

痹祺胶囊治疗类风湿性关节炎的药效研究及网络机制预测

李新^{1,2,3}, 卜睿臻⁴, 王玉丽^{1,2,3}, 李虎玲^{1,2,3}, 韩彦琪^{1,2,3}, 王磊⁵, 张星艳^{1,2,3}, 赵文静^{1,2,3}, 许浚^{1,2,3}, 张铁军^{1,2,3*}, 刘昌孝^{1,2,3*}

1. 天津药物研究院 天津市中药质量标志物重点实验室, 天津 300462
2. 天津药物研究院 中药现代制剂与质量控制技术国家地方联合工程实验室, 天津 300462
3. 天津药物研究院 药物成药性评价与系统转化全国重点实验室, 天津 300462
4. 天津达仁堂京万红药业有限公司, 天津 300112
5. 津药达仁堂集团股份有限公司, 天津 300193

摘要: 目的 基于 II 型胶原诱导的类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 大鼠模型和网络药理学方法探讨痹祺胶囊的药效作用及作用机制。方法 SD 大鼠采用 II 型胶原蛋白造模, 造模成功大鼠随机分为模型组, 痹祺胶囊 (0.05、0.10、0.20、0.40 g/kg) 组及泼尼松 (10 mg/kg) 组和雷公藤总苷 (10 mg/kg) 组, 连续给药 15 d。持续监测大鼠体重、足趾肿胀度和关节炎评分, 苏木素-伊红染色考察大鼠踝关节病理变化, ELISA 法测定血清细胞因子含量, 初步评价痹祺胶囊治疗效果。选择痹祺胶囊中 39 个化合物为研究对象, 依据反向药效团匹配方法和 TCSP、Uniprot 等数据库预测化合物作用靶点, 与通过 OMIM、DisGeNet 等数据库收集的 RA 相关靶点相互交互, 将交互靶点借助 Omicsbean、STRING 等数据库平台对获得靶点进行基因本体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, 利用 Cytoscape 软件构建“药材-化合物-靶点-通路-功效-疾病”网络, 预测其可能的作用机制。结果 与对照组比较, 模型组大鼠活动、饮食减少, 足趾肿胀、关节呈急性炎症表现, 关节炎评分显著增加 ($P < 0.01$), 血清中类风湿因子 (rheumatoid factor, RF)、白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-1 β 和 γ -干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 水平均显著增加 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), IL-10 水平降低, 脾脏、胸腺指数显著增加 ($P < 0.01$ 、0.001), 病理显示膝关节可见滑膜细胞增生、炎性细胞浸润, 骨与软骨被侵蚀。与模型组比较, 痹祺胶囊组大鼠踝关节病变情况得到不同程度改善, 具体可见足趾肿胀度、关节炎评分显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 血清中 RF、IL-17、TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), IL-10 水平增高, 脾脏、胸腺指数降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 踝关节骨、软骨组织损伤减轻, 炎性细胞浸润、滑膜结缔组织增生减少。网络药理学预测发现, 痹祺胶囊 39 个成分与 RA 交集靶点共 371 个。蛋白质-蛋白质相互作用网络分析结果显示, IL-6、白蛋白、TNF、血管内皮生长因子 A、基质金属蛋白酶 9、趋化因子配体 8 等 124 个靶点可能是痹祺胶囊治疗 RA 的关键靶点。KEGG 通路富集分析获得 IL-17 信号通路、Toll 样受体信号通路、Th1 和 Th2 细胞分化、VEGF 信号通路、瞬时受体电位通道的炎症介质调节、Wnt 信号通路、血小板激活等 80 条信号通路, 与免疫调控、抗炎、抑制血管壁生成、成骨/破骨细胞平衡等过程相关。对网络进行分析发现痹祺胶囊治疗 RA 具有多成分、多靶点、多途径的特点, 其中单体成分士的宁、三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、丹参酮 I、丹参酮 II_A、丹酚酸 B、异甘草素、迷迭香酸、阿魏酸等可能为痹祺胶囊的关键药效物质基础。结论 痹祺胶囊对 II 型胶原诱导的 RA 大鼠模型治疗效果较好, 可能通过抗炎、免疫调节、血管生成、骨形成/侵蚀平衡等发挥治疗作用, 体现了痹祺胶囊治疗 RA 多成分、多靶点、多通路的特点。

关键词: 痹祺胶囊; 类风湿性关节炎; 免疫调节; 血管增生; 炎症; 镇痛; 士的宁; 三七皂苷 R₁; 人参皂苷 Rg₁; 丹参酮 I; 丹参酮 II_A; 丹酚酸 B; 异甘草素; 迷迭香酸; 阿魏酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)23-7618-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.23.003

Pharmacodynamic study and network mechanism prediction of Biqi Capsule in treatment of rheumatoid arthritis

LI Xin^{1,2,3}, BU Rui-zhen⁴, WANG Yu-li^{1,2,3}, LI Hu-ling^{1,2,3}, HAN Yan-qi^{1,2,3}, WANG Lei⁵, ZHANG Xing-yan^{1,2,3}, ZHAO Wen-jing^{1,2,3}, XU Jun^{1,2,3}, ZHANG Tie-jun^{1,2,3}, LIU Chang-xiao^{1,2,3}

收稿日期: 2023-06-13

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (U21A20406)

作者简介: 李新, 助理研究员, 研究方向为中药药理研究。E-mail: lix6@tjipr.com

*通信作者: 张铁军, 研究员。E-mail: zhangtj@tjipr.com

刘昌孝, 中国工程院院士。E-mail: liucx@tjipr.com

1. Tianjin Key Laboratory of Quality Marker of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China
2. National & Local United Engineering Laboratory of Modern Preparation and Quality Control Technology of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China
3. National Key Laboratory of Druggability Evaluation and Systematic Translational Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China
4. Tianjin Darentang Jingwanhong Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300112, China
5. Tianjin Pharmaceutical Da Ren Tang Group Co., Ltd., Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To explore the pharmacodynamic effect and potential mechanism of Biqi Capsule (痹祺胶囊) based on type II collagen-induced rheumatoid arthritis (RA) rat model and network pharmacology. **Methods** SD rats were modeled with type II collagen, and the successful rats were randomly divided into model group, Biqi Capsule (0.05, 0.10, 0.20, 0.40 g/kg) groups, prednisone (10 mg/kg) group and *Tripterygium* glycosides (10 mg/kg) group. Rats were continuously ig for 15 d, body weight, foot swelling and arthritis score of rats were continuously monitored. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the pathological changes of ankle joint in rats, and the content of cytokines in serum was determined by ELISA, so as to preliminarily evaluate the therapeutic effect of Biqi Capsule. A total of 39 compounds in Biqi Capsule were selected as the research objects, and the targets of the compounds were predicted according to the reverse pharmacophore matching method and databases such as TCMSP and Uniprot. With the help of database platforms such as Omicsbean, STRING, etc., the interactive targets were analyzed by gene ontology function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway by interacting with RA-related targets collected through OMIM, DisGeNet and GeneCards, and “medicinal material-compound-target-pathway-efficacy-disease” network was constructed by Cytoscape software to predict its possible mechanism. **Results** Compared with control group, the activity and diet of rats in model group were reduced, the toes were swollen, the joints showed acute inflammation, the arthritis score was significantly increased ($P < 0.01$), and the levels of rheumatoid factor (RF), interleukin-17 (IL-17), tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-1 β and interferon- γ (IFN- γ) in serum were significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), while the level of IL-10 was decreased, indexes of spleen and thymus were increased ($P < 0.01, 0.001$). Pathology showed that synovial cells were proliferated, inflammatory cells were infiltrated and bone and cartilage were eroded. Compared with model group, the pathological changes of ankle joint in Biqi Capsule group were improved in different degrees, and the foot swelling and arthritis score were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$), and the levels of RF, IL-17, TNF- α , IL-1 β and IFN- γ in serum were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), IL-10 level was increased, indexes of spleen and thymus were decreased ($P < 0.05, 0.01$). The injury of ankle bone and cartilage tissue were reduced, inflammatory cell infiltration and synovial connective tissue proliferation were reduced. According to the prediction of network pharmacology, there were 371 targets where 39 components of Biqi Capsule intersected with RA. Protein-protein interaction network analysis showed that 124 targets such as IL-6, albumin, TNF, vascular endothelial growth factor A, matrix metalloproteinase 9 and chemokine ligand 8 may be the key targets of Biqi Capsule in treatment of RA. KEGG pathway enrichment analysis obtained 80 signal pathways, including IL-17 signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, Th1 and Th2 cell differentiation, VEGF signaling pathway, inflammatory mediator regulation of transient receptor potential (TRP) channels, Wnt signaling pathway, platelet activation, etc., which were related to immune regulation, anti-inflammation, inhibition of pannus formation, osteogenesis/osteoclast balance and other processes. The analysis of the network showed that Biqi Capsule had the characteristics of multi-component, multi-target and multi-channel, among which the monomer components of strychnine, notoginseng saponin R₁, ginsenoside Rg₁, tanshinone I, tanshinone II_A, salvianolic acid B, isoliquiritigenin, rosmarinic acid and ferulic acid may be the key pharmacodynamic substance basis of Biqi Capsule. **Conclusion** Biqi Capsule has a good therapeutic effect on type II collagen-induced RA rat model, which may play a therapeutic role through anti-inflammation, immunomodulation, angiogenesis, bone formation/erosion balance, etc., reflecting the characteristics of Biqi Capsule in treating RA with multiple components, multiple targets and multiple channels.

