

通过网络药理学探究宽筋藤治疗类风湿性关节炎的 药理机制

王强, 兰明, 骆玺, 蒙涛, 杨光忠, 李竣*

(中南民族大学 药学院, 湖北 武汉 430074)

摘要 宽筋藤(TS)可用于治疗类风湿性关节炎,本研究使用网络药理学的方法,探究了宽筋藤抗类风湿性关节炎可能的药理机制.最终,从宽筋藤的22种有效成分中找到了对应的17个关键靶点,这些靶点主要涉及三个信号通路:花生四烯酸代谢通路、PI3K-Akt信号通路和T细胞受体信号通路.此外,通过构建和分析“成分-靶点-通路网络”,推测宽筋藤通过调节COX-2、LCK、P38和ERK等关键蛋白,维持了细胞因子和花生四烯酸代谢的稳态,改善了病理性的细胞免疫紊乱,从而发挥出对类风湿性关节炎的治疗效果.通过RAW 264.7小鼠巨噬细胞的体外细胞实验和分子对接模拟,发现化合物C12降低了PGE₂52.8%的生物合成,而化合物C10使得LTB₄的生物合成降低了49.5%,推测它们可作为潜在的COX-2和ALOX5抑制剂,与之前网络药理学分析预测所得的结果相符,验证了所得结论的合理性和可靠性.

关键词 类风湿性关节炎;宽筋藤;网络药理学;分子机制

中图分类号 R931.71 文献标志码 A 文章编号 1672-4321(2025)05-0616-13

doi:10.20056/j.cnki.ZNMDZK.20250506

Exploring the pharmacological mechanism of *Tinospora sinensis* on rheumatoid arthritis by a network pharmacology approach

WANG Qiang, LAN Ming, LUO Xi, MENG Tao, YANG Guangzhong, LI Jun*

(School of Pharmaceutical Sciences, South-Central Minzu University, Wuhan 430074, China)

Abstract “Kuan-Jin-Teng”(TS) are used in traditional medicine for the treatment of rheumatoid arthritis. In this study, the possible pharmacological mechanism of anti-rheumatoid arthritis was investigated by using the method of network pharmacology. Finally, 17 key targets corresponding to 22 active components of TS, which mainly involved three signaling pathways: Arachidonic acid metabolism pathway, PI3K-Akt signaling pathway and T cell receptor signaling pathway. In addition, through the construction and analysis of the “composition-target-pathway network”, it is speculated that by regulating key proteins such as COX-2, LCK, P38 and ERK, the TS maintains the homeostasis of cytokine and arachidonic acid metabolism, so as to improve the pathological cellular immune disorders, and thus exert the therapeutic effect on RA. Finally, using RAW 264.7 mouse macrophages to conduct *in vitro* cell experiments and molecular docking simulations, compound C12 was found to reduce the biosynthesis of PGE₂ by 52.8%, while compound C10 reduce the biosynthesis of LTB₄ by 49.5%, suggesting that they could serve as potential COX-2 and ALOX5 inhibitors. The results are consistent with those predicted by the previous network pharmacological analysis, which verifies the rationality and reliability of the conclusions.

Keywords rheumatoid arthritis; *Tinospora sinensis* (Lour.) Merr.; network pharmacology; molecular mechanism

类风湿性关节炎(RA)是一种系统性自身免疫性疾病,该病症会逐渐影响到关节内膜,引起疼痛肿

收稿日期 2023-12-13 *通信作者 李竣,研究方向:小分子药物的设计与合成,E-mail:lijun-pharm@hotmail.com

作者简介 王强(1982-),男,副教授,博士,研究方向:小分子药物的设计与合成,E-mail:wq@mail.scuec.edu.cn

基金项目 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(CZY18037)

胀,最终导致骨侵蚀和关节畸形^[1].治疗类风湿性关节炎的常用药物有抗风湿药物(DMARDs)和非甾体抗炎药(NSAIDs)^[2],这些药物治疗RA虽然取得了一定程度的成功,但其副作用限制了其应用^[3].当前看来,生物制剂对RA的综合疗效最好,但价格却很高昂.因此,开发出低毒性,治疗效果好且价格容易被广大RA患者所接受的药物仍然非常重要.近年来,民族药理学疗法因其作用更温和、不良反应更少而越来越多地被用作RA的替代治疗方法^[4],是延缓RA发展和改善RA患者生活质量的重要策略.

中华青牛胆 *Tinopsis sinensis* (Lour.) Merr. 分布于西藏东南部,其茎部称为“宽筋藤”(TS),常被用于治疗肿痛、瘀伤扭伤和类风湿关节炎^[5].几十年来,在中国,宽筋藤粗提物的免疫调节和抗炎作用已被类风湿性关节炎的实验模型所证实^[5-6],然而,该药物发挥其治疗作用的药理机制仍然尚不明确.

网络药理学整合了多学科内容,从中草药生物活性成分的发现与筛选,到成分对应靶点的鉴定和验证,可构建出完整的靶点蛋白互作网络并将它们与生物进程通路相关联,可提供全面且系统的视角,将使用网络药理学的方法对宽筋藤治疗类风湿性关节炎的作用机制进行全面研究^[7-8].首先对宽筋藤提取物中的活性组分进行了分离鉴定,然后筛选得到这些成分所对应的靶蛋白,最后进行KEGG富集分析,构建出“化合物-靶点-通路网络”并对其进行整合分析.最后,通过细胞实验与分子对接模拟,验证网络分析结果的准确性与可靠性.

1 实验部分

1.1 原料试剂

胎牛血清(FBS)(美国GIBCO);RAW264.7细胞购自ATCC(Rockville, MD, USA);细胞计数试剂盒-8(CCK-8)(上海晶科);脂多糖(LPS,大肠杆菌0111:B4)购自北京Coolaber;花生四烯酸(AA)购自上海TargetMol;小鼠LTB₄酶联免疫吸附测定试剂盒、小鼠PGE₂酶联免疫吸附测定试剂盒和小鼠12-S-HETE酶联免疫吸附测定试剂盒分别购自上海秦城公司、江苏盐城ELISA公司和上海卡朗公司.

1.2 宽筋藤成分提取鉴定

采用硅胶柱层析、Sephadex LH-20柱层析、MCI柱层析、HPLC分离等方法,结合UV、MS、NMR、CD等鉴定方法,对宽筋藤提取物的有效部位进行了分离.

1.3 网络药理学分析

1.3.1 靶点的获取

为了确保TS提取成分的安全性,使用ProTox-II(http://tox.charite.de/protox_II/)预测筛选了所有化合物的毒性,并将这些通过毒性筛选的成分使用PharmMapper Server(<http://lilab-ecust.cn/pharmmapper/>)和BindingDB(<http://www.bindingdb.org/bind/index.jsp>)进行靶点预测和收集,并在UniPort(<http://www.uniprot.org/>)中进行集中分析.从Drugbank(<https://www.drugbank.ca/>)、TTD(<http://db.idrblab.net/ttd/>)、OMIM(<https://omim.org/>)、DisGeNET(<https://www.disgenet.org/>)和GEO(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)数据库中收集RA的相关靶点,并在UniPort中进行集中分析.

