

网络药理学、分子动力学和实验验证探究秦艽环烯醚萜苷抗类风湿性关节炎关键成分和作用机制

孙建国^{1,2}, 李慧娟¹, 宝文萍¹, 卿越雷¹, 蒋玲雪¹, 刘德敏¹, 李东云¹, 潘正^{3*}, 魏丹霞^{1*}

1. 云南中医药大学第三附属医院 风湿病科, 云南 昆明 650500

2. 云南中医药大学中药学院, 云南 昆明 650500

3. 重庆医科大学中医药学院, 重庆 400016

摘要: **目的** 通过网络药理学、分子对接及实验验证探究秦艽 *Gentiana straminea* 中环烯醚萜苷抗类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的主要成分和作用机制。**方法** 通过文献报道和 TCMSP 数据收集并通过 SwissADME 数据库筛选环烯醚萜苷类成分, PharmMapper 数据库预测药物靶点; 通过 OMIM、GeneCards 和 TTD 等数据库收集 RA 相关靶点, 并通过 Venn 分析筛选出环烯醚萜苷抗 RA 的潜在作用靶点, 通过构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络筛选环烯醚萜苷抗 RA 的核心靶点, 通过基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析预测环烯醚萜苷抗 RA 的作用机制。以核心靶点为受体进行分子对接和分子动力学模拟筛选出环烯醚萜苷的关键成分, 通过人风湿关节炎成纤维滑膜细胞 (human fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis, HFLS-RA) 进行体外实验验证。**结果** 共收集获得 18 个具有类药性的环烯醚萜苷类成分、300 个药物相关靶点和 1 641 个 RA 相关靶点; Venn 分析筛选出 103 个环烯醚萜苷抗 RA 的潜在作用靶点; PPI 网络分析发现原癌基因酪氨酸蛋白激酶 Src (proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src, SRC)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase-1, MAPK1)、非受体酪氨酸激酶淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶 (non-receptor tyrosine kinase lymphocyte cell-specific protein-tyrosine kinase, LCK)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 和 Ras 同源基因家族成员 A (Ras homolog gene family member A, RhoA) 等可能是环烯醚萜苷抗 RA 的核心靶点; GO 和 KEGG 富集分析结果显示磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 通路环烯醚萜苷抗 RA 密切相关, 环烯醚萜苷还参与调控中性粒细胞活化和脱颗粒等多种生物过程, 进而调控机体免疫反应发挥抗 RA 的作用。分子对接确定了 SRC 为其中最核心的靶点, 龙胆苦苷可能是环烯醚萜苷中的关键成分; 分子动力学模拟显示龙胆苦苷与 SRC 靶点结合紧密, 表明其具有通过靶向作用 SRC 对 RA 起治疗作用的可能性。体外实验结果证实龙胆苦苷可显著抑制 HFLS-RA 增殖 ($P < 0.01$ 、 0.001), 降低上清液中炎症因子水平 ($P < 0.001$), 抑制 PI3K/Akt 和核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路的激活 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。**结论** 环烯醚萜苷是秦艽发挥药理作用的主要成分, 其中龙胆苦苷为环烯醚萜苷抗 RA 的关键成分, 可以通过抑制 HFLS-RA 增殖, 降低炎症反应, 调控 PI3K/Akt 和 NF- κ B 信号通路进而发挥抗 RA 作用。

关键词: 秦艽; 环烯醚萜苷; 类风湿性关节炎; 网络药理学; 分子对接; PI3K/Akt 信号通路; NF- κ B 信号通路; 人风湿关节炎成纤维滑膜细胞; 龙胆苦苷

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)17-5853-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.17.012

Key ingredients and mechanism of iridoid glycoside in *Gentiana straminea* against rheumatoid arthritis by network pharmacology, molecular dynamics and experimental verification

SUN Jianguo^{1,2}, LI Huijuan¹, BAO Wenping¹, QING Yuelei¹, JIANG Lingxue¹, LIU Demin¹, LI Dongyun¹, PAN Zheng³, WEI Danxia¹

收稿日期: 2024-04-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973567); 云南省万人计划基金资助项目 (YNWR/MY/2020/083); 昆明市名中医专家传承工作室基金资助项目 (MYGZS/2022/315)

作者简介: 孙建国, 硕士研究生, 研究方向为中药药理研究。E-mail: 1240603832@stu.cqmu.edu.cn

*通信作者: 魏丹霞, 教授, 硕士生导师, 从事中西医结合防治肾病风湿病研究。E-mail: 1216508769@qq.com

潘正, 副教授, 硕士生导师, 从事中药药理研究。E-mail: 102796@cqmu.edu.cn

1. Department of Rheumatology, the Third Affiliated Hospital of Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China
2. College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China
3. College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective To explore the main components and mechanism of iridoid glycosides in *Gentiana straminea* against rheumatoid arthritis (RA) through network pharmacology, molecular docking and experimental verification. **Methods** Through literature review and TCMSP data collection, iridoid glycosides were screened using SwissADME database, and drug targets were predicted using PharmMapper database; RA related targets was collected through databases such as OMIM, GeneCards and TTD, potential anti-RA targets of iridoid glycosides were screened through Venn analysis, protein-protein interaction (PPI) network was constructed to screen the core anti-RA targets of iridoid glycosides, and mechanism of iridoid glycosides anti-RA was predicted through gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis. The key components of iridoid glycosides were screened through molecular docking and molecular dynamics simulations using core targets as receptors. *In vitro* experiments were conducted on human fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis (HFLS-RA) to validate the results. **Results** A total of 18 iridoid glycosides with drug-like properties, 300 drug-related targets and 1 641 RA related targets were collected and obtained; Venn analysis screened 103 potential targets of iridoid glycosides for anti-RA; PPI network analysis revealed that proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (SRC), mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), non-receptor tyrosine kinase lymphocyte cell-specific protein-tyrosine kinase (LCK), epidermal growth factor receptor (EGFR) and Ras homologous gene family member A (RhoA) may be the core targets of iridoid glycosides against RA. GO and KEGG enrichment analysis results showed that phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) pathway was closely related to the anti-RA effect of iridoid glycosides, which also participated in regulating various biological processes such as neutrophil activation and degranulation, thereby regulating the body's immune response to exert anti-RA effects. Molecular docking identified SRC was the most central target, and gentiopicroside may be a key component of iridoid glycosides; Molecular dynamics simulations showed that gentiopicroside binded tightly to the SRC target, indicating its potential therapeutic effect on RA through targeted action on SRC. The *in vitro* experimental results confirmed that gentiopicroside could significantly inhibit the proliferation of HFLS-RA ($P < 0.01, 0.001$), reduce the levels of inflammatory factors in supernatant ($P < 0.001$), and inhibit the activation of PI3K/Akt and nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathways ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** Iridoid glycosides are the main components that exert pharmacological effects in *G. straminea*, among which gentiopicroside is the key component of iridoid glycosides anti-RA. It can exert anti-RA effects by inhibiting HFLS-RA proliferation, reducing inflammatory reactions and regulating PI3K/Akt and NF- κ B signaling pathways.

Key words: *Gentiana straminea* Maxim.; iridoid glycosides; rheumatoid arthritis; network pharmacology; molecular docking; PI3K/Akt signaling pathway; NF- κ B signaling pathway; human fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis; gentianoside

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性、全身性炎症和自身免疫性疾病, 主要的临床特征表现为全身关节疼痛和肿胀^[1], 如果不及时治疗, 严重者甚至会出现活动受限、关节变形和关节功能丧失的情况^[2]。RA 的发病机制复杂, 有研究表明 RA 的发病与关节的慢性滑膜炎有关, 但也有研究表明成纤维细胞样滑膜细胞 (fibroblastic synoviocytes, FLSs) 异常增生引起的纤维化是 RA 的另一个重要发病原因, 这一过程由异常免疫驱动, 关节滑膜组织转变为增生组织, 从而导致软骨和骨骼的破坏^[3-4]; 以上研究表明 RA 主要由炎症反应和免疫失衡引起。此外, 研究证实 RA 与中性粒细胞和自然杀伤细胞中的核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、原癌基因酪氨酸蛋白激酶 Src (proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src, SRC)、基质金

属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等靶点的上调有关^[5-6]。最近的研究发现 NF- κ B、SRC 等的上调可通过激活炎症反应进而促进人风湿关节炎成纤维滑膜细胞 (human fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis, HFLS-RA) 纤维化形成, 下调这些炎症因子的表达可以有效缓解关节炎小鼠的 RA 症状^[7]。

秦艽 *Gentiana straminea* Maxim. 是一种被《中国药典》2020 年版收录的传统藏药, 具有祛风湿和退虚热的功效, 用于治疗风湿痹痛、骨节酸痛和筋脉拘挛等症状, 在治疗 RA 方面的应用已有数千年历史^[8]。目前的植物化学研究共鉴定了 68 种秦艽中的化学成分, 包括环烯醚萜苷类、黄酮类、木脂素