Key words: Biqi Capsule; rheumatoid arthritis; immune regulation; vascular hyperplasia; inflammation; analgesia; strychnine; notoginseng saponin R₁; ginsenoside Rg₁; tanshinone I; tanshinone II_A; salvianolic acid B; isoliquiritigenin; rosmarinic acid; ferulic acid

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是以关节滑膜慢性炎症为主的自身免疫性疾病^[1], 以关节肿胀、关节压痛和持续性滑膜炎为特征。研究发

现, 免疫细胞的激活、炎症因子的大量释放、氧化应激等与 RA 的发病息息相关, 并且在这些活性物质的作用下进一步加快患者病情的进展^[2]。RA 没有永久

的治疗方法,目前 RA 的治疗用药主要依赖于非甾体抗炎药、糖皮质激素、生物制剂等,但内科治疗方法起效缓慢、久服对肝、肾及血液系统损害较大^[3]。终末期 RA 下只能采用外科的部分或全部关节置换等关节整形手术^[4],然而手术前的评估较为严苛,术后可能存在潜在的远期并发症,如感染、磨损、骨溶解等^[5]。RA 在中医中称为“痹证”,中医药治疗 RA 在改善临床症状、药物不良反应小等方面具有独特的优势。痹祺胶囊是由马钱子、党参、白术、丹参、茯苓、牛膝、地龙、川芎、三七和甘草 10 味药材组成的中药复方制剂,具有益气养血、祛风除湿、活血止痛的作用,临床上用于气血不足、风湿痹阻、肌肉关节酸痛、关节肿大、僵硬变形或肌肉萎缩、气短乏力;风湿、RA,腰肌劳损,软组织损伤属上述证候者^[6-7]。痹祺胶囊在临床上表现出较好的抗关节炎作用,研究发现,痹祺胶囊可通过抑制骨保护蛋白(osteoprotegerin, OPG)/核因子- κ B 受体活化因子(receptor activator of nuclear factor- κ B, RANK)/核因子- κ B 受体活化因子配基(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)、Janus 激酶(Janus kinase, JAK)/信号转导子和转录活化因子(signal transducer and activators of transcription, STATs)信号通路降低大鼠滑膜增生,减轻关节软骨及骨破坏^[8-9]。本研究采用胶原诱导的关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)大鼠模型及网络药理学方法^[10]研究痹祺胶囊在整体动物模型下对 RA 大鼠的药效作用及可能机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 120 只,体质量 110~130 g,由北京斯贝福生物技术有限公司提供,许可证号 SCXK(京)2019-0010。饲养在天津天诚新药评价有限公司实验动物屏障系统[合格证 SYXK(津)2021-0008],温度、湿度、换气次数由中央系统自动控制,温度维持在 20~26 °C,相对湿度维持在 40%~70%,通风次数为 10~15 次/h 全新风,光照为 12 h 明、12 h 暗。自由摄食饮水。实验动物的使用经天津药物研究院新药评价有限公司实验动物伦理委员会批准(批准号 No.2021031803)。

1.2 药品与试剂

痹祺胶囊(0.3 g/粒,批号 311574)由天津达仁堂京万红药业有限公司提供;醋酸泼尼松片(5 mg/片,批号 21020162)购自新乡市常乐制药有限责任公司;雷公藤总苷片(10 mg/片,批号 180502)购

自上海复旦复华药业有限公司;鸡 II 型胶原蛋白购自美国 Chondrex 公司;大鼠白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA 试剂盒(批号 P261453)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒(批号 P254162)购自美国 R&D Systems 公司;大鼠 IL-17 ELISA 试剂盒(批号 2104251)购自上海西唐生物科技有限公司;大鼠 IL-10 ELISA 试剂盒(批号 22J225)购自 ExCell Bio 公司;类风湿因子(rheumatoid factor, RF)检测试剂盒(批号 20210407)购自南京建成生物工程研究所;大鼠 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ) ELISA 试剂盒(批号 B303835)购自 Biolegend 公司。

1.3 仪器

YLS-7B 型足肿仪(山东省医学科学院设备站);SpectraMax M5 型酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);ASP200S 型自动真空组织脱水机;EG1150H 型自动生物组织包埋机、RM2255 型切片机(德国 Leica 公司);Ci-L 型显微镜(日本 Nikon 公司)。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

2.1.1 配制 II 型胶原混悬乳剂 取 0.1 mol/L 冰醋酸溶液 10 mL 与鸡 II 型胶原 20 mg,于棕色试剂瓶内,冰浴下充分混合均匀,直至白色絮状鸡 II 型胶原完全溶于冰醋酸内,并于实验前加入弗氏完全佐剂并充分乳化,使鸡 II 型胶原质量浓度为 1 mg/mL。

2.1.2 CIA 大鼠模型制备 120 只 SD 大鼠适应期喂养 1 周,随机取 10 只作为对照组,其余所有大鼠均进行 II 型胶原蛋白造模。于左侧足跖肉垫处皮内注射鸡 II 型胶原蛋白(0.1 mL/只),注射后注射点按压防液体外流。对照组大鼠以同样方式注射等体积生理盐水注射液。在第 1 次注射免疫的第 7 天,在背部注射相同乳剂 0.1 mL 进行加强免疫,密切观察大鼠状态至造模 15 d 筛选双侧关节出现炎症肿胀的动物进行分组。

2.1.3 给药 选取造模成功大鼠重新标记后用随机数字法分为模型组、泼尼松(10 mg/kg)组、雷公藤总苷(10 mg/kg)组和痹祺胶囊各剂量(0.05、0.10、0.20、0.40 g/kg)组。各给药组 ig 相应药物,对照组和模型组 ig 0.5%羧甲基纤维素钠溶液,1 次/d,连续 15 d,期间给予 SPF 级动物常规饲料及饮水。

2.2 指标观察及检测

2.2.1 体质量测定 给药第 1、3、5、8、10、12、15 天,用天平对大鼠体质量进行称量,计算每组大

鼠的平均体质量。

2.2.2 足趾肿胀度测定 给药第 1、3、5、8、10、12、15 天,用足肿胀测定仪测量大鼠右后爪肿胀度。

2.2.3 关节炎评分 左后爪注射 II 型胶原 15 d 后,右后爪会形成继发性关节炎,监测给药第 1、3、5、8、10、12、15 天的关节炎指数评分^[11]。0 分代表正常足爪;1 分代表足趾红肿;2 分代表足趾和足掌红肿;3 分代表肿胀至踝关节以下;4 分代表整个足爪完全肿胀,不能弯曲。将每只大鼠的 4 只足爪得分相加作为关节炎得分,每只大鼠最高得分为 16 分。

2.2.4 血清 RF 及炎症因子检测 末次给药前禁食不禁水 12 h 以上,于末次给药结束 1 h 后,大鼠以戊巴比妥钠进行麻醉后,从腹主动脉采血于采血管中,4 ℃、3000 r/min 离心 10 min,分离得到血清样品,按照试剂盒说明书分别检测 RF、IL-17、IL-

