

基于网络药理学和分子对接技术探讨鼠曲草治疗类风湿性关节炎的作用机制

储自勇¹,李雨龙¹,夏占峰¹,任敏¹,曾红^{1,2*}

¹塔里木大学生命科学学院,阿拉尔 843300;²右江民族医学院,百色 533000

摘要:采用网络药理学和分子对接技术,对鼠曲草治疗类风湿性关节炎的机制进行研究。通过中国知网、SymMap 和 TCMSp 数据库收集和筛选鼠曲草的活性成分,在 TCMSp 数据库中检索活性成分的靶蛋白;通过 GeneCards 和 DisGeNET 数据库筛选类风湿性关节炎的疾病靶点;利用 Cytoscape 3.7.1 软件绘制“药物-成分-疾病-靶点”网络图;在 STRING 平台构建靶蛋白 PPI 网络,根据拓扑分析所得“度值”绘制前 30 个关键靶蛋白的条形图,利用 R 语言进行 GO 富集分析和 KEGG 通路分析;以临床常用于治疗类风湿性关节炎药物作为阳性对照和鼠曲草活性成分分别与关键靶点进行分子对接。筛选得到鼠曲草活性成分 14 个,涉及类风湿性关节炎的靶点 40 个。GO 富集分析得到 1 249 个条目,KEGG 通路分析显示与 113 条通路有关。分子对接显示鼠曲草中活性成分木犀草素与白细胞介素-6、基质金属蛋白酶-9、肿瘤坏死因子的结合能力最佳,且其结合能远大于阳性对照,推测木犀草素是鼠曲草治疗类风湿性关节炎的关键成分。本研究揭示了鼠曲草多成分、多靶点、多通路发挥治疗类风湿性关节炎的作用,为其治疗类风湿性关节炎的研究奠定基础。

关键词:鼠曲草;类风湿性关节炎;网络药理学;分子对接;作用机制

中图分类号:R275.9

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)Suppl-0120-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.S.018

Mechanism of *Gnaphalium affine* D. Don in treatment of rheumatoid arthritis based on network pharmacology and molecular docking

CHU Zi-yong¹, LI Yu-long¹, XIA Zhan-feng¹, REN Min¹, ZENG Hong^{1,2*}

¹College of Life Sciences, Tarim University, Alaer 843300, China;

²Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China

Abstract: To study the mechanism of *Gnaphalium affine* D. Don in treatment of rheumatoid arthritis based on network pharmacology and molecular docking. Chinese National Knowledge Infrastructure (CNKI), SymMap database, Traditional Chinese Medicine System Pharmacology (TCMSp), were used to search and screen the active ingredients in *G. affine*, and related targets of active ingredients were collected from TCMSp database. The targets of rheumatoid arthritis were collected through GeneCards database and DisGeNET database. Cytoscape 3.7.1 software was used to construct the network diagram of “drug-component-disease-target”. The target protein PPI network was constructed on the STRING platform. Bar graphs of the top 30 key target proteins was drawn based on the “degree value” obtained from topological analysis. The drugs commonly used in the clinical treatment of rheumatoid arthritis were used as positive control and the active ingredients of *G. affine* were used for molecular docking with the key targets. Fourteen active components and 40 targets related to rheumatoid arthritis were obtained. GO enrichment analysis showed 1 249 entries, and KEGG pathway analysis showed that it was related to 113 pathways. Molecular docking showed that luteolin had the best binding ability with interleukin-6, matrix metalloproteinase-9 and tumor necrosis factor, and its binding energy was much higher than that of the positive control, suggesting that luteolin is the key ingredient in the treatment of rheumatoid arthritis. This study revealed the multi-component, multi-target, and multi-pathway effects of

G. affine on the treatment of rheumatoid arthritis, and laid a foundation for the study of its treatment of rheumatoid arthritis.

Key words: *Gnaphalium affine* D. Don; rheumatoid arthritis; network pharmacology; molecular docking; mechanism of action

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性疾病, 它表现为关节肿胀、疼痛、变形, 骨和软骨被不可逆性破坏, 并且渐恶化, 逐渐失去自理能力, 使人们的生活质量大大降低, 如果不及时治疗, 可能会导致残疾, 甚至死亡^[1]。该病发病率、致残率高, 全球发病率为 0.5% ~ 1%, 中国发病率为 0.42%^[2]。目前尚无治疗类风湿性关节炎的特效疗法, 只能通过糖皮质激素、非甾体类抗炎药和新型生物抑制剂等药物来改善病情, 且这些药物存在不同程度的不良反应, 会给患者带来一定的痛苦。

鼠曲草 (*Gnaphalium affine* D. Don) 俗称清明菜、追骨风、佛耳草, 为菊科植物鼠曲草的全草, 其主要产地为云南^[3]。现有的研究表明鼠曲草的主要药理作用为止咳化痰、抑菌、抗炎、抗氧化、抗紫外辐射、抗补体活性、镇痛、保肝等。在网络药理学方面除 Ye 等^[4]在 2019 年预测了鼠曲草的主要活性成分治疗呼吸系统疾病的作用靶点并对其作用机制进行了探讨外, 关于鼠曲草的国内外报道尚不多见。值得注意的是鼠曲草具有较好的抗补体活性, 补体的激活是诱发类风湿性关节炎的原因之一, 2012 年 Xi 等^[5]从鼠曲草中分离到 24 种黄酮类化合物, 并对其体外抗补体活性评估, 多种化合物具有较好的抗补体活性, 其中 luteolin-4'-*O*- β -D-(6''-*E*-caffeoyl)-glucopyranoside 的抗补体效果最佳。目前对于鼠曲草治疗类风湿性关节炎的作用机制研究尚不多见。因此, 本研究采用网络药理学和分子对接技术, 对鼠曲草治疗类风湿性关节炎的机制进行研究, 为鼠曲草治疗类风湿性关节炎的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 鼠曲草活性成分的收集与筛选

