

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

蒋 勇^{1,2}, 钟淑欣³, 何升华⁴, 梁家彬^{1,2}, 张浩宇^{1,2}, 叶裕丰^{2*}, 陈汉威^{2,5*}

1. 广州中医药大学番禺区中心医院, 广东 广州 510006
2. 广州市番禺区中心医院 中心实验室, 广东 广州 511486
3. 暨南大学基础医学院, 广东 广州 510632
4. 广州中医药大学第四临床医学院, 广东 深圳 518033
5. 广州市番禺区健康管理中心, 广东 广州 511495

摘要: **目的** 通过以网络药理学为基础的策略研究防风治疗类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的分子生物学机制。**方法** 采用网络药理学方法收集防风活性成分和治疗 RA 的潜在靶点, 并评估活性成分的药理和毒理学等相关参数; 构建蛋白质相互作用网络筛选核心靶点, 并通过生物信息学方法进一步验证核心靶点和疾病的关联; 对核心成分和相应靶点进行分子对接。体外通过 CCK-8 实验、细胞迁移和侵袭、细胞凋亡、qRT-PCR 和 Western blotting 分析, 阐明别欧前胡素对 MH7A 细胞磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 通路的调控作用。**结果** 从防风中共鉴定出 18 种活性成分和 66 个与筛选出的 RA 疾病靶基因相交的潜在靶基因, 最终获得了汉黄芩素、 β -谷甾醇、5-O-甲基维斯阿米醇和别欧前胡素等核心成分。防风治疗 RA 的潜在机制可能是通过调控 PI3K/Akt、白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17)、凋亡等信号通路和多种生物过程来实现, 以发挥抗炎和免疫调节作用。分子对接证实了所有的核心成分和关键靶点均具有很好的对接活性。别欧前胡素抑制 MH7A 细胞的活力、迁移和侵袭 ($P < 0.05$, 0.01), 诱导细胞凋亡 ($P < 0.01$), 并显著下调 IL-1 β 、IL-6、IL-8、基质金属蛋白酶-1 (matrix metalloproteinase-1, MMP-1) 和 MMP-3 的基因表达 ($P < 0.01$)。分子分析表明别欧前胡素通过抑制 PI3K/Akt 通路发挥对 MH7A 的调控作用。**结论** 成功预测了防风治疗 RA 的有效成分和潜在靶点, 为进一步探究其分子机制提供了新的理论基础。揭示了别欧前胡素通过 PI3K/Akt 通路抑制 RA 成纤维样滑膜细胞的活力、迁移、侵袭及细胞因子和 MMPs 的表达, 并诱导细胞凋亡。

关键词: 防风; 类风湿关节炎; 网络药理学; 发病机制; 别欧前胡素; 汉黄芩素; 5-O-甲基维斯阿米醇; 成纤维样滑膜细胞; PI3K/Akt 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)17-5601-18

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.17.014

Bioactive components in *Saposhnikovia divaricata* and its mechanism on rheumatoid arthritis based on network pharmacology

JIANG Yong^{1,2}, ZHONG Shu-xin³, HE Sheng-hua⁴, LIANG Jia-bin^{1,2}, ZHANG Hao-yu^{1,2}, YE Yu-feng², CHEN Han-wei^{2,5}

1. Guangzhou Panyu Central Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China
2. Central Laboratory, Guangzhou Panyu Central Hospital, Guangzhou 511486, China
3. School of Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China
4. The Fourth Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen 518033, China
5. Guangzhou Panyu Health Management Center, Guangzhou 511495, China

Abstract: Objective To investigate the molecular biological mechanism of *Saposhnikovia divaricata* in treating rheumatoid arthritis (RA) through a pharmacology-based strategy. **Methods** The bioactive phytochemicals of *S. divaricata* and potential targets for the

收稿日期: 2023-04-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (8217150266); 国家自然科学基金资助项目 (81729003); 广州市卫生健康委员会科技项目 (2021A0111114); 广州市番禺区科技计划重大项目 (2022-Z04-114)

作者简介: 蒋 勇, 博士研究生, 主要从事中药药理学研究。E-mail: 20202120219@stu.gzucm.edu.cn

*通信作者: 叶裕丰, 教授, 博士生导师。E-mail: 838554325@qq.com

陈汉威, 教授, 博士生导师。E-mail: docterwei@sina.com

treatment of RA were screened by network pharmacology, and phytochemicals-related parameters such as pharmacology and toxicology were evaluated. The protein interaction network was established to screen the core targets, and the correlation between the core targets and RA was further validated by bioinformatics strategy. Finally, molecular docking of core components and corresponding targets was performed. CCK-8 assay, cell migration and invasion, cell apoptosis, qRT-PCR, and Western blotting analysis were performed to clarify the regulation of prangenidin on phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) pathway in MH7A cells. **Results** A total of 18 bioactive phytochemicals and 66 potential target genes intersecting with the screened RA disease target genes were identified from *S. divaricata*. Finally, core ingredients such as wogonin, β -sitosterol, 5-*O*-methylvisamminol and prangenidin were obtained. The underlying mechanism of *S. divaricata* in treating RA might be achieved by regulating pathways such as PI3K/Akt, interleukin-17 (IL-17), apoptosis and multiple biological processes to exert anti-inflammatory and immunomodulatory effects. Molecular docking confirmed that all core ingredients and key targets had great docking activity. Prangenidin inhibited viability, migration and invasion ($P < 0.05, 0.01$), induced apoptosis in MH7A cells ($P < 0.01$), and significantly down-regulated *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8*, matrix metalloproteinase-1 (*MMP-1*) and *MMP-3* gene expressions ($P < 0.01$). Molecular analysis showed that prangenidin exerts its regulatory effect on MH7A cells by inhibiting PI3K/Akt pathway. **Conclusion** This study successfully predict the effective components and potential targets of *S. divaricata* in the treatment of RA, which provide a new theoretical basis for further exploring its molecular mechanism. It is revealed that prangenidin inhibits the activity, migration, invasion and expressions of cytokines and MMPs of RA fibroblast-like synovial cells through PI3K/Akt pathway, and induces cell apoptosis.

Key words: *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk; rheumatoid arthritis; network pharmacology; pathogenesis mechanism; prangenidin; wogonin; 5-*O*-methylvisamminol; fibroblast-like synoviocytes; PI3K/Akt signaling pathway

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种病因不明的慢性全身性自身免疫疾病, 主要损害关节, 以对称性滑膜炎为特征。目前, RA 的全球发病率为 0.5%~1.0%, 以女性为多见, 其晚期形式的特点为严重且使人衰弱的慢性疼痛, 管理不善会进一步导致疾病进展, 最终导致关节侵蚀、破坏和畸形^[1]。迄今尚无有效的针对 RA 的治疗方法, 目前的西医治疗主要用于减少关节炎症、防止不可逆的骨破坏和尽可能维持关节功能, 但构成高昂的财务成本并表现出严重的不良反应^[2]。滑膜炎是 RA 的病理基础, 而成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLSs) 是 RA 中具有免疫作用的核心靶细胞。在 RA 滑膜炎性环境中, FLSs 发生凋亡异常, 导致 RA 滑膜增生, 聚积并黏附在骨和软骨上加重关节破坏^[3]。同样, RA-FLSs “类肿瘤样” 异常增殖, 会导致细胞过度活化, 迁移、侵袭能力加强, 产生大量的蛋白酶、细胞因子和黏附分子促使软骨破坏, 进一步激活破骨细胞造成骨破坏, 并且激活的 FLSs 还可以通过与邻近血管内皮细胞发生串扰来调节炎症浸润的侵入, 在关节骨和软骨的破坏中也发挥重要作用^[4-8]。

防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk 广泛分布于东西伯利亚和北亚^[9]。首载于秦汉时期的《神农本草经》, 被列为上品, 一般规定用防风祛风解表、祛湿止痛、定惊, 与现代应用大致相符, 对普通感冒、头痛、风疹、瘙痒、破伤风、风湿病

和关节痛有明显的治疗作用^[10-11]。防风在当前临床实践中被广泛用于治疗炎症、疼痛和关节炎等^[12]。防风含有 100 多种化学成分, 主要有色原酮类、香豆素类、多糖类、聚乙炔等, 这些活性成分有解热、抗炎镇痛、抗增殖、抗肿瘤以及免疫调节等多种药理作用^[13-15]。基于系统生物学与药理学的网络药理学, 是评价药物的代谢和有效性特征, 分析药物治疗疾病的具体途径, 揭示药物作用的分子机制的有力方法^[16-17]。分子对接技术可以评估分析药物与疾病关键靶点结合的活性和机制, 对进一步药物筛选和研发提供一些见解^[18]。因此, 本研究采用网络药理学、微阵列数据分析和分子对接技术系统地鉴定防风活性成分的有效靶蛋白, 探索防风治疗 RA 的分子机制, 筛选出防风治疗 RA 的活性成分和重要信号通路, 为后续研究提供参考。

1 材料

1.1 细胞

人 RA 成纤维样滑膜细胞系 MH7A 购自吉妮欧生物科技有限公司。

1.2 药品与试剂

别欧前胡素 (批号 D21091501, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自南京狄尔格医药科技有限公司; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α , 批号 031825) 购自美国 Peprotech 公司; 磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 抑制剂 LY294002 (批号 134167) 购自美国 MCE 公司; 甲

氨蝶呤 (methotrexate, MTX, 批号 02211101) 购自山西普德药业有限公司; Matrigel 胶 (批号 2082001) 购自美国 Corning 公司; 胎牛血清 (批号 SA220629)、胰蛋白酶溶液 (批号 WH0622G111) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司; DMEM 培养基 (批号 8123020)、青霉素-链霉素 (批号 2321131) 购自美国 Gibco 公司; CCK-8 试剂盒 (批号 VB816) 购自日本 DOJINDO 公司; 总 RNA 提取试剂盒 (批号 343904) 购自美国 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒 (批号 H0104731) 购自上海翊圣生物科技有限公司; SYBR Green qPCR 试剂盒 (批号 027E2232EB) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (批号 20220610)、全蛋白提取试剂盒 (批号 20221009)、BCA 测定试剂盒 (批号 20220427) 购自江苏凯基生物技术股份有限公司; ECL 化学发光检测溶液 (批号 2127701) 购自美国 Millipore 公司; 特大 B 细胞淋巴瘤 (B-cell lymphoma-extra-large, Bcl-xL) 抗体 (批号 F1741) 购自英国 EterLife 公司; B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白 (B-cell lymphoma-2 associated X protein, Bax) 抗体 (批号 GR151406-19)、剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cystein-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3) 抗体 (批号 GR46472-1) 购自英国 Abcam 公司; PI3K 抗体 (批号 CJ36131)、p-PI3K 抗体 (批号 AA10171)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 抗体 (批号 CN13211)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) p-Akt 抗体 (批号 AA44161)、抗体 (批号 1201908)、HRP 标记山羊抗兔二抗 (批号 AA102109) 购自美国 Bioworld 公司。

