

基于网络药理学和代谢组学探究荆防颗粒对类风湿关节炎的保护作用及机制

王秀文¹, 张丛慧¹, 韦方娇¹, 李 梦³, 周继栋², 姚景春², 孙成宏^{2*}, 程国良^{1,2*}

1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

2. 鲁南制药集团股份有限公司 经方与现代中药融合创新全国重点实验室, 山东 临沂 276005

3. 中国海洋大学医药学院, 山东 青岛 266100

摘要: **目的** 通过网络药理学和代谢组学联合分析探讨荆防颗粒 (Jingfang Granules, JFG) 对类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的保护作用及机制。**方法** 采用完全弗氏佐剂诱导建立关节炎大鼠模型, 检测足趾肿胀度、脏器指数和踝关节组织病理学变化, 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平, Western blotting 检测 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)、磷酸化核因子- κ B (Phosphorylated nuclear factor- κ B, p-NF- κ B)、髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 蛋白表达水平, 评价 JFG 对 RA 的保护作用。利用 UPLC-MS 技术结合代谢组学寻找 JFG 调节的血清代谢产物和代谢途径。基于 JFG 入血成分, 进行网络药理学分析, 预测 JFG 入血成分的抗 RA 作用靶点和信号通路, 并利用 Western blotting 技术验证 JFG 改善 RA 的关键信号通路。**结果** JFG 显著改善关节炎大鼠足趾肿胀程度 ($P < 0.05$ 、 0.01) 及病理损伤, 降低脾脏和胸腺指数, 降低血清炎症细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量 ($P < 0.05$ 、 0.01), 下调滑膜组织中 TLR4、p-NF- κ B、MyD88 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)。血清代谢组学发现 13 种内源性代谢物是 JFG 治疗 RA 的潜在生物标志物, 这些代谢物主要参与了不饱和脂肪酸合成、脂肪酸代谢等代谢途径。网络药理学共鉴定出 JFG 与 RA 的交集靶点 364 个, 其中关键靶点 54 个。京都基因与基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析表明其潜在机制可能与磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路有关。此外, Western blotting 结果显示, 与模型组比较, JFG 组大鼠滑膜组织中 PI3K、Akt、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mechanistic target of rapamycin kinase, mTOR) 磷酸化水平明显下调 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** JFG 可能是通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路, 调节脂肪酸代谢, 抑制关节滑膜炎, 改善 RA 大鼠关节损伤。

关键词: 荆防颗粒; 类风湿关节炎; 网络药理学; 代谢组学; PI3K/Akt/mTOR 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)23-8067-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.23.014

Exploration of protective effect and mechanism of Jingfang Granules on rheumatoid arthritis based on network pharmacology and metabolomics

WANG Xiuwen¹, ZHANG Conghui¹, WEI Fangjiao¹, LI Meng³, ZHOU Jidong², YAO Jingchun², SUN Chenghong², CHENG Guoliang^{1,2}

1. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. State Key Laboratory of Integration and Innovation of Classic Formula and Modern Chinese Medicine, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276005, China

3. School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266100, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect and mechanism of Jingfang Granules (荆防颗粒, JFG) on rheumatoid arthritis (RA) through a combined analysis of network pharmacology and metabolomics. **Methods** Rat model of arthritis was

收稿日期: 2024-08-14

基金项目: 山东省自然科学基金创新发展联合基金项目 (ZR2022LZY029)

作者简介: 王秀文 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向中药药理学。E-mail: wangxiuwen98@163.com

*通信作者: 孙成宏 (1985—), 高级工程师, 主要从事新药研发。E-mail: sch658@163.com

程国良 (1985—), 高级工程师, 主要从事中药药理研究。E-mail: cgl.yb@163.com

established using complete Freund's adjuvant induction. Degree of toe swelling, organ index, and pathological changes in ankle joint tissue were detected. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect levels of interleukin-6 (IL-6), IL-1 β and tumor necrosis factor- α (TNF- α). Western blotting was used to detect Toll like receptor 4 (TLR4), phosphorylated nuclear factor-kappa B (p-NF- κ B), and myeloid differentiation factor 88 (MyD88) to evaluate the protective effect of JFG on RA. Using UPLC-MS technology combined with metabolomics to identify serum metabolites and metabolic pathways regulated by JFG. Based on the blood components of JFG, network pharmacology analysis was conducted to predict the anti RA targets and signaling pathways, and Western blotting technology was used to verify the key signaling pathways of JFG improving RA. **Results** JFG significantly improved the degree of toe swelling ($P < 0.05, 0.01$) and pathological damage in arthritis rats, decreased the spleen and thymus index ($P < 0.05, 0.01$), decreased the contents of serum inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6 ($P < 0.05, 0.01$), and down-regulated the expression levels of TLR4, p-NF- κ B and MyD88 protein in synovial tissue ($P < 0.05, 0.01$). Serum metabolomics had identified 13 endogenous metabolites as potential biomarkers for JFG treatment of RA, which mainly participated in metabolic pathways such as unsaturated fatty acid synthesis and fatty acid metabolism. Network pharmacology identified 364 intersecting targets between JFG and RA, including 54 key targets. Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis indicated that the underlying mechanism may be related to phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway. In addition, Western blotting results showed that compared with the model group, the phosphorylation levels of PI3K, Akt and mechanistic target of rapamycin kinase (mTOR) in synovial tissue of JFG group were significantly down-regulated ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** JFG may regulate fatty acid metabolism, inhibit joint synovial inflammation, and improve joint injury in RA rats by inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway.

Key words: Jingfang Granules; rheumatoid arthritis; network pharmacology; metabolomics; PI3K/Akt/mTOR pathway

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种常见的自身免疫性疾病, 主要临床表现为关节滑膜损伤和软骨组织破坏引起关节肿胀和疼痛、关节僵硬、畸形等, 严重可能导致功能残疾^[1-2]。临床研究表明, RA 作为一种慢性疾病, 具有易复发、预后差、致残率高等特点^[3]。目前, 抗 RA 的药物主要有非甾体类抗炎药、抗风湿药物和生物制剂等, 但它们常伴有如诱发肝肾损伤、溃疡、心血管疾病等不良反^[3-4], 因此, 相关药物仍未满足临床需求。中医认为类风湿关节炎属于“痹证”范畴, 风寒湿热等邪气侵袭, 痹阻于人体肌肉和关节以及经络, 从而导致关节炎^[5]。因此, 散风祛湿成为中医药治疗 RA 重要方法。荆防颗粒 (Jingfang Granule, JFG) 是《摄生众妙方》中荆防败毒散的现代制剂, 由荆芥、防风、羌活、独活、柴胡、前胡、川芎、枳壳、茯苓、桔梗、甘草组成, 具有疏风除湿、散寒通痹、活血止痛的作用^[6], 可以用于治疗 RA。楚华等用荆防败毒散治疗 RA 4 周, 显效率为 88%^[7]。现代药理学研究表明 JFG 可通过多种通路发挥抗炎、调节免疫、镇痛等作用^[8-9]。根据 JFG 的传统用途和现代药理学研究结果, 提示 JFG 在 RA 的治疗中具有潜在价值, 但其用机制尚不清晰。