和三萜类等；环烯醚萜苷类成分龙胆苦苷作为其主要特征成分在《中国药典》2020 年版中用于秦艽的质量控制^[9]，课题组前期通过 UPLC-Q-Exactive-MS/MS 和多变量分析检测了不同产地的秦艽，结果也表明龙胆苦苷是秦艽中最具特征性的标记物，可用于区分不同产地的秦艽^[10]。此外，药理研究表明秦艽发挥药理活性的成分主要是环烯醚萜苷^[11]，其可以改善胶原蛋白诱导的小鼠关节炎，减少软骨损伤^[12-13]；然而，环烯醚萜苷抗 RA 的关键成分和机制仍不清楚，需要进一步阐明。

网络药理学作为现代药理学研究的重要手段，可从统计学角度对药物进行多层次、多靶点和系统性分析，常用于分析中药和中药复方的复杂药理机制^[14]；但大量研究出现的槲皮素、山柰酚和甾醇等成分“包治百病”的现象让人对网络药理学结果存疑^[15-16]；这种非正常的同质化现象可能是由于在纯数据分析中错误评估某些药理成分的药理权重以及对中药成分数据库的滥用等原因导致的^[17-18]，因此，需要对现有网络药理学方法进行优化以确保结果更加可靠，本研究通过聚焦秦艽中的环烯醚萜苷成分分析其抗 RA 的作用机制，有望获得更加科学可靠的结果。本研究根据秦艽的植物化学研究收集了其中的环烯醚萜苷类成分，通过 PharmMapper 和 SwissADME 数据库筛选出具有类药性的药理成分和药物靶点；相较于传统的 TCMSP 数据库分析，该方法更加科学地评估了秦艽中化学成分的药理权重，在很大程度上避免了非正常的同质化现象，提高了网络药理学预测结果的可靠性。本研究通过网络药理学、分子对接和分子动力学等方法阐明了环烯醚萜苷抗 RA 的关键成分和作用机制，并通过体外培养 HFLS-RA 细胞进行体外实验验证，为进一步研究秦艽治疗 RA 提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞

HFLS-RA 细胞购自深圳豪地华拓生物公司。

1.2 药品与试剂

龙胆苦苷对照品（批号 MUST-23031310，质量分数 >97%）购自成都曼斯特生物科技有限公司；FM-2 细胞培养基（批号 SC231009）购自美国 ScienCell 公司；胎牛血清（批号 GA230622）购自美国 Gibco 公司；RNA 提取试剂盒（批号 T8262305）、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒（批号 T8332305）购自北京 Takara 公司；CCK-8 试剂盒（批号 Byt-10314）、SDS-PAGE 预

制胶（批号 Byt-0053A）、RIPA 裂解液（批号 Byt-0013C）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH）抗体（批号 AF1186）、磷脂酰肌醇 3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K）抗体（批号 AF7742）、p-PI3K 抗体（批号 AF5905）、蛋白激酶 B（protein kinase B, Akt）抗体（批号 AF1777）、p-Akt 抗体（批号 AF5737）、 κ B 抑制因子激酶 α/β （inhibitor of κ B kinase α/β , IKK α/β ）抗体（批号 AF2221）、NF- κ B p65 抗体（批号 AF0246）、p-NF- κ B p65 抗体（批号 AF5881）、二抗（批号 A0208）购自上海碧云天生物有限公司；白细胞介素-10（interleukin-10, IL-10）ELISA 试剂盒（批号 B1002307）、IL-17A ELISA 试剂盒（批号 B17A2307）、IL-1 β ELISA 试剂盒（批号 B1B2306）、IL-6 ELISA 试剂盒（批号 B602307）、TNF- α ELISA 试剂盒（批号 TA2301）购自上海信裕生物有限公司。

1.3 仪器

十万分之一天平（德国 Sartorius 公司）；Reaserch plus 型单通道移液枪、Centrifuge 5810R 型高速低温离心机（德国 Eppendorf 公司）；Elx808 型多功能酶标仪（美国 Bio-Tek 公司）；ChemiDoc[™] XRS 型凝胶成像系统、Mini-PRO TEAN Tetra 电泳仪（美国 Bio-Rad 公司）；Midi 40 型 CO₂ 细胞培养箱、7500 Fast 型 qRT-PCR 仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）。

2 方法

2.1 环烯醚萜苷和 RA 的靶点获取

通过 TCMSP 和 SwissTargetPrediction 数据库以“qinjiao”为关键词筛选得到秦艽的靶点^[19-20]。此外，根据先前的研究收集了环烯醚萜苷信息并通过 Swiss ADME 数据库筛选出其中具有类药性的化学成分^[21]；将环烯醚萜苷信息导入 PharmMapper 数据库中，以 NormFit ≥ 0.6 为条件筛选出环烯醚萜苷的靶点^[22]。从 GeneCards、OMIM 和 TTD 等数据库中收集 RA 的相关靶点^[23-25]；分别汇总环烯醚萜苷和 RA 的所有靶点并去除重复值，通过 Venny 工具对各数据库中获取的环烯醚萜苷靶点进行分析；对环烯醚萜苷靶点和 RA 相关靶点进行 Venn 分析，取交集得到环烯醚萜苷抗 RA 的潜在作用靶点。

2.2 蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein interaction, PPI）网络的构建

将潜在作用靶点导入 STRING 数据库中，物种设置为人，置信度设置为最高，剔除离散蛋白后得到蛋白互作网络信息；将信息导入 CytoScape 3.9.1

软件构建 PPI 网络, 并使用 MCODE 插件对 PPI 网络进行聚类分析以确定核心靶点。使用 ggplot2 程序对所有结果进行可视化处理。

2.3 潜在作用靶点的基因本体 (gene ontology, GO) 功能及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

GO 数据库整合了大量生物学研究成果, 通过 GO 分析可以大致了解靶点的生物过程、分子功能、细胞组分等信息; KEGG 数据库是分析靶点相关信号通路的重要工具, 结合 GO 和 KEGG 富集分析可以快速获取到靶点的功能信息和相关信号通路。以 $P < 0.05$ 为条件使用 Cluster Profiler 程序对环烯醚萜苷抗 RA 的潜在作用靶点进行 GO 和 KEGG 分析, 并将得到的结果进行排序。此外, 将 KEGG 分析结果导入微生信平台进行聚类分析以更好地发现环烯醚萜苷抗 RA 的通路。使用 ggplot2 程序对 Top35 的 GO 条目和 Top20 的 KEGG 通路结果进行可视化处理。

2.4 环烯醚萜苷抗 RA 的“药物-靶点-通路”调控网络构建

整理潜在作用靶点信息、PPI 网络信息、GO 和 KEGG 富集分析结果获取到药物-靶点-通路的相互关系, 为了更直观地阐明环烯醚萜苷抗 RA 的关键成分、核心靶点和信号通路, 将得到的药物-靶点-通路信息导入 Cytoscape 3.9.1 软件中构建环烯醚萜苷抗 RA 的“药物-靶点-通路”调控网络, 导出绘制的调控网络图。

2.5 分子对接与分子动力学模拟

为了进一步阐明环烯醚萜苷与关键靶点之间的分子相互作用以及环烯醚萜苷中的关键药理成分, 从 PubChem 数据库中下载环烯醚萜苷的三维结构并将其作为配体; 选择 PPI 网络中的前 5 个关键靶点作为受体, 并以蛋白含小分子配体和分辨率小于 0.25 nm 为筛选条件从 PDB 数据库中下载其人源蛋白质结构文件。使用 PyMol 2.5.2 对受体蛋白进行去水和加氢等预处理和^[26], CASTp 3.0 程序分析受体蛋白的表面口袋和内部空腔确定适用于分子对接的结合口袋^[27]。使用 AutoDock 1.5.7 软件对配体分子和受体蛋白进行分子对接计算, 一般结合能大于 4.0 kcal/mol ($1 \text{ kcal/mol} = 4.182 \text{ kJ/mol}$) 表示受体和配体之间亲和力良好, 结合能超过 7.0 kcal/mol 则表示受体和配体之间具有强烈的亲和力。使用 PyMOL

2.5.2 和 Pheatmap 程序对分子对接结果进行可视化。

采用分子动力学方法模拟龙胆苦苷与 SRC 之前的结合情况, 使用 CGenFF 数据库生成龙胆苦苷的全原子力场参数, 参考先前的研究对系统能量进行预处理和优化^[28]; 使用库仑力和范德华力以 30 fs 的步长控制短程静电, ParticleMesh Ewald 算法维持长程静电, LINCS 算法保持分子结构。在 300 K 和 1 bar 条件下使用 GROMACS 对龙胆苦苷和 SRC 靶点复合物进行分子动力学模拟, 并根据轨迹确定均方根偏差 (root-mean-square deviation, RMSD)、均方根波动 (root-mean-square fluctuation, RMSF)、吉布斯自由能和氢键数等信息。

2.6 细胞培养

HFLS-RA 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素双抗的 FM-2 培养基, 于 37 °C 细胞培养箱中培养。

2.7 CCK-8 检测细胞活力

将对数生长期的 HFLS-RA 细胞以 5 000 个/孔接种于 96 孔板中, 培养 24 h。分别加入不同浓度 (25、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 的龙胆苦苷处理 24 h, 对照组加入不含药物的培养基, 另设置不接种细胞不含药物的空白孔。每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 孵育 2 h, 采用酶标仪检测 450 nm 处各孔的吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.8 ELISA 检测炎症因子水平