1.3 仪器

5804R 型冷冻高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); 371 型 CO₂ 培养箱、1300 series A2 型生物安全柜、Variskan LUX microplate reader 多功能酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); DMI1 型倒置光学显微镜 (德国 Leica 公司); LightCycler480 II Real-time PCR 系统 (瑞士 Roche 公司); CytoFLEX Flow Cytometer 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司); PowerPac HC 型垂直电泳/转膜套装、Bio-Rad Gel-Doc XR+凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 防风中的有效成分和靶点 在 TCMSP

(<http://tcmspw.com/tcmsp.php>)、YaTCM (<http://cadd.pharmacy.nankai.edu.cn/yatcm>)、BATMAN-TCM (<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm>) 和 TCMIP (<http://www.tcmip.cn/TCMIP>) 4 个中药药理学数据库检索和收集防风的化学成分。以口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 作为主要的药动学参数 (符合这一标准的化合物具有更高的类药物特性) 对防风的成分进行筛选^[19], 同时通过文献检索进行补充, 获得最终候选目标活性成分。然后, 搜集 TCMSP 中预测的与这些活性分子相对应的靶点。所有活性成分的化学结构均来自 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)。

2.1.2 药理和毒理参数评估 通过参考里宾斯基“五规则” (rule of 5, RO5), 评估活性成分的“类药物”特性, 符合该规则的化合物有更好的药动学性质和更高的生物利用度, 因而也更有可能是口服药物。化合物毒性的预测是药物设计开发过程的关键部分之一。ProTox-II 网络服务器 (https://tox-new.charite.de/protox_II) 用于预测获得的活性成分的毒理学参数, 包括毒理学终点 (免疫毒性、致突变性和致癌性)、器官毒性 (肝毒性) 和急性口服毒性 (median lethal dose, LD₅₀)。活性成分的合成可及性得分 (synthetic accessibility score, SAscore) 通过 ADMETlab 2.0 (<https://admetmesh.scbdd.com>) 计算, SAscore < 6 表示容易合成, 否则难以合成。

2.1.3 防风-RA 潜在靶基因 为确保数据的全面性与准确性, 从 GeneCard (<https://www.genecards.org>)、OMIM (<https://omim.org/search/advanced/geneMap>)、DisGeNET (<https://www.disgenet.org/search>)、DRUGBANK (<https://go.drugbank.com>) 4 个数据库中收集 RA 相关的靶点。其中 DRUGBANK 数据库基于临床试验药物证据构建而成, 包含丰富的药物数据与全面的药物靶标信息, GeneCard、OMIM、DisGeNET 3 个数据库基于现有文献构建, 各个数据库之间优势互补。将上述 4 个数据库获取的靶基因, 删除重复项后合并。使用 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org>) 将药物成分和疾病的目标统一规范为标准 “Gene Symbol”, 通过 VENN 2.1 网站 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 获取防风治疗 RA 的潜在靶基因 (即共存靶基因)。

通过收集基因表达综合数据库 (gene expression

omnibus, GEO) 数据集 (GSE93272 和 GSE97779) 的对照和 RA 组中差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 分析与 RA 发病机制相关的防风靶标的标准化表达水平。此外, 通过 Panther 分类系统 (<http://pantherdb.org>) 进行潜在靶基因的功能分类。

2.1.4 防风-RA 潜在靶基因的蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络分析 通过将获取的防风-RA 潜在靶基因输入 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org>) 并选择生物体为 “Homo sapiens”, 设置靶基因交互得分的置信度为 0.40, 以获得 PPI 网络来呈现潜在靶基因之间互作的直接与间接调控关系。PPI 网络中每个节点代表 1 个蛋白质, 边代表蛋白质-蛋白质关联, 即潜在靶基因相互之间共同功能的关联。将这些结果导入 Cytoscape 3.7.1 对目标蛋白进行包含拓扑参数的可视化 PPI 网络构建和分析。

2.1.5 基因本体 (gene ontology, GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 将防风-RA 共同靶基因导入 R (<https://www.r-project.org>) 软件, 利用 “Cluster Profiler” 包进行生物信息富集分析, 包括 GO 功能和 KEGG 信号通路分析。 $P < 0.05$ 为显著富集, 结果用 R 软件绘制气泡图和条形图来直观地显示。R 包 “pathview” 和 “GOplot” 分别用于将 KEGG 数据映射到 RA 相关的信号通路图上并显示出来和绘制 Chord plot 将靶基因映射到 GO 或 KEGG 条目来反应归属关系。

2.1.6 靶点-器官定位网络构建 防风体内代谢过程尚未明确, 防风诱导的 RA 治疗作用可能涉及多个器官和组织。通过使用 BioGPS 数据库 (<http://biogps.org>) 获得每个防风-RA 靶点在器官组织水平的 mRNA 表达谱。分别计算每个 mRNA 在每个组织或器官中的平均值和在所有组织器官中的总体平均值, 提取 mRNA 表达值高于总体值的相关组织器官。使用 Cytoscape 3.7.1 构建靶点-器官定位网络。

2.1.7 “成分-潜在靶基因-信号通路 (ingredients-potential target genes-signaling pathways, IPS)” 网络构建 利用 Cytoscape 3.7.1 构建 IPS 网络, 节点代表活性化合物、靶基因或信号通路, 线条则代表活性化合物、靶基因和信号通路三者之间的相互作用。利用 Cytoscape 3.7.1 中内置的 “Network Analyzer” 功能分析活性成分和靶基因的网络拓扑参数, 包括

连接度、介度、紧密度等, 并据此鉴定核心靶基因和化合物。

2.1.8 核心成分和核心靶点的分子对接验证 对 IPS 核心网络 (Hithubs Network) 中得到的核心成分和靶基因按照化合物-靶点网络中的组合关系进行分子对接验证。首先从 PubChem 数据库下载活性成分的 SDF 格式文件并利用 Chem 3D 软件进行能量最小化计算后转换为 MOL2 格式文件。通过 RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org>) 下载分辨率低于 0.2 nm (优先选择分辨率值更小且有小分子复合的结构) 的靶蛋白的 PDB 结构文件, 并使用 AutoDock Tools 1.5.7 软件进行去杂原子、氢化、计算电荷等加工。运行 AutoDock Vina 1.2.3 进行分子对接, 以对接评分 $\text{Affinity} < -20.929 \text{ kJ/mol}$ 表明具有较强的结合活性^[20]。最后, 通过 CB-Dock 网站 (<http://clab.labshare.cn/cb-dock>) 将结果进行可视化。

2.2 细胞实验

2.2.1 细胞培养和处理 MH7A 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基, 在 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养, 每 48~72 小时传代 1 次 (细胞融合度达到 80%~90% 时用胰蛋白酶溶液消化细胞)。MH7A 细胞以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于相应培养皿中, 给予 TNF- α (10 ng/mL), 别欧前胡素 (20、40、60 $\mu\text{mol/L}$), MTX (20 $\mu\text{mol/L}$) 或 LY294002 (20 $\mu\text{mol/L}$) 干预 24 h 或 48 h。

2.2.2 细胞活力测定 MH7A 细胞分别给予别欧前胡素 (20、40、60、80、120、160 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24、48 h, 然后用 CCK-8 试剂孵育 3 h, 酶标仪在 450 nm 处检测吸光度 (A) 值, 计算细胞活力。

2.2.3 划痕愈合测定 细胞融合度达到 80% 时更换基础培养基培养 12 h, 用药物预处理 24 h, 再使用移液管尖端制造伤口, 记作 0 h, 完全培养基继续培养 48 h。分别在 0、24、48 h 进行拍照, 计算迁移细胞数。

2.2.4 迁移和侵袭测定 细胞用药物预处理 12 h 后转移至 Transwell 小室, 24 h (迁移) 或 48 h 后 (侵袭, Matrigel 胶包被) 对小室进行固定、染色、拍照并计数。

2.2.5 qRT-PCR 检测 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $IL-8$ 、基质金属蛋白酶-1 (matrix metalloproteinase-1, $MMP-1$) 和 $MMP-3$ 基因表达 按照试剂盒说明书提取细胞中总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
<i>IL-1β</i>	F: CAGGCTGCTCTGGGATTCTC R: GTCCTGGAAGGAGCACTTCAT
<i>IL-6</i>	F: CCTGAACCTTCCAAAGATGGC R: TTCACCAGGCAAGTCTCCTCA
<i>IL-8</i>	F: GAAGTTTTTGAAGAGGGCTGAGA R: GCCCTTGGCCTCAATTTTGC
<i>MMP-1</i>	F: ATGAAGCAGCCCAGATGTGGAG R: TGGTCCACATCTGCTCTTGGCA
<i>MMP-3</i>	F: TGGACAAAGGATACAACAGGGAC R: ATCTTGAGACAGGCGGAACC
<i>GAPDH</i>	F: TCGGAGTCAACGGATTGGT R: TTCCCCTTCTCAGCCTTGAC

2.2.6 细胞凋亡测定 收集药物干预 48 h 后的细胞, PBS 洗涤 3 次, 在细胞缓冲液中依次加入 Annexin V-FITC 和碘化丙啶 (PI) 孵育 5~10 min, 通过流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.2.7 Western blotting 检测 PI3K/Akt 通路和凋亡相关蛋白表达 使用全蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白, 并用 BCA 测定试剂盒测定蛋白质浓度。蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后, 分别加入 p-Akt (1:750)、Akt (1:750)、p-PI3K (1:750)、PI3K (1:750)、Bax (1:5000)、cleaved Caspase-3 (1:500)、Bcl-xL (1:1000) 和 GAPDH (1:5000) 抗体, 4 °C 孵育过夜。然后, 将膜与二

抗在室温下孵育 1 h。滴加 ECL 化学发光检测溶液后, 使用 Bio-Rad Gel-Doc XR+ 可视化蛋白条带。使用 Image Lab 软件对条带进行量化。

2.3 统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并使用 GraphPad Prism 软件 (9.5 版) 进行分析。统计分析采用单因素方差分析, 独立样本 *t* 检验, 双侧检验标准。

3 结果

3.1 网络药理学分析

3.1.1 防风活性成分的药理学性质和靶基因 以 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 标准对防风检索出的成分进行筛选并结合文献检索, 最终获得 19 种活性成分。其中升麻素苷 (Hacc > 10), 其余 18 种活性成分符合 “RO5” ($MW < 500$ 、 $Hdon < 5$ 、 $Hacc < 10$ 、 $-2 < \log P < 5$ 、 $RBN < 10$)。这些活性成分的相关药理参数见表 2。通过检索 HERB 数据库 (<http://herb.ac.cn/>) 分析它们在中药中分布情况。结果表明, 它们在防风中具有高度特异性。11-羟基-亥茅酚苷_{qt}、divaricat acid 和珊瑚菜内酯仅存在于防风中, 防风色酮醇和 divaricatol 存在于包括防风在内的 2 种中药中, 川白芷内酯和别欧前胡素则是 3 种。防风的所有活性成分均未表现出肝毒性, 亚油酸乙酯和 11,14-二十碳二烯酸甲酯的 LD₅₀ 值最高 (图 1)。SAscore 评估表明所有成分都是容易合成的。上述结果表明, 筛

表 2 防风生物活性成分的药理学和分子性质

Table 2 Pharmacological and molecular properties of bioactive components in *S. divaricata*

