2	3
GO:0007257	activation of JUN kinase activity	biological process	PKN1, SYK, TNFSF11	3
GO:0034105	positive regulation of tissue remodeling	biological process	CA2, SYK, TNFSF11	3
GO:0046850	regulation of bone remodeling	biological process	CA2, SYK, TNFSF11	3
GO:0045453	bone resorption	biological process	CA2, CTSK, SYK, TNFSF11	4
GO:0046852	positive regulation of bone remodeling	biological process	CA2, SYK, TNFSF11	3
GO:0045124	regulation of bone resorption	biological process	CA2, SYK, TNFSF11	3
GO:0045780	positive regulation of bone resorption	biological process	CA2, SYK, TNFSF11	3
GO:1990874	vascular smooth muscle cell proliferation	biological process	JAK2, MMP9, PKN1	3
GO:1904705	regulation of vascular smooth muscle cell proliferation	biological process	JAK2, MMP9, PKN1	3
GO:1904707	positive regulation of vascular smooth muscle cell proliferation	biological process	JAK2, MMP9, PKN1	3
GO:0016572	histone phosphorylation	biological process	CDK2, JAK2, PKN1	3
GO:0070669	response to interleukin-2	biological process	JAK1, JAK3, SYK	3
GO:0038110	interleukin-2-mediated signaling pathway	biological process	JAK1, JAK3, SYK	3
GO:0071352	cellular response to interleukin-2	biological process	JAK1, JAK3, SYK	3
GO:0038083	peptidyl-tyrosine autophosphorylation	biological process	JAK1, JAK2, JAK3, KDR, SYK	5
GO:0006692	prostanoid metabolic process	biological process	AKR1C2, COX2, ZADH2	3
GO:0006693	prostaglandin metabolic process	biological process	AKR1C2, COX2, ZADH2	3
GO:1904591	positive regulation of protein import	biological process	COX2, JAK2, MAPK1	3
GO:0042307	positive regulation of protein import into nucleus	biological process	COX2, JAK2, MAPK1	3
GO:0030574	collagen catabolic process	biological process	CTSK, MMP1, MMP3, MMP9	4
GO:1903672	positive regulation of sprouting angiogenesis	biological process	COX2, JAK1, KDR	3
GO:0071276	cellular response to cadmium ion	biological process	MAPK1, MAPK8, MMP9	3

表 5 KEGG 通路富集分析结果
Table 5 Results of KEGG pathway enrichment analysis

KEGG 编号	名称	相关基因	相关基因数
KEGG:04380	osteoclast differentiation	CTSK, JAK1, MAP2K1, MAPK1, MAPK8, SYK, TNFSF11	7
KEGG:05161	hepatitis B	CDK2, JAK1, MAP2K1, MAPK1, MAPK8, MMP9	6
KEGG:04917	prolactin signaling pathway	JAK2, MAP2K1, MAPK1, MAPK8, TNFSF11	5
KEGG:04658	Th1 and Th2 cell differentiation	JAK1, JAK2, JAK3, MAPK1, MAPK8	5
KEGG:04657	IL-17 signaling pathway	MAPK1, MAPK8, MMP1, MMP3, MMP9	5
KEGG:05215	prostate cancer	CDK2, MAP2K1, MAPK1, MMP3, MMP9	5
KEGG:04659	Th17 cell differentiation	JAK1, JAK2, JAK3, MAPK1, MAPK8	5
KEGG:04668	TNF signaling pathway	MAP2K1, MAPK1, MAPK8, MMP3, MMP9	5
KEGG:05219	bladder cancer	MAP2K1, MAPK1, MMP1, MMP9	4
KEGG:04664	Fc epsilon RI signaling pathway	MAP2K1, MAPK1, MAPK8, SYK	4
KEGG:05212	pancreatic cancer	JAK1, MAP2K1, MAPK1, MAPK8	4
KEGG:05323	rheumatoid arthritis	CTSK, MMP1, MMP3, TNFSF11	4
KEGG:04914	progesterone-mediated oocyte maturation	CDK2, MAP2K1, MAPK1, MAPK8	4
KEGG:04370	VEGF signaling pathway	KDR, MAP2K1, MAPK1	3
KEGG:05223	non-small cell lung cancer	JAK3, MAP2K1, MAPK1	3
KEGG:04662	B cell receptor signaling pathway	MAP2K1, MAPK1, SYK	3
KEGG:05140	leishmaniasis	JAK1, JAK2, MAPK1	3