网络药理学可以通过构建网络模型分析药物、靶点和疾病之间的关系^[10], 从而探索 JFG 对 RA 网络的干预作用, 预测药效成分对某些关键靶点及其

途径的影响。基于高效液相色谱法和质谱法的代谢组学可以在生物系统中发现生物标志物, 并关注分子化合物的变化^[11]。二者都关注生物系统的复杂性, 可以相互补充, 帮助全面了解中药作用机制。由完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 诱导的佐剂型关节炎 (adjuvant-induced arthritis, AA) 是一种实验性关节炎模型, 其病理特征类似于 RA, 被广泛用于研究 RA 的发病机制和治疗方法^[12]。本研究通过建立 AA 模型, 结合网络药理学和代谢组学, 探讨 JFG 对 RA 的改善作用及相关机制, 为 JFG 治疗 RA 的临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 6~7 周龄, 体质量 180~220 g, 购自北京华阜康实验动物技术有限公司, 生产许可证号 SCXK (京) 2021-0008, 本研究动物实验经鲁南制药集团股份有限公司动物伦理委员会批准 (伦理号 HN-IACUC-2023-039)。

1.2 药品与试剂

荆防颗粒 (国药准字 Z37020357, 批号 0012301078) 由山东新时代药业有限公司提供; 双氯芬酸钠 (国药准字 H10970209, 批号 09723271) 由深圳致君制药有限公司提供; 完全弗氏佐剂 (批号 F5881) 购自美国 Sigma 公司; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β

(interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6 ELISA 试剂盒 (批号分别为 ml002953、ml037361、ml064292) 均购自上海酶联生物科技有限公司; Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 一抗 (批号 J1322) 购自美国 Santa cruz 公司; 核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K)、 β -肌动蛋白 (β -actin) 一抗 (批号分别为 1034098-5、1042026-1、1009716-1) 购自英国 Abcam 公司; 磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinases, p-PI3K)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B, p-Akt)、髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) (批号分别为 09/2028、08/2028、01/2029、09/2028) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司; HRP 标记的山羊抗兔二抗、HRP 标记的山羊抗鼠二抗、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、极超敏 ECL 化学发光试剂盒 (批号分别为 030623230711、011623230720、Z928240816、111423240314) 购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 仪器

PV-200 型足趾溶剂测量仪 (成都泰盟软件有限公司); ELX-800 型酶标仪 (美国 BioTek 公司); DYY-7C 型电泳仪及 DYCZ-40D 型转移槽 (北京六一生物科技有限公司); ChemiScope 型全自动化学发光成像系统 (上海勤翔科学仪器有限公司); HermoScientificLTQ-Oribitrap 型高分辨质谱联用仪、Vanquish 型超高效液相色谱仪 (美国 ThermoFisher 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

大鼠适应性喂养 7 d 后, 根据体质量随机分为对照组、模型组和 JFG 低、中、高剂量 (0.5、1.0、2.0 g/kg) 组及双氯芬酸钠 (10 mg/kg) 组, 每组 10 只。依据文献方法^[13]建立 AA 模型, 除对照组外, 其余各组大鼠于右后足趾 sc 100 μ L CFA (10 mg/mL), 对照组大鼠在相同部位注射等体积生理盐水。造模后的第 2 天 ig 相应的药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组大鼠 ig 等体积蒸馏水, 1 次/d, 持续 21 d。

2.2 足肿胀度检测

于造模前在大鼠右后足踝关节处划线标记, 使用足趾容积测量仪测量各组大鼠右后足踝关节以

下足容积, 造模后每 3 天测量 1 次各组大鼠右后足容积, 计算足肿胀度。

足肿胀度 = (造模后足体积 - 造模前足体积) / 造模前足体积

2.3 脏器指数检测

末次给药 24 h 后, 各组大鼠麻醉处死, 迅速取出脾脏和胸腺并称定质量, 分别计算脾脏指数和胸腺指数。

脾脏指数 = 脾脏质量 / 体质量

胸腺指数 = 胸腺质量 / 体质量

2.4 组织病理学评价

取各组大鼠右后足踝关节, 于 10% 中性甲醛中固定, 经去钙化、脱水、石蜡包埋等步骤后切片, 对切片进行 HE 染色, 于光学显微镜下观察关节组织的病理变化。

2.5 ELISA 检测炎症因子水平

腹主动脉采血, 4 $^{\circ}$ C 静置 30 min, 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 于 -80 $^{\circ}$ C 保存。根据试剂盒说明书检测各组大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平。

2.6 血清代谢检测

取各组大鼠血清样本 100 μ L, 加入 400 μ L 甲醇-乙腈 (2:1), 在冰浴中涡旋混合并超声 10 min 后, 12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 取上清, 根据文献方法^[13]进行 UPLC-MS 分析。

2.7 Western blotting 检测相关蛋白表达

取关节滑膜组织, 按试剂盒说明书提取总蛋白, 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, 5% 脱脂奶粉封闭后, 孵育一抗、二抗, 采用超灵敏化学发光成像系统采集图像, 并使用 Image-J 软件对蛋白条带进行灰度值分析。

2.8 网络药理学分析

2.8.1 JFG 活性成分靶点筛选 通过 PubChem 数据库、SwissTargetPrediction 数据库筛选预测得分 (probability) 大于 0 的靶点, 整理得到 JFG 入血成分^[14]靶点。

2.8.2 RA 靶点筛选 以 “Rheumatoid Arthritis” 为关键词, 在 GeneCards 数据库中检索相关靶点, 类别选择 “Protein Coding”, 得到 RA 相关的疾病靶点。

2.8.3 JFG 治疗 RA 的潜在靶点 在 Venny2.1.0 平台取 JFG 入血成分靶点和 RA 靶点的交集, 利用 Cytoscape 软件构建 “JFG 活性成分-疾病靶点” 网络。

2.8.4 PPI网络分析 将交集靶点导入STRING数据库,物种选择“智人(Homosapiens)”,设置minimum required interaction score为“high confidence(0.700)”,导出.tsv文件。将文件导入Cytoscape软件,利用Centiscape 2.2 插件拓扑分析筛选关键靶点,并将其可视化。

2.8.5 基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)功能富集 将关键靶点导入KOBAS 数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析,并将分析结果进行可视化。

2.9 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Graphpad Prism 8.0.2 软件进行统计分析,组间样本比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对大鼠足肿胀度的影响

如图 1 所示,大鼠足肿胀度随时间的变化曲线可分为 2 个阶段,第 1 阶段足肿胀加重,sc CFA 后 3 d 足肿胀度达到高峰,随后缓慢消退,至第 9 天又开始肿胀,第 12 天达到第 2 次高峰。与模型