通过中国知网 (CNKI)、SymMap (<https://www.symmap.org/>) 数据库和 TCMSp 数据库 (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 收集鼠曲草的化学成分, 合并所有数据, 采用 Excel 2019 删除重复的化合物, 采用 TCMSp 数据库 (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 以口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 为条件, 筛选鼠曲草的活性成分。

1.2 鼠曲草活性成分的靶点预测

将鼠曲草活性成分输入 TCMSp ([\[msp-e.com/tcmsp.php\]\(https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php\)\) 数据库进行活性成分的靶点预测。将预测得到的靶点信息输入 UniProt \(<https://www.uniprot.org/>\) 数据库进行标准化, 选择物种为“Homo sapiens”, 获取人源靶点的基因名。](https://old.tc-</p></div><div data-bbox=)

1.3 类风湿性关节炎的疾病靶点预测

在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 和 DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>) 数据库以“rheumatoid arthritis”关键词进行搜索, 合并两个数据库的数据, 采用 Excel 2019 删除重复靶点, 把靶点名称输入 UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 数据库进行标准化, 选择物种为“Homo sapiens”, 获得相应的人源靶点基因名。

1.4 关键靶点筛选和蛋白互作网络构建

采用 Cytoscape 3.7.1 软件绘制“药物-成分-疾病-靶点”网络图。利用在线工具 Venn 2.1.0 (<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 绘制鼠曲草和类风湿性关节炎靶点的韦恩图, 交集的部分可能为鼠曲草治疗类风湿性关节炎的关键靶点, 将关键的靶点导入 STRING11.0 平台 (<https://string-db.org/>), 选择物种为“Homo sapiens”以构建靶蛋白相互作用网络, 最低相互作用阈值设置为 0.400。根据拓扑分析所得“度值”利用 RStudio 软件中 barplot 软件包绘制出前 30 个关键靶蛋白的条形图。

1.5 GO 和 KEGG 通路富集分析

利用 RStudio 软件中 Stringr 和 clusterProfiler 软件包对获得的基因进行 GO 富集分析, 选择前十个结果, 利用 RStudio 软件中 ggplot2 软件包进行绘图展示。利用 RStudio 软件中 org.Hs.eg.db 和 clusterProfiler 软件包对获得的基因进行 KEGG 通路分析, 选择 *P*-value 排名前二十的结果, 利用 RStudio 软件中 ggplot2 软件包进行绘图展示。

1.6 分子对接验证

为证明鼠曲草活性成分对治疗类风湿性关节炎具有良好效果, 挑选了临床上常用的甾体类药物氢化可的松、非甾体类药物美洛昔康和其他类的甲氨蝶呤三种药物作为阳性对照与筛选得到的鼠曲草活性成分分别和对应靶点进行分子对接。采用 Excel 2019 以“度值”为主要关键词, “closeness centrality”为次要关键词对活性靶点进行筛选, 选择排名前三

的核心靶蛋白进行分子对接。首先,从 PubChem Compound (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>) 数据库下载活性成分的三维结构,并以 sdf 格式保存,使用 ChemBioDraw 3D 软件将 sdf 格式转为 pdb 格式,使用 AutoDock Tools 进行加氢和加电荷等修饰,保存为 pdbqt 格式作为配体文件。从 RCSB 蛋白质数据库 (PDB, <http://www.rcsb.org/>) 下载分辨率最高的关键靶点的晶体结构,用 PyMOL 软件删除配体,并用 AutoDock Tools 进行除水、加氢和加电荷等修饰,保存为 pdbqt 格式作为受体文件。设置对接相关参数,利用 AutoDock 4.2 软件进行分子对接。

2 结果

2.1 鼠曲草活性成分的收集与筛选结果

通过中国知网 (CNKI)、TCMSP 和 SymMap 收集鼠曲草所有化学成分,选取口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (DL) ≥ 0.18 为条件筛选活性成分,筛选出鼠曲草的活性成分 14 个,详细信息见表 1。

表 1 鼠曲草活性成分

Table 1 Active compounds in *G. affine*

分子编号 Molecule ID	分子名称 Molecule name	口服生物利用度 OB (%)	类药性 DL
MOL013110	异贝壳杉烯酸 Kaurenoic acid	59.52	0.34
MOL013111	SBB005938	49.48	0.21
MOL013112	4-胆固醇-3-酮 4-Cholesten-3-one	37.18	0.68
MOL002372	(6Z,10E,14E,18E)-2,6,10,15,19,23-六甲基四糖-2,6,10,14,18,22-乙烯 (6Z,10E,14E,18E)-2,6,10,15,19,23-Hexamethyltetracos-2,6,10,14,18,22-hexaene	33.55	0.42
MOL000358	β -谷甾醇 β -Sitosterol	36.91	0.75
MOL000359	谷甾醇 Sitosterol	36.91	0.75
MOL000422	山柰酚 Kaempferol	41.88	0.24
MOL000449	豆甾醇 Stigmasterol	43.83	0.76
MOL000006	木犀草素 Luteolin	36.16	0.25
MOL000098	槲皮素 Quercetin	46.43	0.28
MOL000354	异鼠李素 Isorhamnetin	49.6	0.31
MOL008043	茵陈色原酮 Capillarisin	57.56	0.31
MOL000173	汉黄芩素 Wogonin	30.68	0.23
MOL001689	金合欢素 Acacetin	34.97	0.24