1.3.2 “靶点-通路”网络的构建

将得到的药物成分靶点与RA靶点使用DAVID(<http://david.ncifcrf.gov/>)进行KEGG富集分析获取关键通路信息,将药物成分通路与RA通路的交集定义为关键通路.然后利用Cytoscape.3.6.0软件构建出“成分-靶点-通路”网络,并通过软件的网络分析单元计算出Sub indegree_{Pathway}与Outdegree_{compound}等参数,确定关键通路.随后通过KEGG数据库,进行关键通路整合,构建了“靶点-通路”网络.

有效率(E_r)用于预测化合物影响特定功能可能性的评价^[9].(E_r)的计算公式如下:

$$E_r = \frac{\text{Sub indegree}_{\text{Pathway}}}{\text{Outdegree}_{\text{compound}}} \times \frac{\text{Sub indegree}_{\text{Pathway}}}{\text{Count}_{\text{Pathway}}} \times 10^3$$

其中Outdegree_{compound}表示每种化合物所对应的靶点数量,Sub indegree_{Pathway}表示每种化合物所对应的通路数量,Count_{Pathway}表示通路中所包含靶点的总数.

1.4 细胞实验

1.4.1 细胞培养与活力测定

将RAW 264.7小鼠巨噬细胞置入添加了10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素-链霉素的Dulbecco's modified Eagle's培养基(DMEM)中,5% CO₂及37 °C条件下培养.将RAW264.7细胞以5 × 10⁴细胞/孔的密度植入96孔板中,并用不同浓度的样品(0~100 μM)在37 °C, 5% CO₂条件下处理细胞24 h.每孔加入10 μL CCK-8溶液处理细胞2 h,使用酶标仪450 nm处测量吸光度.

1.4.2 PGE₂、LTB₄、12-S-HETE的浓度测定

参考文献^[10-11],EIA试剂盒检测培养基上清中PGE₂、LTB₄与12-S-HETE的浓度.将RAW264.7巨噬细胞置于96孔板中(每孔5 × 10⁴细胞),并用阿司匹林(200 mM)处理2 h使细胞COX-1失活,然后用2

mg/mL 脂多糖(LPS)刺激细胞 24 h. 之后添加终浓度为 50 μM 的化合物,同时添加终浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 的 AA 促进 PGE_2 的生物合成,孵育 2 h,收集上清液,检测 PGE_2 的含量. LTB_4 和 12-S-HETE 的浓度测定流程中不使用阿司匹林进行预处理,其余方法同上.

1.4.3 分子对接

在 PDB 数据库得到蛋白晶体结构,使用分子对接软件 SYBYL-X v1.0 进行分子对接,探究化合物与蛋白质的相互作用.

1.5 统计分析

所有实验独立进行三次,数据以平均值 \pm 标准差

表示,显著性水平设为 $P < 0.05$ 具有统计学意义.

2 实验结果

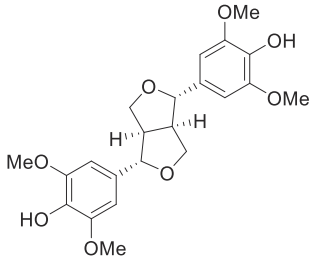
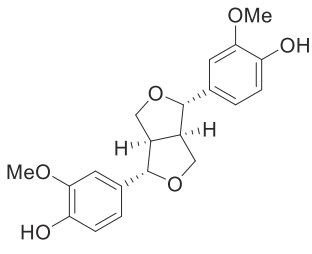
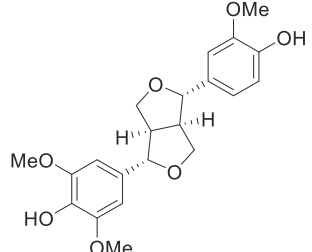
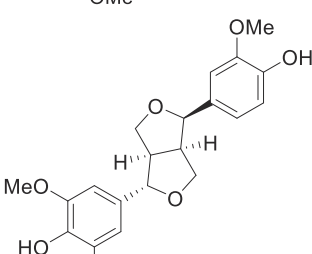
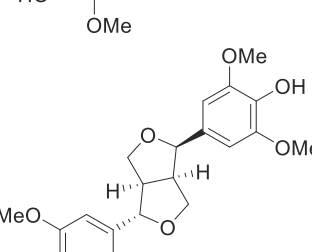
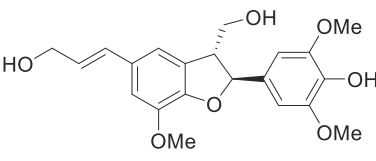
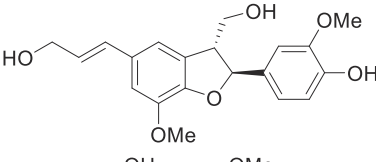
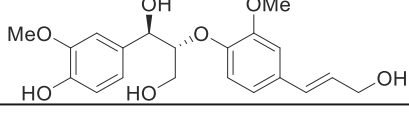
在前期基础中,课题组综合运用分部萃取、正反向硅胶色谱、葡聚糖凝胶色谱、高效液相色谱和 UV、MS、NMR、CD 等多种纯化和鉴定方法完成宽筋藤活性部位化学成分分离鉴定,并从宽筋藤活性部位中提取分离得到 22 个化合物,其中新化合物 5 个,首次从宽筋藤中分离得到的化合物 14 个(表 1).

表 1 宽筋藤的 22 种提取成分

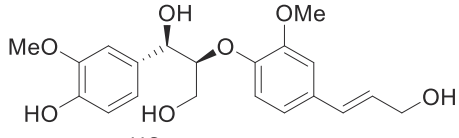
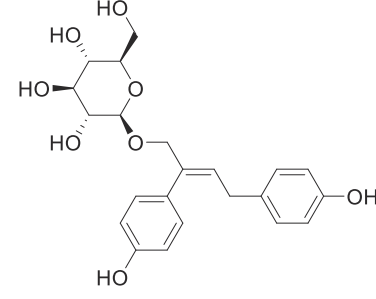
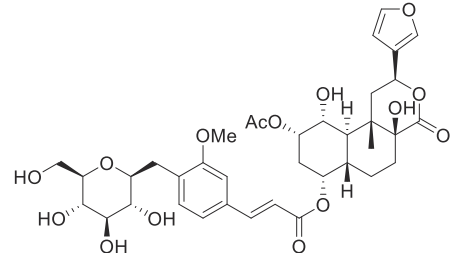
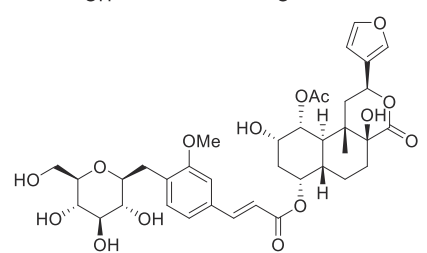
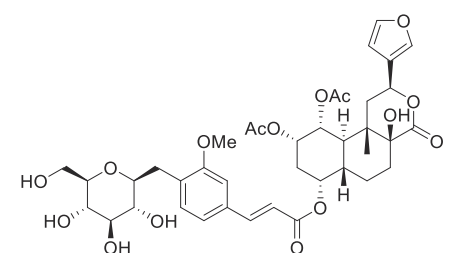
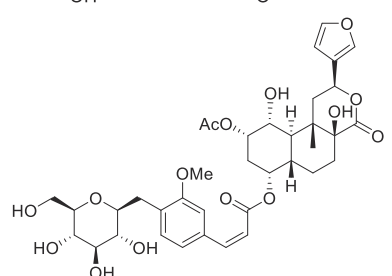
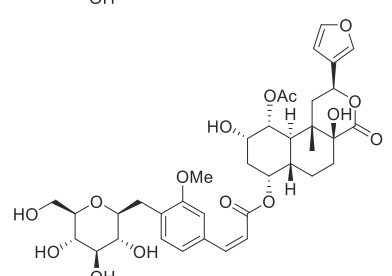
Tab. 1 The structure of 22 compounds from TS