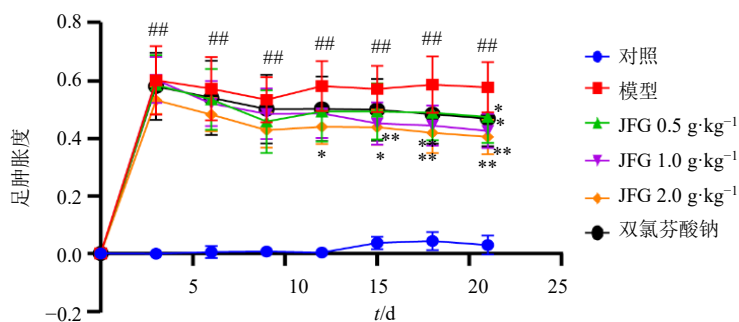
组比较,JFG 高剂量组在第 12 天后足肿胀度显著降低($P<0.05$ 、 0.01),JFG 中剂量组在第 15 天后足肿胀度显著降低($P<0.05$ 、 0.01),JFG 低剂量组和双氯芬酸钠组在第 21 天后足肿胀度显著降低($P<0.05$),表明 JFG 能够改善 AA 大鼠的关节肿胀情况。

3.2 对脏器指数的影响

如图 2 所示,与对照组比较,模型组大鼠的脾脏指数和胸腺指数显著升高($P<0.05$ 、 0.01);与模型组比较,JFG 中、高剂量组大鼠脾脏指数显著降低($P<0.05$ 、 0.01),JFG 低、中、高剂量组大鼠胸腺指数显著降低($P<0.05$ 、 0.01)。

3.3 对病理损伤的影响

如图 3 所示,对照组大鼠踝关节结构、软骨内层、关节间隙及骨组织形态均正常,滑膜无炎症细胞浸润;模型组大鼠关节组织异常,滑膜组织明显增生,呈绒毛状深入关节腔内,且有大量炎性细胞浸润;与模型组比较,JFG 各剂量组和双氯芬酸钠组大鼠滑膜组织慢性炎症表现为滑膜轻微增生,炎症细胞浸润,提示 JFG 能够减轻 AA 大鼠关节病理损伤。



与对照组比较: $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ $^{\#\#\#}P<0.001$; 与模型组比较: $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$, 下同。
 $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ $^{\#\#\#}P<0.001$ vs control group; $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs model group, same as below tables.

图 1 JFG 对足肿胀度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 1 Effect of JFG on degree of foot swelling ($\bar{x} \pm s, n=8$)

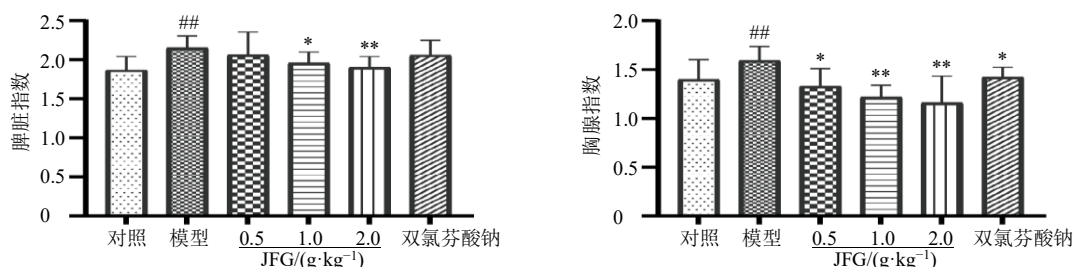


图 2 JFG 对脾脏和胸腺指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 2 Effects of JFG on spleen and thymus index ($\bar{x} \pm s, n=8$)

3.4 对血清炎症因子水平的影响

如图 4 所示,与对照组比较,模型组大鼠血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量均显著升高 ($P < 0.001$); JFG 中、高剂量组大鼠血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01),且呈剂量相关性,表明 JFG 可显著抑制炎症反应。

3.5 对炎症相关蛋白表达的影响

如图 5 所示,与对照组比较,模型组滑膜组织中 TLR4、MyD88、p-NF- κ B 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,JFG 给药干预后,TLR4、

MyD88、p-NF- κ B 蛋白的表达显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01),表明 JFG 可通过调节 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路抑制关节滑膜炎。

3.6 血清代谢分析

对正、负离子模式下的质谱数据进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA),见图 6、7。PCA 结果显示,在正、负离子模式下,各组数据均呈现良好的聚类特征,表明各组血清代谢水平存在显著

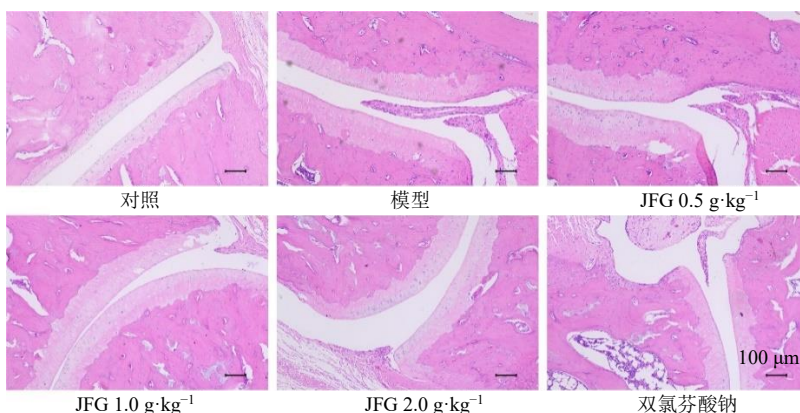


图 3 JFG 对关节组织的影响 ($\times 100$)

Fig. 3 Effect of JFG on ankle tissue ($\times 100$)

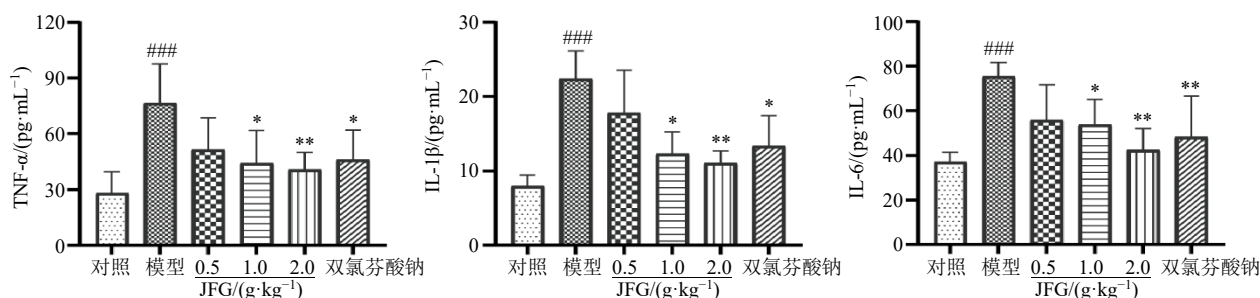


图 4 JFG 对血清炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effect of JFG on levels of serum inflammatory factors ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