按“2.7”项下方法处理细胞, 给药 24 h 后收集上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测上清液中 IL-17A、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和 IL-10 水平。

2.9 qRT-PCR 检测 PI3K、Akt、IL-17A、TNF 受体关联因子 6 (TNF receptor associated factor 6, TRAF6)、IKK β 、NF- κB p65、IL-10、IL-1 β 和 IL-6 基因表达

按“2.7”项下方法处理细胞, 给药 24 h 后收集细胞, 使用 TRIzol 法提取总 RNA^[29], 并使用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析^[30]。引物序列见表 1, 结果以 GAPDH 为内参进行归一化处理, 并用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各基因的相对表达量。

2.10 Western blotting 检测 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、IKK α/β 、NF- κB p65 和 p-NF- κB p65 蛋白表达

按“2.7”项下方法处理细胞, 给药 24 h 后收集细胞, 使用 RIPA 裂解液提取总蛋白, 并用 BCA 法定量蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
<i>GAPDH</i>	GGGGAGCCAAAAGGGTCATCATCT	GAGGGGCCATCCACAGTCTTCT
<i>PI3K</i>	CAGAACAATGCCTCCACGA	CTGAAATCTTACGGAGGCAC
<i>Akt</i>	CACTTTCGGCAAGGTGATCC	TTCAGTAGCACCGGTTCTTG
<i>IL-17A</i>	ACCGGAATACCAATACCAATCC	GGATATCTCTCAGGGTCCTCAT
<i>TRAF6</i>	AAAGCGAGAGATTCTTTCCCTG	ACTGGGGAGACAATTCACTAGAGC
<i>IKKβ</i>	GAGCTCAGCCCAAAGAACAG	AGGTTCTGCATCCCCTCTGG
<i>NF-κB p65</i>	ACCTTTGCTGGAAACACACC	ATGGCCTCGGAAGTTTCTTT
<i>IL-10</i>	ATTGAATTCCCTGGGTGAGAAG	CACAGGGGAGAAATCGATGACA
<i>IL-1β</i>	AGAGCCCATCCTCTGTGACT	GCTCATATGGGTCCGACAGC
<i>IL-6</i>	TAGTCCTTCCTACCCCAATTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC

酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，加入脱脂牛奶封闭，加入一抗 4 ℃ 孵育过夜，TBST 洗涤 3 次；加入二抗室温孵育 2 h，TBST 洗涤 3 次，加入 ECL 发光液进行显影成像。使用 Image J 软件分析条带灰度值，并以 GAPDH 为内参对结果进行归一化处理。

2.11 统计学分析

采用 GraphPad Prism 软件进行分析，两组之间的比较采用 *t* 检验分析，多组间比较采用单因素方差分析，结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

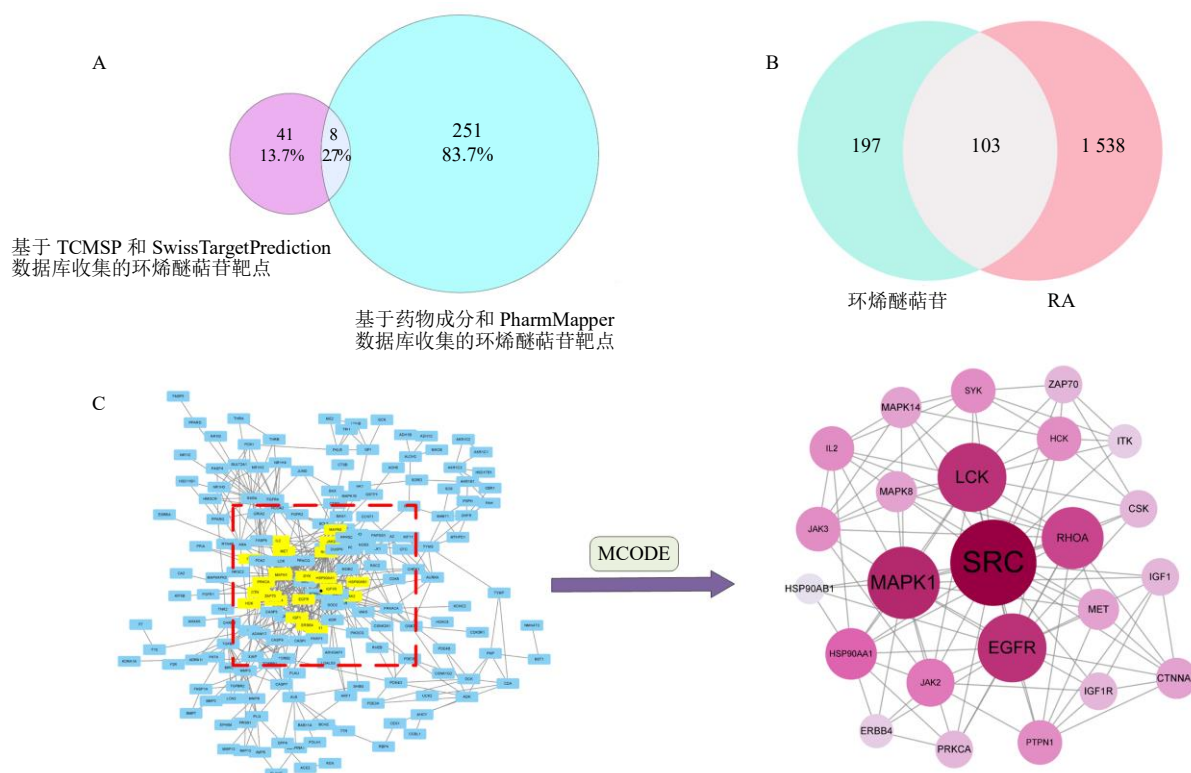
3.1 环烯醚萜苷抗 RA 的潜在作用靶点与 PPI 网络构建

通过 TCMSP 和 SwissTargetPrediction 数据库的纯数据分析共收集了 49 个环烯醚萜苷靶点；此外，

通过前期研究、文献收集和 SwissADME 数据库筛选确定了 18 个环烯醚萜苷成分（表 2），并通过 PharmMapper 数据库预测了 259 个环烯醚萜苷靶点。Venn 分析结果显示纯数据分析得到的 49 个环烯醚萜苷靶点与 PharmMapper 数据库预测的 259 个环烯醚萜苷靶点仅有 2.7% 重复，占环烯醚萜苷靶点总数的 16%（图 1-A）。表明纯数据分析的方法会使得一些药物成分的药效权重被严重高估，大量有效的药理成分被忽视，也就必然导致了网络药理学出现某些成分“包治百病”的非正常同质化现象，使得预测的结果不可靠。因此，本研究采用了一种改良的网络药理学方法对环烯醚萜苷抗 RA 的作用机制进行分析，很大程度上使得网络药理学预测的结果更加真实可靠。

表 2 秦艽环烯醚萜苷类成分
Table 2 Iridoid glycosides in *Gentiana straminea*

序号	化合物	分子式	CAS 号	类别
1	莫诺苷	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₁	25406-64-8	环烯醚萜苷
2	customorusside	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₂	74213-77-7	裂环环烯醚萜苷
3	断马钱子酸	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	60077-46-5	裂环环烯醚萜苷
4	6'-O-β-D-吡喃葡萄糖基马钱苷酸	C ₂₂ H ₃₄ O ₁₅	176226-39-4	环烯醚萜苷
5	6'-O-乙酰龙胆苦苷	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₂	—	环烯醚萜苷
6	马钱苷酸	C ₁₈ H ₂₂ O ₁₀	22255-40-9	环烯醚萜苷
7	獐牙菜苦苷	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	17388-39-5	裂环环烯醚萜苷
8	2'-O-乙酰獐牙菜苦苷	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₁	—	裂环环烯醚萜苷
9	龙胆苦苷	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	20831-76-9	裂环环烯醚萜苷
10	獐牙菜苷	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	14215-86-2	裂环环烯醚萜苷
11	secologanol	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	72463-81-1	裂环环烯醚萜苷
12	秦艽苷 A	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	—	裂环环烯醚萜苷
13	8'-epikingiside/7-酮马钱素	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	16606-70-5	环烯醚萜苷
14	olivioside A	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₁	—	裂环环烯醚萜苷
15	白柳苷 III	C ₂₂ H ₃₂ O ₁₅	—	裂环环烯醚萜苷
16	saprosmoside H	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₁ S	—	裂环环烯醚萜苷
17	rindoside	C ₃₅ H ₄₂ O ₂₁	128420-44-0	裂环环烯醚萜苷
18	三叶苷	C ₃₅ H ₄₂ O ₂₀	53823-10-2	裂环环烯醚萜苷



A-不同方法和数据库收集的环烯醚萜苷靶点信息；B-环烯醚萜苷靶点与 RA 靶点的 Venn 分析；C-潜在作用靶点的 PPI 网络分析。

A-information of iridoid glycosides targets collected using different methods and databases; B-Venn analysis between iridoid glycosides targets and RA targets; C-PPI network analysis of potential targets.