10、TNF- α 、IL-1 β 和 IFN- γ 水平。

2.2.5 脾脏、胸腺指数测定 于末次给药结束 1 h 腹主动脉采血后,分别收集各组脾脏与胸腺,称定质量并计算脏器指数。

2.2.6 踝关节组织病理学检测 取大鼠右爪踝关节部分,采用 10%多聚甲醛溶液固定后,将组织经甲酸甲醛脱钙液处理后,采用不同浓度的乙醇溶液梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片,依次经苏木素和伊红染色,封片后镜下观察并比较各组踝关节滑膜增生,炎性细胞浸润,关节腔浸出、关节软骨破坏、纤维化等情况。

2.3 网络药理学分析

2.3.1 目标化合物的选取 结合本课题组前期化学物质组及血中移行成分选取痹祺胶囊中 39 个化合物为研究对象,详细信息见表 1。

表 1 痹祺胶囊目标化合物

Table 1 Candidate active compounds in Biqi Capsule

编号	化合物	结构类型	分子式	相对分子质量	来源
1	土的宁	生物碱类	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₂	334.42	马钱子
2	马钱子碱	生物碱类	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	228.24	马钱子
3	番木鳖苷酸	环烯醚萜类	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	376.40	马钱子
4	咖啡酸	有机酸类	C ₉ H ₈ O ₄	180.16	马钱子、白术、川芎
5	奎宁酸	有机酸类	C ₇ H ₁₂ O ₆	192.17	马钱子、白术、川芎
6	党参炔苷	炔类	C ₂₀ H ₂₈ N ₈	396.48	党参
7	党参苷 I	木质素类	C ₂₉ H ₄₂ O ₁₈	678.71	党参
8	党参苷 II	木质素类	C ₁₇ H ₂₄ O ₉	372.37	党参
9	白术内酯 I	内酯类	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	230.30	白术
10	白术内酯 II	内酯类	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232.32	白术
11	白术内酯 III	内酯类	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	248.32	白术
12	苍术酮	倍半萜类	C ₁₅ H ₂₀ O	216.32	白术
13	土莫酸	三萜类	C ₃₁ H ₅₀ O ₄	486.81	茯苓
14	茯苓酸	三萜类	C ₃₃ H ₅₂ O ₅	528.85	茯苓
15	去氢土莫酸	三萜类	C ₃₁ H ₄₈ O ₄	484.71	茯苓
16	茯苓酸 B	三萜类	C ₃₀ H ₄₄ O ₅	484.74	茯苓
17	丹酚酸 B	酚酸类	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	718.66	丹参
18	迷迭香酸	酚酸类	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	360.34	丹参
19	丹参素	酚酸类	C ₉ H ₁₀ O ₅	198.17	丹参
20	丹参酮 I	丹参酮类	C ₁₈ H ₁₂ O ₃	276.30	丹参
21	隐丹参酮	丹参酮类	C ₁₉ H ₂₀ O ₃	296.39	丹参
22	丹参酮 II _A	丹参酮类	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	294.37	丹参
23	丹参新酮	丹参酮类	C ₁₉ H ₂₂ O ₂	282.41	丹参
24	人参皂苷 Rg ₁	皂苷类	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	801.02	三七
25	人参皂苷 Rb ₁	皂苷类	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1 109.31	三七
26	三七皂苷 R ₁	皂苷类	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₈	933.27	三七
27	人参皂苷 CK	皂苷类	C ₃₆ H ₆₂ O ₈	622.87	三七
28	阿魏酸	内酯类	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.06	川芎
29	藁本内酯	内酯类	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	190.24	川芎
30	洋川芎内酯 A	内酯类	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	192.25	川芎
31	洋川芎内酯 I	内酯类	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	224.25	川芎
32	牛膝皂苷 II	皂苷类	C ₄₁ H ₆₂ O ₁₅	957.24	牛膝
33	牛膝皂苷 IV	皂苷类	C ₄₁ H ₆₀ O ₁₅	793.01	牛膝
34	25S-牛膝甾酮	甾酮类	C ₂₇ H ₄₄ O ₇	480.30	牛膝
35	20-羟基蜕皮激素	甾酮类	C ₂₇ H ₄₄ O ₇	480.60	牛膝
36	甘草苷	黄酮类	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	418.40	甘草
37	异甘草素	黄酮类	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	256.25	甘草
38	甘草次酸	三萜类	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	470.68	甘草
39	次黄嘌呤	核苷类	C ₅ H ₄ N ₄ O	136.11	地龙

2.3.2 靶标蛋白选取 通过 TC MSP 数据库 (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)、CTD 数据库 (<https://ctdbase.org>) 和 PharmMapper 数据库 (<http://lilabecust.cn/pharmmapper/>) 检索得到目标化合物相关靶标蛋白, 通过 OMIM 数据库 (<https://omim.org/>)、TTD 数据库 (<http://db.idrblab.net/ttd/>)、DisGeNet 数据库 (<http://www.disgenet.org/home/>) 和 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 检索得到 RA 相关靶点, 并借助 Uniprot 数据库 (<http://www.uniprot.org/>) 校正其靶标蛋白为官方名。

2.3.3 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络并筛选关键蛋白靶点 将化合物靶点与疾病靶点取交互, 将整合的交集靶点信息导入 STRING10 数据库 (<http://string-db.org/>) 中, 物种限定为“Homo sapiens”, 阈值限定为 0.900, 获得蛋白间相互作用关系, 将结果导入 Cytoscape 3.6.0 软件中, 通过 Cytoscape 软件绘制 PPI 网络, 以度值大于 2 倍中位数筛选 PPI 网络中关键靶点蛋白。

2.3.4 通路分析及生物信息学分析 运用 Omicsbean 软件对靶点蛋白进行生物信息学分析, 探究靶点蛋白在细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 以及生物过程 (biological process, BP) 方面的作用机制。然后, 通过 STRING10 数据库得到与靶点相关的通路过程, 利用京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 数据库 (<http://www.genome.jp/kegg/>) 分析并查阅相关文献, 对得到的通路进行深入分析。

2.3.5 “药材-化合物-靶点-通路-疾病”网络构建 根据上述痹祺胶囊 39 个化学成分的靶点及通路预测结果, 在 Excel 表格中建立药材-化合物、化合物-

靶点、靶点-通路、靶点-疾病的相互对应关系, 导入 Cytoscape 3.6.0 软件中构建网络, 并运用其插件 Network Analyzer 计算网络的特征。网络中节点表示化合物、靶点以及作用通路、药理作用、功效。边表示药材-化合物、化合物-靶点、靶点-通路以及靶点-疾病相互作用。经处理后, 得到 39 个成分的相关靶点、通路预测图, 以该图来表示痹祺胶囊“药材-化合物-靶点-通路-疾病”间的相互关系。

2.4 统计学分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异性采用 GraphPad Prism 7 统计学软件进行 *t* 检验和单因素方差分析。

3 结果

3.1 痹祺胶囊对 CIA 大鼠体质量、足趾肿胀度和关节炎评分的影响

如图 1 所示, 15 d 的 II 型胶原造模后, 大鼠体质量减轻, 足趾相继出现红肿, 关节肿大, 关节畸形, 导致行走艰难, 严重的甚至会丧失活动能力, 说明成功建立了 CIA 大鼠模型。连续给药过程中监测大鼠的体质量、足趾肿胀度及关节炎评分, 结果显示随着给药时间的延长, 痹祺胶囊 (0.20、0.40 g/kg) 组可改善关节炎大鼠的体质量。在给药 5 d 时, 痹祺胶囊 (0.40 g/kg) 组显著降低大鼠的足趾肿胀度 ($P < 0.05$), 给药 8~15 d 后痹祺胶囊各给药组均显著降低足趾肿胀度 ($P < 0.01$)。在给药 5 d 时, 痹祺胶囊 (0.40 g/kg) 组明显降低关节炎评分 ($P < 0.05$), 随着给药时间的延长, 至给药 12 d 时痹祺胶囊 (0.10、0.20、0.40 g/kg) 组均可显著降低 CIA 大鼠关节炎评分 ($P < 0.05$ 、0.01)。综上说明, 痹祺胶囊可改善关节炎大鼠状态, 具有明显的抗炎作用, 表现在改善足趾肿胀度、降低关节炎评分方面。