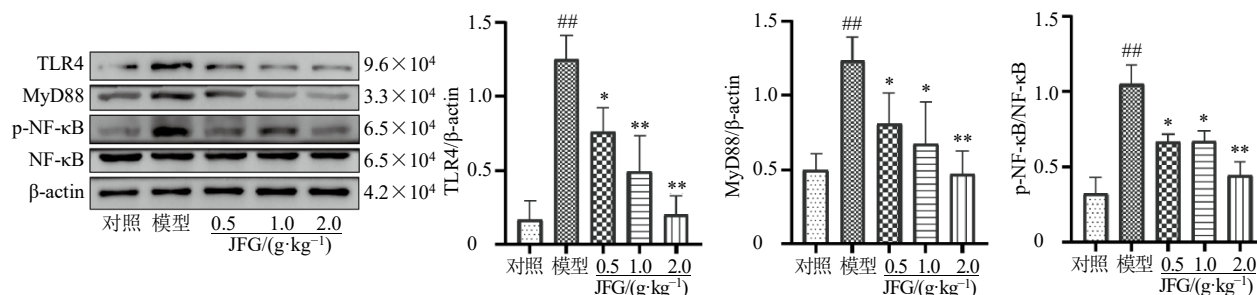


图 5 大鼠滑膜组织中 TLR4、MyD88、p-NF- κ B 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Expression of TLR4, MyD88, p-NF- κ B protein in synovial tissue of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

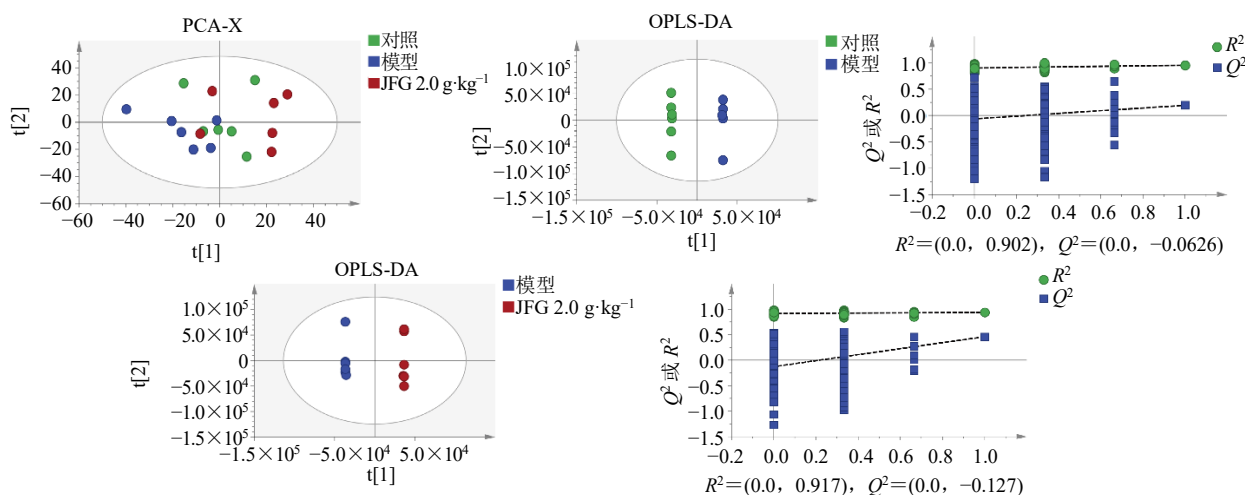


图 6 正离子模式下血清代谢物的 PCA、OPLS-DA 和置换检验

Fig. 6 PCA, OPLS-DA and replacement tests of serum metabolites in positive ion mode

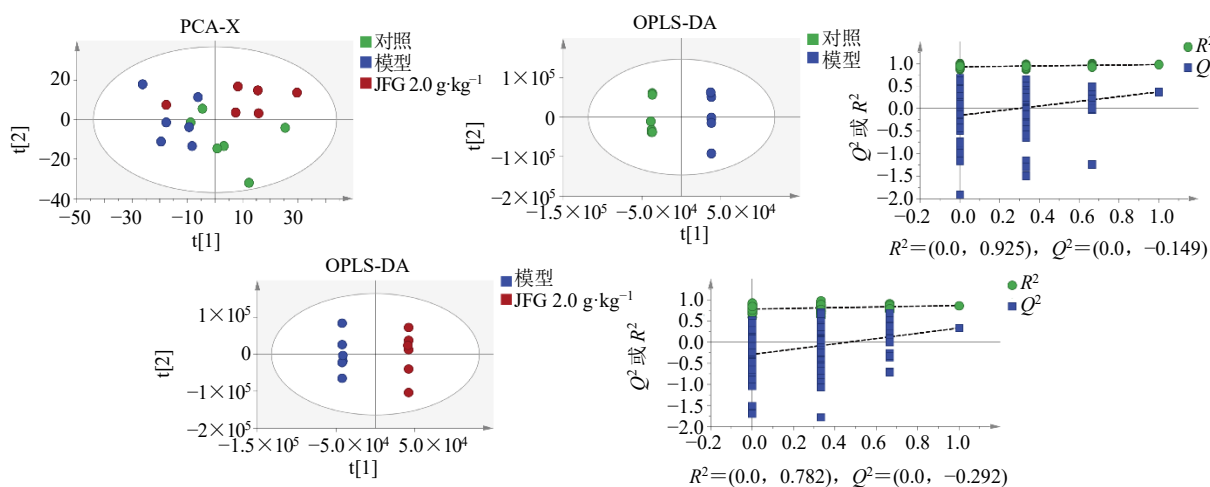


图 7 负离子模式下血清代谢物的 PCA、OPLS-DA 和置换检验

Fig. 7 PCA, OPLS-DA scores and displacement tests of serum metabolites in negative ion mode

差异。此外, JFG 高剂量组接近于对照组, 表明 JFG 可以减轻 AA 导致的代谢紊乱。OPLS-DA 结果表明, 对照组与模型组之间存在明显的分离, 模型组与 JFG 高剂量组之间存在明显的分离。置换检验分析未发现过拟合现象, 且 R^2 接近于 1、 Q^2 小于 0。

以 $VIP \geq 1$ 和 $P < 0.05$ 为筛选标准, 共鉴定出 13 种差异代谢物 (表 1、图 8-A)。如图 8-B 所示将 13 种差异代谢物导入 MetaboAnalyst 6.0 数据库进行分析, 富集结果表明 JFG 调节的代谢通路主要为不饱和脂肪酸生物合成 (biosynthesis of unsaturated fatty acids)、脂肪酸代谢 (fatty acid degradation) 和脂肪酸生物合成 (fatty acid biosynthesis) 等。

3.7 “JFG 活性成分-疾病靶点”网络分析

在 SwissTargetPrediction 数据库中, 对 JFG 入

血成分进行靶点检索, 共获得 591 个靶点。在 GeneCards 数据库中, 共筛选得到 RA 靶点 6028 个, 将之与 JFG 入血成分靶点取交集, 得到 364 个共同靶点。利用 Cytoscape 软件构建 “JFG 入血成分-疾病靶点” 网络, 见图 9。

3.8 PPI 网络分析

将共同靶点导入 STRING 数据库, 筛选出置信度 ≥ 0.700 的靶点, 剔除孤立靶点, 利用 Cytoscape 软件和 Centiscape2.2 插件, 以 degree 值、betweenness、closeness 为主要参数进行拓扑分析, 筛选关键靶点并将其可视化 (图 10)。