活性成分	MW	AlogP	Hdon	Hacc	OB/%	DL	Caco-2	BBB	TPSA	RBN	SAscore
黄花草木脂素 A	386.38	2.49	2	8	68.83	0.66	0.21	-0.53	107.59	4	3.448
11-羟基-亥茅酚苷 _{qt}	292.31	0.88	3	6	50.24	0.27	-0.27	-1.23	100.13	1	3.502
川白芷内酯	426.46	5.05	0	7	59.65	0.66	0.56	-0.02	92.04	6	3.932
divaricat acid	320.32	1.34	2	7	87.00	0.32	-0.18	-1.05	106.20	3	3.436
divaricatol	334.35	1.25	2	7	31.65	0.38	-0.13	-1.09	106.20	3	3.505
欧前胡素	270.30	3.65	0	4	34.55	0.22	1.13	0.92	52.58	3	2.782
防风色酮醇	374.42	2.80	2	7	32.05	0.51	0.07	-0.81	106.20	4	3.718
珊瑚菜内酯	300.33	3.64	0	5	43.39	0.28	0.90	0.43	61.81	4	2.815
5-O-甲基维斯阿米醇	290.34	2.02	1	5	37.99	0.25	0.54	-0.10	68.90	2	3.466
珊瑚菜素	300.33	3.64	0	5	40.19	0.28	0.98	0.48	61.81	4	2.815
3-表-β-谷甾醇	414.79	8.08	1	1	36.91	0.75	1.32	0.87	20.23	6	4.388
汉黄芩素	284.28	2.59	2	5	30.68	0.23	0.79	0.04	79.90	2	2.288
β-谷甾醇	414.79	8.08	1	1	36.91	0.75	1.32	0.99	20.23	6	4.388
亚油酸乙酯	308.56	6.99	0	2	42.00	0.19	1.46	1.14	26.30	16	2.305
异欧前胡素	270.30	3.65	0	4	45.46	0.23	0.97	0.66	52.58	3	2.674
别欧前胡素	270.30	3.79	1	4	36.31	0.22	0.91	0.50	63.58	2	2.982
11,14-二十碳二烯酸甲酯	322.59	7.55	0	2	39.67	0.23	1.47	1.10	26.30	17	2.322
紫花前胡素	328.39	3.96	0	5	39.27	0.38	0.77	0.25	65.74	3	3.359

MW-相对分子质量 AlogP-辛醇/水分配系数的对数 Hdon-氢键供体 Hacc-氢键受体 Caco-2-肠上皮通透性 BBB-血脑屏障 TPSA-拓扑极性表面积 RBN-化合物中可旋转键的个数

MW-molecular weight AlogP-log of octanol/water partition coefficient Hdon-hydrogen bond donors Hacc-hydrogen bond acceptors Caco-2-intestinal epithelial permeability BBB-blood-brain barrier TPSA-topological polar surface area RBN-rotation bonds number

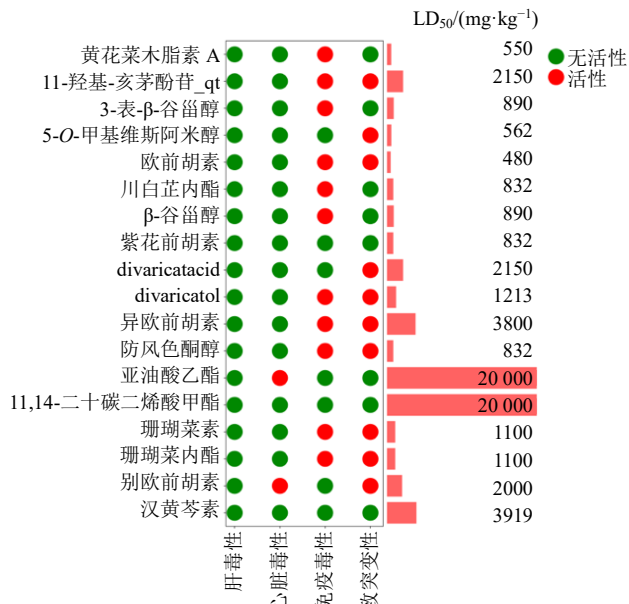
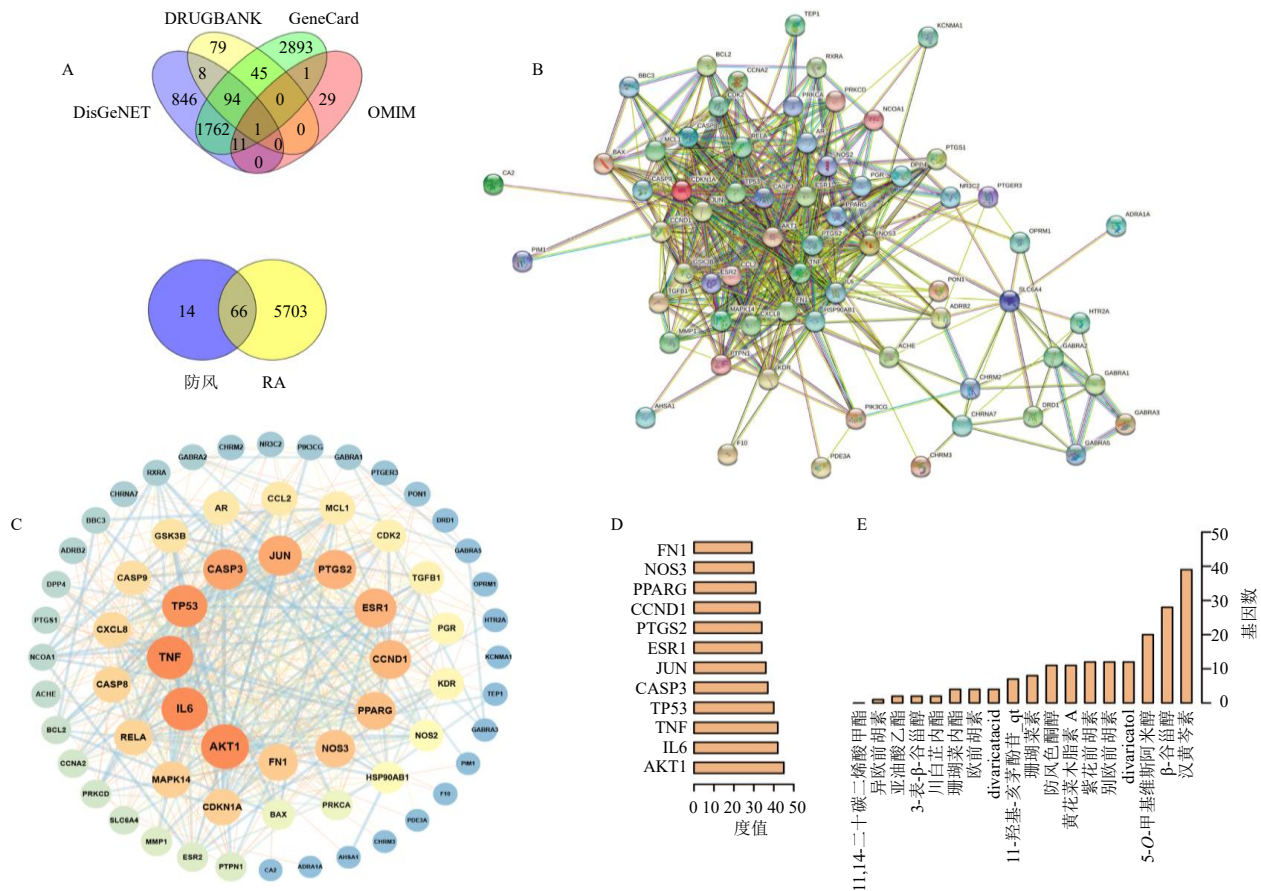


图 1 防风生物活性成分的毒理学参数

Fig. 1 Toxicological parameters of bioactive components in *S. divaricata*

A-Venn 图 B、C-PPI 网络 D-排名前 12 的关键靶点 E-防风中 18 种活性成分靶向 RA 发病机制相关靶点的数量

A-Venn diagram B, C-PPI network D-top 12 key targets E-numbers of RA pathogenesis-related targets targeted by 18 bioactive components in *S. divaricata*

图 2 防风生物活性成分与 RA 共存靶标的相互作用

Fig. 2 Interaction of coexistent targets between bioactive components in *S. divaricata* and RA

选出的这些防风活性成分具有很高的“类药物”药理学性质。在 TCMSP 收集到防风 18 种活性成分的 218 个靶蛋白，经去重和验证后得到 80 个靶蛋白。

3.1.2 防风治疗 RA 的潜在靶基因及 PPI 网络分析 选取 GeneCard、DisGeNET 数据库中评分大于中位数的靶点，合并 DRUGBANK、OMIM 数据库中获得靶点，去重得到 5769 个 RA 相关靶基因。利用 Venny 2.1 工具将防风活性成分靶基因和 RA 靶基因取交集，得到 66 个潜在靶基因（图 2-A）。将该 66 个共同靶点输入 STRING 数据库，构建 PPI 网络来呈现靶点间相互作用的调控关系（图 2-B）。将这些结果导入 Cytoscape 3.7.1 构建了 66 个节点、547 条边的可视化 PPI 网络（图 2-C），平均节点连接度为 16.6。排名前 12 的关键靶点见图 2-D，18 种活性成分靶向 RA 发病机制相关靶点的数量见图 2-E。

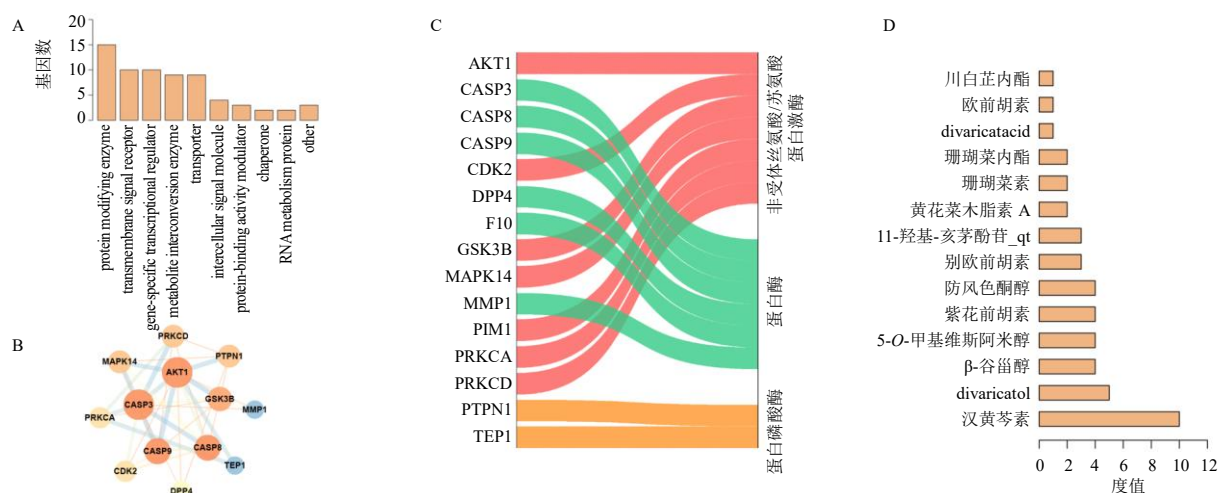
3.1.3 与 RA 发病机制相关的防风靶点的功能分类 FLSs 功能障碍（如异常增殖、凋亡）导致滑膜增生，