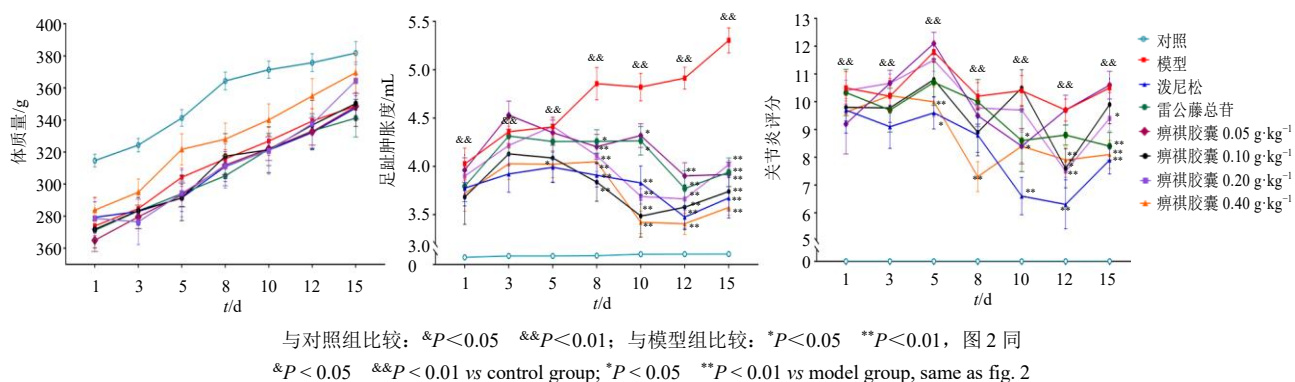


图 1 痹祺胶囊对 CIA 大鼠体质量、足趾肿胀度和关节炎评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Effect of Biqi Capsule on body weight, foot swelling and arthritis score in CIA rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.2 痹祺胶囊对 CIA 大鼠血清 RF 及炎性因子水平的影响

细胞因子在 RA 炎症与关节损伤中扮演着重要的角色。如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 RF、IL-17、IFN- γ 、TNF- α 和 IL-1 β 水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001); 与模型组比较, 痹祺胶囊各剂量组大鼠血清中 RF、IFN- γ 、TNF- α 和 IL-1 β 水平均明显降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 痹祺胶囊 (0.10、0.20、0.40 g/kg) 组血清中 IL-17 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.001), 且呈剂量相关性。IL-10 具有较强的抗炎作用, 提高 IL-10 含量有利于抑制体内炎性因子的释放和清除。结果显示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 IL-10 水平呈下降趋势; 与模型组比较, 痹祺胶囊可上调大鼠血清中 IL-10 水平。

3.3 痹祺胶囊对 CIA 大鼠脾脏及胸腺指数的影响

如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠脾脏及脾脏指数均明显增大 ($P < 0.01$ 、0.001), 提示在

关节炎病理状态下胸腺和脾脏出现肿大; 经 15 d 连续给药后, 痹祺胶囊各给药组均表现出降低脾脏指数的作用, 在降低胸腺指数上显示出剂量相关性, 其中 0.20、0.40 g/kg 剂量组具有显著性差异 ($P < 0.05$ 、0.01), 表明痹祺胶囊对于 CIA 导致的脾脏和胸腺损伤有着一定的改善作用。

3.4 痹祺胶囊对 CIA 大鼠踝关节组织病理变化的影响

如图 3 所示, 对照组大鼠踝关节组织结构基本正常, 关节面光滑, 关节腔内无渗出, 滑膜细胞及结缔组织未见增生; 模型组大鼠关节软骨被破坏, 软骨细胞或大量增生或坏死, 局部可见坏死组织碎片, 可见大量滑膜结缔组织增生, 侵蚀关节软骨及骨, 并伴大量炎性细胞浸润; 痹祺胶囊给药组对 CIA 大鼠的治疗作用呈剂量相关性, 表现在减轻关节软骨破坏、关节腔内坏死组织减少、软骨细胞增生或坏死减少、滑膜结缔组织增生减少、炎性细胞浸润情况显著降低。

表 2 痹祺胶囊对 CIA 大鼠血清 RF 及炎性因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of Biqi Capsule on levels of RF and inflammatory factors in serum of CIA rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	RF/(IU·mL ⁻¹)	IL-17/(pg·mL ⁻¹)	IFN- γ / (pg·mL ⁻¹)	TNF- α / (pg·mL ⁻¹)	IL-1 β / (pg·mL ⁻¹)	IL-10/ (pg·mL ⁻¹)
对照	—	140.87 ± 3.64	61.13 ± 8.41	8.50 ± 0.67	5.81 ± 0.31	18.70 ± 2.47	27.03 ± 10.04
模型	—	180.23 ± 4.83 ^{&&&}	94.67 ± 8.95 ^{&}	47.95 ± 15.21 ^{&&}	11.56 ± 2.08 ^{&&&}	39.60 ± 6.21 ^{&&&}	15.01 ± 3.92
泼尼松	0.01	146.07 ± 3.15 ^{***}	64.81 ± 5.15 [*]	13.40 ± 2.14 ^{**}	6.06 ± 0.36 ^{***}	21.25 ± 2.41 ^{**}	26.74 ± 3.86
雷公藤总苷	0.01	164.93 ± 2.48 [*]	52.96 ± 7.47 ^{**}	9.67 ± 0.43 ^{**}	6.62 ± 0.47 ^{**}	16.27 ± 2.35 ^{***}	18.42 ± 5.13
痹祺胶囊	0.05	162.30 ± 2.80 ^{**}	69.90 ± 12.03	13.80 ± 2.55 ^{**}	6.59 ± 0.66 ^{**}	21.02 ± 3.32 ^{**}	15.13 ± 2.53
	0.10	153.87 ± 4.92 ^{**}	58.80 ± 11.55 ^{***}	17.38 ± 7.16 [*]	6.26 ± 0.37 ^{**}	17.38 ± 1.82 ^{***}	21.64 ± 8.13
	0.20	148.43 ± 5.42 ^{**}	46.99 ± 5.24 [*]	12.16 ± 1.20 ^{**}	5.37 ± 0.18 ^{***}	22.25 ± 3.25 ^{**}	22.41 ± 10.01
	0.40	136.33 ± 5.84 ^{***}	52.05 ± 8.23 ^{***}	8.99 ± 0.95 ^{**}	5.99 ± 0.39 ^{***}	20.87 ± 1.20 ^{**}	23.39 ± 8.88

与对照组比较: [&] $P < 0.05$ ^{&&} $P < 0.01$ ^{&&&} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$

[&] $P < 0.05$ ^{&&} $P < 0.01$ ^{&&&} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group

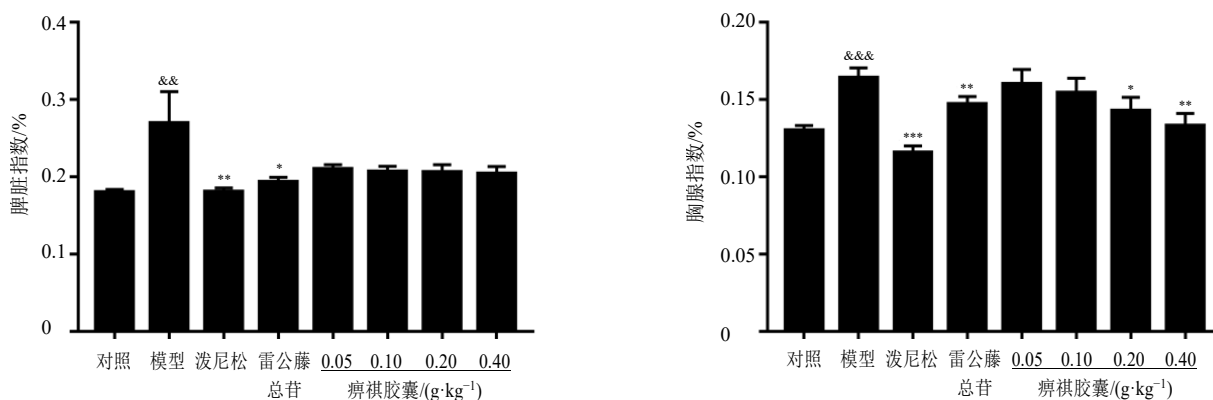


图 2 痹祺胶囊对 CIA 大鼠脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Effect of Biqi Capsule on organ index in CIA rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