3.9 GO 和 KEGG 功能富集

为探讨 JFG 治疗 RA 的潜在途径, 利用 KOBAS 数据库对关键靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。

表 1 血清代谢差异物
Table 1 Serum metabolic differences

序号	代谢物	分子式	离子模式	VIP (对照 vs 模型)	对照 vs 模型	VIP (模型 vs JFG)	模型 vs JFG
1	1-油酰甘油磷酸胆碱	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	正离子	3.20766	↑ ¹⁾	3.06046	↓ ¹⁾
2	棕榈酰肉碱	C ₂₃ H ₄₅ NO ₄	正离子	2.29873	↑ ¹⁾	2.34428	↓ ¹⁾
3	D-1-氨基丙-2-氧基磷酸酯	C ₃ H ₁₀ NO ₄ P	正离子	1.69649	↓ ²⁾	1.29306	↑ ¹⁾
4	L-谷氨酰胺	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	正离子	1.74492	↑ ¹⁾	1.99387	↓ ²⁾
5	棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	正离子	1.88573	↓ ²⁾	1.02052	↑ ²⁾
6	2,3-环氧-4-氧代-7,10-十二碳二烯酰胺	C ₁₂ H ₁₇ NO ₃	正离子	1.15936	↑ ¹⁾	1.57941	↓ ²⁾
7	γ-亚麻酸	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	负离子	11.20790	↑ ¹⁾	12.5256	↓ ¹⁾
8	(4β)-12-磺基枞-8,11,13-三烯-18-酸	C ₂₀ H ₂₈ O ₅ S	负离子	8.24778	↑ ¹⁾	7.3405	↓ ¹⁾
9	全顺式-4,7,10,13,16-二十二碳五烯酸	C ₂₂ H ₃₄ O ₂	负离子	4.46685	↑ ¹⁾	3.72547	↓ ¹⁾
10	尿氯酸	C ₈ H ₁₁ Cl ₃ O ₇	负离子	2.53447	↑ ¹⁾	3.30136	↓ ¹⁾
11	7Z,10Z 十六碳二烯酸	C ₁₆ H ₂₈ O ₂	负离子	2.14850	↑ ¹⁾	2.67897	↓ ²⁾
12	月桂酸	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	负离子	2.29813	↑ ²⁾	2.53595	↓ ²⁾
13	壬酸	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	负离子	1.72015	↓ ²⁾	1.57103	↑ ²⁾

¹⁾P<0.05 ²⁾P<0.01; “↑”表示上调,“↓”表示下调。

¹⁾P<0.05 ²⁾P<0.01; “↑” indicates up-regulation, “↓” indicates down-regulation.

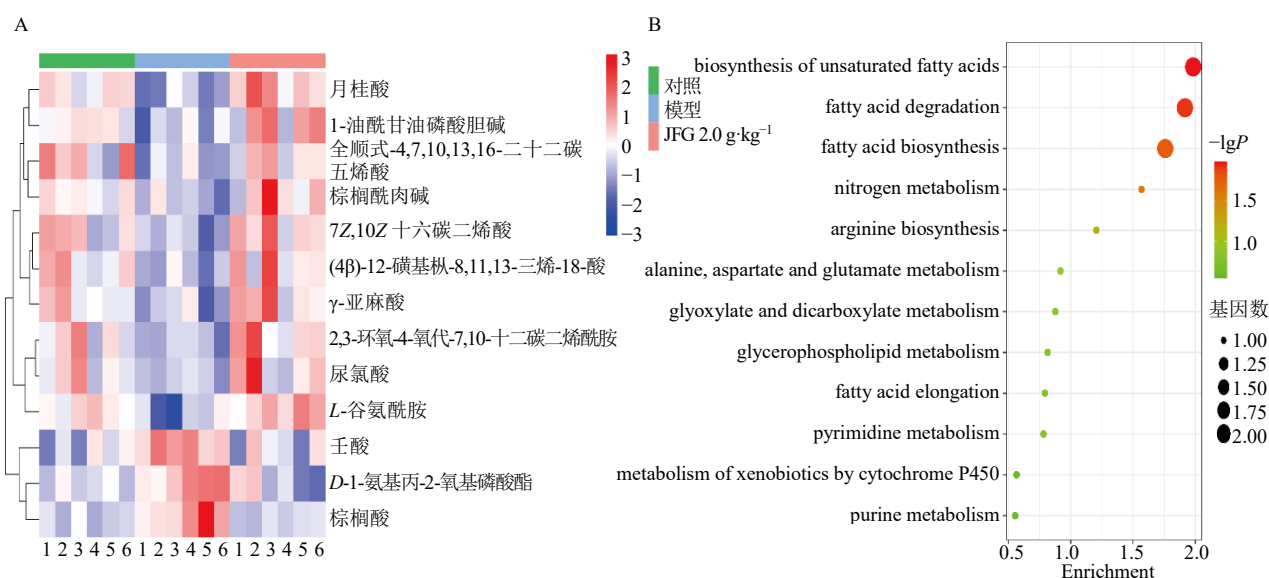


图 8 差异代谢物热图 (A) 及 JFG 调控的代谢途径 (B)

Fig. 8 Differential metabolite heat map (A) and metabolic pathways regulated by JFG (B)

GO 富集分析筛选各类别排名前 10 的条目 ($P < 0.05$), 结果显示生物过程 (biological process, BP) 条目主要为 RNA 聚合酶 II (positive regulation of transcription by RNA polymerase II) 的调节、细胞因子介导的信号通路 (cytokine-mediated signaling pathway) 和蛋白质磷酸化 (protein phosphorylation) 等; 细胞组成 (cellular component, CC) 条目包括细胞质 (cytosol)、细胞核 (nucleus)、核质 (nucleoplasm)、线粒体

(mitochondrion) 等; 分子功能 (molecular function, MF) 条目主要涉及蛋白结合 (protein binding)、ATP 结合 (ATP binding)、酶结合 (enzyme binding) 等, 见图 11。KEGG 通路富集分析, 筛选得到 174 条通路 ($P < 0.01$), 主要分布在癌症相关通路、PI3K/Akt 等信号通路, 见图 12 (排名前 20)。KEGG 通路富集分析显示“癌症相关通路”, 可能是因其调控细胞增殖、代谢、存活等基本生物过程, 而这些过程在 RA 等炎症性疾病中同样重要。此外,

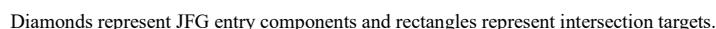


Fig. 9 Network “blood entry component of JFG-disease target”