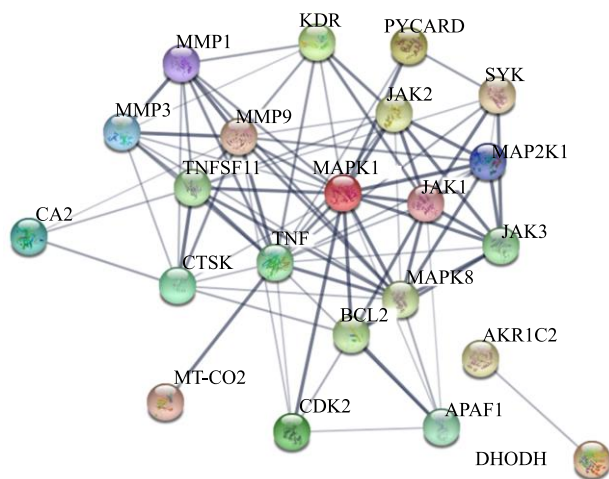


图 4 PPI 蛋白互作网络

Fig. 4 PPI protein interaction network

治疗 RA 的基础方和首选方。方中桂枝为主药，温经通脉，调和营卫，白芍养血平肝，麻黄祛风解表，生姜解表散寒，白术燥湿益气，知母滋阴润燥，防风祛风解表，甘草调和诸味，制附子温经散寒止痛，诸药相伍合用，以达通阳行痹，祛风逐湿，和营止痛，到达治疗风湿痹症的效果。查阅文献发现目前对 GSZD 治疗 RA 的临床疗效报道很多，这些研究结果均显示 GSZD 能改善 RA 患者的晨僵时间、关节肿胀数，关节压痛数等病理体征，同时减少血清中类风湿因子（RF）水平，降低红细胞沉降率（ESR）和 C 反应蛋白（CRP）水平^[12-14]，但对其作用机制研究甚少，限制 GSZD 的推广应用。

本研究采用分子对接的方法，结合网络药理学实现活性分子与靶点蛋白之间关系的可视化，揭示了 GSZD 治疗 RA 是多个活性成分通过多条途径作用于多个靶点蛋白，符合中药多成分多靶点的特点。我们的预测结果显示，GSZD 中的活性成分主要作用的靶蛋白是 MAPK1、ZADH2、AKR1C2、DHODH、P38、CA2、MMP9、MMP3、RANKL、PKN1 和 COX2（表 2）。

P38-MAPK 信号通路在 RA 滑膜炎症中扮演着重要角色，是介导其炎症发生的核心机制。滑膜细胞中的 P38-MAPK 信号通路被 TNF- α 、IL-1 等激活，产生细胞因子，促进炎症反应^[15]。环氧合酶 2（COX2）参与花生四烯酸的代谢途径，可以催化花生四烯酸转化为前列腺素类物质。目前研究发现 COX2 的表达异常与炎症有密切关系，其表达水平可以反应炎症的严重程度，同时可以与 AKR1C2 作用减少 PGF2C 和 PGE2 释放^[16-17]。因此，P38-

MAPK、COX2、AKR1C2 可能是 GSZD 改善 RA 炎症的重要靶标之一。

基质金属蛋白酶 MMPs 家族蛋白可以降解包括蛋白多糖，层粘连蛋白等在内的多种细胞外基质，在滑膜成纤维细胞的迁移和侵袭中起关键作用，同时可以加重软骨破坏，最终导致 RA 患者关节腔结构破坏，滑膜增生和软骨降解。Zhu 等^[18]的研究发现白芍总苷能降低体外培养的 CIA 大鼠滑膜成纤维细胞中的 MMP-1、MMP-3 水平，预测白芍总苷除了存在抗炎活性，还可以作为一种软骨保护剂。RANKL 是一种活化因子配体，可以直接激活 NF- κ B，直接参与破骨细胞形成和分化，也能调节骨吸收。Tsuji-Naito 等^[19]发现桂皮醛和 2-甲氧基肉桂醛能抑制 RANKL 诱导的破骨细胞发生，且 2-甲氧基肉桂醛对骨吸收的抑制率达 95%。同样的 CA2 也参与骨吸收和破骨细胞分化过程，对 RA 治疗有重要意义^[20]。DHODH 属于第二族的线粒体相关酶，被作为抗 RA、抗肿瘤、抗器官移植排异等多种自身免疫性疾病的治疗靶点，可以通过抑制嘧啶合成途径，致使 DNA 合成障碍，造成细胞周期阻滞，抑制淋巴细胞增殖以及自身抗体形成^[21-22]。PKN1 参与细胞骨架的重组，与细胞迁移和侵袭能力有着密切的关系^[23]。RA 发病的一个重要原因就是滑膜细胞的迁移和侵袭能力增强，逐渐侵蚀关节软骨，阻断软骨营养供应，间接破坏软骨功能。抑制 PKN1 的活化可能是 GSZD 的活性机制。对这些靶点的生物功能和通路分析均提示 RA 是一种涉及体内多种生物过程的复杂疾病，这与现有文献报道相一致。同时蛋白互作网络分析也发现这些蛋白并不是单独发挥作用，蛋白之间存在复杂的相互作用关系。ZADH2 的过表达会抑制 PPARG 的转录活性，能间接参与制 NF- κ B 介导的促炎症反应^[24]。另外 Choi 等^[25]发现 ZADH2 与血管内皮生长因子（VEGF）水平存在一定联系。