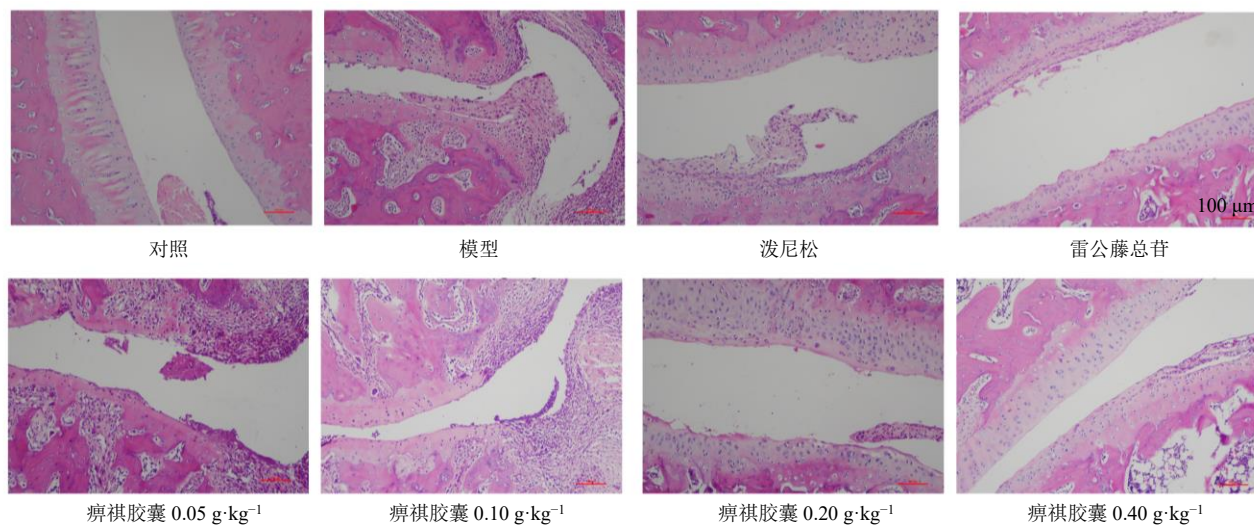


图 3 各组大鼠踝关节组织病理观察结果 (HE, ×100)

Fig. 3 Pathological observation of ankle joint of rats in each group (HE, × 100)

3.5 网络药理学分析

通过 TCMSP 数据库、CTD 数据库和 PharmMapper 数据库等预测和检索得到 39 个化合物的 627 个相关靶点。从 OMIM 数据库、TTD 数据库、DisGeNet 数据库和 GeneCards 数据库得到 RA 疾病靶点 3368 个，将化合物靶点与疾病靶点取交集，得到交集 371 个共同靶点 (图 4-A、B)。

将 371 个共同靶点投放至 STRING 10 数据库中获 PPI，然后利用 Cytoscape 软件构建 PPI 网络图并对网络进行分析，结果 (图 4-C) 显示，IL-6、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、白蛋白 (serum albumin, ALB)、蛋白激酶 B1 (protein kinase B1, AKT1)、TNF、肿瘤蛋白 p53 (tumor protein p53, TP53)、血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、STAT3、丝裂原活化蛋白激酶 3 (mitogen-activated protein kinase 3, MAPK3)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、MAPK8、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, CASP3)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinases 9, MMP9)、趋化因子配体 8 (chemokine ligand 8, CXCL8)、JUN、MAPK1 等靶点蛋白拥有较多相互作用关系，位于 PPI 蛋白网络中心，这些蛋白涉及氧化应激、炎症反应、免疫调节、血管生成、活血、镇痛、滑膜增生等方面，提示痹祺胶囊抗炎、镇痛、免疫调节等作用与这些蛋白有关。进一步了解 PPI 网络的生物作用，使用 Cytoscape 的 MCODE 插件对网络进行

Cluster 模块分析，共获得 2 个 Cluster 模块 (图 4-C)。对 2 个模块分别进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能和 KEGG 通路富集分析，发现 Cluster 1 主要与免疫调控、炎症反应、凝血级联、血小板激活等生物过程有关；Cluster 2 主要与血管生成、中枢及外周疼痛、血小板激活等生物过程相关。

利用 OmicsBean 分析软件对相关靶点蛋白进行功能注释分析，选取 P 值最小的前 10 个进行作图呈现 (图 4-D)。结果发现，这些蛋白在 CC 方面主要参与细胞囊泡、细胞器内腔形成、细胞内膜系统等过程；在 MF 方面主要参与蛋白结合绑定、受体结合、酶结合、细胞功能调控等过程；在 BP 方面主要涉及有机物或含氧化合物的应激反应、对化学刺激的细胞应答、对内源性刺激的反应等过程。

在 STRING 10 数据库中得到 229 条相关通路，取 false discovery rate < 0.01 的通路并筛出无关的通路后共 146 条，随后对这 146 条通路进行 KEGG 通路分析及相关文献查阅，得到 80 条相关信号通路，并对前 20 的通路进行可视化处理 (图 4-E)，分析富集的通路发现，主要涉及与炎症反应相关的通路，如 IL-17 信号通路、TNF- α 信号通路、NOD 样受体信号通路等；与免疫应答相关的通路，如 T 细胞受体信号通路、辅助性 T 细胞 1 (helper T cell, Th1) 和 Th2 细胞分化等；与凋亡相关的通路，如 FoxO 信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-Akt 信号通路等；与活血相关的通路，如血小板活化、黏着斑、VEGF 信号通路、补体和凝血级联等；与疼痛相关的信号通路，如瞬时