序号	化合物名称	结构	分子式	
C1	tinosinenine A		$\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_8$	首分
C2	(-)-(7'R,8'S,8S)-isolariciresinol		$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_6$	首分
C3	tinosinenine B		$\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_7$	首分
C4	secoisolariciresinol		$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_6$	首分
C5	rel-(2R,3S,4R,5S)-tetrahydro-2,5-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)3,4-furandimethanol		$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_7$	首分
C6	tinosinenine C		$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_7$	新化合物

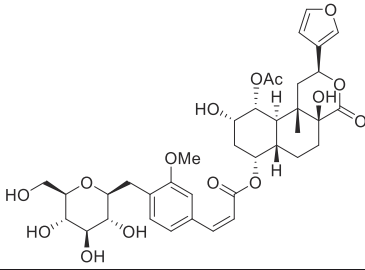
续表

序号	化合物名称	结构	分子式	
C7	syringaresinol		$C_{22}H_{26}O_8$	首分
C8	medioresinol		$C_{20}H_{22}O_6$	首分
C9	pinoresinol		$C_{21}H_{24}O_7$	首分
C10	lirioresinol-A		$C_{20}H_{22}O_6$	首分
C11	epipinoresinol		$C_{22}H_{26}O_8$	首分
C12	(+) -(7 <i>S</i> ,8 <i>R</i>)-simulanol		$C_{21}H_{24}O_7$	首分
C13	(+) -(7 <i>S</i> ,8 <i>R</i>)-dehydrodiconiferyl alcohol		$C_{20}H_{22}O_6$	首分
C14	threo-guaiacylglycerol-β- <i>O</i> -4'-coniferyl ether		$C_{20}H_{24}O_7$	首分

续表

序号	化合物名称	结构	分子式	
C15	erythro-guaiacylglycerol- β -O-4'-coniferyl ether		$C_{20}H_{24}O_7$	首分
C16	tinosinenine D		$C_{22}H_{26}O_8$	新化合物
C17	tinosinenoside D		$C_{36}H_{44}O_{16}$	已知化合物
C18	tinosinenoside F		$C_{36}H_{44}O_{16}$	已知化合物
C19	tinosinenine E		$C_{38}H_{46}O_{17}$	新化合物
C20	tinosinenoside E		$C_{36}H_{44}O_{16}$	已知化合物
C21	tinosinenoside K		$C_{36}H_{44}O_{16}$	新化合物

续表

序号	化合物名称	结构	分子式
C22	tinosinenine F		C ₃₈ H ₄₆ O ₁₇ 新化合物

2.1 网络药理学分析

2.1.1 获取靶点

将得到的单体化合物的 SMILES 格式文件上传到 ProTox-II, 预测化合物的 LD₅₀ 值, 剔除毒性等级 ≤ 2 级 (LD₅₀ ≤ 50 mg/kg) 的化合物, 保留毒性等级 > 2 (LD₅₀ > 50 mg/kg) 的化合物, 作为潜在活性成分. ProTox-II 毒

性预测分析结果显示 (表 2), 所有化合物的 LD₅₀ 值高于 500 mg/kg, 毒性等级高于 4 级, 说明所有 22 个化合物安全无毒, 可以使用. 从 PharmMapper 和 BindingDB 筛选出 22 种药物成分的 437 个预测靶点, 再从 Drugbank、TTD、OMIM、DisGeNET 和 GEO 五个数据库中获得 RA 相关靶点共 808 个.

表 2 药物成分毒性预测结果

Tab. 2 Predictive results of compound toxicity

No.	Compounds	Predicted LD50/ (mg/kg)	Predicted Toxicity Class	Prediction accuracy/%
C1	tinosinenine A	899	4	68.07
C2	(-)-(7'R, 8'S, 8S)-isolariciresinol	5000	5	68.07
C3	tinosinenine B	500	4	69.26
C4	secoisolariciresinol	2000	4	69.26
C5	rel-(2R, 3S, 4R, 5S)-tetrahydro-2, 5-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3, 4-furandimethanol	1500	4	68.07
C6	tinosinenine C	1500	4	69.26
C7	syringaresinol	1500	4	68.07
C8	medioresinol	1500	4	68.07
C9	pinoresin	1500	4	68.07
C10	lirioresinol-A	1500	4	68.07
C11	epipinoresinol	1500	4	68.07
C12	(+)-(7S, 8R)-simulanol	3000	5	67.38
C13	(+)-(7S, 8R)-dehydrodiconiferyl alcohol	3001	5	67.38
C14	threo-guaiacylglycerol-β-O-4'-coniferyl ether	1000	4	68.07
C15	erythro-guaiacylglycerol-β-O-4'-coniferyl ether	1000	4	68.07
C16	tinosinenine D	5000	5	68.07
C17	tinosinenoside D	5000	5	67.38
C18	tinosinenoside F	5000	5	67.38
C19	tinosinenine E	5000	5	67.38
C20	tinosinenoside E	5000	5	67.38
C21	tinosinenoside K	5000	5	67.38
C22	tinosinenine F	5000	5	67.38

使用 GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 相关数据, 分析健康正常人和 RA 病人基因表达数据, 以 RA 病人差异表达基因 (DEGs) 作为潜在治疗靶基因, 选择编号为 GSE55235 和 GSE55475 的数据进行分析. 使用分位数 (quantiles) 算法进行背景校正和矩阵数据标准化处理, 利用 limma 包分析芯片数据的差

异基因, 显著差异表达基因的筛选条件设定为 $P < 0.01$, 差异倍数 $\log_2 FC > 2$, 剔除重复值后共获得 431 个差异表达基因, 筛选结果如图 1 和 2 所示.

GSE55235 共包含 30 个滑膜组织样本, 有 10 个正常人的滑膜组织、10 个骨关节炎病人的滑膜组织和 10 个 RA 病人的滑膜组织样本. 最终获得 219 个上