图 1 环烯醚萜苷抗 RA 的潜在作用靶点筛选与 PPI 网络分析

Fig. 1 Screening of potential targets of iridoid glycosides against RA and PPI network analysis

3.2 PPI 分析及核心靶点筛选结果

将环烯醚萜苷靶点进行汇总去重后得到了 300 个药物相关靶点，从多个疾病数据库中预测了 1 641 个 RA 的相关靶点；Venn 分析结果显示药物靶点与疾病靶点共有 103 个交集靶点，说明这些靶点可能是环烯醚萜苷抗 RA 的潜在作用靶点（图 1-B），使用 STRING 数据库和 Cytoscape 3.9.1 软件对 103 个潜在作用靶点进行 PPI 网络分析，并使用 MCODE 对 PPI 网络进行聚类分析，结果表明环烯醚萜苷抗 RA 的核心靶点主要为 SRC、MAPK1、非受体酪氨酸激酶淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶（non-receptor tyrosine kinase lymphocyte cell-specific protein-tyrosine kinase, LCK）、表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor, EGFR）和 Ras 同源基因家族成员 A（Ras homolog gene family member A, RhoA）等（图 1-C）；其中 SRC 的节点数为 20，MAPK1 为 16，LCK 和 EGFR 为 15，RhoA 为 13。

3.3 GO 和 KEGG 富集分析结果

将环烯醚萜苷抗 RA 的潜在作用靶点进行 GO

富集分析，得到的条目包括 1 853 个生物过程、64 个细胞组分和 146 个分子功能。其中主要生物过程包括中性粒细胞脱颗粒、免疫反应中的中性粒细胞活化、对脂多糖的反应和伤口愈合等，细胞组分包括囊腔、富含 ficolin-1 的颗粒和分泌颗粒腔等，分子功能包括内肽酶活性、丝氨酸型内肽酶活性和丝氨酸型肽酶活性等（图 2-A）。这些结果表明环烯醚萜苷抗 RA 主要涉及的生物过程为中性粒细胞脱颗粒和中性粒细胞活化；GO 弦图显示 SRC、MAPK1 和 LCK 等核心靶点在主要的生物过程中均有富集（图 2-B）。

KEGG 富集分析结果显示环烯醚萜苷抗 RA 的 103 个潜在作用靶点共富集到了 144 条信号通路，聚类分析结果显示 144 条通路共涉及 27 个途径，主要包括信号转导和免疫系统等（图 2-C）。富集分析气泡图显示信号转导和免疫系统途径下关键的通路主要包括 PI3K/Akt 通路、MAPK 和 IL-17 等信号通路（图 2-D），表明这些通路与环烯醚萜苷抗 RA 密切相关。

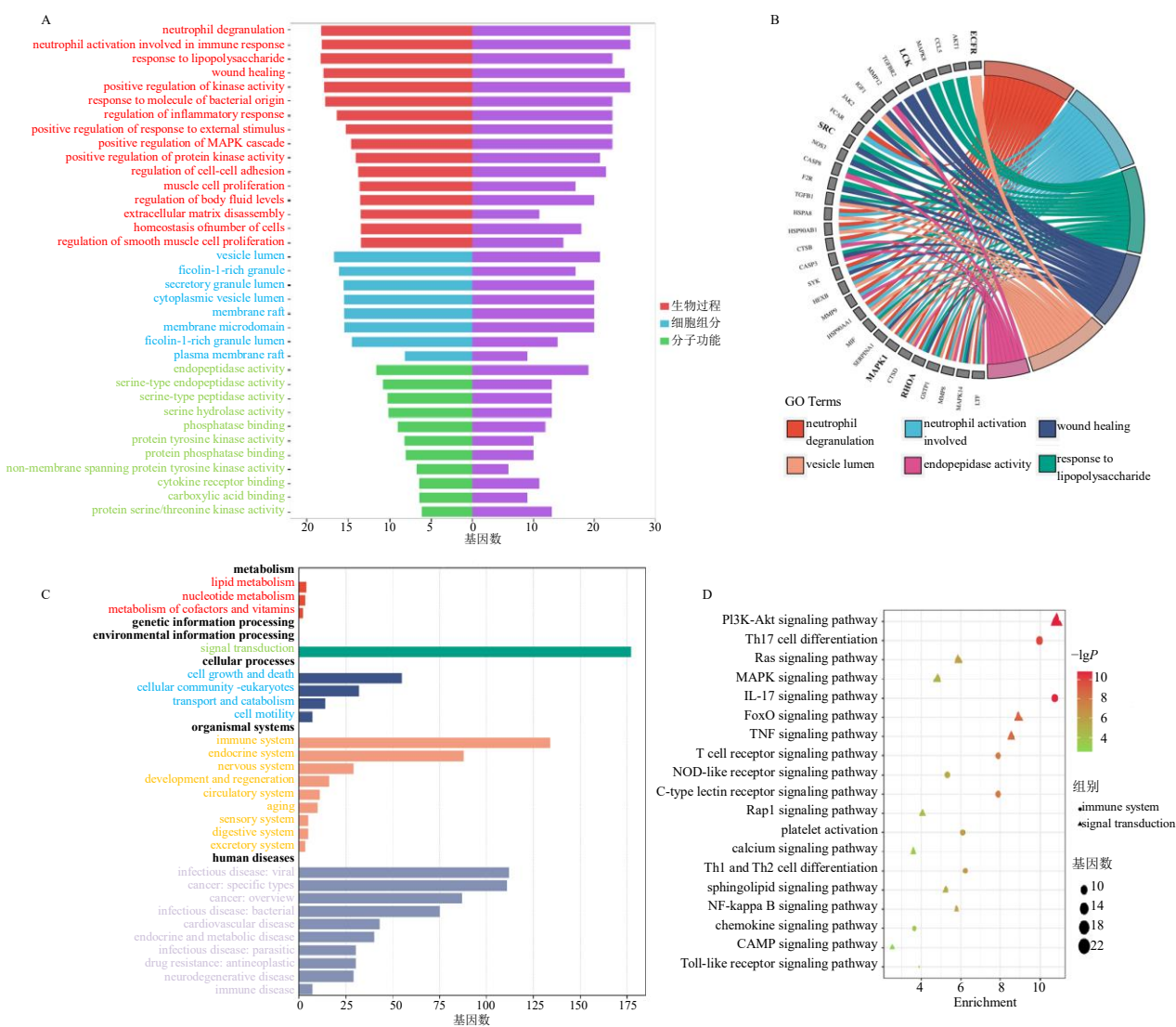


图 2 GO (A、B) 和 KEGG (C、D) 富集分析
Fig. 2 GO (A, B) and KEGG (C, D) enrichment analysis

3.4 环烯醚萜苷抗 RA 的“药物-靶点-通路”调控网络

“药物-靶点-通路”调控网络显示 SRC、MAPK1 和 LCK 等是环烯醚萜苷抗 RA 的核心靶点,与核心靶点相关的生物过程包括中性粒细胞脱颗粒和中性粒细胞活化等,表明这些生物过程在环烯醚萜苷抗 RA 活性的功能中发挥了重要作用。调控网络还显示环烯醚萜苷抗 RA 活性的主要信号通路主要包括 PI3K/Akt、MAPK 和 IL-17 等信号通路(图 3)。表明环烯醚萜苷通过调控核心靶点,影响关键的生物过程和信号通路从而发挥抗 RA 的作用。

3.5 分子对接与分子动力学模拟结果

分子对接结果显示 5 个核心靶点与环烯醚萜苷的结合能均大于 4 kcal/mol (1 kcal/mol = 4.182

kJ/mol),其中龙胆苦苷与 SRC 结合能最大(PDB ID: 3kmr, -9.53 kcal/mol),这些结果表明环烯醚萜苷与核心靶点之间的结合良好(图 4-A)。对打分最高的 6 次结果进行可视化(图 4-B~G),结果显示龙胆苦苷与 SRC 结合能之间在 ILE-410、LEU-414、LEU-266 和 PHE-228 处形成了 4 个氢键。此外,对龙胆苦苷与 SRC 进行了 100 ns 的分子动力学模拟以确定其复合物的构象稳定性,结果显示龙胆苦苷与 SRC 在 0~100 ns 时 RMSD 曲线波动相对稳定(图 5-A),且 RMSF 值相对较小(图 5-B),表明龙胆苦苷与 SRC 的结合具有很高的稳定性;同时在 100 ns 内龙胆苦苷与 SRC 的回旋半径(radius of gyration, Rg)值非常低(图 5-C),氢键数量最大为 10 个(图 5-D),表明龙胆苦苷与 SRC 可能通过氢键紧密结合。吉布斯