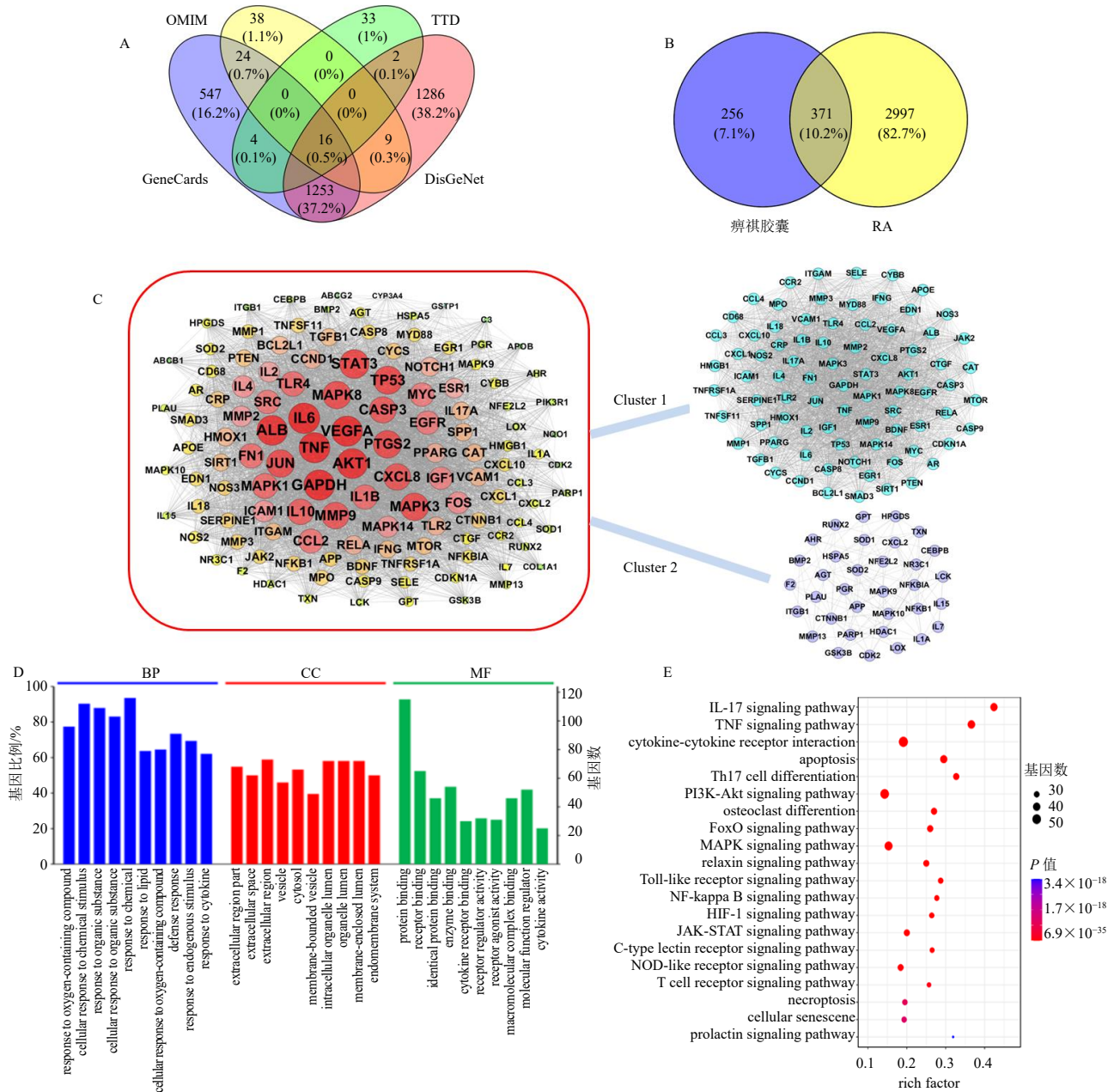


图 4 痹祺胶囊治疗 RA 的靶点分析

Fig. 4 Targets analysis of Biqi Capsule in treatment of RA

受体电位 (transient receptor potential, TRP) 通道的炎症介质调节、Wnt 信号通路、环磷酸腺苷信号通路、多巴胺能神经突触等。

根据对应关系在 Cytoscape 3.6.0 软件中, 构建

痹祺胶囊“药材-化合物-靶点-通路-疾病”的网络关系图, 黄色代表药材, 绿色代表化合物, 紫色代表靶点, 蓝色代表通路, 红色代表疾病 (图 5)。采用软件的插件进一步分析发现, 网络平均度值为 11.4,

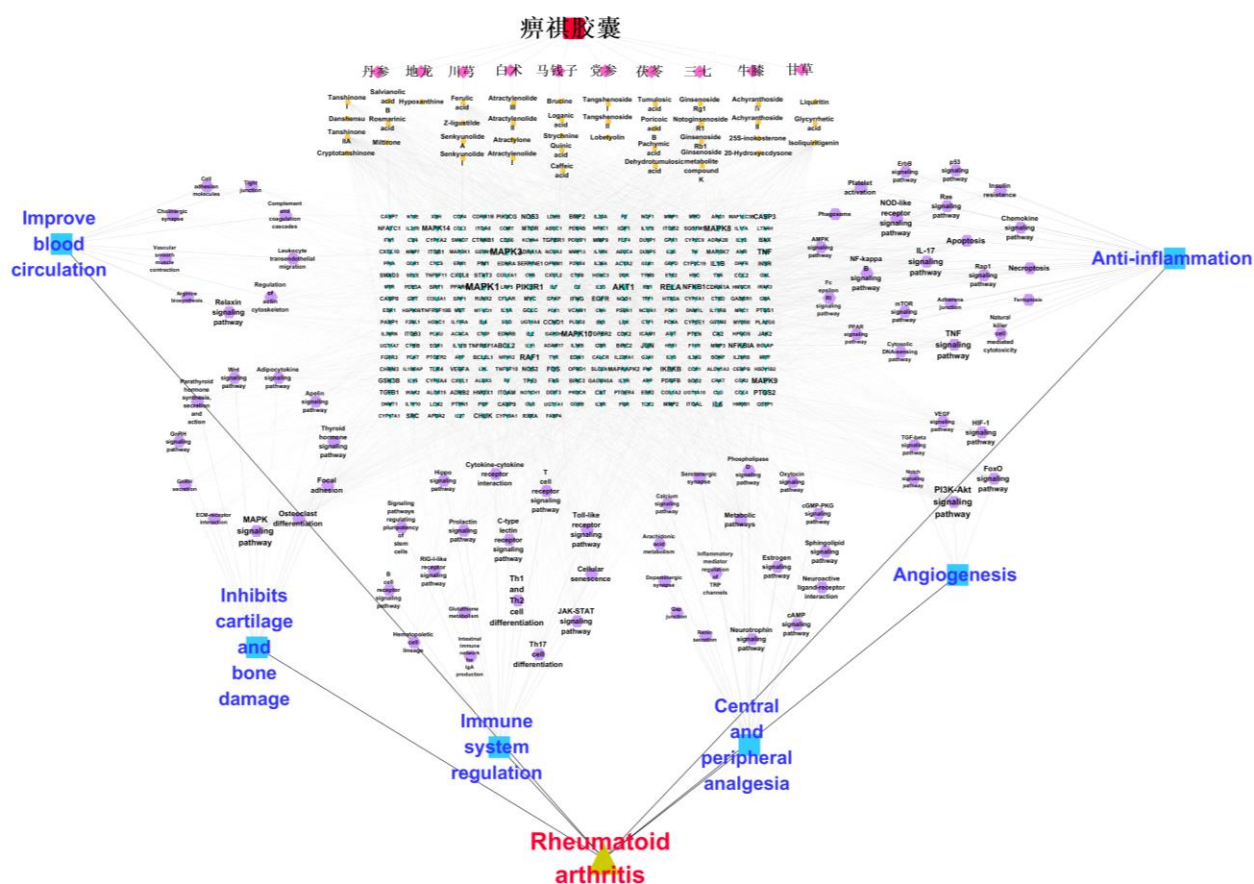


图 5 痹祺胶囊“药材-化合物-靶点-通路-功效-疾病”网络

Fig. 5 “Medicinal material-compound-target-pathway-efficacy-disease” network of Biqi Capsule

其中大于度值中位数的化合物有 13 个，分别为三七皂苷 R₁、丹参酮 II_A、异甘草素、咖啡酸、迷迭香酸、阿魏酸、人参皂苷 Rg₁、丹参酮 I、丹酚酸 B、士的宁、隐丹参酮等；靶点有 58 个，主要有 MAPK1、MAPK3、AKT1、磷脂酰肌醇 3 激酶调节亚基（phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha, PIK3R1）、MAPK8、MAPK10、TNF、JUN、IL1B、核因子-κB 抑制剂 α(nuclear factor-κB inhibitor α, NFKBIA)、糖原合成酶激酶 3β (glycose sythase kinase 3β, GSK3B)、前列腺素 G/H 合成酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2)、胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF1)、EGFR、一氧化氮合酶 3 (nitric oxide synthase 3, NOS3) 等；通路有 54 个，主要有 TNF 信号通路、IL-17 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、Toll 样受体信号通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用、NOD 样受体信号通路、Th17 细胞分化、MAPK 信号通路、FoxO 信号通路等。网络中既存在 1 个分子与多个靶点蛋白的相互作用，也存在不同分子作用于同 1 个靶点蛋白的现象，显示出痹祺胶囊治疗 RA 具有

多靶点的作用特点，而多靶点的物质基础在于痹祺胶囊中含有的特征成分，可能通过抗炎、免疫调节、抗血管生成等多种途径发挥治疗 RA 作用。

4 讨论

RA 作为一种慢性自身免疫性疾病，全世界约有 1%~2%的人口受困于 RA，选择理想的动物模型对于评价药效至关重要，CIA 动物模型始于 1977 年，此动物模型在临床表现和病理机制上与人 RA 在临床表现、病理、免疫上十分相似，是研究 RA 机制和治疗较为理想的动物模型，本研究采用 II 型胶原诱导关节炎模型，在体征上表现出多关节肿胀等现象，病理上表现出明显的大量炎性细胞浸润、滑膜增生和软骨破坏等，而痹祺胶囊可明显改善 RA 大鼠足趾肿胀并降低关节炎评分。从 HE 染色结果可见痹祺胶囊可显著改善 CIA 大鼠的关节损伤，表现为关节软骨破坏减轻，关节腔内坏死组织减少，软骨细胞增生或坏死减少，滑膜结缔组织增生减少，炎性细胞浸润情况也显著降低。