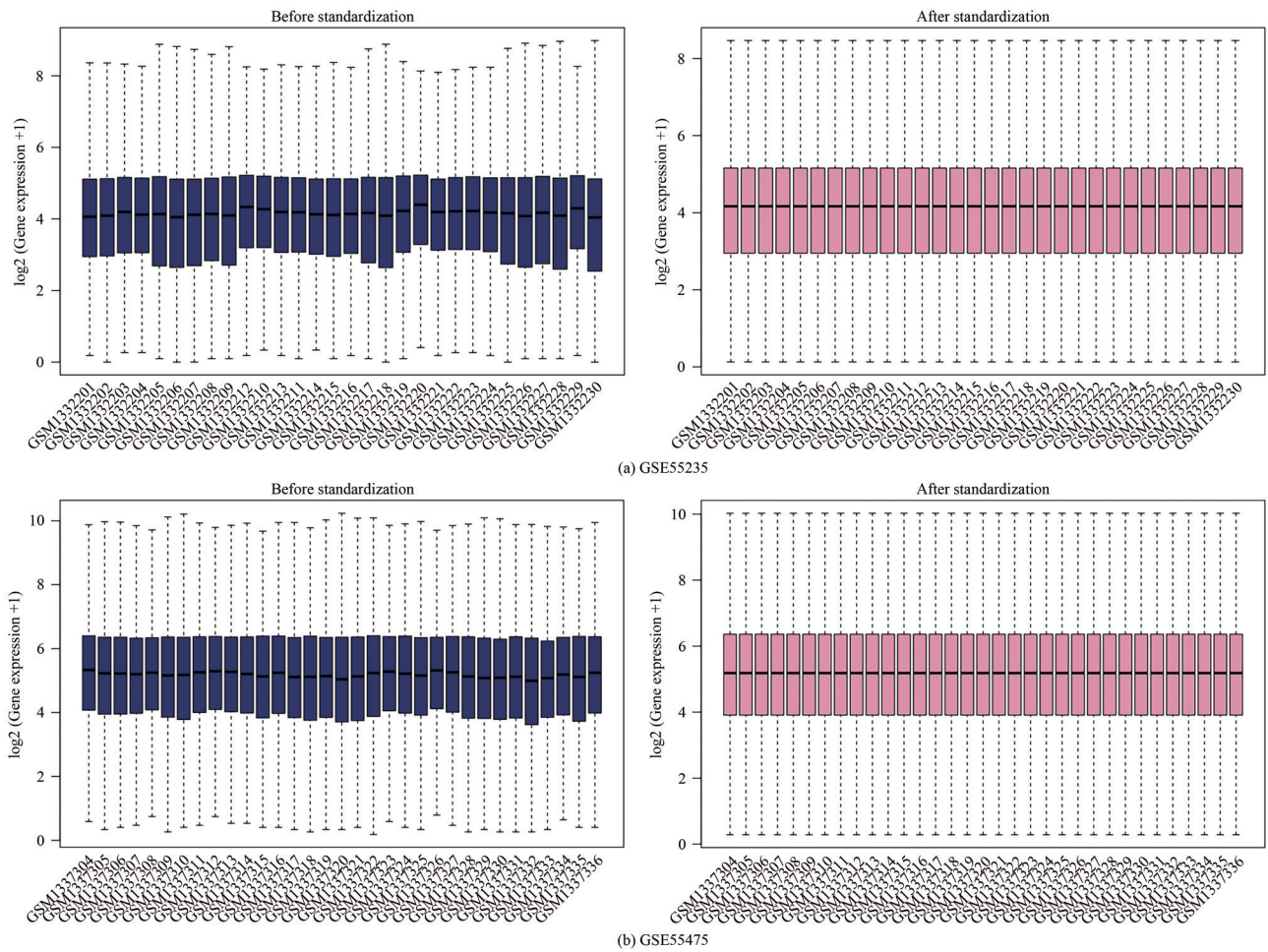
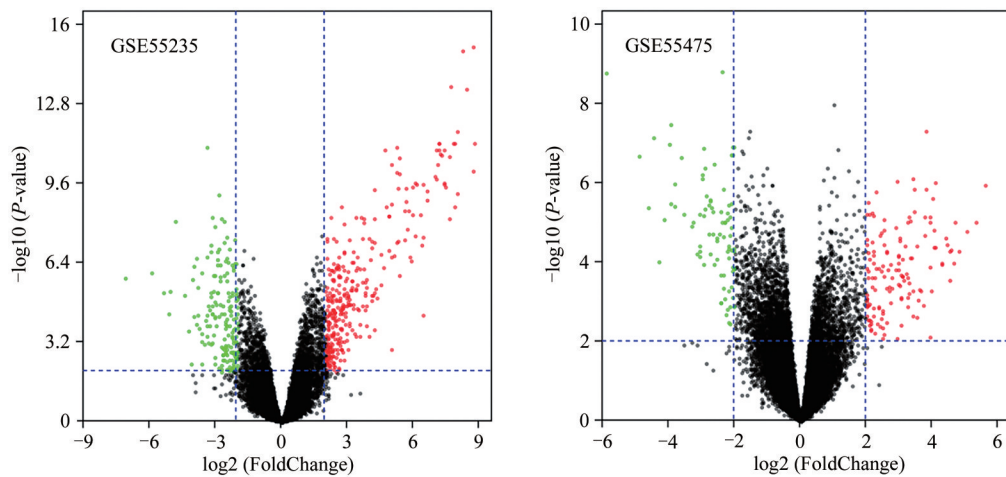


图1 GSE55235 和 GSE55475 差异表达基因箱形图

Fig. 1 GSE55235 and GSE55475 boxplots



GSE55235 与 GSE55475 的差异表达基因分布, 红色为上调基因, 绿色为下调基因.

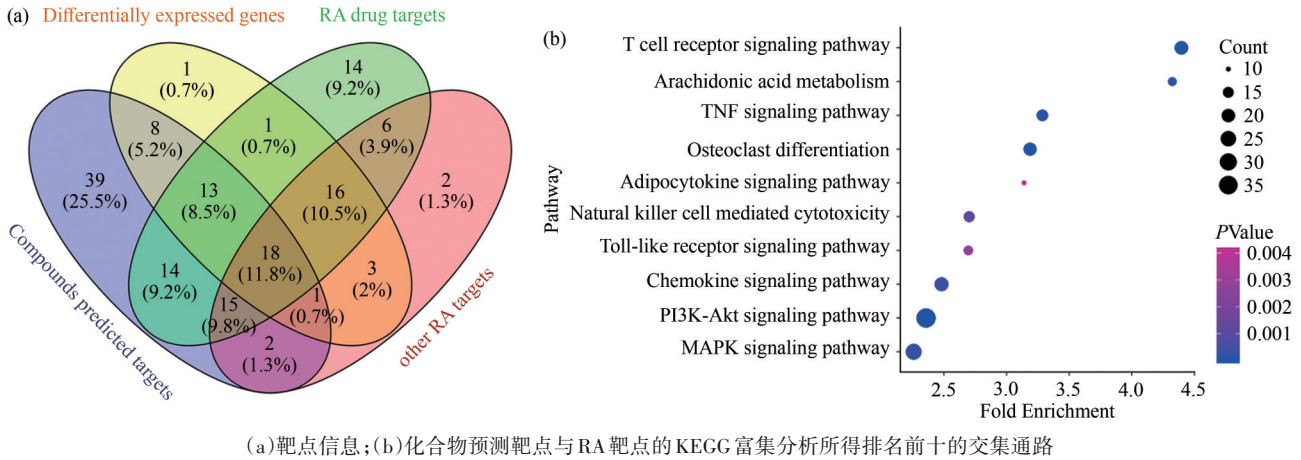
图2 差异表达基因分析

Fig. 2 Analysis of DEGs

调基因, 144 个下调基因. GSE55475 共包含 33 个滑膜组织样本, 其中 10 个正常人的滑膜组织、10 个骨关节炎病人的滑膜组织和 13 个 RA 病人滑膜组织样本. 共得到 154 个上调基因和 163 个下调基因. 蓝色为标准化之前, 粉色为标准化之后.

2.1.2 功能通路富集分析

将成分靶点与 RA 靶点分别输入 DAVID 数据库中, 进行 KEGG 富集分析, 这两者的交集通路即为关键通路, 共计 18 条, 如图 3(a) 所示. 设定 $P < 0.001$ 进行筛选, 结果共得到 10 条交集通路, 如图 3(b) 所示,



(a)靶点信息;(b)化合物预测靶点与RA靶点的KEGG富集分析所得排名前十的交集通路

图3 KEGG富集分析.