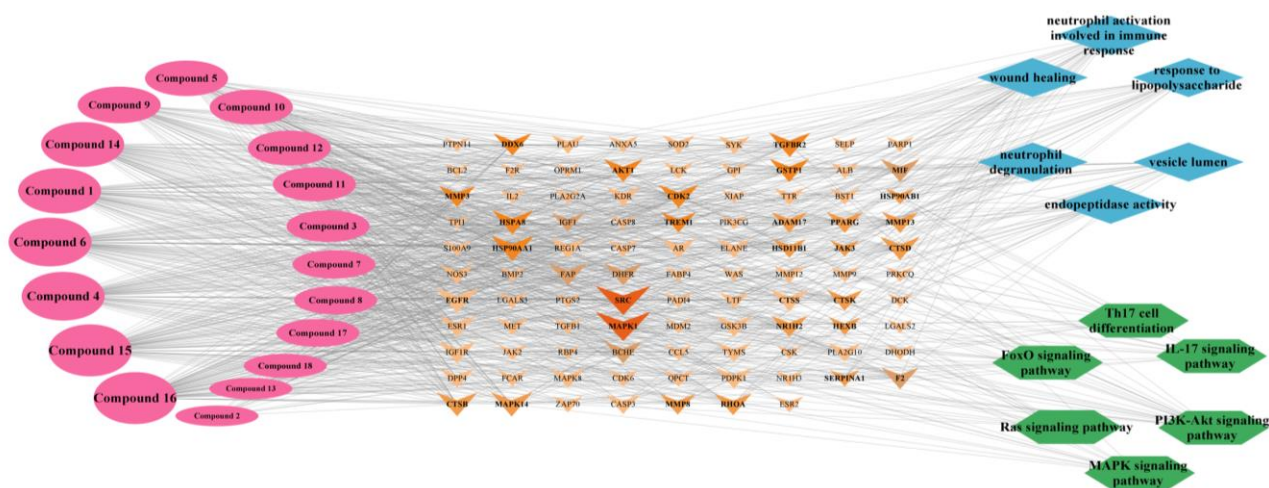
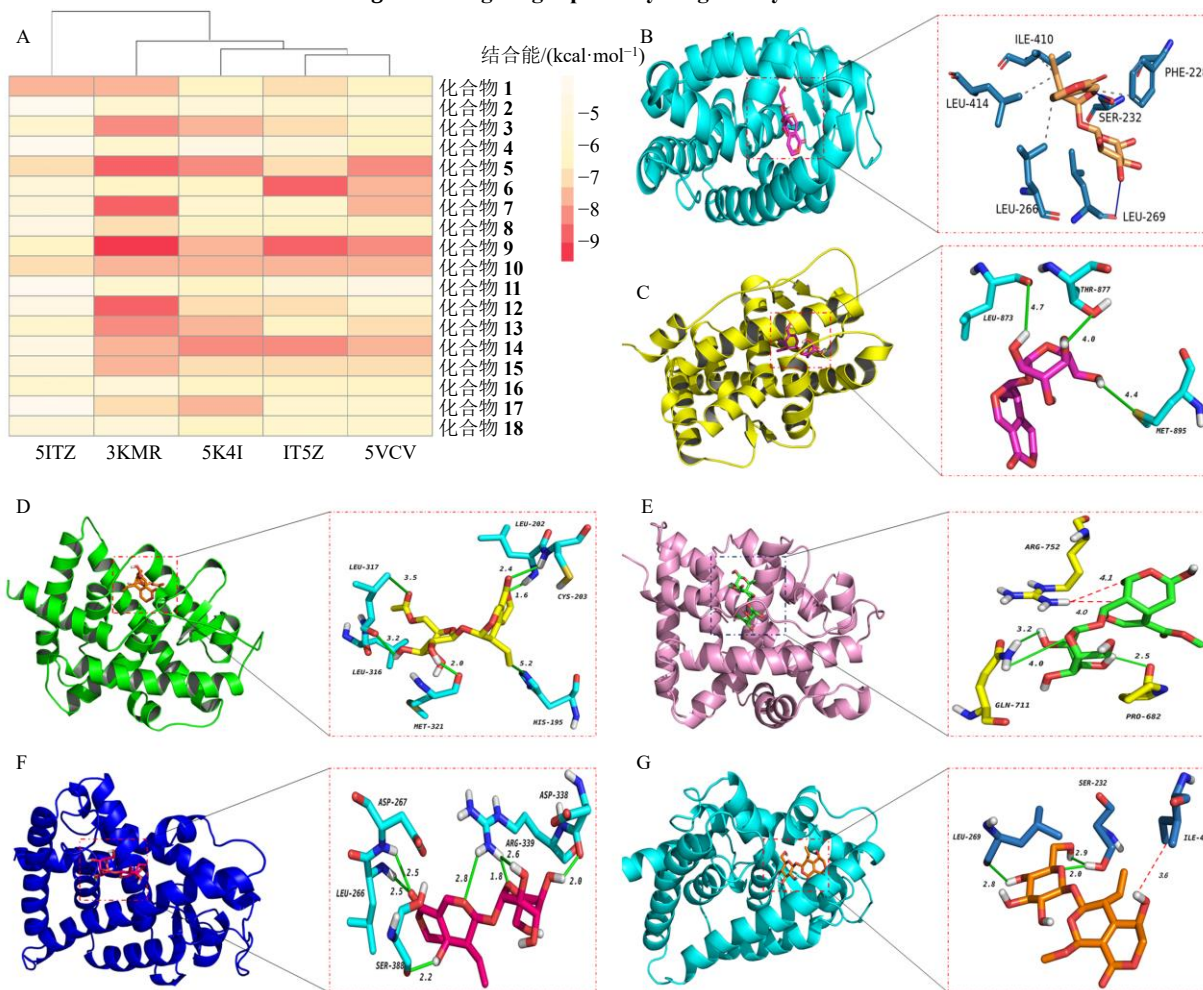


图 3 “药物-靶点-通路”调控网络

Fig. 3 “Drug-target-pathway” regulatory network

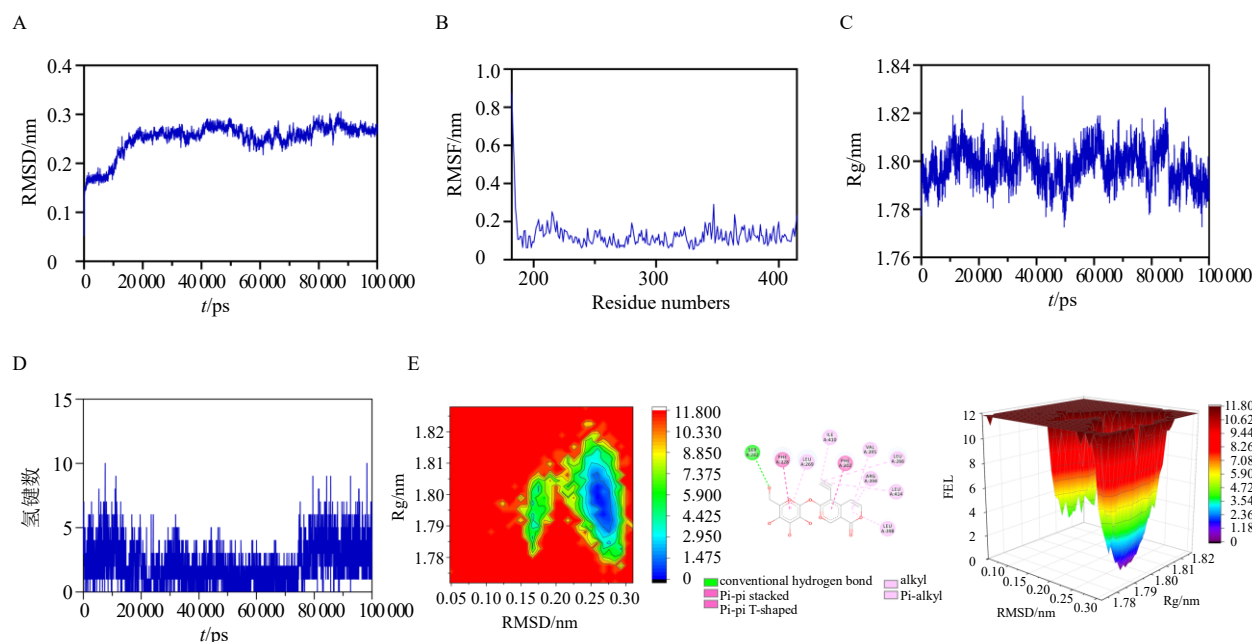


A-环烯醚萜苷与核心靶点的结合能热图; B-SRC 与龙胆苦苷的 3D 结合构象; C-MAPK1 与龙胆苦苷的 3D 结合构象; D-SRC 与 6'-O-乙酰龙胆苦苷的 3D 结合构象; E-MAPK1 与马钱苷酸的 3D 结合构象; F-SRC 与獐牙菜苦苷的 3D 结合构象; G-SRC 与秦艽苷 A 的 3D 结合构象。

A-heatmap of binding energy between iridoid glycosides and core targets; B-3D binding conformation of SRC and gentiopicoside; C-3D binding conformation of MAPK1 and gentiopicoside; D-3D binding conformation of SRC and 6'-O-acetyl gentiopicoside; E-3D binding conformation of MAPK1 and loganic acid; F-3D binding conformation of SRC and swertiamarin; G-3D binding conformation of SRC and qinjiioside A.