2.3 关键靶点筛选和蛋白互作网络构建结果

利用在线工具 Venn 2.1 绘制鼠曲草和类风湿性关节炎靶点韦恩图,共得到 40 个交集关键靶点,如图 2 所示。将关键靶点导入 STRING11.0 平台 (<https://string-db.org/>),选择物种为“Homo sapi-

2.2 鼠曲草活性成分的靶点和类风湿性关节炎的疾病靶点预测结果

将收集并筛选得到的鼠曲草活性成分编号输入 TCMSP 数据库预测得到 181 个靶基因,但(6Z,10E,14E,18E)-2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracos-2,6,10,14,18,22-hexaene 未找到对应靶基因。通过 GeneCards 按照 Relevance score ≥ 20 进行筛选,DisGeNET 按照 Score_gda ≥ 2.0 进行筛选,合并两数据库结果,采用 Excel 2019 删除重复基因,共得到 353 个疾病靶点基因,IL-6、HLA-DRB1、IL-10、PTPN-22、TNF 等。利用 Cytoscape 3.7.1 软件绘制“药物-成分-疾病-靶点”网络图,如图 1 所示。在网络图中,共包含 145 个节点,其中化合物节点 13 个,相互作用的边 283 条,靶点与成分的平均度值为 3.876,“药物-成分-疾病-靶点”网络图显示木犀草素、山柰酚、槲皮素、异鼠李素、汉黄芩素、金合欢素等活性成分的“度值”较高,推测其是鼠曲草治疗类风湿性关节炎的有效成分。

ens”以构建靶蛋白相互作用网络,如图 3 所示,包含 40 个靶蛋白的互作用网络,平均度值为 27.85。根据靶点蛋白的“度值”大小利用 RStudio 软件中 barplot 软件包绘制出前 30 个关键靶蛋白的条形图,如图 4 所示。

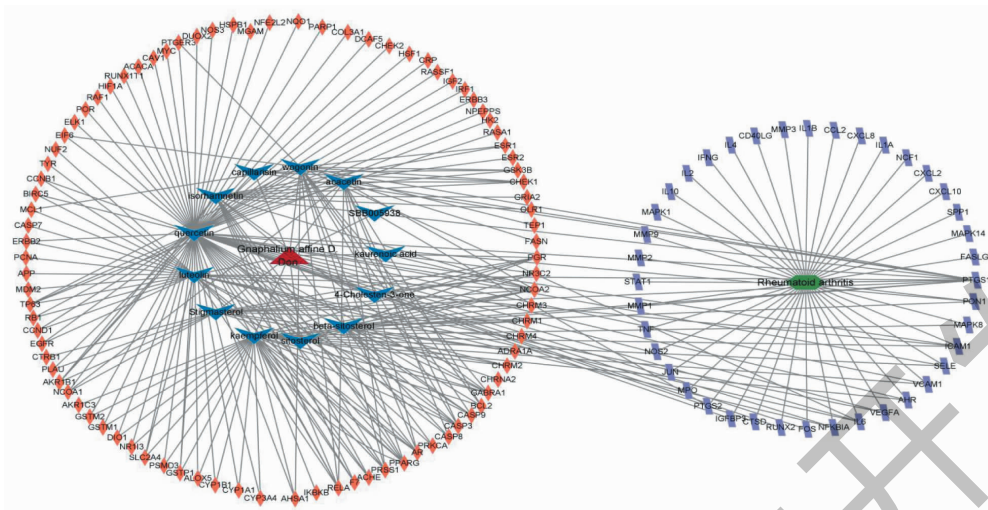


图1 “药物-成分-疾病-靶点”网络图

Fig. 1 The network diagram of " drug-component-disease-target "