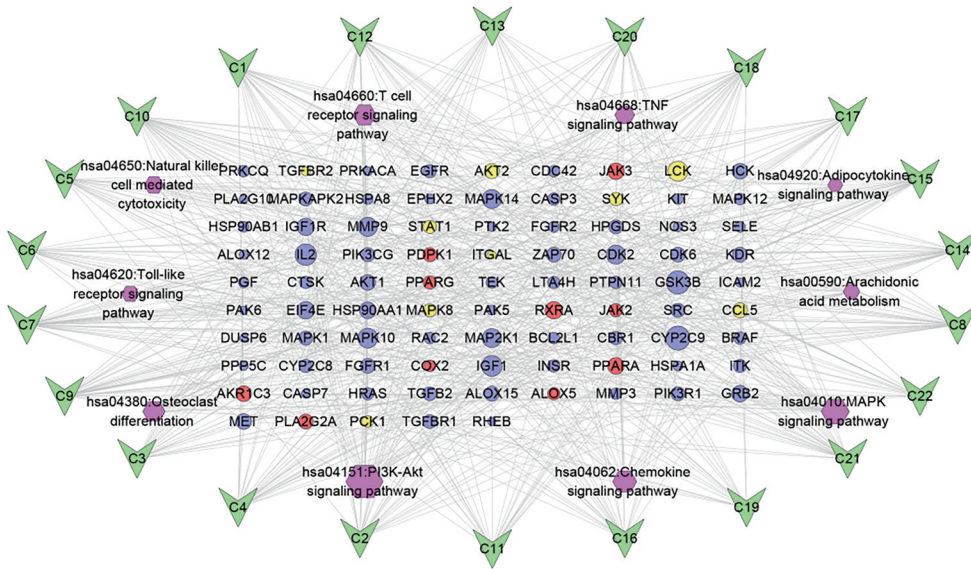
Fig. 3 Pathway enrichment analysis

Cytoscape软件进行网络构建结果显示,这些靶点与T细胞受体信号通路、花生四烯酸代谢和TNF信号通路等具有很强的相关性,表明宽筋藤可能正是通过这些生物途径发挥其治疗作用.

2.1.3 “化合物-靶点-通路”网络的构建与分析

将药物成分靶点定位到所得的10条关键通路当中,共获得86个交集基因,构建“化合物-靶点-通路”

网络(C-T-P network),如图4所示,这些与RA密切相关的交集基因即为药物成分治疗RA的潜在靶点.将交集基因输入Drugbank和GEO数据库当中,其中有9个为RA药物靶点,有12个为差异表达基因(图5),删去重复项共计17个靶点,即为宽筋藤治疗RA的关键靶点,见表3.



绿色v形节点代表药物成分;紫色六边形节点代表通路;圆圈节点代表靶点,红色为药物成分靶点,黄色为DEGs,蓝色为RA靶点.

图4 “化合物-靶点-通路”网络

Fig. 4 C-T-P network

为评估每种成分作用于特定通路的有效性,分别计算了它们的有效率(E), (E)评分较高的前3条通路为关键通路,即PI3K-Akt信号通路、T细胞受体信号通路和花生四烯酸代谢通路,如图5(a)所示.此三条通路共涉及59个交集靶点,超过了总靶点的一半,这意味着此22种药物成分很有可能就是通过这些途径来治疗RA的.在某条通路上,其中(E)评分最高的

前三位成分为影响此通路的关键成分, C18(7.3)、C1(7.0)和C4(6.5)为影响PI3K-Akt信号通路的关键成分, C7(9.6)、C8(5.9)和C12(5.6)为影响花生四烯酸代谢通路的关键成分, C14(8.0)、C16(6.4)和C21(6.4)为影响T细胞受体信号通路的关键成分.

2.1.4 “靶点-通路”网络的构建与通路分析

通过KEGG数据库整合了PI3K-Akt信号通路、T

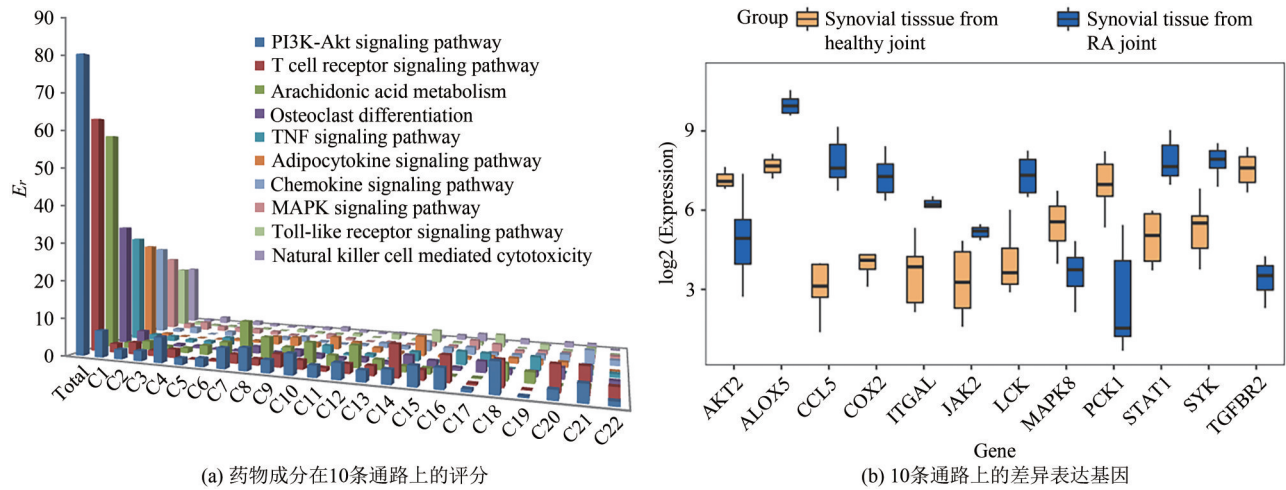


图5 10条通路分析

Fig. 5 The analysis on the 10 pathways

表3 “化合物-靶点-通路”网络关键靶点

Tab. 3 The key targets of the T-C-P network

NO.	Gene	Description	Uniprot
TAR1	AKR1C3	Aldo-keto reductase family 1 member C3	P42330
TAR2	AKT2	RAC-beta serine/threonine-protein kinase	P31751
TAR3	ALOX5	arachidonate 5-lipoxygenase	P09917
TAR4	CCL5	C-C motif chemokine 5	P13501
TAR5	COX2	Prostaglandin G/H synthase 2	P35354
TAR6	ITGAL	Integrin alpha-L	P20701
TAR7	JAK2	Tyrosine-protein kinase JAK2	O60674
TAR8	JAK3	Tyrosine-protein kinase JAK3	P52333
TAR9	LCK	Tyrosine-protein kinase Lck	P06239
TAR10	MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8	P45983
TAR11	PCK1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	P35558
TAR12	PDPK1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1	O15530
TAR13	PLA2G2A	Phospholipase A2, membrane associated	P14555
TAR14	RXRA	Retinoic acid receptor RXR-alpha	P19793
TAR15	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1	P42224
TAR16	SYK	Tyrosine-protein kinase SYK	P43405
TAR17	TGFBR2	TGF-beta receptor type-2	P37173

细胞受体信号通路和花生四烯酸代谢三个主要通路,并将所有相关靶点映射到这些信号通路上,生成“靶点-通路”网络(图6).