图 4 分子对接结果

Fig. 4 Molecular docking results



A-RMSD 值; B-SRC 与龙胆苦苷的 RMSF; C-SRC 与龙胆苦苷的回转半径; D-SRC 与龙胆苦苷的氢键数; E-SRC 与龙胆苦苷复合物的吉布斯能图, 蓝色区域表示能量较低的构象, 红色表示能量较高的构象, 中间面板表示龙胆苦苷和 SRC 之间的分子间相互作用能量最低。
A-RMSD value; B-RMSF of SRC and gentiopicroside; C-turning radius of SRC and gentiopicroside; D-number of hydrogen bonds between SRC and gentiopicroside; E-Gibbs energy diagram between SRC and gentiopicroside complex, blue region represents low-energy conformation, red region represents high-energy conformation, and middle panel indicates lowest intermolecular interaction energy between gentiopicroside and SRC.

图 5 分子动力学模拟结果

Fig. 5 Molecular dynamics simulation results

能谱显示当 Rg 值为 1.79~1.81、RMSD 值为 0.25~0.28 时, 龙胆苦苷与 SRC 结合构象处于相对稳定的状态 (图 5-E)。

3.6 龙胆苦苷抑制 HFLS-RA 增殖

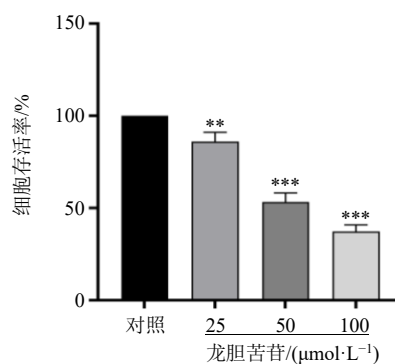
如图 6 所示, 与对照组比较, 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 龙胆苦苷均显著抑制 HFLS-RA 存活率 ($P<0.01$ 、 0.001), 表明龙胆苦苷可能通过抑制 HFLS-RA 增殖进而抑制其纤维化进程, 从而发挥抗 RA 的作用。

3.7 龙胆苦苷抑制 HFLS-RA 上清液中炎症因子水平

如图 7 所示, 与对照组比较, 龙胆苦苷各剂量组 HFLS-RA 上清液中促炎因子 IL-17A、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平显著降低 ($P<0.001$), 抗炎因子 IL-10 水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.001), 表明龙胆苦苷可以调控 HFLS-RA 上清液中炎症因子水平进而抑制 RA 的炎症反应, 从而发挥抗 RA 的作用。

3.8 龙胆苦苷对 HFLS-RA 中 PI3K/Akt 和 NF- κ B 信号通路相关蛋白表达的影响

网络药理学结果表明 PI3K/Akt 通路可能是环烯醚萜苷抗 RA 的重要途径, 因此进一步采用 Western blotting 检测龙胆苦苷干预后 HFLS-RA 中 PI3K/Akt 及下游 NF- κ B 通路相关蛋白的表达。如图

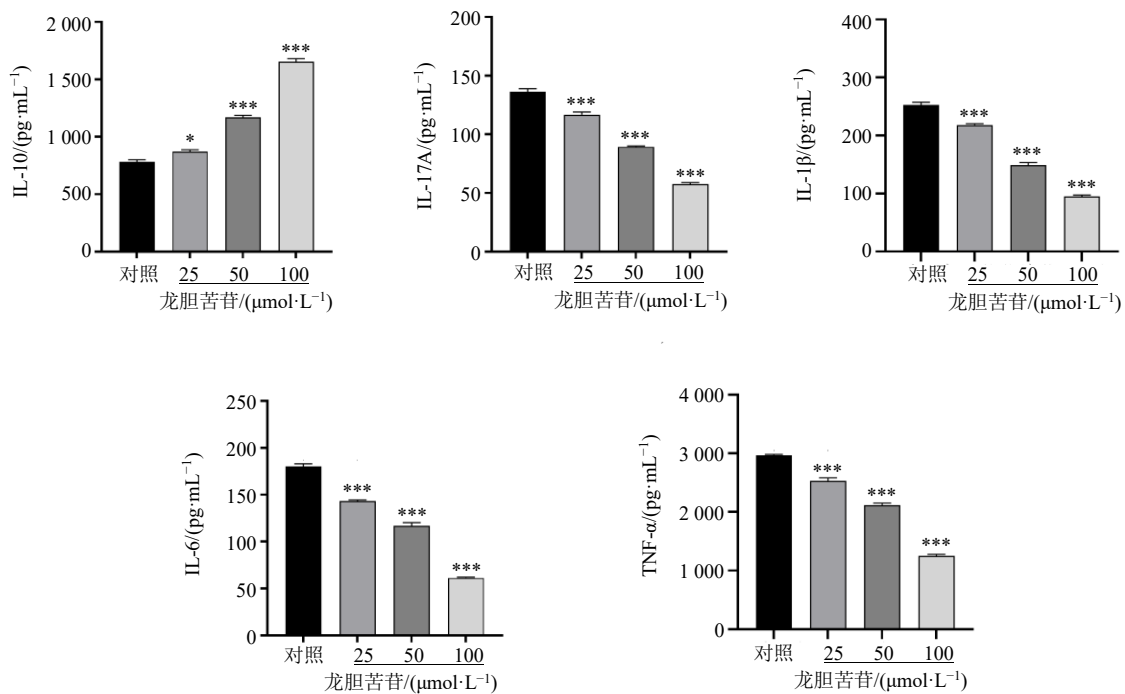
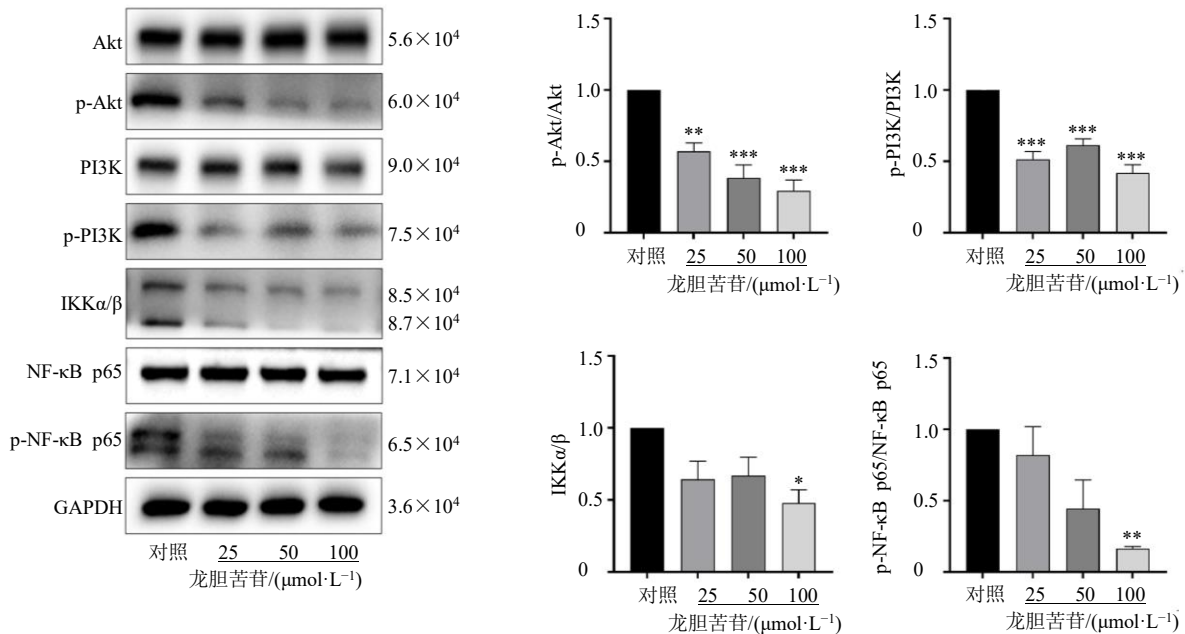


与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$, 下图同。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group, same as below figures.

图 6 龙胆苦苷对 HFLS-RA 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Fig. 6 Effect of gentiopicroside on proliferation of HFLS-RA ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

8 所示, 与对照组比较, 龙胆苦苷各剂量组 PI3K 和 Akt 的磷酸化水平均显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001), 龙胆苦苷高剂量组 IKK α/β 和 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 的蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。表明龙胆苦苷可通过抑制 PI3K/Akt 和 NF- κ B 信号通路的激活进而发挥抗 RA 作用。

图 7 龙胆苦苷对 HFLS-RA 上清液中炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 7 Effect of gentiopicroside on levels of inflammatory cytokine in supernatant of HFLS-RA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 8 龙胆苦苷对 HFLS-RA 中 PI3K/Akt 和 NF-κB 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 8 Effect of gentiopicroside on PI3K/Akt and NF-κB signaling pathway related protein expressions in HFLS-RA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.9 龙胆苦苷对 HFLS-RA 中 PI3K/Akt 和 NF-κB 信号通路相关基因表达的影响

如图 9 所示, 与对照组比较, 龙胆苦苷各剂量

组 IL-17A、IL-1β、IL-6、PI3K、Akt、TARF6、IKKβ 和 NF-κB 的 mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), 龙胆苦苷 (50、100 μmol/L) 组 IL-10 mRNA