与免疫系统细胞相互作用从而产生一系列炎症级联反应,而持续的滑膜炎是 RA 进展的主要原因^[2]。通过 Panther 分类系统,对 66 个防风-RA 靶点进行蛋白质功能分类。与 RA 发病机制相关的 66 个防风靶点根据其细胞功能分为 10 个不同的类别,其中蛋白质修饰酶、跨膜信号受体和基因特异性转录调节因子是最丰富的类别(图 3-A)。涉及蛋白质修饰酶的 15 个潜在防风靶点形成了 1 个具有 13 个节点和 35 个边的 PPI 网络(图 3-B),其中 AKT1 和 CASP3 是关键靶点。由酶活性介导的蛋白质翻译后修饰在调节细胞活性和功能方面起着至关重要的作用,包括信号转导、细胞间相互作用、细胞增殖和凋亡等^[21]。在蛋白质修饰酶中(图 3-C),丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶与磷酸酶共同参与调节细胞增殖、凋亡过程关键元件的磷酸化状态。CASP3、CASP8、CASP9 则属于 Caspase 家族蛋白酶,其在细胞程序性死亡中起关键作用。根据相关靶点的数量提出了可能的 RA 发病机制相关的蛋白质修饰酶调节因子(图 3-D)。这些发现表明防风活性成分对 RA 的治疗靶点与多个关键生物学功能密切相关。

3.1.4 防风生物活性成分治疗 RA 的潜在协同机制
GO 分析结果显示 66 个靶基因在 1081 个 GO 生物过程(biological process, BP)条目中显著富集,基于调整后 *P* 值排序的前 20 个富集项绘制的条形-气泡图如图 4-A 所示。主要丰富的 BP 条目是对激素的反应、细胞死亡的正向调节等。前 8 个 BP 条目

的数据导入 R 包“GOplot”绘制“GOChord plot”来直观地映射“条目”与“基因”的归属关系(图 4-B)。RA 在女性中患病率较高,大量的研究表明激素与 RA 的发病和临床表现密切相关^[22]。27 个 RA 相关的防风目标密切参与对激素的反应并形成 1 个包含 25 个节点和 173 个边的 PPI 网络(图 4-C)。其中有 9 个是关键靶点,在这个 PPI 网络中发挥着关键作用(即图 4-C 内一圈)。FLSs 凋亡异常导致的持续滑膜炎在 RA 的发病机制中具有重要的意义。19 个防风目标参与细胞死亡的正向调节,并形成 1 个具有 18 个节点和 112 个边的 PPI 网络(图 4-D)。表明防风的有效成分通过多种 BP 起到治疗 RA 的协同作用。

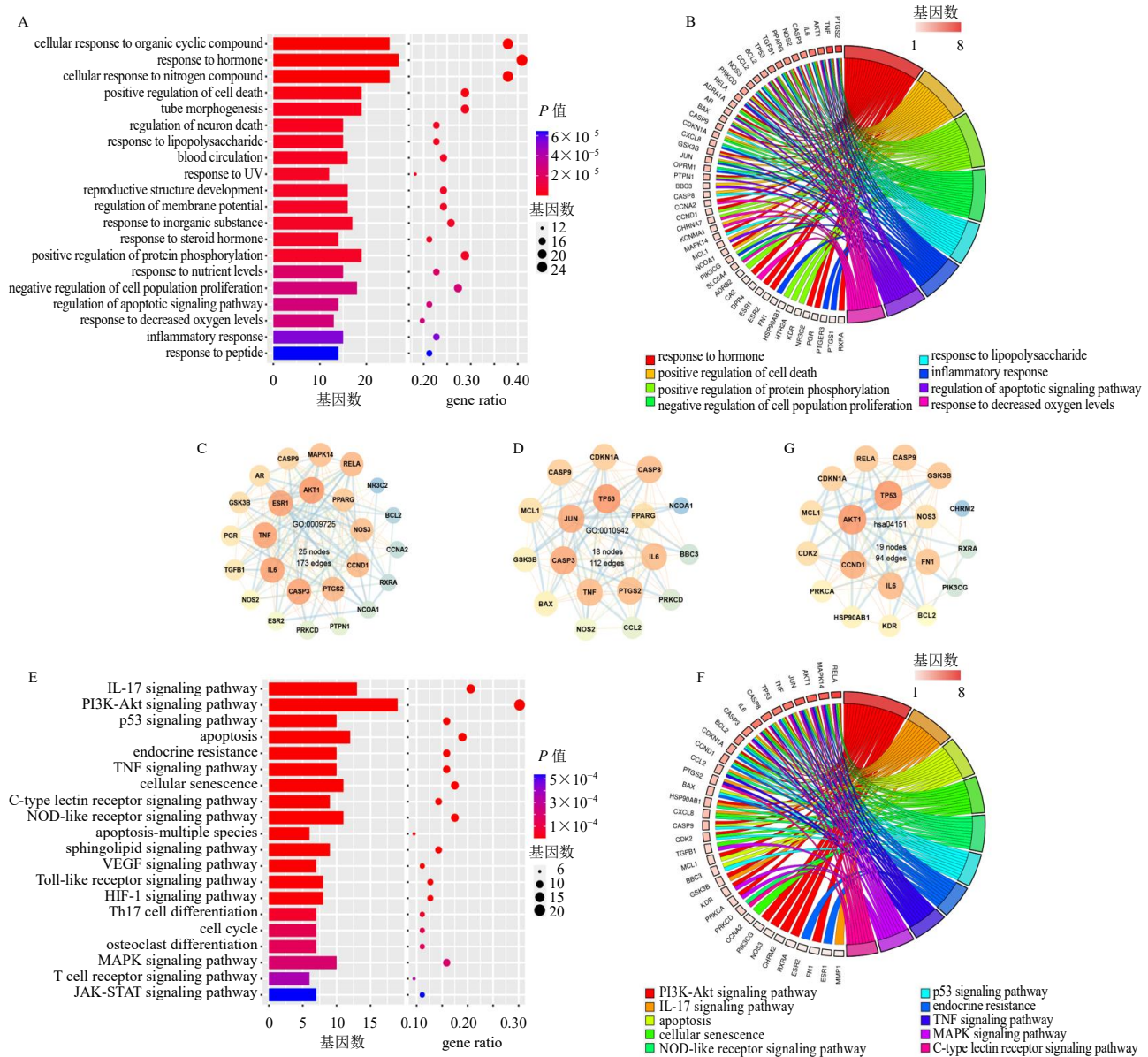
同样,KEGG 富集分析结果显示 66 个靶基因在 215 个信号通路中显著富集。基于调整后 *P* 值排序的前 20 个 KEGG 富集项如图 4-E 所示。KEGG 通路主要涉及对 PI3K/Akt、IL-17 和凋亡等信号通路。对按照“基因计数”排序的前 10 个 KEGG 条目绘制 KEGG “Chord plot”来映射项目与基因归属关系(图 4-F)。PI3K/Akt 和 IL-17 信号通路是最显著富集的通路,19 个 SD 靶点参与 PI3K/Akt 信号通路,形成 1 个包含 19 个节点和 94 条边的 PPI 网络(图 4-G)。这些结果表明,防风活性成分对 RA 的多种协同作用涉及多个靶点和多种途径。此外,防风治疗 RA 潜在靶基因的 PI3K/Akt 和 IL-17 信号通路分别如图 5 所示(红色矩形代表潜在的靶基因)。



A-Panther 分类 B-参与蛋白质修饰酶的 PPI 靶标网络 C-参与蛋白质修饰酶的防风靶标桑基图 D-参与蛋白质修饰酶的防风活性成分
A-Panther classification B-PPI network of targets involved in protein modifying enzyme C-Sankey diagram of targets of *S. divaricata* involved in protein modifying enzyme D-active components in *S. divaricata* involved in protein modifying enzyme

图 3 防风治疗 RA 靶点的蛋白质功能分类

Fig. 3 Protein functional classification of targets of *S. divaricata* against RA



A-BP 分析的前 20 个富集项的条形-气泡图, 按调整后的 P 值排序 B-BP 分析中主要 8 项富集弦图 C、D-参与激素响应 (GO: 0009725) 和细胞死亡的正向调节 (GO: 0010942) 防风靶点的 PPI 网络 E-KEGG 分析的前 20 个富集途径的条形-气泡图, 按调整后的 P 值排序 F-KEGG 分析前 10 项富集途径的弦图, 按潜在靶基因的基因数排序 G-参与 PI3K/Akt 信号通路的防风靶标的 PPI 网络 (hsa04151)

A-bar-bubble plot of top 20 enriched terms of BP analysis, sorted by adjusted P value B-GO chord plot of primary enriched 8 terms of BP analysis C, D-PPI network of targets of *S. divaricata* involved in response to hormone (GO: 0009725) and positive regulation of cell death (GO: 0010942) E-bar-bubble plot of top 20 enriched pathways of KEGG analysis, sorted by adjusted P value F-KEGG chord plot of top 10 enriched pathways of KEGG analysis sorted by gene count for potential target genes G-PPI network of targets of *S. divaricata* involved in PI3K/Akt signaling pathway (hsa04151)

图 4 防风治疗 RA 靶点的 GO BP 和 KEGG 途径富集分析

Fig. 4 GO BP and KEGG pathway enrichment analysis of targets of *S. divaricata* against RA

3.1.5 IPS 网络的构建与分析 根据获得的 KEGG 通路富集分析结果, 运用 Cytoscape 构建 IPS 网络, 系统地解释防风对 RA 的作用机制, 并通过内置工具分析防风靶点。如图 6-A 所示, 该网络由 104 个节点和 366 条边构成, 橙色节点代表防风活性成分 (六边形), 绿色节点代表 KEGG 分析得到的前 20

条信号通路 (正方形), 红色节点代表防风和 RA (椭圆) 的共同靶基因。在 Cytoscape 中将拓扑参数高于 IPS 网络平均连接度、介度和紧密度的节点提取出来, 得到 Hithubs Network (核心网络, 图 6-B), 这些节点是防风治疗 RA 的核心靶点、核心成分和重要的信号通路。涉及的主要信号通路是 PI3K/Akt