在该网络当中,花生四烯酸代谢通路是炎症代谢网络中的核心^[13],当炎症因子侵入细胞,磷脂被磷脂酶 A2 (PLA2)催化,将会激活花生四烯酸代谢炎症级联反应.其中前列腺素(prostaglandins, PGs)和白三烯(leukotrienes, LTs)是花生四烯酸的重要代谢物,是导致RA患者滑膜炎发展以及细胞免疫功能障碍的关键分子^[14];LTB₄介导了粒细胞产生细胞因子和B淋巴细胞的活化与增殖^[15];PGE₂和PGL₂具有较强的血管收缩和促炎活性,且对淋巴细胞的活化与增殖也有抑制作用^[14-16].因此,该代谢网络中的PLA2、COX-2、5-LOX 和白三烯 A4 水解酶(LTA4H)

可作为抗 RA 药物的关键靶点.

T细胞是参与RA发病进程的主要细胞之一.在CD28等激活分子的存在下,主要组织相容性复合体(MHC)分子向T细胞受体(TCR)呈递外源抗原,导致T细胞活化,同时细胞外向细胞内传递信号,产生一系列信号级联反应,促进T细胞产生细胞因子,激活适应性免疫反应^[17].“靶点-通路”网络中的LCK、ZAP70、ITK、P38等多种靶蛋白均可参与调控T细胞受体信号通路的转导^[18-19],如P38可调节细胞因子的产生,是细胞分化和凋亡的关键调控因子^[20].TCR信号异常是RA病理状态的明显特征,在RA患者的滑膜组织中,通过GEO数据分析可观察到一些靶标表达的明显增加,如图5(b),目前已有文献报道,可通过抑制这些异常的TCR信号,来进行RA的治疗^[20].

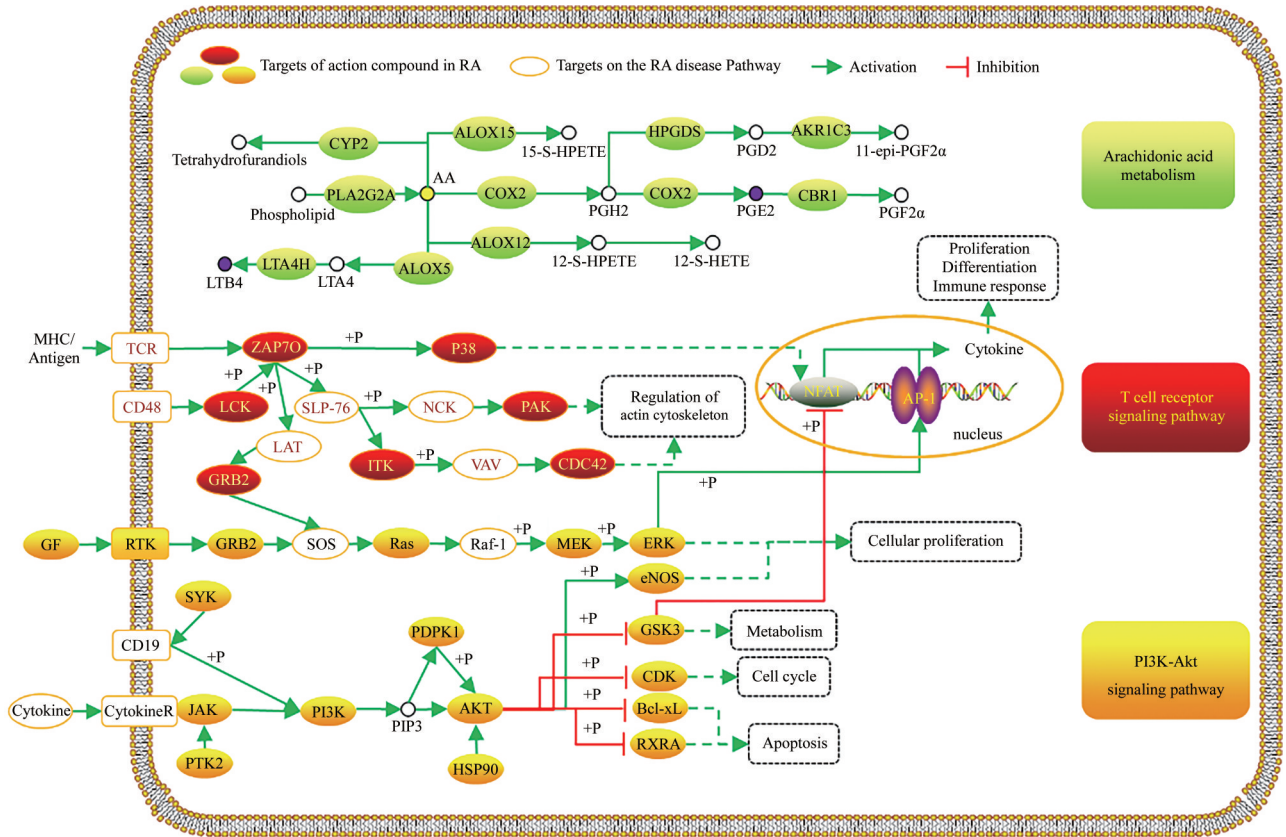


图6 “靶点-通路”网络

Fig. 6 Targets-passways network

在PI3K-Akt信号通路当中共有PI3K与Akt两个中枢调节因子,其中PI3K在白细胞中大量表达,可刺激细胞的生长,增殖与分化^[21],而Akt也具有多种生理调节功能,如调控细胞周期,细胞的存活,增殖与代谢^[22],若通过药物抑制PI3K的表达可观察到免疫反应的明显减弱^[23]. PI3K-Akt信号通路在多种细胞中广泛分布,在RA患者的滑膜细胞中能够观察到该通路的异常激活^[24],可能是因为通路上的关键靶点如SYK、JAK和AKT的异常表达所致(图5(b)),此外该通路可通过“靶点-通路”网络中的Bcl-xL、RXRA、eNOS和GSK3β等多种靶蛋白参与调控细胞的存活^[25-27]. PI3K在免疫系统中发挥的种种作用表明,抑制这一信号通路可能为RA的治疗开辟出新的途径.

2.2 细胞实验

2.2.1 检测药物成分的细胞毒性

为了确定宽筋藤成分的最佳使用浓度范围,使用RAW264.7细胞进行了细胞毒性CCK-8实验,结果表明,当剂量为100 μM时无明显细胞毒性,后续实验中使用不同浓度(6.25、12.5、25、50和100 μM)化合物.