RA 病理生理学较为复杂，其发病机制被认为始于血液中的免疫复合物，即关节前阶段，在这个

阶段会产生针对自身组织成分的自身抗体,同时与自体抗原进入关节,此为过渡阶段。抗体抗原结合至前哨细胞上的Fc受体 γ ,先天免疫反应被激活,T细胞被分化和增殖为Th细胞和调节性T细胞(regulatory T cell, Treg),Th细胞通过浆细胞激活B细胞产生RF等抗体,从而通过不同途径破坏骨、软骨和滑膜^[4]。本研究表明RA大鼠血清中RF水平显著增加,而痹祺胶囊呈剂量相关性降低血清中RF水平,表明痹祺胶囊可以延缓因RF的大量产生导致对骨、软骨和滑膜的损伤。

RA特征主要是炎症细胞向滑膜关节浸润增多,最终导致软骨和骨骼损伤,而滑膜巨噬细胞与RA严重程度密切相关。活化的巨噬细胞产生促炎细胞因子和趋化因子,如IFN- γ 、TNF- α 等推动RA的进展^[12]。巨噬细胞、树突状细胞等的激活依赖迁移至关节中活化的T细胞,其中Th1和Th17细胞亚群是炎症滑膜组织中发现的主要细胞类型。Th1细胞在滑膜关节中促进促炎细胞因子如TNF- α 、IL-6等释放,继而诱导Th17细胞活化,分泌IL-17促进骨吸收,导致关节病变^[13-14]。研究发现,痹祺胶囊在临床实践和动物实验(佐剂型关节炎及CIA等)中可调节T淋巴细胞亚群Th/Ts之间的平衡,下调IL-1和TNF- α 水平,显示抗炎、镇痛、免疫调节等药效作用^[15]。本研究表明,痹祺胶囊可显著降低CIA大鼠血清中IL-17、TNF- α 、IL-1 β 和IFN- γ 水平。Treg通过分泌IL-10、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、IL-35等细胞因子参与免疫负性调节。研究发现,IL-10可通过多种途径参与免疫负性调节,如抑制T细胞向Th细胞转化并抑制Th细胞分泌细胞因子,另外IL-10可抑制B细胞活化,抑制骨化三醇介导的免疫球蛋白E(immunoglobulin E, IgE)表达^[16]。研究发现,RA患者Treg细胞百分比及其生成IL-10的含量较正常人低^[17-18]。本研究表明,痹祺胶囊可升高IL-10的水平,综合以上结果提示痹祺胶囊显示出较好的抗炎和免疫调节作用。

RA中因特异性自身抗原的持续存在,持续的免疫细胞激活导致关节中一种自我永存的慢性炎症状态和滑膜肿胀,被识别为疼痛和关节肿胀^[19]。研究发现,滑膜成纤维细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS)产生TNF- α ,通过p38/JNK/MAPK通路造成活性氧(reactive oxygen species, ROS)蓄积,而ROS经NF- κ B反馈形成ROS/TNF-

α 正反馈,促进关节破坏,伤害感受器致敏^[20]。同时在TNF- α 、IL-17等细胞因子的存在下,NF- κ B信号通路、JAK-STAT信号通路的激活可导致T细胞活化,进一步介导炎症反应,还可诱导RA-FLS异常增殖,激发破骨细胞分泌RANKL,诱导破骨细胞的增殖与活化,导致关节的畸形与骨侵蚀^[21],而此过程可被Wnt信号通路阻断^[22]。此外,IL-17A还可促进滑膜细胞产生MMP1,导致软骨破坏,还可促进内皮细胞分泌MMPs,促进FLS产生VEGF、血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和血管生成素-1(angiotensin-1, Ang-1)^[23],从而促进滑膜组织内血管增生,滑膜不规则增厚,并伸向关节腔和软骨边缘部扩展导致血管翳形成^[24]。此外,RA患者中,在各种细胞活化和凋亡过程中释放的细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)水平升高,可能与体内凝血激活有关^[25]。血小板激活因子(platelet activating factor, PAF)是目前最强的脂质介质,又是强效的炎症介质,PAF在RA中与滑膜炎、组织破坏及血管新生密切相关,并且能够诱导血小板聚集,与RA患者存在血液学异常关系密切^[26]。而抑制纤凝、促进纤溶,纠正RA凝血异常,能阻止滑膜炎的进展,进而阻止骨质破坏^[27]。

本研究的靶点预测及作用通路分析结果提示,痹祺胶囊中党参炔苷、党参苷I、党参苷II、土莫酸、茯苓素、苍术酮、白术内酯I、白术内酯II等成分可作用于IL-10、IL-4、IL-2、酪氨酸受体激酶Lck(tyrosine-protein kinase Lck, LCK)、热休克蛋白A5(heat shock protein A5, HSPA5)、MAPK1、MAPK9、MAPK14、Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)、髓性分化原发反应蛋白88(myeloid differentiation primary response protein MyD88, MYD88)、雄激素受体(androgen receptor, AR)、CASP3、骨形成蛋白2(bone morphogenetic protein 2, BMP2)等靶点,通过Toll样受体信号通路、T细胞受体信号通路、Wnt信号通路、MAPK信号通路等发挥免疫调节、成骨/破骨细胞平衡等的作用;咖啡酸、迷迭香酸、丹参酮I、丹参酮II_A、三七皂苷R₁、异甘草素、奎宁酸、苍术酮、丹参新酮、三七皂苷CK等作用于神经源性位点Notch同源蛋白

1 (neurogenic locus notch homolog protein 1, NOTCH1)、纤连蛋白 (fibronectin, FN1)、凝血酶 (thrombin, F2)、连接黏附分子 A (Junctional adhesion molecule A, F11R)、VEGFA、NOS3、ALB、细胞间黏附分子 1 (Intercellular adhesion molecule 1, ICAM1) 等靶点, 参与调节 JAK-STAT、Ca²⁺、VEGF 通路、Ras 通路、FoxO 通路、缺氧诱导因子-1 信号通路等信号通路过程, 抑制白细胞与内皮细胞黏附、降解纤维蛋白、抑制血小板聚集, 维持血液渗透压, 抑制血栓形成和血管翳形成; 土的宁、马钱子碱、番木鳖苷酸、咖啡酸、奎宁酸、甘草苷、异甘草素、甘草次酸、迷迭香酸、阿魏酸、洋川芎内酯 A、党参苷 II、丹参酮 II_A、人参皂苷 Rg₁ 等作用于 PTGS2、谷胱甘肽 S 转移酶 P1 (glutathione S-transferase P1, GSTP1)、TNF、IL1B、CXCL8、NOS2、血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM1)、μ-阿片受体 δ1 (Delta-type opioid receptor, OPRD1)、OPRM1 等蛋白靶点, 通过 NF-κB 信号通路、花生四烯酸代谢、C 型凝集素受体信号通路、5-羟色胺突触、神经活性配体-受体相互作用、环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) - 蛋白激酶 G (protein kinase G, PKG) 信号通路等通路, 抑制白细胞-内皮细胞黏附及 TNF-α、IL-1β 等炎症因子释放和前列腺素的生成以及拮抗前列腺素受体、外周痛觉神经元的刺激或抑制中枢神经兴奋和 5-羟色胺释放等发挥外周和中枢镇痛作用。

痹祺胶囊由马钱子、党参、白术、丹参、茯苓、牛膝、地龙、川芎、三七和甘草 10 味药材组成, 现代药理学研究显示, 党参多糖可通过影响 TLR4 信号通路激活 CD4⁺ T 细胞, 触发 Th2 转化为 Th1^[28], 从而维持 Th1/Th2 细胞、Tregs/Th17、IL-10/TNF-α 及 IL-10/IL-1β 的免疫稳态^[29]。党参醇提物可促进造血干 (祖) 细胞 CD34⁺、CD3⁺、CD19⁺ 及 CD71⁺ 分子的表达, 抑制 CD45⁺、CD14⁺ 分子的表达, 使其处于分化早期阶段, 维持造血干 (祖) 细胞的干性, 其物质基础主要为党参炔苷和党参苷 I^[30]。丹参中丹参酮 II_A、丹参素和丹酚酸 A 可通过抑制血小板蛋白质二硫键异构酶 ERp57 和整合素 αIIbβ3 的相互作用, 降低凝血因子 7 的活性, 增加血小板中环磷酸腺苷的含量, 降低血液黏度, 还可激活纤溶酶原-纤溶酶系统, 促使纤维蛋白溶解, 但同时保持血细胞正常状态等途径发挥活血化瘀作用^[31-33]。三七中皂苷类成分三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁ 等通过增