破骨细胞是在多种细胞因子的刺激下分化形成的成熟多核破骨细胞，是骨吸收的主要参与者，与机体造血功能调控、骨形成、骨内血管生成、骨钙素调控等生理过程有密切联系^[26]。当破骨细胞的功能出现异常活化会影响骨质吸收，引起骨、关节等出现退行性病变如骨质疏松症、癌骨转移、关节炎等^[27]。研究发现，RA 患者体内成熟的破骨细胞形成增多，同时其功能被异常激活^[28]。现代药理学研究也证实成熟的破骨细胞与骨基质接触后能形成骨

吸收区,发挥侵蚀软骨,降解骨组织的作用,最终造成患者骨和关节破坏^[29]。总之,破骨细胞是造成 RA 发生、发展的主要原因之一^[30]。目前临床上很多药物的治疗途径就是通过有效的抑制破骨细胞的分化,减少患者骨量丢失。通过对 GO 和 KEGG 的富集分析,发现 GSZD 发挥治疗 RA 作用的主要途径和骨吸收,破骨细胞分化有关(图 3),这一结果提示 GSZD 发挥治疗 RA 作用的可能机制是抑制破骨细胞分化,减少骨吸收。后期本课题组将针对这一机制进行深入研究,阐明 GSZD 治疗 RA 的药理基础。

本次研究应用分子对接技术结合网络药理学的方法,从多成分、多靶点的角度证明了 GSZD 用于治疗 RA 的科学性和可靠性。但是,目前的工作尚停留在虚拟筛选,只能为研究其治疗机制提供参考,后续课题组将对本次结果进行进一步的实验验证,从而更系统科学地阐明 GSZD 治疗 RA 的药理机制。