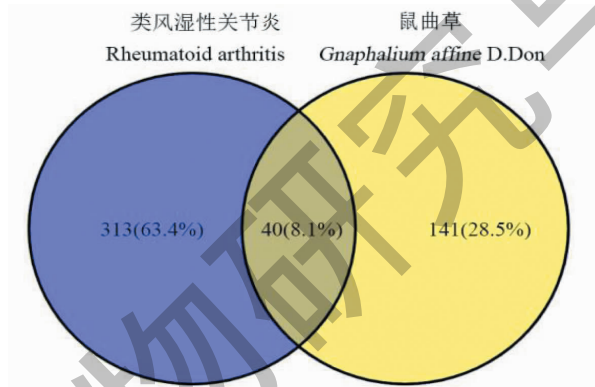


图2 鼠曲草和类风湿性关节炎靶点韦恩图

Fig. 3 Venn diagram of targets of *G. affine* and rheumatoid arthritis

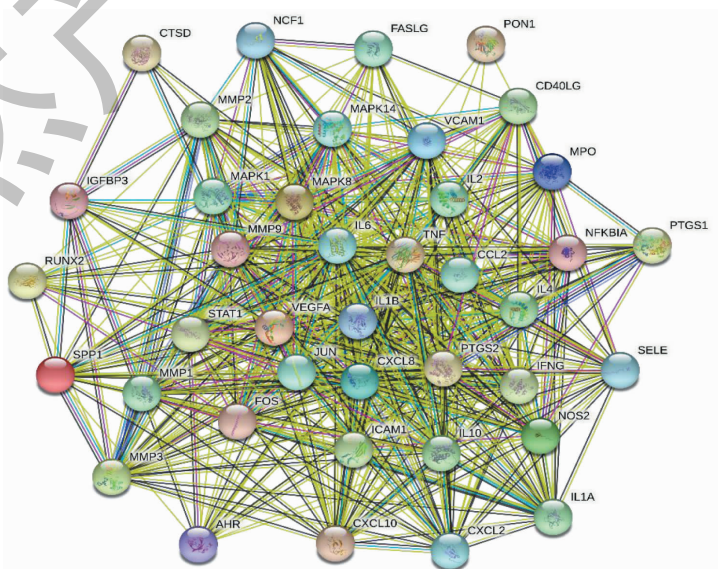


图3 靶蛋白相互作用网络

Fig. 3 Target protein interaction network

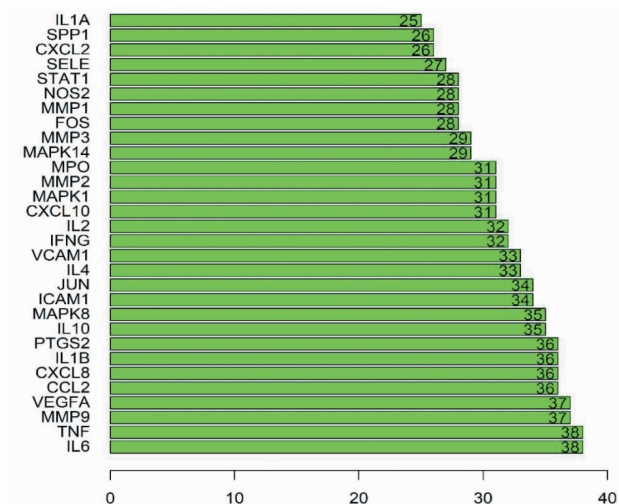


图4 鼠曲草治疗类风湿性关节炎关键靶点蛋白的条形图

Fig. 4 Bar diagram of key target proteins in the treatment of rheumatoid arthritis by *G. affine*

2.4 GO 富集分析结果

GO 富集分析结果中与生物学过程相关的条目有 1 190 个,占 95.28%,主要包括脂多糖的响应、细菌起源的分子响应、细胞对脂多糖的响应、细胞对细菌起源的分子响应、细胞对生物刺激的响应等。与细胞组成相关的条目有 14 个,占 1.12%,主要包括膜筏、膜微结构域、膜区域、膜小凹等。与分子功能相关的条目有 45 个,占 3.60%,主要包括细胞因子活性、细胞因子受体结合、受体配体活性、生长因子受体结合、信号受体激活因子活性等。选择 GO 富集分析前十个结果,利用 RStudio 软件中 ggplot2 软件包进行绘图展示,如图 5 所示。GO 富集分析结果表明鼠曲草通过调控多个生物学过程和分子功能

来治疗类风湿性关节炎。

2.5 KEGG 通路分析结果

KEGG 通路分析显示与 113 条通路有关,其中涉及白细胞介素-17 信号通路(IL-17 signaling pathway)、肿瘤坏死因子信号通路(TNF signaling pathway)、AGE-RAGE 信号通路(AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、利什曼病信号通路(Leishmaniasis)、恰加斯病信号通路(Chagas disease)、流体剪切应力和动脉粥样硬化信号通路(fluid shear stress and atherosclerosis)、类风湿性关节炎信号通路(rheumatoid arthritis)等,如图 6 所示。KEGG 通路分析结果说明鼠曲草通过作用于多条通路来治疗类风湿性关节炎。