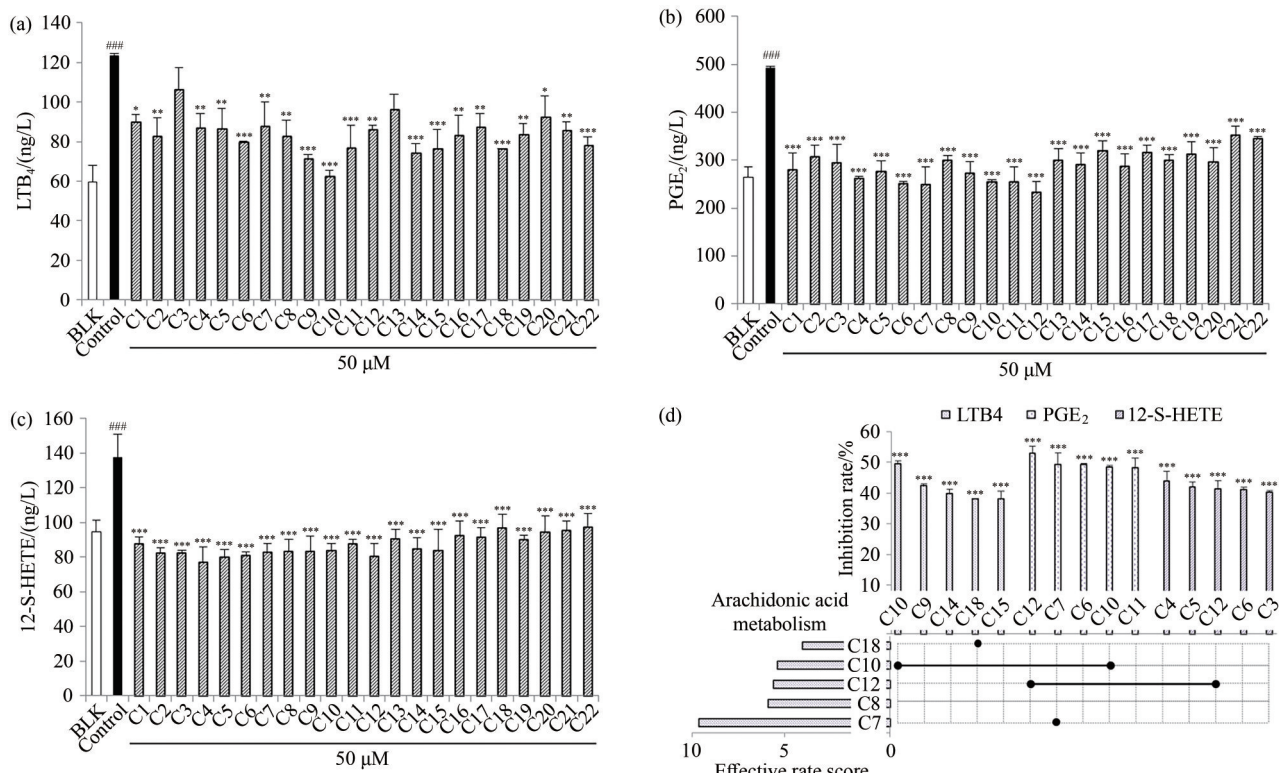
2.2.2 药物成分对炎性因子生成的调控

PGE₂、12-S-HETE与LTB₄为花生四烯酸的代谢

产物,是引发一系列免疫反应的关键炎性因子,通过对RAW264.7细胞中的PGE₂、12-S-HETE和LTB₄的水平进行检测,评估22种药物成分各自的抗炎效果.结果显示:RAW264.7细胞经过2 μg/mL LPS处理后炎性因子水平有了明显增高,而经过化合物处理过的细胞其含量水平则出现了明显降低,其中抗炎效果最明显的化合物为C10、C12和C4(图7).

如图7(d)所示,化合物C10可显著抑制LTB₄与PGE₂的生成,在浓度为50 μM时的最大抑制率分别为(49.5±1.0)% (*P*<0.001)和(48.4±0.5)% (*P*<0.001). 化合物C12在浓度为50 μM时,对PGE₂的最大抑制率为(52.8±2.4)% (*P*<0.001). 化合物C7在浓度为50 μM时,对PGE₂的最大抑制率为(49.3±1.5)% (*P*<0.001). 化合物C4对12-S-HETE的抑制效果最强,在浓度为50 μM时,对12-S-HETE的最大抑制率为(43.9±3.2)% (*P*<0.001).

对“化合物-靶点-通路”网络的分析中,花生四烯酸代谢通路中*E_r*评分最高的前五位化合物为C7、C8、C12、C10和C18,如图7(d),该结论与在细胞实验找到的三个关键成分一致,佐证了所使用的分析方法的准确性与可靠性.



所有数据均以平均值±标准差表示(n=3);与LPS诱导对照组的差异显著性用* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 和*** $P<0.001$ 表示;与空白组(BLK)的差异显著性为### $P<0.001$ 。

(a)细胞中LTB₄的水平;(b)细胞中PGE₂的水平;(c)细胞中12-S-HETE的水平;(d)花生四烯酸代谢通路中抑制炎症因子生成*E_i*评分最高的5种化合物

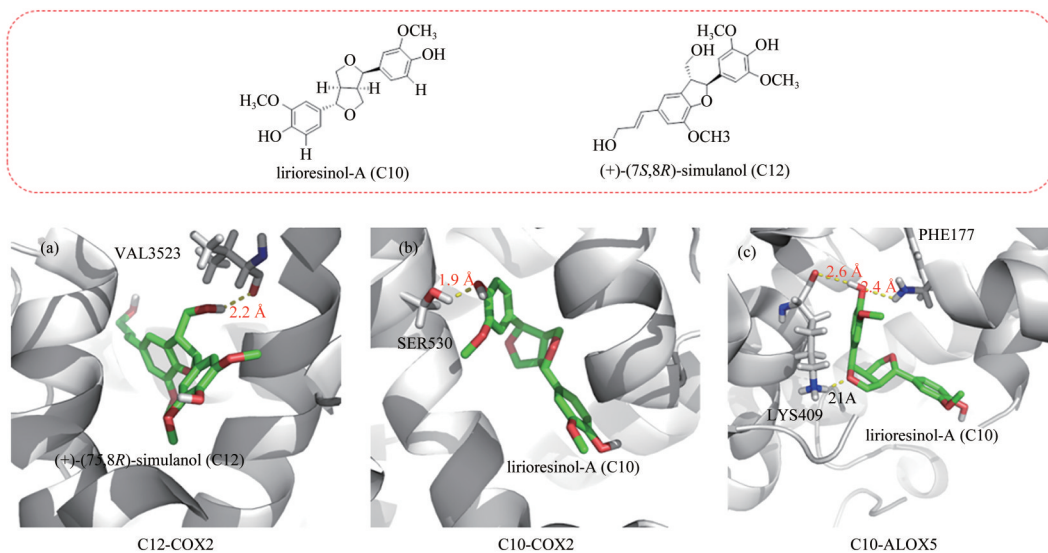
图7 药物成分对RAW264.7细胞的PGE₂、12-S-HETE和LTB₄生成的影响

Fig. 7 Effects of the isolated compounds from TS on PGE₂, 12-S-HETE and LTB₄ generation in macrophages

2.2.3 分子对接

COX-2与ALOX5分别为PGE₂与LTB₄的上游代谢酶,为检验上述“成分-靶点”相互作用的可靠性,选

择了活性较高的C10与C12,与COX-2(PDB ID: 1PXX)和ALOX5(PDB ID: 3V99)进行了分子对接。结果如图8所示,化合物C12与C10可分别与蛋白残



分子以球棒模型表示;黄色虚线表示氢键,距离单位为Å。

(a) C12-COX2复合体;(b) C10-COX2复合体;(c) C10-ALOX5复合体

图8 分子对接获得的药物-靶复合物结合位点内的氢键网络

Fig. 8 Hydrogen-bonding networks within the binding site of the drug-target complexes obtained from molecular docking

基 VAL3523 和 SER530 之间形成氢键,从而与 COX-2 蛋白稳定结合.此外,C10 也能通过与蛋白残基 PHE177 和 LYS409 形成氢键牢牢占据 ALOX5 内的活性口袋,如图 8(c).基于以上细胞实验与对接分析结果,C12 和 C10 很可能作为一种潜在的 COX-2 和 ALOX5 的抑制剂.