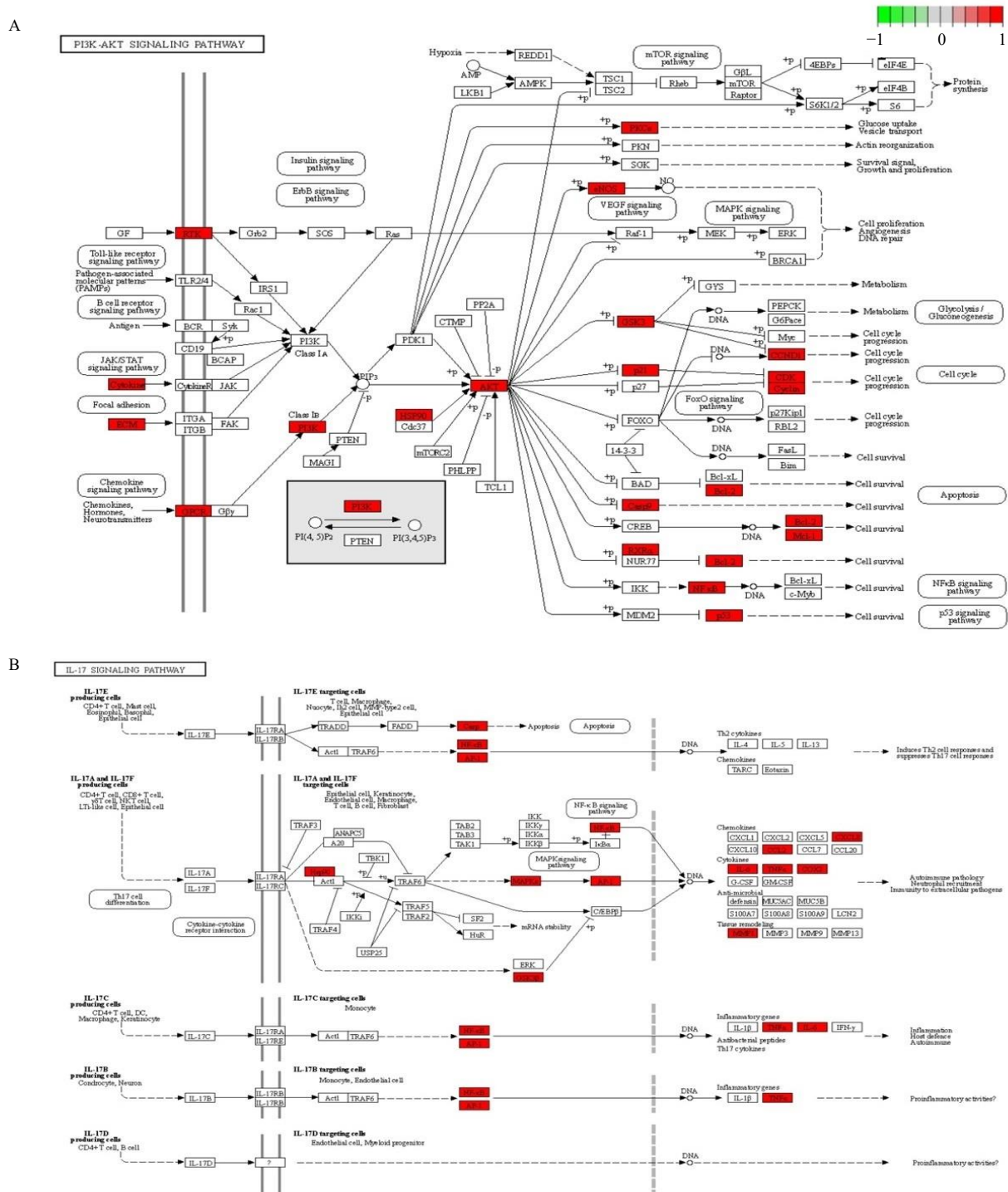


图5 防风治疗 RA 潜在靶基因在 PI3K/Akt (A) 和 IL-17 (B) 信号通路上的映射

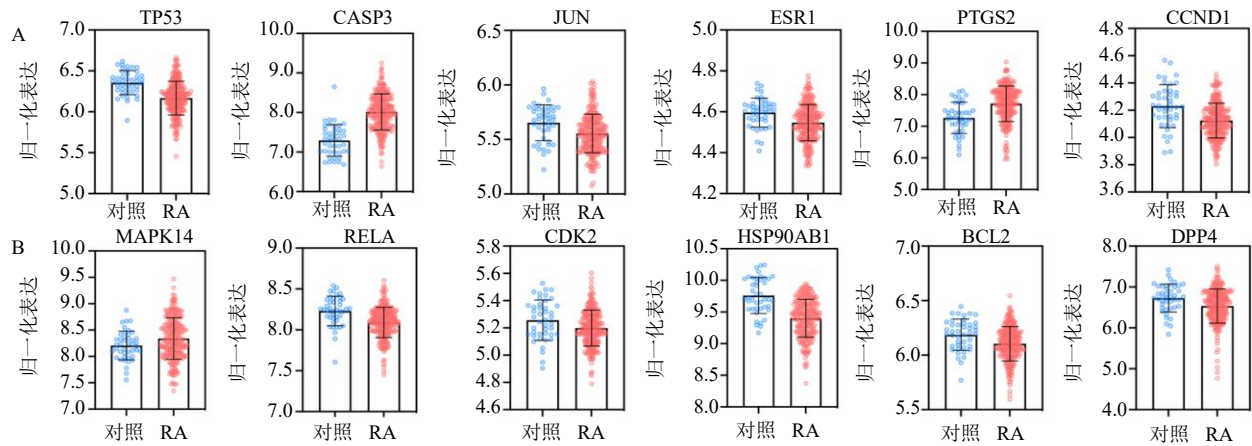
Fig. 5 Mapping of potential target genes in PI3K/Akt (A) and IL-17 (B) signaling pathways for *S. divaricata* treatment of RA

和 IL-17, 核心靶点是前列腺素内过氧化物酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase2, PTGS2)、转录因子 p65(transcription factor p65, RELA)和 AKT1 等, 核心成分则包括汉黄芩素、 β -谷甾醇、5-O-甲基维斯阿米醇和别欧前胡素等。

3.1.6 靶点-器官定位网络分析 评估 66 个防风-

RA 靶点的 mRNA 水平, 所有靶蛋白的 mRNA 水平在 BioGPS 中均可用。其中有 64 个靶蛋白在 21 个与 RA 相关免疫器官中 mRNA 表达水平升高, 包括滑膜 (29 个靶点)、脾脏 (26 个靶点)、淋巴结 (25 个靶点)、肾上腺皮质 (28 个靶点)、骨髓 (28 个靶点)、肾皮质 (19 个靶点)、骨髓质 (19 个靶点)、

Fig. 7 Target-organ location network

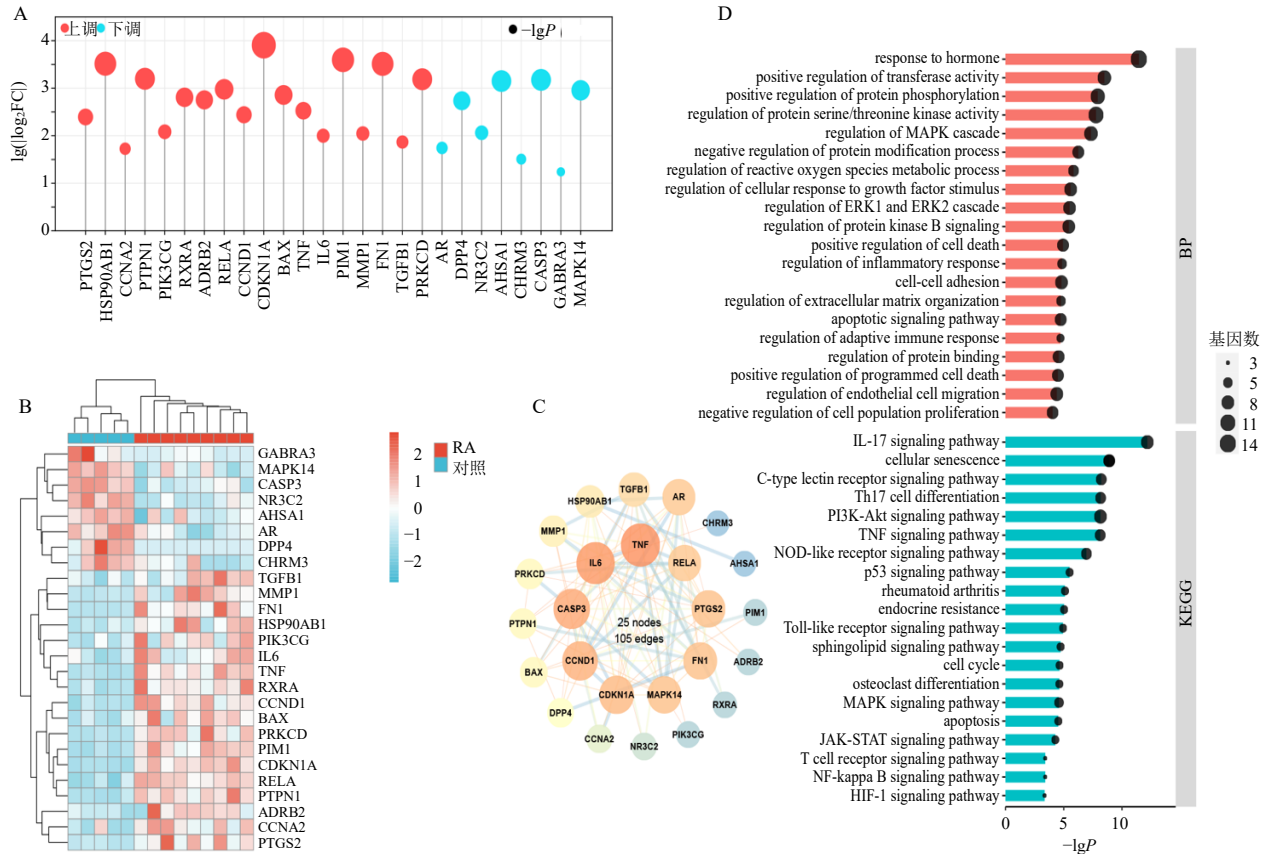


A-PPI 网络中防风治疗 RA 关键靶点表达 B-IPS 网络中核心靶点表达

A-expressions of key targets of *S. divaricata* against RA in PPI network B-expressions of core targets in IPS network

图 8 GEO 数据集对照组 ($n = 43$) 和 RA 组 ($n = 232$) 中防风活性成分治疗 RA 靶点表达水平

Fig. 8 Expressions of targets of active ingredients of *S. divaricata* against RA in GEO data set control group ($n = 43$) and RA group ($n = 232$)



A-DEGs 和防风治疗 RA 的共同靶点, 每个气泡点的大小表示相应的 P 值 B-26 个 DEGs 的表达模式热图 C-参与巨噬细胞病理学的 25 个防风靶点的 PPI 网络 D-巨噬细胞病理学相关靶标的 GO BP 和 KEGG 通路富集分析, BP 和 KEGG 分析的前 20 个富集项的气泡图, 按 $-\lg P$ 排序

A-DEGs and common targets of *S. divaricata* against RA, the size of every bubble point represents the corresponding P value B-heatmaps of expression patterns of 26 DEGs C-PPI network of 25 targets of *S. divaricata* involved in macrophages pathology D-GO BP and KEGG pathway enrichment analysis of targets involved in macrophages pathology. Bubble plot of top 20 enriched terms of BP and KEGG analysis, sorted by $-\lg P$

图 9 巨噬细胞病理学相关的防风靶点的分析

Fig. 9 Analysis of targets of *S. divaricata* related to synovial macrophages pathology