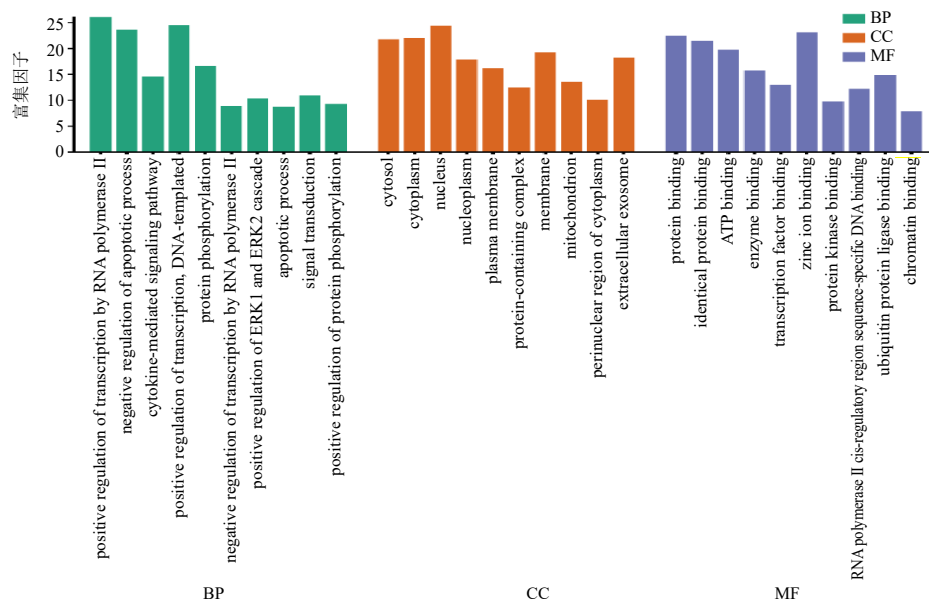


图 11 JFG 治疗 RA 靶点的 GO 富集分析

Fig. 11 GO enrichment analysis of RA targets treated by JFG

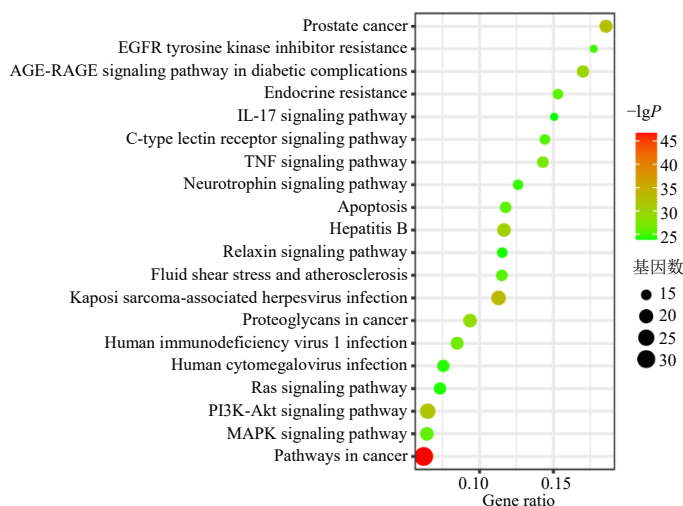


图 12 JFG 对 RA 靶点的 KEGG 富集分析

Fig. 12 KEGG enrichment analysis of RA target by JFG

癌症研究数据丰富，数据库对其注释更详细，因此在富集分析中频繁出现。

本研究结合网络药理学和代谢组学结果，选择与调节脂肪酸代谢相关的 PI3K/Akt 信号通路进行验证，以排除结果假阳性。研究表明，PI3K/Akt 信号通路可通过激活 mTOR 调控脂肪酸代谢^[15]，故利用 Western blotting 技术验证 JFG 对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响。如图 13 所示，与对照组比较，模型组大鼠关节组织中 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 比值显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)；与模型组比较，JFG 组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-

mTOR/mTOR 显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01)，提示 JFG 可通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路治疗 RA，进一步验证了网络药理学结果。

4 讨论

RA 是一种常见的自身免疫性疾病，具有滑膜炎和增生（肿胀）的症状，随着疾病进展，关节受损，严重影响患者生活质量^[16]。AA 是一种诱发的（亚）慢性关节炎，可引起关节肿胀、滑膜炎和软骨破坏，被广泛用作模拟 RA 的发病过程，以评估药物的镇痛潜力或抗炎作用^[12-13]。本研究建立由 CFA 诱导的 AA 大鼠模型，探究 JFG 对 RA

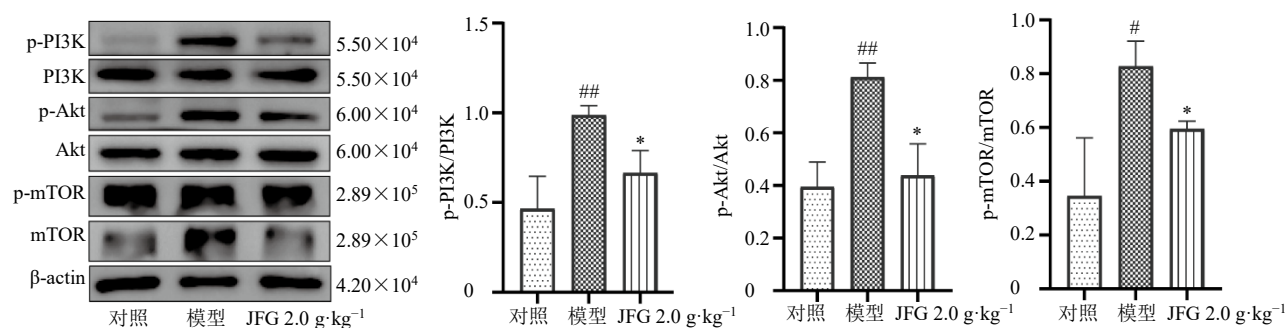


图 13 JFG 对 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白表达的影响

Fig. 13 Effect of JFG on protein expression levels of p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt and p-mTOR/mTOR

的保护作用及作用机制。结果表明, JFG 可以减轻 AA 大鼠足趾肿胀、降低脾脏和胸腺指数、抑制血清炎症因子水平和关节炎症蛋白表达、缓解滑膜损伤程度、调节脂肪酸代谢紊乱, 表明 JFG 可能是治疗 RA 的潜在药物。

促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 在 RA 进展中发挥重要作用^[18]。在 RA 中, TNF- α 被认为在炎症中起主导作用^[19]。IL-1 β 由巨噬细胞产生, 可作用于软骨细胞, 诱发软骨基质降解, 导致软骨损伤。同时, TNF- α 和 IL-1 β 可协同增加其他细胞因子的表达, 加剧肿胀^[20]。IL-6 可由 TNF- α 刺激成纤维细胞持续产生, 并增强 TNF- α 和 IL-1 β 的作用, 进而加重炎症^[21]。因此, 抑制以上炎性介质的表达和活性被认为是治疗 RA 的可行方法。此外, TLR4/NF- κ B 信号通路为经典炎症通路, 当 TLR4 被其配体结合时, 它通过 MyD88 依赖和独立途径激活 NF- κ B, 从而增加促炎分子的产生, 加重炎症反应^[22]。研究表明, 通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路, 可以减轻 RA 炎症^[23-25]。在本研究中, JFG 能够抑制 AA 大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达, 降低滑膜组织中 TLR4、MyD88、p-NF- κ B 蛋白表达量, 表明 JFG 可减轻 AA 模型大鼠炎症反应。