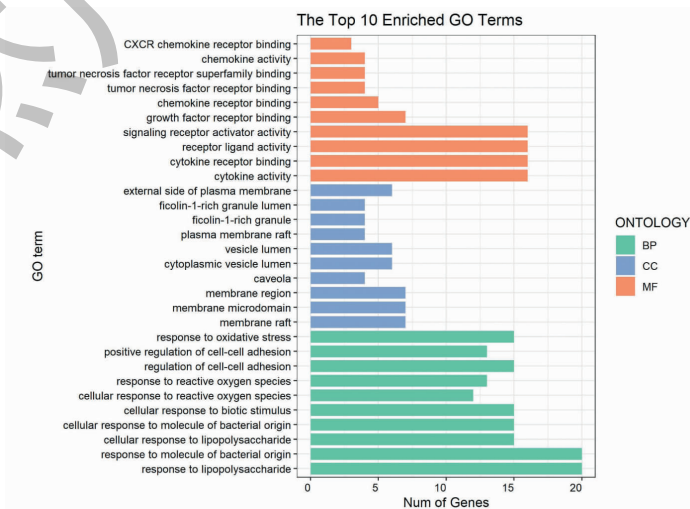


图5 GO 富集分析

Fig. 5 GO enrichment analysis

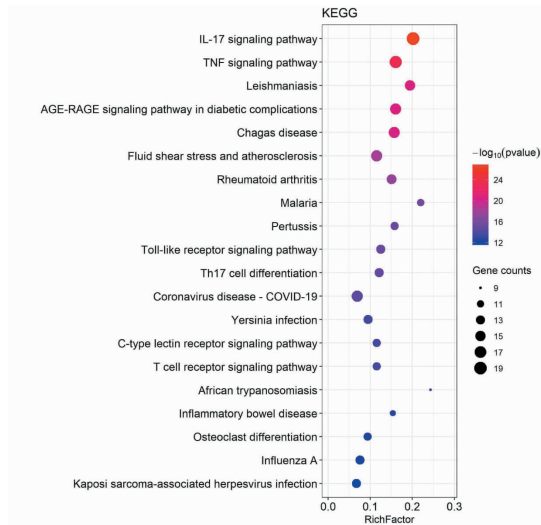


图6 KEGG 通路分析

Fig. 6 KEGG pathway analysis

2.6 分子对接验证结果

采用 Excel 2019 以“度值”为主要关键词,“Closeness Centrality”为次要关键词对活性靶点进行筛选,选择排名前三的核心靶蛋白进行分子对接,对接结果见表 2、表 3、图 7。分子对接显示木犀草素与白细胞介素-6、基质金属蛋白酶-9、肿瘤坏死因子的结合效果最佳,结合能分别为-5.67、-7.24、-7.75 kJ/mol,木犀草素主要分别结合白细胞介素-6 的 GLN-175、ASP-34、SER-176、ARG-182 氨基酸残基,如图 7A 所示,结合基质金属蛋白酶-9 的 LEU-188、ALA-189、ALA-191、ASP-235、HIS-236 氨基酸残基,如图 7C 所示,结合肿瘤坏死因子的 TYR-151、LYS-11、ALA-156、LEU-157、TYR-119 氨基酸残基,如图 7E 所示。在三种阳性对照的药物中甲氨蝶呤与白细胞介素-6、基质金属蛋白酶-9、肿瘤坏死因子的结合效果最差,结合能分别为-2.54、-2.39、-4.15 kJ/mol,其中甲氨蝶呤主要分别结合白细胞介素-6 的 ASN-61、LYS-150 氨基酸残基,如图 7B 所示,结合基质金属蛋白酶-9 的 GLN-199、GLY-112 氨基酸

残基,如图 7D 所示,结合肿瘤坏死因子的 SER-99、GLN-102、ARG-103 氨基酸残基,如图 7F 所示。此外,木犀草素、槲皮素和汉黄芩素与白细胞介素-6 的结合能远大于阳性对照甲氨蝶呤和氢化可的松与白细胞介素-6 的结合能;木犀草素与基质金属蛋白酶-9 的结合能远大于阳性对照美洛昔康、甲氨蝶呤和氢化可的松与基质金属蛋白酶-9 的结合能,槲皮素与基质金属蛋白酶-9 的结合能远大于阳性对照甲氨蝶呤与基质金属蛋白酶-9 的结合能,茵陈色原酮与基质金属蛋白酶-9 的结合能远大于阳性对照甲氨蝶呤和氢化可的松与基质金属蛋白酶-9 的结合能;山奈酚、木犀草素、槲皮素与肿瘤坏死因子的结合能远大于阳性对照美洛昔康、甲氨蝶呤和氢化可的松与肿瘤坏死因子的结合能,汉黄芩素与肿瘤坏死因子的结合能远大于阳性对照甲氨蝶呤与肿瘤坏死因子的结合能。综上所述,对接结果表明鼠曲草中的主要活性成分与疾病靶蛋白具有较强的结合能力,与阳性对照相比疗效更佳。

表 2 靶点蛋白与活性化合物的分子对接结果

Table 2 Molecular docking results of target protein and active compounds

分子编号 Molecular ID	配体 Ligand	受体 Receptor	结合能 Binding energy (kJ/mol)
MOL000422	山奈酚 Kaempferol	TNF	-7.50
MOL000006	木犀草素 Luteolin	TNF	-7.75
MOL000098	槲皮素 Quercetin	TNF	-7.45

续表 2(Continued Tab. 2)

分子编号 Molecular ID	配体 Ligand	受体 Receptor	结合能 Binding energy(kJ/mol)
MOL000173	汉黄芩素 Wogonin	TNF	-6.91
MOL000006	木犀草素 Luteolin	IL-6	-5.67
MOL000098	槲皮素 Quercetin	IL-6	-5.18
MOL000173	汉黄芩素 Wogonin	IL-6	-4.93
MOL000006	木犀草素 Luteolin	MMP-9	-7.24
MOL000098	槲皮素 Quercetin	MMP-9	-5.55
MOL008043	茵陈色原酮 Capillarisin	MMP-9	-6.17

表 3 靶点蛋白与阳性对照药物的分子对接结果

Table 3 Molecular docking results of target protein and positive control drugs

阳性对照药物 Positive control	受体 Receptor	结合能 Binding energy(kJ/mol)
美洛昔康 Meloxicam	TNF	-6.95
甲氨蝶呤 Methotrexate	TNF	-4.15
氢化可的松 Hydrocortisone	TNF	-7.05
美洛昔康 Meloxicam	IL-6	-6.09
甲氨蝶呤 Methotrexate	IL-6	-2.54
氢化可的松 Hydrocortisone	IL-6	-4.69
美洛昔康 Meloxicam	MMP-9	-6.24
甲氨蝶呤 Methotrexate	MMP-9	-2.39
氢化可的松 Hydrocortisone	MMP-9	-5.97

3 讨论与结论

类风湿性关节炎是一种全身性慢性自身免疫性疾病,它的发病机制至今尚不清楚,与遗传因素、微生物感染、肠道菌群、环境因素以及后天免疫系统等都有一定的关系^[6]。研究表明类风湿性关节炎的发病机制与免疫系统密切相关,主要受滑膜巨噬细胞、滑膜 B 细胞、中性粒细胞、T 细胞等免疫细胞和白细胞介素-1、白细胞介素-6、白细胞介素-8、白细胞介素-17、肿瘤坏死因子- α 、基质金属蛋白酶等细胞因子的相互作用而诱发疾病的产生^[7]。类风湿性关节炎的发病机制十分复杂,若采用西药治疗作用的靶点单一,只能起到缓解作用,而且具有一定的不良反应,所以需要多靶点联合治疗。鼠曲草是菊科草本植物,现代药理学研究表明鼠曲草具有抗炎、镇痛、降血脂、降血糖、降血压、抗衰老、消炎抑菌、增强免疫力等多种功效^[8],鼠曲草中的酚类化合物可以有效地抑制 α -淀粉酶的活性,清除自由基和抗氧化^[9];鼠曲草中的总黄酮可抑制腹腔注射醋酸后小