25 个防风靶点参与巨噬细胞病理学, 形成 1 个包含 25 个节点和 105 条边的 PPI 网络, 其中 TNF、IL6、CASP3、CCND1、MAPK14、纤连蛋白 1 (fibronectin 1, FN1)、PTGS2 和 RELA 是发挥重要作用的关键靶点 (图 9-C)。为了进一步分析这些参与巨噬细胞病理学的目标, 进行了 GO 和 KEGG 通路富集分析以进行功能预测。主要在靶标中富集的 GO BP 条目包括对激素的反应、蛋白质磷酸化的正向调节、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性的调节、细胞死亡的正向调节等 (图 9-D)。在 KEGG 通路分析中, 这 26 个防风靶点在 IL-17、PI3K/Akt、RA 和凋亡等信号通路高度富集。上述结果表明, 这些防风靶点与巨噬细胞病理学密切相关, 在 RA 发病机制的相关病理过程中发挥着重要的作用。

3.1.9 通过分子对接检测核心成分与核心靶标之间的结合能力 在 IPS 核心网络中共有 8 个活性成分和 10 个关键靶点, 最终得到 40 组配体-受体对接结果。基于亲和力分数的对接结果见图 10, 所有对接组合的结合能均小于 -20.9293 kJ/mol , 其中得分最低的是汉黄芩素-AKT1 对接组合, 得分为 -26.3709 kJ/mol , 最高的是紫花前胡素-PTGS2 对接组合, 得分为 -47.3001 kJ/mol 。配体-受体结合构象结合能越低, 表明构象越稳定, 则互作的可能性也越大。分子对接结果显示所有对接组合均具有较强的对接活性, 表明这些核心活性成分可能通过核心靶点在 RA 的治疗中发挥关键作用。对接分数排名前 5 的分子对接三维视图如图 11 所示。

3.2 实验验证

3.2.1 别欧前胡素抑制细胞活力、迁移和侵袭及细胞因子和 MMPs 的表达, 并诱导细胞凋亡 在 Hithubs Network 中排名前 4 的核心成分是汉黄芩素 (26)、 β -谷甾醇 (567)、5-O-甲基维斯阿米醇 (11)

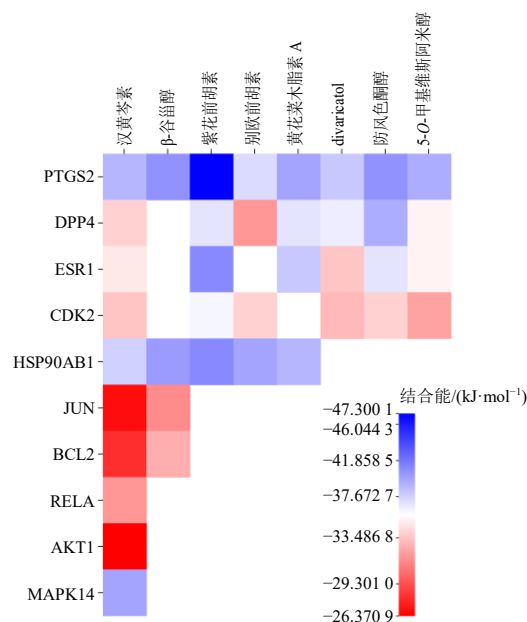


图 10 防风的 8 个核心成分与 10 个关键靶点的对接得分
Fig. 10 Docking score of eight core ingredients of *S. divaricata* with 10 key targets

和别欧前胡素 (3), 前 3 个并不是防风的特异性成分, 因此选择仅在 3 种 (括号中数字) 中药中分布的别欧前胡素作进一步的深入验证机制研究。

如图 12-A 所示, 在 MH7A 细胞中干预 24 h 后, 别欧前胡素 (60、80、120、160 $\mu\text{mol/L}$) 和 MTX (20 $\mu\text{mol/L}$) 明显抑制细胞活力 ($P < 0.05$ 、0.01); 在处理 48 h 后, 别欧前胡素 (80、120、160 $\mu\text{mol/L}$) 和 MTX (20 $\mu\text{mol/L}$) 明显抑制细胞活力 ($P < 0.01$)。在 MH7A 细胞中选择浓度为 20、40、60 $\mu\text{mol/L}$ 的别欧前胡素进行后续实验。别欧前胡素和 MTX 显著抑制 MH7A 细胞的迁移和侵袭 ($P < 0.05$ 、0.01, 图 12-B); 别欧前胡素和 MTX 均显著降低 TNF- α 诱导的 MH7A 细胞中 *IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-8*、*MMP-1* 和 *MMP-3* 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.01$, 图 12-C);

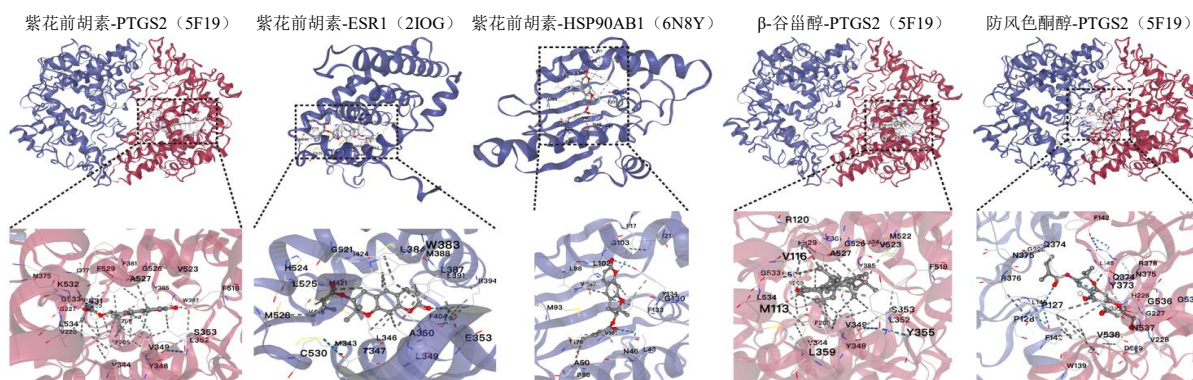
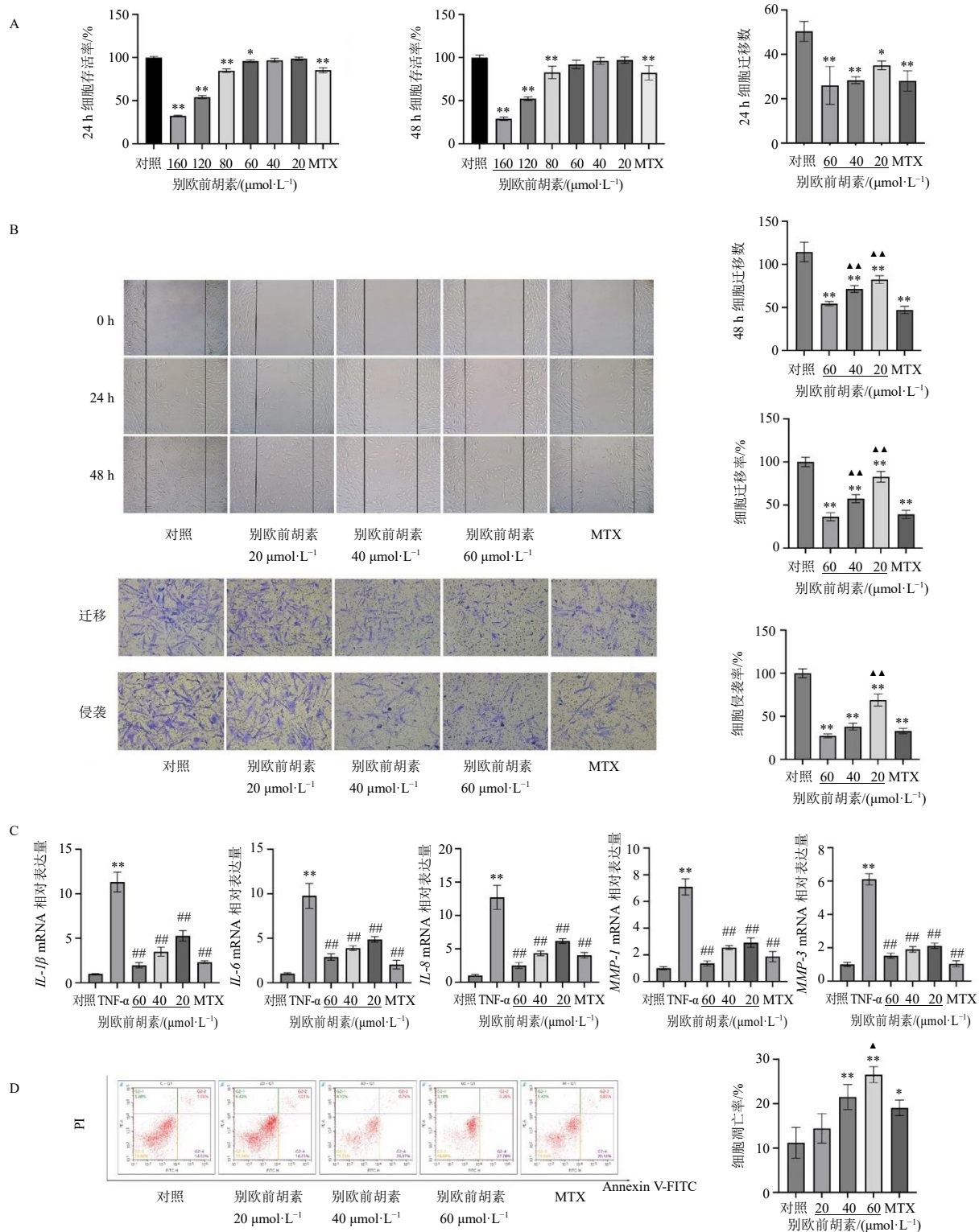


图 11 按对接分数排序的前 5 种分子对接组合的 3D 视图

Fig. 11 3D views of top five molecular docking combinations sorted by docking score



A-别欧前胡素和 MTX 作用 24、48 h 对细胞活力的影响 B-别欧前胡素和 MTX 对细胞迁移和侵袭的影响 C-别欧前胡素和 MTX 对 TNF- α 诱导的细胞炎症因子基因表达的影响 D-别欧前胡素和 MTX 对细胞凋亡的影响 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 TNF- α 组比较: ### $P < 0.01$; 与 MTX 组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$

A-effects of prangenidin and MTX for 24 and 48 h on cell viability B-effects of prangenidin and MTX on cell migration and invasion C-effects of prangenidin and MTX on inflammatory factors gene expressions in TNF- α -induced cells D-effects of prangenidin and MTX on cell apoptosis * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; ### $P < 0.01$ vs TNF- α group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs MTX group