加内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 的磷酸化, 激活 PI3K/Akt/eNOS 途径增加内源性一氧化氮的释放, 发挥血管舒张作用^[34-35]。地龙中蚓激酶、纤溶酶类成分可直接降解纤维蛋白原与纤维蛋白, 活化纤溶酶原、促进组织型纤溶酶原激活物 (tissue-type plasminogen activator, t-PA) 等纤溶激活因子的释放, 抑制凝血途径, 促进凝血因子的水解, 防止血小板发生聚集^[36]。马钱子碱能抑制外周炎症组织前列腺素 E₂、5-羟色胺、6-酮-前列腺素 Fla 与血栓烷素等炎症介质的释放, 并可降低感觉神经末梢对痛觉敏感性, 并通过抑制钙激活钾离子通道抑制背根神经节神经元的兴奋性, 增加脑内神经递质-脑啡肽含量发挥抗炎、镇痛作用^[37-39]。

综上, 本研究通过 CIA 动物模型及网络药理学手段综合分析了痹祺胶囊的药效作用和可能的作用机制, 表明痹祺胶囊可能通过多种与免疫调控、血管生成、骨形成/侵蚀平衡、凝血、镇痛等相关通路调控相关活性物质达到治疗 RA 的效果, 并为进一步确定痹祺胶囊中的活性成分、具体作用机制奠定基础, 然而本研究并未对网络药理学预测出的靶点及通路进行进一步的验证, 具体单体组分的作用机理和靶效应也需进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] He Y F, Mai C T, Pan H D, *et al.* Targeting immunometabolism by active ingredients derived from traditional Chinese medicines for treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Chin Herb Med*, 2021, 13(4): 451-460.
- [2] 韩宇飞, 高明利, 刘东武. 类风湿性关节炎的发病机制研究进展综述 [J]. *中国卫生标准管理*, 2021, 12(1): 162-165.
- [3] 宋泽冲, 照日格图. 中医药治疗类风湿关节炎研究进展 [J]. *新疆中医药*, 2021, 39(1): 113-116.
- [4] Kumar L D, Karthik R, Gayathri N, *et al.* Advancement in contemporary diagnostic and therapeutic approaches for rheumatoid arthritis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 79: 52-61.
- [5] 张巍, 林剑浩. 人工关节置换术治疗类风湿关节炎 [J]. *协和医学杂志*, 2017, 8(S2): 221-228.
- [6] 张冬梅, 李宝丽. 痹祺胶囊治疗胶原诱导型关节炎大鼠的作用机制研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(4): 1059-1062.
- [7] 刘素芳, 赵阳, 贾彬, 等. 痹祺胶囊联合甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎的临床研究 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44(8): 1727-1731.

- [8] 谭洪发, 荣晓凤, 徐艳明, 等. 痹祺胶囊对 CIA 大鼠 OPG/RANKL 表达的影响 [J]. 免疫学杂志, 2016, 32(10): 878-883.
- [9] 徐艳明, 荣晓凤, 谭洪发, 等. 痹祺胶囊对类风湿关节炎 CIA 大鼠 JAK-STAT 信号通路的影响 [J]. 免疫学杂志, 2015, 31(12): 1072-1076.
- [10] 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.
- [11] Kocyigit A, Guler E M, Kaleli S. Anti-inflammatory and antioxidative properties of honey bee venom on Freund's complete adjuvant-induced arthritis model in rats [J]. *Toxicol*, 2019, 161: 4-11.
- [12] Wang Q, Zhou X, Zhao Y J, *et al.* Polyphyllin I ameliorates collagen-induced arthritis by suppressing the inflammation response in macrophages through the NF- κ B pathway [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2091.
- [13] Chemin K, Gerstner C, Malmström V. Effector functions of CD4⁺ T cells at the site of local autoimmune inflammation—lessons from rheumatoid arthritis [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 353.
- [14] Nakae S, Nambu A, Sudo K, *et al.* Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice 1 [J]. *J Immunol*, 2003, 171: 6173-6177.
- [15] 张星艳, 李虎玲, 李新, 等. 痹祺胶囊研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2746-2757.
- [16] 刘倩倩. 调节性 T 细胞通过产生 IL-10 抑制自身抗体分泌参与类风湿性关节炎的发病 [D]. 新乡: 新乡医学院, 2016.
- [17] Chen J W, Li J X, Gao H Y, *et al.* Comprehensive evaluation of different T-helper cell subsets differentiation and function in rheumatoid arthritis [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 535361.
- [18] Limón-Camacho L, Vargas-Rojas M I, Vázquez-Mellado J, *et al.* *In vivo* peripheral blood proinflammatory T cells in patients with ankylosing spondylitis [J]. *J Rheumatol*, 2012, 39: 830-835.
- [19] Lin Y J, Anzaghe M, Schülke S. Update on the pathomechanism, diagnosis, and treatment options for rheumatoid arthritis [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 880.
- [20] Feldmann M, Maini R N. Anti-TNF α therapy of rheumatoid arthritis: What have we learned? [J]. *Annu Rev Immunol*, 2001, 19: 163-196.
- [21] 谢小倩, 王亚乐, 罗沙沙, 等. 类风湿性关节炎发病机制研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(71): 109-111.
- [22] 温志华. 类风湿性关节炎发病机制的临床研究进展 [J]. 临床医学, 2022, 42(7): 123-125.
- [23] Ryu S, Lee J H, Kim S I. IL-17 increased the production of vascular endothelial growth factor in rheumatoid arthritis synoviocytes [J]. *Clin Rheumatol*, 2006, 25(1): 16-20.
- [24] Colville-Nash P R, Scott D L. Angiogenesis and rheumatoid arthritis: Pathogenic and therapeutic implications [J]. *Ann Rheum Dis*, 1992, 51(7): 919-925.
- [25] Stojanovic A, Veselinovic M, Zong Y N, *et al.* Increased expression of extracellular vesicles is associated with the procoagulant state in patients with established rheumatoid arthritis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 718845.
- [26] 章平衡, 刘健, 谈冰, 等. 类风湿性关节炎患者高凝血状态与核因子 κ B 活化及致炎因子增加有关 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(3): 364-368.
- [27] 黄嘉, 黄慈波. 类风湿性关节炎的诊断治疗进展 [J]. 临床药物治疗杂志, 2010, 8(1): 1-5.
- [28] Zheng Y S, Wu Z S, Ni H B, *et al.* *Codonopsis pilosula* polysaccharide attenuates cecal ligation and puncture sepsis via circuiting regulatory T cells in mice [J]. *Shock*, 2014, 41(3): 250-255.
- [29] Deng X L, Fu Y J, Luo S, *et al.* Polysaccharide from *Radix Codonopsis* has beneficial effects on the maintenance of T-cell balance in mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108682.
- [30] 高石曼. 党参药材的质量评价及其免疫调节和造血改善的药效物质基础研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2020.
- [31] 梁勇, 羊裔明, 袁淑兰. 丹参酮药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中草药, 2000, 31(4): 304-306.
- [32] 赵焱. 丹参药理作用的研究进展 [J]. 内蒙古中医药, 2008, 27(11): 53-54.
- [33] 赵全如, 谢晓燕. 丹参的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 广东化工, 2021, 48(1): 57-59.
- [34] 谭亮, 汤秋凯, 樊光辉. 三七皂苷 R₁ 在心血管及神经系统疾病应用的研究进展 [J]. 华南国防医学杂志, 2019, 33(2): 142-145.
- [35] 杨娜, 周柏松, 王亚茹, 等. 人参皂苷 Rg₁ 生物活性研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(4): 1463-1465.
- [36] 王春玲. 中药地龙的活性成分与药理作用研究 [J]. 亚太传统医药, 2015, 11(7): 53-54.
- [37] 殷武. 马钱子生物碱类成分镇痛作用研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2000.
- [38] 李永丰. 马钱子碱通过钾离子通道调节外周镇痛 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2021, 35(10): 787-788.
- [39] 崔姣, 许惠琴, 陶玉菡. 马钱子碱透皮贴剂镇痛实验研究及对大鼠脑啡肽含量的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 35(5): 7-9.