参考文献

- [1] 汉·张仲景. 金匱要略方论 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1963.
- [2] 谢 斌, 田雪飞. 桂枝芍药知母汤治疗类风湿性关节炎 60 例临床观察 [J]. 湖南中医药大学学报, 2003, 23(5): 49-51.
- [3] 张素养, 王 利, 刘 丹, 等. 桂枝芍药知母汤联合甲氨蝶呤治疗类风湿性关节炎 45 例临床研究 [J]. 江苏中医药, 2019, 51(6): 43-45.
- [4] 曹翠华. 对类风湿性关节炎给予桂枝芍药知母汤加减联合补肾祛瘀针刺法治疗的效果观察 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(36): 170.
- [5] 赵 慧, 顾立刚, 陈小军, 等. 桂枝芍药知母汤对 II 型胶原诱导性关节炎大鼠血清肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素 1 β 活性的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(11): 27-29.
- [6] Guo Q, Mao X, Zhang Y Q, *et al.* Guizhi-Shaoyao-Zhimu decoction attenuates rheumatoid arthritis partially by reversing inflammation-immune system imbalance [J]. *J Transl Med*, 2016, 14(1): 165-173.
- [7] 李克宁, 郑惠婷, 王淑美, 等. 基于分子对接技术虚拟筛选葛根治疗脑卒中的物质基础研究 [J]. 中草药, 2018, 49(8): 1847-1853.
- [8] Papadopoulos I, Demetrios C, Markantoni-Kyroudi S, *et al.* The safety of biological medicines for rheumatoid arthritis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 822(8): 209-210.
- [9] Andersson A K, Li C, Brennan F M. Recent developments in the immunobiology of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10(2): 204-213.
- [10] Urushibara M, Takayanagi H, Koga T, *et al.* The antirheumatic drug leflunomide inhibits osteoclastogenesis by interfering with receptor activator of NF- κ B ligand-stimulated induction of nuclear factor of activated T cells c1 [J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(3): 794-804.
- [11] 杨德才, 刘珍意, 郑新春. 类风湿性关节炎的中医治疗方法 [J]. 湖北中医杂志, 2002, 24(10): 20-21.
- [12] 刘志队, 史丽璞. 加味桂枝芍药知母汤对活动期寒热错杂型类风湿关节炎患者 ESR、CRP 和 RF 调控作用分析 [J]. 陕西中医, 2019, 40(1): 82-84.
- [13] 石岩江, 申 军. 桂枝芍药知母汤加减治疗对风寒湿痹型类风湿关节炎患者血清炎症因子和 OPG 及 RANKL 水平的影响 [J]. 四川中医, 2018, 36(12): 106-109.
- [14] 曾 权, 王朝凤, 朱 宏. 桂枝芍药知母汤治疗类风湿关节炎 96 例临床观察 [J]. 中医临床研究, 2018, 10(32): 77-78.
- [15] Wendling D, Clément P, Éric T, *et al.* Targeting intracellular signaling pathways to treat rheumatoid arthritis: Pandora's box? [J]. *Joint Bone Spine Revue Du Rhumatisme*, 2010, 77(2): 96-98.
- [16] Kunsch C, Medford R M. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature [J]. *Circ Res*, 1999, 85(8): 753-766.
- [17] Grendling K K, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: Role in cardiovascular biology and diseases [J]. *Circ Res*, 2000, 86(5): 494-501.
- [18] Zhu L, Wei W, Zheng Y Q, *et al.* Effects and mechanisms of total glucosides of paeony on joint damage in rat collagen-induced arthritis [J]. *Inflamm Res*, 2005, 54(5): 211-220.
- [19] Tsuji-Naito K. Aldehydic components of Cinnamon bark extract suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis through NFATc1 downregulation [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16(20): 9176-9183.
- [20] 刘玉槐, 王 宏, 景元海, 等. II 型碳酸酐酶对破骨细胞性骨吸收的影响 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2004, 30(1): 11-13.
- [21] Fairbanks L D, Bofill M, Ruckemann K, *et al.* Importance of ribonucleotide availability to proliferating T-lymphocytes from healthy humans [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(50): 29682-29689.
- [22] Khutornenko A A, Roudko V V, Chernyak B V, *et al.* From the cover: Pyrimidine biosynthesis links mitochondrial respiration to the p53 pathway [J]. *Proc*

- Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(29): 12828-12833.
- [23] Mukai H. The structure and function of PKN, a protein kinase having a catalytic domain homologous to that of PKC [J]. *J Biochem*, 2003, 133(1): 17-27.
- [24] Park S H, Choi H J, Yang H, *et al.* Endoplasmic reticulum stress-activated C/EBP homologous protein enhances nuclear factor- κ B stress-activated C/EBP homologous proliferator-activated receptor γ [J]. *J Biol Chem*, 285(46): 35330-35339.
- [25] Choi S H, Ruggiero D, Sorice R, *et al.* Six novel loci associated with circulating VEGF levels identified by a meta-analysis of genome-wide association studies [J]. *PLoS Genetics*, 2016, 12(2): e1005874.
- [26] Blair H C, Athanasou N A. Recent advances in osteoclast biology and pathological bone resorption. [J]. *Histol Histopathol*, 2004, 19(1): 189-199.
- [27] Rodan G A, Martin T J. Therapeutic approaches to bone diseases [J]. *Science*, 2000, 289(5484): 1508-1514.
- [28] 陈红梅, 王友莲. 破骨细胞在类风湿关节炎致骨破坏病理变化中的作用及其调控 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(9): 1168-1173.
- [29] 郑振峰. 破骨细胞的发生和骨代谢的分子调控研究新进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2004, 10(4): 510-513.
- [30] Binder N B, Puchner A, Niederreiter B, *et al.* Tumor necrosis factor-inhibiting therapy preferentially targets bone destruction but not synovial inflammation in a tumor necrosis factor-driven model of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2014, 65(3): 608-617.