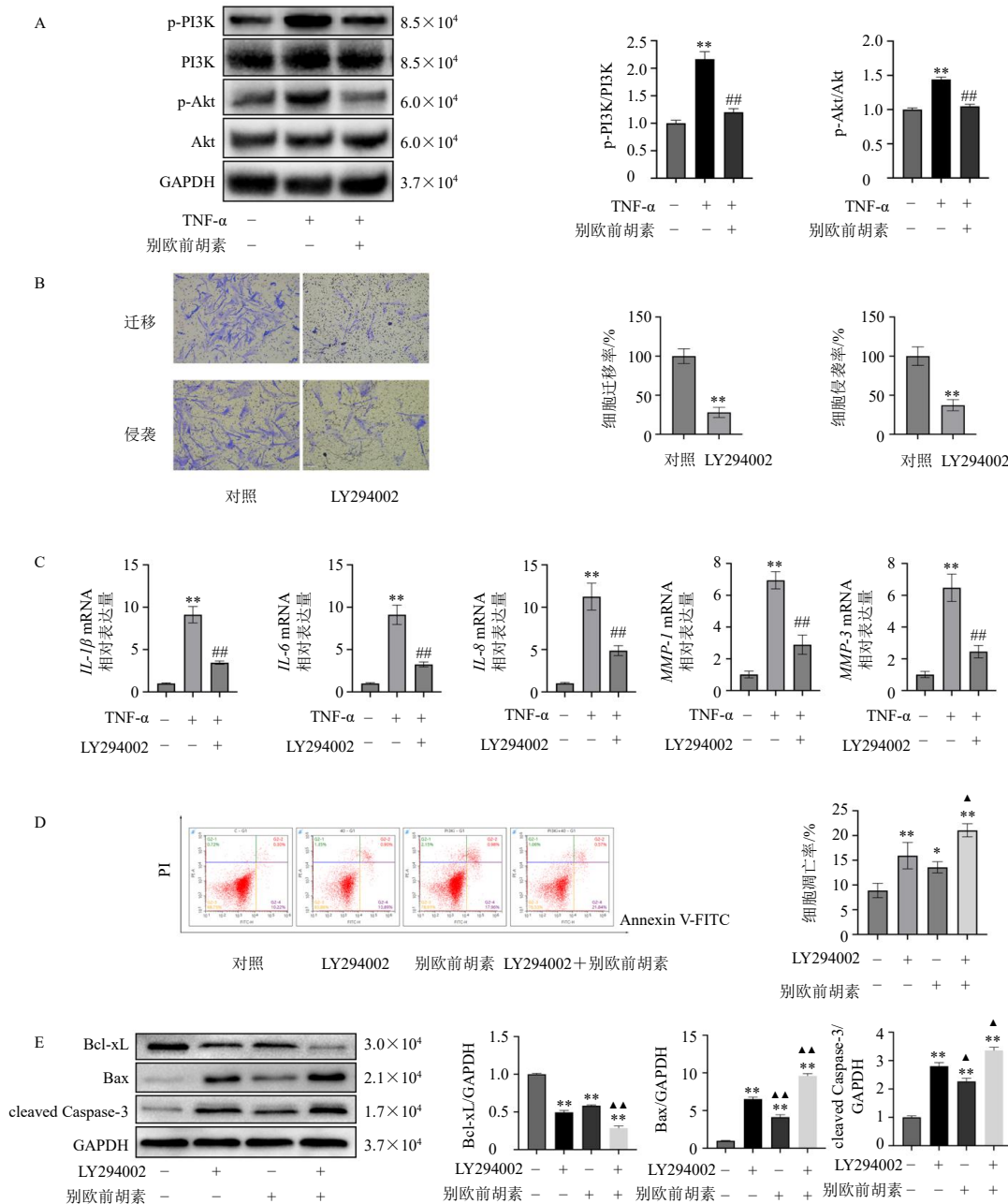
图 12 别欧前胡素对 MH7A 细胞生物学行为的影响

Fig. 12 Effect of prangenidin on biological behavior of MH7A cells

别欧前胡素 (40、60 $\mu\text{mol/L}$) 和 MTX 显著诱导 MH7A 细胞凋亡 ($P < 0.05$ 、0.01, 图 12-D)。

3.2.2 别欧前胡素通过抑制 PI3K/Akt 通路对 MH7A 细胞发挥调节作用 网络药理学的结果表明别欧前胡素治疗 RA 的机制与 PI3K/Akt 通路和细胞死亡的

调控生物过程相关, 潜在靶基因包括 Bax、Bcl-2 等与细胞凋亡相关的蛋白。为了阐明别欧前胡素改善 RA 的机制, 采用 Western blotting 分析相关蛋白表达。TNF- α (10 ng/mL) 诱导后 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 值显著升高 ($P < 0.01$, 图 13-A), 别欧前胡



A-别欧前胡素对 TNF- α 诱导的细胞 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响 B-LY294002 对细胞迁移和侵袭的影响 C-LY294002 对 TNF- α 诱导的细胞炎症因子基因表达的影响 D-别欧前胡素和 LY294002 对细胞凋亡的影响 E-别欧前胡素和 LY294002 对细胞凋亡相关蛋白表达的影响 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 TNF- α 组比较: # $P < 0.01$; 与 LY294002 组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$

A-effect of prangenidin on PI3K/Akt pathway related protein expressions in TNF- α -induced cells B-effect of LY294002 on cell migration and invasion C-effect of LY294002 on inflammatory factors gene expressions in TNF- α -induced cells D-effects of prangenidin and LY294002 on cell apoptosis E-effects of prangenidin and LY294002 on apoptosis related protein expressions in cells * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.01$ vs TNF- α group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs LY294002 group

图 13 别欧前胡素对 MH7A 细胞 PI3K/Akt 通路的影响

Fig. 13 Effect of prangenidin on PI3K/Akt pathway in MH7A cells

素 (40 $\mu\text{mol/L}$) 作用后显著降低了 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 值 ($P<0.01$)。然后, 使用 PI3K 抑制剂 LY294002 检测其对细胞迁移和侵袭、细胞凋亡、细胞因子和 MMPs 表达的调控作用, 并检测凋亡相关蛋白表达。LY294002 (20 $\mu\text{mol/L}$) 显著抑制 MH7A 细胞迁移和侵袭 ($P<0.01$, 图 13-B), 并显著降低 TNF- α (10 ng/mL) 诱导的 MH7A 细胞中 IL-1 β 、IL-6、IL-8、MMP-1 和 MMP-3 的 mRNA 表达水平 ($P<0.01$, 图 13-C)。别欧前胡素 (40 $\mu\text{mol/L}$) 和 LY294002 (20 $\mu\text{mol/L}$) 显著诱导 MH7A 细胞凋亡 ($P<0.05$ 、0.01, 图 13-D), 下调 Bcl-xL 并上调 Bax、cleaved Caspase-3 表达 ($P<0.01$, 图 13-E)。

4 讨论

本研究系统地评价了防风生物活性成分的药理、毒理和分子特性, 加深了对这些防风活性成分的认识。对防风-RA 共存靶点进行蛋白质功能分类、BioGPS 靶点-器官定位分析, 还使用 GEO 数据库中人类高通量组学数据验证了与 RA 致病机制相关的防风靶点, 并对别欧前胡素进行了体外实验验证。

通过建立和筛选 IPS 网络得到核心成分汉黄芩素、 β -谷甾醇、5-*O*-甲基维斯阿米醇和别欧前胡素等, 核心靶点 PTGS2、RELA、AKT1 等。Khan 等^[24]研究显示汉黄芩素可以有效抑制 IL-1 β 刺激的软骨细胞中 IL-6、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)、一氧化氮和前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) 炎症介质的表达和产生, 通过激活相应信号通路发挥确切的抗炎和软骨保护作用。此外, 动物实验表明汉黄芩素通过核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)/丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路改善胶原诱导的关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 大鼠 RA 症状, 并呈剂量相关性地改善抗氧化蛋白、氧化应激标志物和炎症细胞因子水平的变化^[25]。一项对小鼠巨噬细胞的研究表明, β -谷甾醇处理后, 一些趋化因子和促炎因子释放减少, 抗炎因子 IL-10 水平增加, 并且提高了蛋白酪氨酸磷酸酶 1 (protein phosphoserine phosphatase-1, SHP-1) 活性, 抑制了信号传导及转录激活因子 1 (signal transducers and activators of transcription 1, STAT1) 和 NF- κ B 信号转导^[26]。其他研究表明, β -谷甾醇通过抑制 NF- κ B 和激活血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)/核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 信

号通路对 CIA 大鼠起到抗关节炎作用, β -谷甾醇可以通过调节巨噬细胞功能, 抑制 M1 极化, 增强 M2 极化从而减少促炎因子和增加抗炎因子释放^[27-28]。大量研究表明汉黄芩素、5-*O*-甲基维斯阿米醇等色原酮类化合物在各种动物模型和细胞实验中抑制炎症细胞因子释放和炎症相关信号通路的转导^[29-30]。以上研究充分说明防风活性成分在 RA 的治疗中有很好的抗炎和免疫调节作用。此外, 既往大量文献研究表明这些核心靶点在 RA 的治疗和发病机制中发挥着关键作用^[31-33]。

通过 PPI 网络可以看出 66 个靶点间并非相互独立, 而是呈现相互作用的交互关系^[34]。在成分-靶点网络中, 很多靶基因可以被防风的多种活性成分调控, 这体现了中医药疗法多成分、多靶点的特质。进一步对 66 个靶基因进行了 GO BP 和 KEGG 通路富集分析。其中 PI3K/Akt 和 IL-17 是 IPS 核心网络中的主要信号通路。和既往的研究一致^[35], 表明这些信号通路在 RA 疾病的发生和发展具有重要影响。研究表明, 阻断 PI3K/Akt 通路可以抑制 RA 患者 FLSs 的肿瘤样生物学行为^[36-37]。Chang 等^[38]发现 IL-17 通过激活 STAT3 上调自噬增强了 RA 中 FLSs 的肿瘤样增殖。IL-17 在 RA-FLSs 中诱导线粒体功能障碍和自噬体形成, 表明它们对细胞凋亡具有抗性。IL-17 诱导的自噬相关抗细胞凋亡通过抑制自噬而恢复, 这表明线粒体功能障碍与 RA-FLSs 中的细胞存活之间存在关系。辅助性 T 细胞 17 (T helper cell 17, Th17) 和 IL-17 通过引起线粒体功能障碍增加 RA-FLSs 的自噬^[39]。最近一项研究总结了中药及其活性成分对 RA-FLSs 的凋亡诱导, 阐述了促凋亡治疗 RA 的重要分子机制^[40]。本研究结果表明, 防风有效成分可以通过作用于多种生物学过程和信号通路发挥抗炎和免疫调节等作用, 从而起到对 RA 的治疗作用。对 IPS 中筛选出的核心成分和核心靶点组合进行分子对接验证, 结果显示所有对接组合均具有良好的对接活性, 说明其可能在 RA 的治疗中发挥着重要的作用。预测结果为防风中活性成分作用于特定靶点治疗 RA 提供了依据。

在 RA 滑膜炎性环境中, FLSs 会发生凋亡异常, “类肿瘤样”异常增殖, 会导致细胞过度活化, 迁移、侵袭能力加强。RA-FLSs 分泌细胞因子和免疫细胞的募集都会导致 PI3K/Akt 通路的高度激活, 并进一步参与 RA-FLSs 的异常生物学行为和炎症, 导致炎症性侵蚀性关节炎和 TNF- α 介导的