研究表明, 脂肪酸可通过激活 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路参与炎症反应, 也可通过引起内质网应激诱发炎症反应^[26-27]。在 RA 中, 饱和脂肪酸棕榈酸和不饱和脂肪酸亚油酸可以诱导滑膜成纤维细胞中促炎细胞因子产生^[28]。 γ -亚麻酸可转化为 Dihomo- γ -亚麻酸, 减少炎性介质花生四烯酸的氧合产物合成, 从而发挥抗炎作用^[29-30]。临床研究表明, γ -亚麻酸可以减轻 RA 患者的炎症及关节损伤^[31]。月桂酸能够降低促炎细胞因子水平, 并下

调 TLR4/NF- κ B 蛋白的表达^[32-33]。因此, 调节脂肪酸紊乱有助于抑制 RA 的炎症反应^[34-35]。本研究通过对血清内源性代谢物进行分析, 发现 AA 大鼠血清中棕榈酸增加、 γ -亚麻酸、月桂酸等减少, JFG 给药干预后棕榈酸含量减少, γ -亚麻酸、月桂酸等含量上调, 表明 JFG 可能通过调节脂肪酸紊乱抑制 AA 模型大鼠的炎症反应。

中药成分复杂, 治疗疾病的作用机制难以阐明。网络药理学通过多成分、多靶点的系统性分析, 能够有效揭示中药的复杂作用机制, 并在推动中医药现代化研究中展现出广阔前景^[36-37]。本研究基于网络药理学方法, 分析 JFG 入血成分的靶点与 RA 之间的关系, 该方法具有较高的准确性和查全性, 但也存在数据更新滞后、对中药成分覆盖不足以及依赖计算预测等局限。为弥补以上不足, 本研究结合血清代谢结果, 并通过 Western blotting 实验进行验证, 以排除假阳性, 从而提高结果的准确性和科学性, 符合指南中对实验验证结果与网络药理学分析结果相结合的建议^[38-39]。通过网络药理学, 共鉴定出 54 个关键靶点, 活性成分中 5-羟基呋喃香豆素能够作用于 AKT1、PIK3CA、HSP90AA1 和 SRC 等靶点^[40], 7-羟基香豆素、7-羟基-4'-甲氧基异黄酮可作用于 EGFR 靶点^[41], 6,7-二甲氧基香豆素可作用于 AKT1 蛋白^[42]等, 而 AKT1、PIK3CA、HSP90AA1、EGFR 等可能是抗 RA 的重要靶点^[43-45]。对关键靶点进行 KEGG 富集分析, 主要分布在癌症相关通路、PI3K/Akt 信号通路、MAPK 信号通路等。其中 PI3K/Akt 信号通路的激活可诱导 mTOR 的磷酸化, 在细胞周期, 细胞存活, 炎症, 代谢和细胞凋亡等过程中发挥重要作用^[46]。激活的 PI3K/Akt/mTOR 信号通路可以诱导脂肪酸、脂质和胆固醇的重新生物

合成^[15]。mTOR 是细胞内代谢和免疫细胞活化的主要调控因子，并形成不同多蛋白复合物的催化亚基，如 mTORC1 和 mTORC2，它们都有助于代谢重编程过程。mTORC1 可被 PI3K/Akt 信号通路激活，触发从头脂肪生成和合成代谢，mTORC2 可通过激活 AKT，也可通过 AKT 磷酸化后对 mTORC2 的相互刺激来介导脂肪酸代谢^[47]。脂肪酸代谢与炎症反应密切相关，饱和脂肪酸通常与促炎症信号的激活相关，而不饱和脂肪酸（如 ω -3 脂肪酸）则具有抗炎作用^[48-49]。通过调节 PI3K/Akt/mTOR 通路来调控脂肪酸代谢，从而抑制炎症介质的产生。Western blotting 结果表明 JFG 可下调 AA 大鼠关节组织中 p-PI3K、p-Akt、p-mTOR 的表达，从而抑制了 PI3K/Akt/mTOR 信号通路。以上结果表明，JFG 可能是通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路调节脂肪酸代谢紊乱，从而抑制关节滑膜炎症，改善对 RA 关节损伤。

综上，本研究发现，JFG 可能是通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路抑制关节炎症，改善 AA 模型大鼠关节损伤。结合网络药理学、代谢组学和 Western blotting 技术，发现 JFG 可能是通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路，调节脂肪酸代谢紊乱，降低 AA 模型大鼠关节炎症。本研究为 JFG 治疗 RA 提供了理论依据，也为中医药治疗 RA 提供了线索和思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Firestein G S, McInnes I B. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Immunity*, 2017, 46(2): 183-196.
- [2] Scott D L, Wolfe F, Huizinga T W J. Rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2010, 376(9746): 1094-1108.
- [3] Chen X, Sun L J, Wang S, *et al.* Effects of *Prunus tomentosa* Thumb total flavones on adjuvant arthritis in rats and regulation of autophagy [J]. *Technol Health Care*, 2023, 31(S1): 123-136.
- [4] Chen Y, Wang Q W, Zuo J, *et al.* Anti-arthritis activity of ethanol extract of *Claoxylon indicum* on Freund's complete adjuvant-induced arthritis in mice [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1): 11.
- [5] 刘伟, 杨梅, 董振华. 董振华治疗类风湿关节炎经验 [J]. 北京中医药, 2024, 43(6): 661-663.
- [6] 赵琰, 胡杰, 张贵民, 等. 荆防败毒散的源流与应用 [J]. 环球中医药, 2020, 13(11): 1996-2002.
- [7] 楚华, 李学良. 荆防败毒散治疗类风湿性关节炎 20 例 [J]. 实用中医内科杂志, 2009, 23(9): 69-70.
- [8] 张奎, 陈红英, 马瑜. 荆防败毒散药效学研究 [J]. 河南中医, 2009, 29(6): 601-602.
- [9] 曹天佑, 屈会化, 董利洋, 等. 荆防颗粒对马兜铃酸 I 致小鼠急性肾损伤的预防和保护作用研究 [J]. 中草药, 2022, 53(18): 5742-5749.
- [10] Hopkins A L. Network pharmacology: The next paradigm in drug discovery [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11): 682-690.
- [11] Wang M, Lamers R J, Korthout H A, *et al.* Metabolomics in the context of systems biology: Bridging traditional Chinese medicine and molecular pharmacology [J]. *Phytother Res*, 2005, 19(3): 173-182.
- [12] Smolen J S, Aletaha D, McInnes I B. Rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2016, 388(10055): 2023-2038.
- [13] Pearson C M. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1956, 91(1): 95-101.
- [14] Sun X X, Xiang H X, Liu Z, *et al.* Jingfang Granules (荆防颗粒) alleviates bleomycin-induced acute lung injury through regulating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 318(Pt A): 116946.
- [15] Saravia J, Raynor J L, Chapman N M, *et al.* Signaling networks in immunometabolism [J]. *Cell Res*, 2020, 30(4): 328-342.
- [16] Quiñonez-Flores C M, González-Chávez S A, Del Río Nájera D, *et al.* Oxidative stress relevance in the pathogenesis of the rheumatoid arthritis: A systematic review [J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 6097417.
- [17] Butler S H, Godefroy F, Besson J M, *et al.* A limited arthritic model for chronic pain studies in the rat [J]. *Pain*, 1992, 48(1): 73-81.
- [18] Tran C N, Lundy S K, Fox D A. Synovial biology and T cells in rheumatoid arthritis [J]. *Pathophysiology*, 2005, 12(3): 183-189.
- [19] Ferraccioli G, Bracci-Laudiero L, Alivernini S, *et al.* Interleukin-1 β and interleukin-6 in arthritis animal models: Roles in the early phase of transition from acute to chronic inflammation and relevance for human rheumatoid arthritis [J]. *Mol Med*, 2010, 16(11/12): 552-557.
- [20] Dayer J M, Fenner H. The role of cytokines and their inhibitors in arthritis [J]. *Baillieres Clin Rheumatol*, 1992, 6(2): 485-516.
- [21] Chen T, Wang R N, Jiang W J, *et al.* Protective effect of astragaloside IV against paraquat-induced lung injury in mice by suppressing rho signaling [J]. *Inflammation*, 2016, 39(1): 483-492.
- [22] Li M C, Yu L Z, She T H, *et al.* Astragaloside IV attenuates Toll-like receptor 4 expression via NF- κ B pathway under high glucose condition in mesenchymal stem cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 696(1/2/3): 203-209.
- [23] Liu W, Wu Y H, Zhang L, *et al.* MicroRNA-146a suppresses rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes proliferation and inflammatory responses by