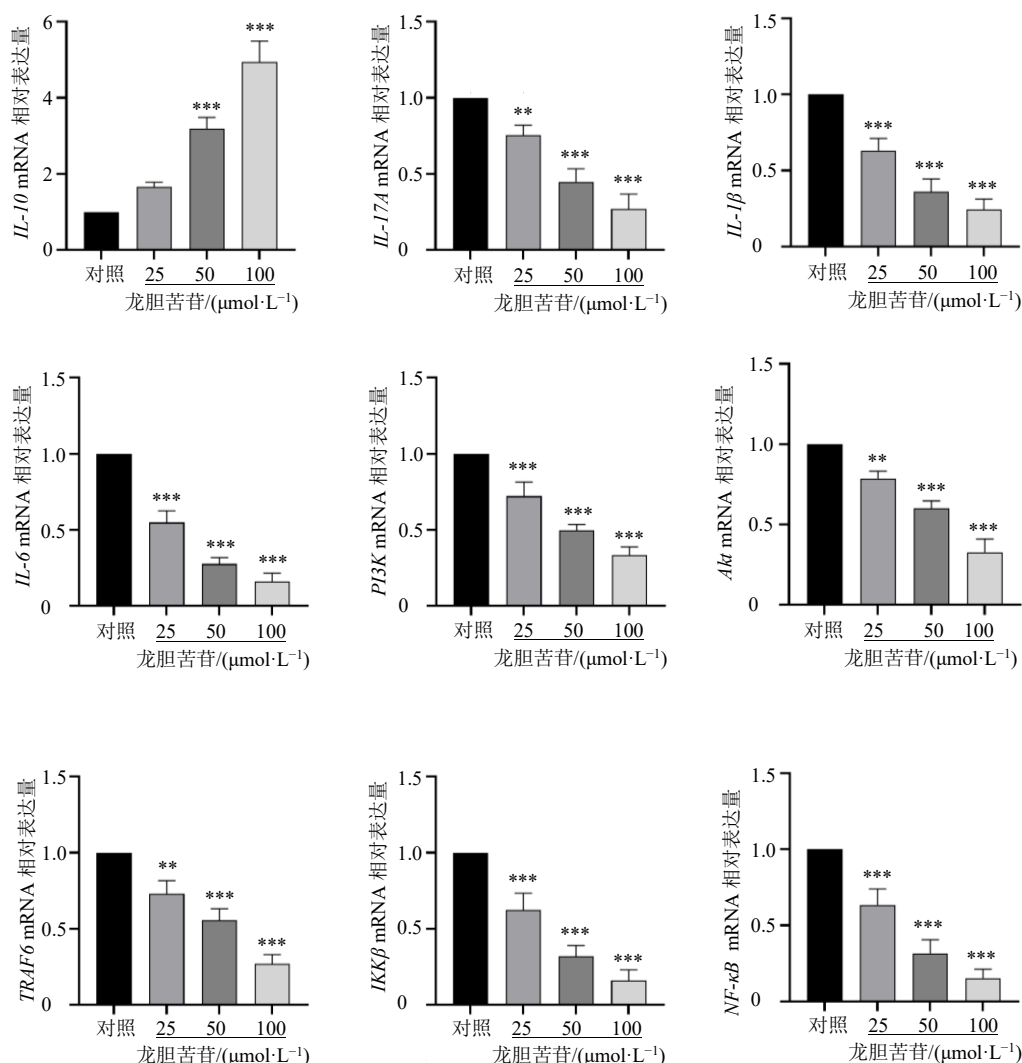


图 9 龙胆苦苣对 HFLS-RA 中 PI3K/Akt 和 NF- κ B 信号通路相关基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effect of gentiopicoside on PI3K/Akt and NF- κ B signaling pathway related gene expressions in HFLS-RA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表达水平显著升高($P < 0.001$),与 ELISA 和 Western blotting 结果一致,也再次证实了环烯醚萜苷抗 RA 的网络药理学分析结果的可靠性。

4 讨论

RA 是一种常见的自身免疫性炎症疾病,主要表现为滑膜炎、关节功能丧失、活动能力下降,并对软骨和骨骼造成永久性损伤^[31];据统计全球约 1% 的人患有不同程度的 RA^[32]。目前,以甲氨蝶呤为代表的抗风湿药是治疗 RA 的一线用药,但甲氨蝶呤抗 RA 的有效率较低,且伴随着严重肝毒性和胃肠功能障碍等多种不良反应^[33]。此外, TNF 靶向药物(如 infliximab 和 etanercept)、IL-6 靶向药物(如 tocilizumab 和 sarilumab)也逐渐应用于临床,

但临床疗效和药物安全性还有待进一步考究^[34-35]。

中医药在治疗 RA 方面具有独特的优势,可单独使用或与抗风湿药联用治疗 RA。秦艽是一种常用的传统藏药,数千年来一直被用于 RA 的防治^[36]。最近的研究表明秦艽中的环烯醚萜苷对 RA 表现出良好的治疗效果^[37],初步研究发现其可以抑制 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 等促炎细胞因子的表达以及下调诱导型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白(NOD like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3)、环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(cysteine-aspartate protease-1, Caspase-1)水平^[38];然而,环

烯醚萜苷抗 RA 的关键成分和作用机制仍未阐明。

为了确定环烯醚萜苷抗 RA 的核心靶点,本研究聚焦秦艽中的环烯醚萜苷类成分对基于 TCMSPP 数据库预测的靶点进行了补充,对潜在作用靶点的 PPI 网络分析最终确定了 5 个环烯醚萜苷抗 RA 的核心靶点,包括 SRC、MAPK1、LCK、RhoA 和 EGFR。大量研究表明这些核心靶点与 RA 炎症反应和破骨细胞生成密切相关^[39-41];其中 SRC 作为环烯醚萜苷抗 RA 最核心的靶点,可在骨关节表面富集和迁移并形成密封调控破骨细胞的吸收过程,破骨细胞中的 SRC 异常激活在关节炎发病早期过程中发挥重要作用^[42]。此外,大量研究发现 MAPK1、LCK、RhoA 和 EGFR 的表达与 RA 密切相关^[39-41]。PPI 分析表明这些核心靶点可能是环烯醚萜苷抗 RA 的重要治疗靶点。

分子对接结果表明龙胆苦苷与 SRC 的结合能最大,可能是环烯醚萜苷中潜在的关键药理活性成分;并通过分子动力学模拟进一步确认了龙胆苦苷可与 SRC 紧密结合;药理研究也表明龙胆苦苷具有良好的抗 RA 作用^[13,43]。值得注意的是除了龙胆苦苷,还发现 6'-O-乙酰龙胆苦苷可能是环烯醚萜苷治疗 RA 的另一种关键活性化合物,有必要对 6'-O-乙酰龙胆苦苷的抗 RA 作用给予更多关注,但这些预测还需进一步实验验证。

通过 KEGG 富集分析确定 PI3K/Akt 和下游 NF- κ B 信号通路 with 潜在作用靶点相关性最好,研究证实 PI3K/Akt 通路可通过表达多种促炎介质促进破骨细胞增生,破骨细胞异常增殖可促进关节组织中的炎症和纤维化进程,因此 PI3K/Akt 通路异常激活可以诱发或加重 RA 进展^[44-45]。此外, NF- κ B 通路作为 PI3K/Akt 通路下游的一个重要分支,正常状态下其可以调节滑膜成纤维细胞的肿瘤样增殖,抑制滑膜纤维化形成,并使炎症因子水平保持正常^[46]。本研究结果显示,环烯醚萜苷中的关键成分龙胆苦苷可以抑制 HFLS-RA 中 PI3K/Akt 和 NF- κ B 通路的激活发挥抗 RA 作用。

同时,富集分析结果还显示 Th17 细胞分化和 IL-17 信号通路在环烯醚萜苷抗 RA 过程中也起着重要作用,研究表明 Th17/Treg 细胞的免疫失衡在 RA 的发病机制中起着关键作用^[47],其主要参与调节 IL-17A、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等炎症因子。因此,环烯醚萜苷还可能通过抑制 Th17 细胞分化和 IL-17 信号通路,降低机体的炎症因子和趋化因子分

泌水平,进而抑制 RA 进展中的免疫炎症反应,减轻免疫应激、炎症细胞浸润和炎症级联反应^[48]。研究发现 IL-17A 和 IL-17F 下调,或者上调 IL-10 和 TGF- β 的表达可以抑制自身反应性 T 细胞的活化减轻 RA 的免疫失衡和炎症反应^[49-50]。KEGG 富集分析结果表明除了 PI3K/Akt 和 NF- κ B 通路外,环烯醚萜苷还可能通过抑制 Th17 细胞分化和 IL-17 通路减少滑膜纤维化发挥抗 RA 作用,但在后续研究中还需对该机制进行进一步探讨。