软骨破坏^[41]。TNF- α 刺激 T 细胞产生巨噬细胞集落刺激因子，激活成骨细胞产生核因子- κ B 受体活化因子配体 (receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL)，间接诱导破骨细胞的产生^[42]。被 PI3K 激活的 Akt 能够通过磷酸化作用抑制或激活其下游死亡启动子相关靶蛋白 Bcl-xL/Bcl-2 从而影响细胞凋亡^[35]。别欧前胡素是一种香豆素类生物活性化合物，既往研究表明，其具有抗肿瘤活性、抗氧化、抗炎，以及诱导激活细胞凋亡、铁死亡、氧化死亡以抑制细胞生长和迁移、侵袭等多种药理学作用^[43-47]。但目前为止，有关该化合物的研究很少，其对 RA-FLSs 的异常生物学行为影响的研究尚无报道。在本研究中，首次阐述了别欧前胡素可以抑制 MH7A 细胞的活力、迁移和侵袭，并诱导细胞凋亡，也能抑制 *IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-8*、*MMP-1* 和 *MMP-3* 的表达，这可能是别欧前胡素治疗 RA 的机制。分子分析表明别欧前胡素通过抑制 PI3K/Akt 通路发挥对 MH7A 细胞的调控作用。

本研究通过以网络药理学为基础的研究方法，系统地阐明了防风治疗 RA 的分子靶点和潜在机制。构建“成分-靶点”网络，筛选出防风治疗 RA 的核心成分和关键靶点及其作用的方式，以及对活性成分-靶点进行分子对接验证，为揭示防风治疗 RA 的分子生物学机制和药物研发提供了进一步的理论依据。体外实验研究结果表明，别欧前胡素是通过抑制 PI3K/Akt 通路的分子机制在 RA 治疗中发挥作用的一种新的有价值的天然潜在药物。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Radu A F, Bungau S G. Management of rheumatoid arthritis: An overview [J]. *Cells*, 2021, 10(11): 2857.
- [2] Guo Q, Wang Y X, Xu D, et al. Rheumatoid arthritis: Pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies [J]. *Bone Res*, 2018, 6: 15.
- [3] Baum R, Gravallesse E M. Bone as a target organ in rheumatic disease: Impact on osteoclasts and osteoblasts [J]. *Clinic Rev Allerg Immunol*, 2016, 51(1): 1-15.
- [4] Cheng L Y, Wang Y Y, Wu R H, et al. New insights from single-cell sequencing data: Synovial fibroblasts and synovial macrophages in rheumatoid arthritis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 709178.
- [5] Serrati S, Margheri F, Chillà A, et al. Reduction of *in vitro* invasion and *in vivo* cartilage degradation in a SCID mouse model by loss of function of the fibrinolytic system of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(9): 2584-2594.
- [6] Bartok B, Firestein G S. Fibroblast-like synoviocytes: Key effector cells in rheumatoid arthritis [J]. *Immunol Rev*, 2010, 233(1): 233-255.
- [7] Nygaard G, Firestein G S. Restoring synovial homeostasis in rheumatoid arthritis by targeting fibroblast-like synoviocytes [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2020, 16(6): 316-333.
- [8] Noss E H, Brenner M B. The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis [J]. *Immunol Rev*, 2008, 223(1): 252-270.
- [9] Bao Z Z, Zhu Z Y, Zhang H J, et al. The complete chloroplast genome of *Saposhnikovia divaricata* [J]. *Mitochondrial DNA B Resour*, 2019, 5(1): 360-361.
- [10] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 156.
- [11] 梁瑞峰, 李兵杰, 葛文静, 等. 防风不同提取部位的燥性差异及其对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜水通道蛋白的影响 [J]. *中草药*, 2021, 52(11): 3312-3320.
- [12] Chun J M, Kim H S, Lee A Y, et al. Anti-inflammatory and antiosteoarthritis effects of *Saposhnikovia divaricata* ethanol extract: *In vitro* and *in vivo* studies [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016: 1984238.
- [13] Tai J, Cheung S. Anti-proliferative and antioxidant activities of *Saposhnikovia divaricata* [J]. *Oncol Rep*, 2007, 18(1): 227-234.
- [14] Yang M, Wang C C, Wang W L, et al. *Saposhnikovia divaricata*-an ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review [J]. *Chin J Integr Med*, 2020, 26(11): 873-880.
- [15] Kreiner J, Pang E, Lenon G B, et al. *Saposhnikovia divaricata*: A phytochemical, pharmacological, and pharmacokinetic review [J]. *Chin J Nat Med*, 2017, 15(4): 255-264.
- [16] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [17] Berger S I, Iyengar R. Network analyses in systems pharmacology [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(19): 2466-2472.
- [18] Kitchen D B, Decornez H, Furr J R, et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3(11): 935-949.
- [19] Shen X, Zhao Z Y, Wang H, et al. Elucidation of the anti-inflammatory mechanisms of *Bupleuri* and *Scutellariae Radix* using system pharmacological analyses [J].

- Mediators Inflamm*, 2017, 2017: 3709874.
- [20] Gaillard T. Evaluation of AutoDock and AutoDock vina on the CASF-2013 benchmark [J]. *J Chem Inf Model*, 2018, 58(8): 1697-1706.
 - [21] Liu X, Shi F, Li Y, *et al*. Post-translational modifications as key regulators of TNF-induced necroptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(7): e2293.
 - [22] Alpízar-Rodríguez D, Pluchino N, Canny G, *et al*. The role of female hormonal factors in the development of rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2017, 56(8): 1254-1263.
 - [23] Yang X Z, Chang Y, Wei W. Emerging role of targeting macrophages in rheumatoid arthritis: Focus on polarization, metabolism and apoptosis [J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(7): e12854.
 - [24] Khan N M, Haseeb A, Ansari M Y, *et al*. Wogonin, a plant derived small molecule, exerts potent anti-inflammatory and chondroprotective effects through the activation of ROS/ERK/Nrf2 signaling pathways in human Osteoarthritis chondrocytes [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 106: 288-301.
 - [25] Huang Y T, Guo L B, Chitti R, *et al*. Wogonin ameliorate complete Freund's adjuvant induced rheumatoid arthritis via targeting NF- κ B/MAPK signaling pathway [J]. *Biofactors*, 2020, 46(2): 283-291.
 - [26] Valerio M, Awad A B. β -Sitosterol down-regulates some pro-inflammatory signal transduction pathways by increasing the activity of tyrosine phosphatase SHP-1 in J774A.1 murine macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(8): 1012-1017.
 - [27] Zhang F, Liu Z Y, He X J, *et al*. β -Sitosterol-loaded solid lipid nanoparticles ameliorate complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats: Involvement of NF- κ B and HO-1/Nrf-2 pathway [J]. *Drug Deliv*, 2020, 27(1): 1329-1341.
 - [28] Liu R, Hao D L, Xu W Y, *et al*. β -Sitosterol modulates macrophage polarization and attenuates rheumatoid inflammation in mice [J]. *Pharm Biol*, 2019, 57(1): 161-168.
 - [29] Kong X Y, Liu C F, Zhang C, *et al*. The suppressive effects of *Saposhnikovia divaricata* (Fangfeng) chromone extract on rheumatoid arthritis via inhibition of nuclear factor- κ B and mitogen activated protein kinases activation on collagen-induced arthritis model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 148(3): 842-850.
 - [30] Okuyama E, Hasegawa T, Matsushita T, *et al*. Analgesic components of *Saposhnikovia* root (*Saposhnikovia divaricata*) [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2001, 49(2): 154-160.
 - [31] Fan H W, Liu G Y, Zhao C F, *et al*. Differential expression of COX-2 in osteoarthritis and rheumatoid arthritis [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4): 12872-12879.
 - [32] Giridharan S, Srinivasan M. Mechanisms of NF- κ B p65 and strategies for therapeutic manipulation [J]. *J Inflamm Res*, 2018, 11: 407-419.
 - [33] Che N, Sun X X, Gu L, *et al*. Adiponectin enhances B-cell proliferation and differentiation via activation of Akt1/STAT3 and exacerbates collagen-induced arthritis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 626310.
 - [34] Zeng Q, Li L F, Jin Y, *et al*. A network pharmacology approach to reveal the underlying mechanisms of *Paeonia lactiflora* Pall. on the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 8706589.
 - [35] Liu S, Ma H X, Zhang H X, *et al*. Recent advances on signaling pathways and their inhibitors in rheumatoid arthritis [J]. *Clin Immunol*, 2021, 230: 108793.
 - [36] Liu Y, Pan Y F, Xue Y Q, *et al*. uPAR promotes tumor-like biologic behaviors of fibroblast-like synoviocytes through PI3K/Akt signaling pathway in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Cell Mol Immunol*, 2018, 15(2): 171-181.
 - [37] Song B, Li X F, Yao Y, *et al*. BMP9 inhibits the proliferation and migration of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis via the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 74: 105685.
 - [38] Chang L, Feng X, Gao W. Proliferation of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes is enhanced by IL-17-mediated autophagy through STAT3 activation [J]. *Connect Tissue Res*, 2019, 60(4): 358-366.
 - [39] Kim E K, Kwon J E, Lee S Y, *et al*. IL-17-mediated mitochondrial dysfunction impairs apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through activation of autophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(1): e2565.
 - [40] Zhang Q, Liu J, Zhang M M, *et al*. Apoptosis induction of fibroblast-like synoviocytes is an important molecular-mechanism for herbal medicine along with its active components in treating rheumatoid arthritis [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(12): 795.
 - [41] Liu S Y, Cao C X, Zhang Y J, *et al*. PI3K/Akt inhibitor partly decreases TNF- α -induced activation of fibroblast-like synoviocytes in osteoarthritis [J]. *J Orthop Surg Res*, 2019, 14(1): 425.
 - [42] Chen X J, Chen W, Aung Z M, *et al*. LY3023414 inhibits both osteogenesis and osteoclastogenesis through the

- PI3K/Akt/GSK3 signalling pathway [J]. *Bone Joint Res*, 2021, 10(4): 237-249.
- [43] Bai Y Y, Yang L J, Zhang C H, *et al.* Studies on the mechanism of alloimperatorin on the proliferation and apoptosis of HeLa cells [J]. *J Oncol*, 2021, 2021: 6617312.
- [44] Abd-Alla H I, Ibrahim Fouad G, Ahmed K A, *et al.* Alloimperatorin from *Ammi majus* fruits mitigates Piroxicam-provoked gastric ulcer and hepatorenal toxicity in rats *via* suppressing oxidative stress and apoptosis [J]. *Biomarkers*, 2022, 27(8): 727-742.
- [45] Bai Y Y, Cheng Y M, Wang W H, *et al.* *In vivo* and *in vitro* studies of alloimperatorin induced autophagy in cervical cancer cells *via* reactive oxygen species pathway [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(6): 14299-14314.
- [46] Zhang J, Gao R F, Li J, *et al.* Alloimperatorin activates apoptosis, ferroptosis, and oxceptosis to inhibit the growth and invasion of breast cancer cells *in vitro* [J]. *Biochem Cell Biol*, 2022, 100(3): 213-222.
- [47] Li H, Chao X, He C-L, *et al.* Alloimperatorin and its epoxide derivative exhibit *in vitro* antitumor activity in HL-60 acute myeloid leukemia cancer cells *via* inducing apoptosis, cell cycle disruption and inhibition of cell migration [J]. *Bangladesh J Pharmacol*, 2016, 11(1): 194-199.

[责任编辑 李亚楠]