鼠血清中炎症因子如 TNF- α 、IL-6、NO 的产生,也可抑制腹腔巨噬细胞 TNF- α 、IL-6、iNOS 基因表达,表明鼠曲草总黄酮的镇痛作用来自抑制巨噬细胞参与的机体炎症反应^[10]。目前鼠曲草用于治疗人类类风湿性关节炎的临床报道并不多见,但其中所含的木犀草素、山奈酚和槲皮素等都具有一定的抗炎镇痛和增强免疫的作用,但关于治疗类风湿性关节炎的作用报道较少,作用机制尚不明确,本文采用网络药理学和分子对接技术对其机制进行初步探究为鼠曲草治疗类风湿性关节炎的临床作用机制研究奠定基础。

按照“1.1”的方法筛选得到的鼠曲草活性成分木犀草素、山奈酚、槲皮素等在“药物-成分-疾病-靶点”网络图显示“度值”都比较高,推测其是鼠曲草治疗类风湿性关节炎的有效成分。现有的研究表明木犀草素具有抗炎作用,可以通过下调 TLR/MyD88/NF- κ B 通路减轻炎症反应^[11];可以抑制 IL-1 β 、IL-6、IL-17、TNF- α 等多种炎症因子的表达而减

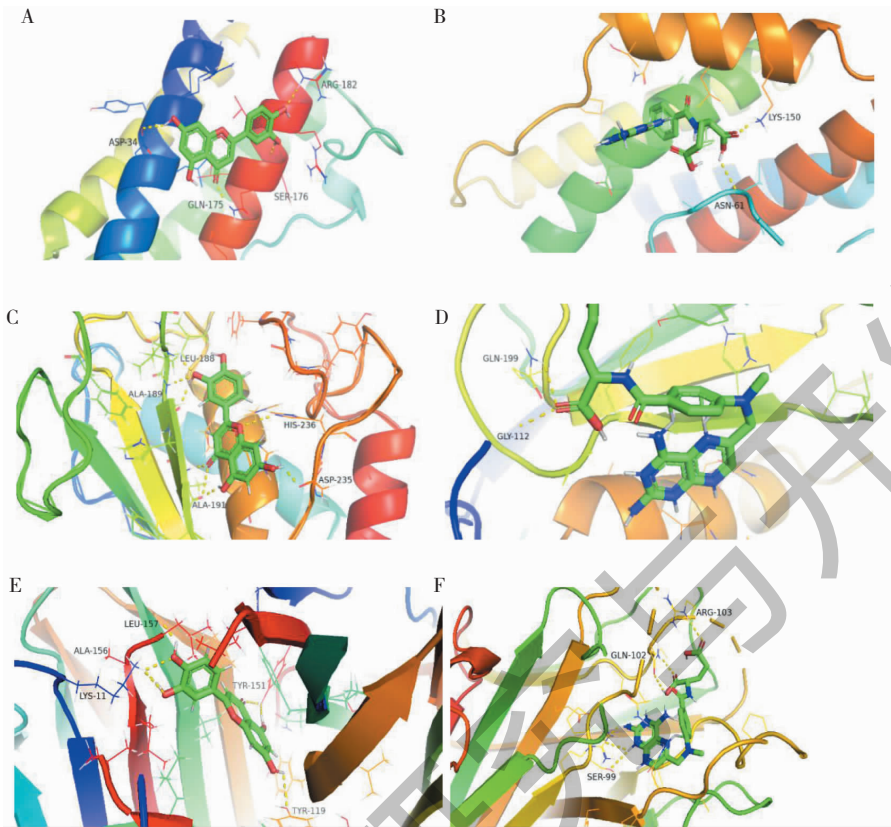


图7 分子对接结果示意图

Fig. 7 Schematic diagram of molecular docking results

注:A:木犀草素和白细胞介素-6;B:甲氨蝶呤和白细胞介素-6;C:木犀草素和基质金属蛋白酶-9;D:甲氨蝶呤和基质金属蛋白酶-9;E:木犀草素和肿瘤坏死因子;F:甲氨蝶呤和肿瘤坏死因子。Note:A:Luteolin and IL-6;B:Methotrexate and IL-6;C:Luteolin and MMP-9;

D:Methotrexate and MMP-9;E:Luteolin and TNF;F:Methotrexate and TNF.