为了避免网络药理学的非正常同质化现象,本研究以秦艽中的关键成分环烯醚萜苷为核心对网络药理学方法进行优化,分析了环烯醚萜苷抗 RA 的关键药理成分和作用机制,结果表明龙胆苦苷和 6'-O-乙酰龙胆苦苷可能是环烯醚萜苷发挥药理作用的关键成分;大量研究表明 PI3K/Akt 和 NF- κ B 通路在调控 RA 的炎症反应和免疫失衡等方面具有重要作用,本研究也得出了相似的结果,这表明以药物关键成分为核心的网络药理学分析可以很好地避免非正常同质化现象的出现,很大程度上提高了分析结果的准确性和可靠性,为网络药理学预测中药治疗不同疾病的机制和靶点提供了新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Weyand C M, Goronzy J J. The immunology of rheumatoid arthritis [J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(1): 10-18.
- [2] McInnes I B, Schett G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10086): 2328-2337.
- [3] 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.
- [4] Holers V M, Demoruelle M K, Kuhn K A, et al. Rheumatoid arthritis and the mucosal origins hypothesis: Protection turns to destruction [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2018, 14(9): 542-557.
- [5] Zhou F, Mei J T, Han X G, et al. Kinsenoside attenuates osteoarthritis by repolarizing macrophages through inactivating NF- κ B/MAPK signaling and protecting chondrocytes [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(5): 973-985.
- [6] Jang S, Kwon E J, Lee J J. Rheumatoid arthritis: Pathogenic roles of diverse immune cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(2): 905.
- [7] Huang C C, Tseng T T, Liu S C, et al. S1P increases VEGF production in osteoblasts and facilitates endothelial

- progenitor cell angiogenesis by inhibiting miR-16-5p expression via the c-src/FAK signaling pathway in rheumatoid arthritis [J]. *Cells*, 2021, 10(8): 2168.
- [8] Zhang X X, Zhan G Q, Jin M, *et al.* Botany, traditional use, phytochemistry, pharmacology, quality control, and authentication of *Radix Gentianae Macrophyllae*-A traditional medicine: A review [J]. *Phytomedicine*, 2018, 46: 142-163.
- [9] 梁国成, 段文贵, 陈舒茵. 秦艽化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55(7): 2472-2490.
- [10] Pan Z, Xiong F, Chen Y L, *et al.* Traceability of geographical origin in *Gentiana straminea* by UPLC-Q exactive mass and multivariate analyses [J]. *Molecules*, 2019, 24(24): 4478.
- [11] Wang M L, Li H Y, Wang Y F, *et al.* Anti-rheumatic properties of gentiopicroside are associated with suppression of ROS-NF- κ B-NLRP3 axis in fibroblast-like synoviocytes and NF- κ B pathway in adjuvant-induced arthritis [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 515.
- [12] Zhang Q L, Xia P F, Peng X J, *et al.* Synthesis, and anti-inflammatory activities of gentiopicroside derivatives [J]. *Chin J Nat Med*, 2022, 20(4): 309-320.
- [13] He M L, Hu C, Chen M J, *et al.* Effects of gentiopicroside on activation of NLRP3 inflammasome in acute gouty arthritis mice induced by MSU [J]. *J Nat Med*, 2022, 76(1): 178-187.
- [14] Yuan Z Z, Pan Y Y, Leng T, *et al.* Progress and prospects of research ideas and methods in the network pharmacology of traditional Chinese medicine [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2022, 25: 218-226.
- [15] Tang M S, Zeng Y, Peng W J, *et al.* Pharmacological aspects of natural quercetin in rheumatoid arthritis [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2022, 16: 2043-2053.
- [16] Bao X X, Zhang Y N, Zhang H R, *et al.* Molecular mechanism of β -sitosterol and its derivatives in tumor progression [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 926975.
- [17] Lipinski C A. Rule of five in 2015 and beyond: Target and ligand structural limitations, ligand chemistry structure and drug discovery project decisions [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 101: 34-41.
- [18] 廖韵诺, 赵凯丽, 郭宏伟. 中药网络药理学的应用与挑战 [J]. 中草药, 2024, 55(12): 4204-4213.
- [19] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: Updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W357-W364.
- [20] Zhou M F, Li J X, Luo D, *et al.* Network pharmacology and molecular docking-based investigation: *Prunus mume* against colorectal cancer via silencing *RelA* expression [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 761980.
- [21] Daina A, Michielin O, Zoete V. iLOGP: A simple, robust, and efficient description of *n*-octanol/water partition coefficient for drug design using the GB/SA approach [J]. *J Chem Inf Model*, 2014, 54(12): 3284-3301.
- [22] Liu X F, Ouyang S S, Yu B, *et al.* PharmMapper server: A web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(Web Server issue): W609-W614.
- [23] Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, *et al.* The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54: 1.30.1-1.30.1.30.33.
- [24] Piñero J, Ramírez-Anguita J M, Saüch-Pitarch J, *et al.* The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 Update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1): D845-D855.
- [25] Amberger J S, Bocchini C A, Schiettecatte F, *et al.* OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(Database issue): D789-D798.
- [26] Eberhardt J, Santos-Martins D, Tillack A F, *et al.* AutoDock vina 1.2.0: New docking methods, expanded force field, and python bindings [J]. *J Chem Inf Model*, 2021, 61(8): 3891-3898.
- [27] Dundas J, Ouyang, Tseng J, *et al.* CASTp: Computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(Web Server issue): W116-W118.
- [28] Eslami H, Mojahedi F, Moghadasi J. Molecular dynamics simulation with weak coupling to heat and material baths [J]. *J Chem Phys*, 2010, 133(8): 084105.
- [29] Dawod B, Liu J H, Gebremeskel S, *et al.* Myeloid-derived suppressor cell depletion therapy targets IL-17A-expressing mammary carcinomas [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 13343.
- [30] Joulia R, Guerrero-Fonseca I M, Girbl T, *et al.* Neutrophil breaching of the blood vessel pericyte layer during diapedesis requires mast cell-derived IL-17A [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 7029.
- [31] Tanaka Y. Rheumatoid arthritis [J]. *Inflamm Regen*, 2020, 40(1): 20.
- [32] Korol I, Baumeister R H. Treating rheumatoid arthritis [J]. *JAAPA*, 2023, 36(9): 1-5.
- [33] Lehmann J, Kyburz D. Rheumatoid arthritis [J]. *Ther*

- Umsch, 2023, 80(1): 27-33.
- [34] Buchanan W W, Kean C A, Kean W F, *et al.* Rheumatoid arthritis [J]. *Inflammopharmacology*, 2024, 32(1): 3-11.
- [35] Pandolfi F, Franza L, Carusi V, *et al.* Interleukin-6 in rheumatoid arthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5238.
- [36] Chang C, Zhang R R, Shi Y M, *et al.* Traditional Chinese medicine therapy for rheumatoid arthritis: A review [J]. *China J Chin Mater Med*, 2023, 48(2): 329-335.
- [37] Jia N, Chu W, Li Y W, *et al.* Iridoid glycosides from the flowers of *Gentiana macrophylla* Pall. ameliorate collagen-induced arthritis in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 189: 1-9.
- [38] Yuan H Y, Kwaku O R, Pan H, *et al.* Iridoid glycosides from the genus *Gentiana* (Gentianaceae) and their chemotaxonomic sense [J]. *Nat Prod Commun*, 2017, 12(10): 1934578X1701201.
- [39] Li Q, Wu M J, Fang G F, *et al.* MicroRNA-186-5p downregulation inhibits osteoarthritis development by targeting MAPK1 [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(4): 253.
- [40] Bros M, Haas K, Moll L, *et al.* RhoA as a key regulator of innate and adaptive immunity [J]. *Cells*, 2019, 8(7): 733.
- [41] Laragione T, Harris C, Gulko P S. TRPV2 suppresses Rac1 and RhoA activation and invasion in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 70: 268-273.
- [42] Blüml S, Friedrich M, Lohmeyer T, *et al.* Loss of phosphatase and tensin homolog (PTEN) in myeloid cells controls inflammatory bone destruction by regulating the osteoclastogenic potential of myeloid cells [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(1): 227-233.
- [43] Wan Z J, Li H, Wu X H, *et al.* Hepatoprotective effect of gentiopicoside in combination with leflunomide and/or methotrexate in arthritic rats [J]. *Life Sci*, 2021, 265: 118689.
- [44] Zarneshan S N, Fakhri S, Farzaei M H, *et al.* Astaxanthin targets PI3K/Akt signaling pathway toward potential therapeutic applications [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 145: 111714.
- [45] Khan H, Sureda A, Belwal T, *et al.* Polyphenols in the treatment of autoimmune diseases [J]. *Autoimmun Rev*, 2019, 18(7): 647-657.
- [46] Yang Z G, Wang J F, Pan Z Z, *et al.* MiR-143-3p regulates cell proliferation and apoptosis by targeting IGF1R and IGFBP5 and regulating the Ras/p38 MAPK signaling pathway in rheumatoid arthritis [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(4): 3781-3790.
- [47] Harrington L E, Mangan P R, Weaver C T. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: The Th17 lineage [J]. *Curr Opin Immunol*, 2006, 18(3): 349-356.
- [48] Beringer A, Miossec P. Systemic effects of IL-17 in inflammatory arthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2019, 15(8): 491-501.
- [49] Chinen T, Kannan A K, Levine A G, *et al.* An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function [J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(11): 1322-1333.
- [50] Zhang X M, Olsen N, Zheng S G. The progress and prospect of regulatory T cells in autoimmune diseases [J]. *J Autoimmun*, 2020, 111: 102461.

[责任编辑 李亚楠]