- inhibiting the TLR4/NF- κ B signaling [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(35): 23944-23959.
- [24] 陈颖婷, 何柯新, 王云秀, 等. 雷公藤内酯醇对类风湿关节炎大鼠 TLR4/NF- κ B 信号通路的调控作用研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(17): 2053-2057.
- [25] 李光淳, 李高峰, 张兆琦, 等. 枸杞多糖对类风湿关节炎大鼠炎症反应及 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(5): 1119-1124.
- [26] Jiao P, Ma J, Feng B, *et al.* FFA-induced adipocyte inflammation and insulin resistance: Involvement of ER stress and IKK β pathways [J]. *Obesity*, 2011, 19(3): 483-491.
- [27] Rocha D M, Caldas A P, Oliveira L L, *et al.* Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response [J]. *Atherosclerosis*, 2016, 244: 211-215.
- [28] Frommer K W, Schäffler A, Rehart S, *et al.* Free fatty acids: Potential proinflammatory mediators in rheumatic diseases [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(1): 303-310.
- [29] Kernoff P B, Willis A L, Stone K J, *et al.* Antithrombotic potential of dihomo-gamma-linolenic acid in man [J]. *Br Med J*, 1977, 2(6100): 1441-1444.
- [30] Zurier R B, Rossetti R G, Jacobson E W, *et al.* Gamma-linolenic acid treatment of rheumatoid arthritis. A randomized, placebo-controlled trial [J]. *Arthritis Rheum*, 1996, 39(11): 1808-1817.
- [31] Cameron M, Gagnier J J, Little C V, *et al.* Evidence of effectiveness of herbal medicinal products in the treatment of arthritis. Part 2: Rheumatoid arthritis [J]. *Phytother Res*, 2009, 23(12): 1647-1662.
- [32] Khan H U, Aamir K, Jusuf P R, *et al.* Lauric acid ameliorates lipopolysaccharide (LPS)-induced liver inflammation by mediating TLR4/MyD88 pathway in Sprague Dawley (SD) rats [J]. *Life Sci*, 2021, 265: 118750.
- [33] Saraswathi V, Kumar N, Gopal T, *et al.* Lauric acid versus palmitic acid: Effects on adipose tissue inflammation, insulin resistance, and non-alcoholic fatty liver disease in obesity [J]. *Biology*, 2020, 9(11): 346.
- [34] Miles E A, Calder P C. Influence of marine *n*-3 polyunsaturated fatty acids on immune function and a systematic review of their effects on clinical outcomes in rheumatoid arthritis [J]. *Br J Nutr*, 2012, 107(Suppl 2): S171-S184.
- [35] Matsumoto Y, Sugioka Y, Tada M, *et al.* Monounsaturated fatty acids might be key factors in the Mediterranean diet that suppress rheumatoid arthritis disease activity: The TOMORROW study [J]. *Clin Nutr*, 2018, 37(2): 675-680.
- [36] Li S, Zhang B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: Theory, methodology and application [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(2): 110-120.
- [37] 张彦琼, 李梢. 网络药理学与中医药现代研究的若干进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2015, 29(6): 883-892.
- [38] Wang Z Y, Wang X, Zhang D Y, *et al.* Traditional Chinese medicine network pharmacology: Development in new era under guidance of network pharmacology evaluation method guidance [J]. *China J Chin Mater Med*, 2022, 47(1): 7-17.
- [39] 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.
- [40] Xu Y C, Zhang S, Yuan S N, *et al.* Study of active phytochemicals and mechanisms of cnidii fructus in treating osteoporosis based on HPLC-Q-TOF-MS/MS and network pharmacology [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2024, 27(2): 317-334.
- [41] Wang Z S, Wang R Q, Na Z G, *et al.* Network pharmacology analysis of liquid-cultured *Armillaria ostoyae* mycelial metabolites and their molecular mechanism of action against gastric cancer [J]. *Molecules*, 2024, 29(7): 1668.
- [42] Li N, Yang F, Liu D Y, *et al.* Scoparone inhibits pancreatic cancer through PI3K/Akt signaling pathway [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2021, 13(9): 1164-1183.
- [43] Dai W B, Yang J, Cao H L, *et al.* Clinical evidence-guided anti-rheumatoid arthritis study of shuji tablet in adjuvant-induced arthritis rats and mechanism exploration via network pharmacological approach [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 694507.
- [44] Yang B L, Ge Y, Zhou Y, *et al.* MiR-124a inhibits the proliferation and inflammation in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via targeting PIK3/NF- κ B pathway [J]. *Cell Biochem Funct*, 2019, 37(4): 208-215.
- [45] Yuan F L, Li X, Lu W G, *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) as a therapeutic target in rheumatoid arthritis [J]. *Clin Rheumatol*, 2013, 32(3): 289-292.
- [46] Ersahin T, Tuncbag N, Cetin-Atalay R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway [J]. *Mol Biosyst*, 2015, 11(7): 1946-1954.
- [47] Koundouros N, Poulogiannis G. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer [J]. *Br J Cancer*, 2020, 122(1): 4-22.
- [48] Cordingley D M, Cornish S M. Omega-3 fatty acids for the management of osteoarthritis: A narrative review [J]. *Nutrients*, 2022, 14(16): 3362.
- [49] Navarini L, Afeltra A, Gallo Afflitto G, *et al.* Polyunsaturated fatty acids: Any role in rheumatoid arthritis? [J]. *Lipids Health Dis*, 2017, 16(1): 197.

[责任编辑 罗 曦]