轻炎症反应^[12];NLRP3 炎症小体是一种含有多蛋白复合物的半胱氨酸蛋白酶-1,控制 IL-1 β 的释放,在先天免疫应答中起重要作用,木犀草素可以阻断 ASC 寡聚化抑制 NLRP3 炎症小体活化且可显著降低 NLRP3 炎症小体的表达量^[13]。槲皮素可有效地减轻类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞炎症因子及基质金属蛋白酶的表达,其机制可能和抑制 NF- κ B 的表达相关^[14];可以提高 Treg 细胞分化、降低 Th17 细胞分化从而恢复 Th17 /Treg 平衡以及提高 HO-1 的表达水平和活性,从而改善炎症反应^[15];此外,槲皮素可通过阻断 MAPK 和 NF- κ B 信号通路的活化,保护 ARPE-19 细胞免受 IL-1 β 刺激的 ICAM-1、sICAM-1、IL-6、IL-8 和 MCP-1 产生增加,从而改善炎症反应^[16]。此外,山奈酚、汉黄芩素等活性成分都具有抗炎作用,但这些活性成分用于治疗类风湿性关节炎的报道并不多,因此可对其进行深入研究。

本研究预测得到的白细胞介素-6、基质金属蛋白酶-9、肿瘤坏死因子、白细胞介素-1 β 、白细胞介素-

8 等是鼠曲草治疗类风湿性关节炎的潜在靶点,这些靶点都是典型的炎症因子,在类风湿性关节炎的发病机制中发挥着关键作用。目前针对炎症因子开发了许多新型的生物制剂,如人源化的单克隆抗体托珠单抗、西鲁库姆、克拉扎单抗等能与白细胞介素-6 的受体结合,阻断白细胞介素-6 介导的信号传导而阻止其发挥作用;阿那白滞素可以竞争性地与白细胞介素-1 受体结合从而拮抗白细胞介素-1 的生物活性而减轻炎症反应;阿达木单抗、戈利木单抗等可与肿瘤坏死因子- α 结合并阻断其与受体结合而减轻炎症反应^[17]。值得注意的是 MMPs 即基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase),可特异性降解细胞外基质的蛋白裂解酶,在核心靶点中涉及 MMP-1、MMP-2、MMP-3 和 MMP-9 多种类型。类风湿性关节炎患者体内的白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- α 等细胞因子可以直接参与组织炎症反应,还可促使血液和滑膜液中 MMPs 水平上调^[18,19]。研究表明多种 MMPs 如 MMP-1、MMP-3、MMP-9 等在细

胞因子如白细胞介素-6等诱导下分泌而在滑膜成纤维细胞中表达上调,被认为在类风湿性关节炎患者的关节软骨退化中起关键作用,可能是类风湿性关节炎患者关节损伤的原因^[20]。由此可见,以上靶点在类风湿性关节炎的发病机制中发挥着关键作用,而鼠曲草活性成分可有效作用于上述靶点,所以鼠曲草有望成为治疗类风湿性关节炎的潜在中药。

KEGG 通路分析结果表明鼠曲草通过干扰白细胞介素-17 信号通路(IL-17 signaling pathway)、肿瘤坏死因子信号通路(TNF signaling pathway)、AGE-RAGE 信号通路(AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、利什曼病信号通路(Leishmaniasis)、恰加斯病信号通路(Chagas disease)等信号通路来治疗类风湿性关节炎,还可干扰类风湿性关节炎信号通路(rheumatoid arthritis)。白细胞介素-17 是一种可以趋化中性粒细胞到反应部位促进更多的炎症反应和自身免疫疾病,刺激软骨、滑膜细胞、巨噬细胞和骨细胞释放更多白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- α 等细胞因子诱发类风湿性关节炎的促炎细胞因子^[21]。此外,白细胞介素-17 还可以协同白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- α 等细胞因子放大炎症反应,召集更多的炎症细胞至炎症部位损坏关节^[22]。本研究显示鼠曲草可以作用于白细胞介素-6、肿瘤坏死因子等细胞因子,进一步调节白细胞介素-17 信号通路来治疗类风湿性关节炎。类风湿性关节炎中的信号传递主要通过 NF- κ B 信号通路进行,而 TNF- α 在肿瘤坏死因子信号通路中参与正反馈调节,NF- κ B 的激活是其最重要的一个下游信号通路,激活 NF- κ B 信号通路可进一步调控 MMP-1、MMP-3、IL-6 等细胞因子促进炎症反应^[23,24]。本研究表明鼠曲草可以作用于 MMP-1、MMP-3、IL-6 等细胞因子,进一步调节肿瘤坏死因子信号通路来治疗类风湿性关节炎。由此可见,类风湿性关节炎的发病机制与上述通路密切相关,鼠曲草可以作用于上述通路的相关靶点来调节各通路,从而达到治疗类风湿性关节炎的目的。特别重要的是鼠曲草可以用作用于类风湿性关节炎信号通路,说明鼠曲草对治疗类风湿性关节炎具有潜在的药用价值。

综上所述,鼠曲草属于菊科植物,通过 13 种活性成分作用于白细胞介素-6、基质金属蛋白酶-9、肿瘤坏死因子等 40 个核心靶点来调节白细胞介素-17 信号通路(IL-17 signaling pathway)、肿瘤坏死因子信号通路(TNF signaling pathway)等信号通路来减

轻或抑制炎症反应、调节免疫反应来治疗类风湿性关节炎。研究表明木犀草素主要存在于菊科植物中,可抑制白细胞介素-2、白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- α 等多种促炎细胞因子的表达,抑制 NF- κ B 等信号通路发挥抗炎作用^[25]。鼠曲草的提取物具有较强的抗补体活性,对类风湿性关节炎有明显抑制作用^[26]。分子对接结果显示木犀草素与白细胞介素-6、基质金属蛋白酶-9、肿瘤坏死因子的结合效果最佳,且其结合能远大于阳性对照美洛昔康、甲氨蝶呤和氢化可的松与白细胞介素-6、基质金属蛋白酶-9、肿瘤坏死因子的结合能。因此,推测木犀草素是鼠曲草治疗类风湿性关节炎的关键成分。本研究表明鼠曲草治疗类风湿性关节炎涉及多种生物过程、分子机制和通路调控,体现了鼠曲草多成分、多靶点、多途径的作用特点,为鼠曲草治疗类风湿性关节炎的研究奠定基础。