3 结论

本研究首次采用网络药理学的方法,从预测与分析的角度初步探究了宽筋藤提取成分抗 RA 潜在的作用机制.通过运用数据库,软件,文献查阅等方法,完成了成分-靶点-通路网络的构建,最终得到关键靶点 17 个,关键通路 3 条.

通过对靶点-通路网络的分析,发现宽筋藤可能从以下 3 个方面发挥抗 RA 的作用:(1)通过体内花生四烯酸代谢途径,维持体内 PGs 和 LTs 等因子的稳态,降低 RA 炎症风险;(2)干预 PI3K-Akt 信号通路,介导滑膜成纤维细胞、B 细胞等 RA 主要细胞凋亡基因的表达,调控细胞凋亡;(3)调控 LCK、ZAP70、ITK 等蛋白,抑制 TCR 诱导的胞内信号传递,减少细胞因子产生.

此外通过 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞的体外细胞实验,发现化合物 C12 在 50 μM 的浓度下大幅度降低了 PGE₂ 的生物合成(52.8 \pm 2.4)%,而化合物 C10 在 50 μM 的浓度下使得 LTB₄ 的生物合成降低了(49.5 \pm 1.0)%,推测它们可作为潜在的 COX-2 和 ALOX5 抑制剂.

本研究初步预测和分析了宽筋藤提取成分抗 RA 可能的作用机制,为宽筋藤成分抗类风湿性关节炎的新药研发提供了科学指导和依据.

参 考 文 献

- [1] SMOLEN J S, ALETAHA D, BARTON A, et al. Rheumatoid arthritis[J]. Nature Reviews Disease Primers, 2018, 4: 18001.
- [2] MAHAJAN T D, MIKULS T R. Recent advances in the treatment of rheumatoid arthritis[J]. Current Opinion in Rheumatology, 2018, 30(3): 231-237.
- [3] BURMESTER G R, POPE J E. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis[J]. The Lancet, 2017, 389(10086): 2338-2348.
- [4] MOUDGIL K D, BERMAN B M. Traditional Chinese medicine: Potential for clinical treatment of rheumatoid arthritis[J]. Expert Review of Clinical Immunology, 2014, 10(7): 819-822.
- [5] XIONG H, DING X, WANG H, et al. Tibetan medicine Kuan-Jin-Teng exerts anti-arthritic effects on collagen-induced arthritis rats via inhibition the production of pro-inflammatory cytokines and down-regulation of MAPK signaling pathway[J]. Phytomedicine, 2019, 57: 271-281.
- [6] HAQUE M A, JANTAN I, ABBAS BUKHARI S N. *Tinospora* species: An overview of their modulating effects on the immune system[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2017, 207: 67-85.
- [7] FOTIS C, ANTORANZ A, HATZIAVRAMIDIS D, et al. Network-based technologies for early drug discovery[J]. Drug Discovery Today, 2018, 23(3): 626-635.
- [8] WANG J H, LI Y, YANG Y F, et al. Systems pharmacology dissection of multiscale mechanisms of action for herbal medicines in treating rheumatoid arthritis[J]. Molecular Pharmaceutics, 2017, 14(9): 3201-3217.
- [9] ZHANG M Y, WU H W, GUO F F, et al. Identification of active components in Yixinshu Capsule with protective effects against myocardial dysfunction on human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by an integrative approach[J]. Molecular BioSystems, 2017, 13(8): 1469-1480.
- [10] HOLZNER S, BRENNER S, ATANASOV A G, et al. Intravasation of SW620 colon cancer cell spheroids through the blood endothelial barrier is inhibited by clinical drugs and flavonoids *in vitro*[J]. Food and Chemical Toxicology, 2018, 111: 114-124.
- [11] LI L, ZENG H W, SHAN L, et al. The different inhibitory effects of Huang-Lian-Jie-Du-Tang on cyclooxygenase 2 and 5-lipoxygenase[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2012, 143(2): 732-739.
- [12] WOETZEL D, HUBER R, KUPFER P, et al. Identification of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients by transcriptome-based rule set generation[J]. Arthritis Research & Therapy, 2014, 16(2): R84.
- [13] LIU Y, CHEN Z, SHANG E C, et al. Controlling arachidonic acid metabolic network: From single- to multi-target inhibitors of key enzymes [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2009, 44(3): 231-241.
- [14] SMITH W L, URADE Y, JAKOBSSON P J. Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis[J]. Chemical Reviews, 2011, 111(10): 5821-5865.
- [15] 许锦虹,罗苗,姜海琴,等. 榭藤对牛 II 型胶原诱导的类风湿性关节炎大鼠的治疗作用研究[J]. 中南民族大学学报(自然科学版),2021,40(1):32-38.
- [16] JAISMY JACOB P, MANJU S L, ETHIRAJ K R, et al.

- Safer anti-inflammatory therapy through dual COX-2/5-LOX inhibitors: A structure-based approach [J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 121: 356-381.
- [17] SMITH-GARVIN J E, KORETZKY G A, JORDAN M S. T cell activation [J]. *Annual Review of Immunology*, 2009, 27: 591-619.
- [18] NIKA K, SOLDANI C, SALEK M, et al. Constitutively active I κ B kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction [J]. *Immunity*, 2010, 32(6): 766-777.
- [19] VAN DER MERWE P A, DUSHEK O. Mechanisms for T cell receptor triggering [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2011, 11(1): 47-55.
- [20] COULTHARD L R, TAYLOR J C, EYRE S, et al. Genetic variants within the MAP kinase signalling network and anti-TNF treatment response in rheumatoid arthritis patients [J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2011, 70(1): 98-103.
- [21] KREMER J M, WESTHOVENS R, LEON M, et al. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig [J]. *New England Journal of Medicine*, 2003, 349(20): 1907-1915.
- [22] XU H, HE Y, YANG X, et al. Anti-malarial agent artesunate inhibits TNF- α -induced production of proinflammatory cytokines via inhibition of NF- κ B and PI3 kinase/Akt signal pathway in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *Rheumatology*, 2007, 46(6): 920-926.
- [23] BANHAM-HALL E. The therapeutic potential for PI3K inhibitors in autoimmune rheumatic diseases [J]. *The Open Rheumatology Journal*, 2012, 6(1): 245-258.
- [24] HARRIS S J, FOSTER J G, WARD S G. PI3K isoforms as drug targets in inflammatory diseases: Lessons from pharmacological and genetic strategies [J]. *Current Opinion in Investigational Drugs (London, England, 2009, 10(11): 1151-1162.*
- [25] SMITH M D, WEEDON H, PAPANGELIS V, et al. Apoptosis in the rheumatoid arthritis synovial membrane: Modulation by disease-modifying anti-rheumatic drug treatment [J]. *Rheumatology*, 2010, 49(5): 862-875.
- [26] SCODELARO BILBAO P, BOLAND R. Extracellular ATP regulates FoxO family of transcription factors and cell cycle progression through PI3K/Akt in MCF-7 cells [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2013, 1830(10): 4456-4469.
- [27] PARK E J, CHUNG H J, PARK H J, et al. Suppression of Src/ERK and GSK-3/ β -catenin signaling by pinosylvic acid inhibits the growth of human colorectal cancer cells [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 55: 424-433.

(责任编辑 & 校对 姚春娜)