参考文献

- McInnes IB, Schett G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2017, 389: 2328-2337.
- Jin SY, Li MT, Fang YF, et al. Chinese registry of rheumatoid arthritis (CREDIT): II. prevalence and risk factors of major comorbidities in Chinese patients with rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, 19(1): 251.
- Gao HY. Study on chemical constituents and bioactivities of *Gnaphalium affine* D. Don [D]. Qiqihar: Qiqihar University (齐齐哈尔大学), 2016.
- Ye XL, Li HL. Study on the therapeutic targets of active components from *Gnaphalium affine* D. Don in the treatment of respiratory diseases [J]. *Strait Pharm J (海峡药学)*, 2019, 31(4): 24-27.
- Xi ZX, Chen WS, Wu ZJ, et al. Anti-complementary activity of flavonoids from *Gnaphalium affine* D. Don [J]. *Food Chem*, 2012, 130: 165-170.
- Li ZX, Ouzhu LB, Chen GW. Study on the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Tibet Med (西藏医药)*, 2021, 42: 148-151.
- Han YF, Gao ML, Liu DW. Review on the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Chin Heal Stand Manag (中国卫生标准管理)*, 2021, 12(1): 162-165.
- Jiangsu New Medical College. Dictionary of Traditional Chinese Medicine; Volume II (中药大辞典: 下册) [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House (上海人民出版社), 1979: 2501-2502.

- 9 Lu Y, Den LY, Zhu LN, et al. Inhibition effects of extract and its compositions from *Gnaphalium affine* D. Don on α -amylase [J]. J Hunan Agr Univ; Nat Sci (湖南农业大学学报: 自科版), 2015, 41: 412-415.
- 10 Huang XJ, Li YJ, Li J, et al. Total flavonoids from *Gnaphalium affine* D. Don exert analgesic effect via inhibiting the production of pro-inflammatory mediators in mouse model of pain [J]. Food Sci (食品科学), 2014, 35(21): 240-243.
- 11 Shen RM, Ma LH, Zheng YP. Anti-inflammatory effects of luteolin on acute gouty arthritis rats via TLR/MyD88/NF- κ B pathway [J]. J Cent South Univ; Med Sci (中南大学学报: 医学版), 2020, 45(2): 115-122.
- 12 Shen RM, Li GQ, Zhong LB. Anti-inflammatory effect of luteolin in acute gouty arthritis model rats [J]. J Hainan Med Univ (海南医学院学报), 2019, 25: 1300-1303.
- 13 Lee MN, Lee Y, Wu DY, et al. Luteolin inhibits NLRP3 inflammasome activation via blocking ASC oligomerization [J]. J Nutr Biochem, 2021, 92: 108614.
- 14 Jia QY, Wang YJ, Liang QQ, et al. Effect of quercetin on the expression of inflammatory factors and matrix metalloproteinases in fibroblast-like synoviocytes of human rheumatoid arthritis [J]. Chin J Osteoporosis (中国骨质疏松杂志), 2019, 25: 738-741.
- 15 Li LM, Lin SS, Zhang DH. The anti-inflammatory effects of quercetin on acute laryngitis and its action mechanism [J]. Hebei Med J (河北医药), 2020, 42: 2730-2734.
- 16 Cheng SC, Huang WC, Pang JHS, et al. Quercetin inhibits the production of IL-1 β -induced inflammatory cytokines and chemokines in ARPE-19 cells via the MAPK and NF- κ B signaling pathways [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(12): 2957.
- 17 Wang J, Zhao QJ, Zhuo XB, et al. Research progress on therapeutic drugs for rheumatoid arthritis [J]. J Pharm Pract (药学实践杂志), 2019, 37: 485-490.
- 18 Klimiuk PA, Sierakowski S, Chwiećko J. Serum interleukin 6 (IL-6) concentration correlates with matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in rheumatoid arthritis [J]. Pol Arch Med Wewn, 2003, 109(2): 119-123.
- 19 Klimiuk PA, Sierakowski S, Chwiećko J. Correlation between tumor necrosis factor alpha and matrix metalloproteinases levels in serum of patients with rheumatic arthritis [J]. Pol Merkur Lekarski, 2003, 14(83): 410-412.
- 20 Araki Y, Wada TT, Aizaki Y, et al. Histone methylation and STAT-3 differentially regulate interleukin-6-induced matrix metalloproteinase gene activation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. Arthritis Rheumatol, 2016, 68: 1111-1123.
- 21 Hideki O, Masaaki M, Yuko O, et al. Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction [J]. Immunity, 2008, 29: 628-636.
- 22 Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease [J]. Immunology, 2010, 129: 311-321.
- 23 Wang J, Bian YY, Zhang C, et al. Research progress of TNF- α and its receptors in rheumatoid arthritis [J]. J Pharm Pract (药学实践杂志), 2017, 35: 289-293.
- 24 Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-Mediated apoptosis via two sequential signaling complexes [J]. Cell, 2003, 114: 181-190.
- 25 Liu W, Sun C, Wu YH. Research progress on mechanism of flavonoid monomers isolated from Chinese materia medica for rheumatoid arthritis treatment [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2014, 45: 2878-2882.
- 26 Sun LN, Xi ZX, Li X, et al. Application of the extract of *Gnaphalium affine* D. Don in the preparation of drugs for prevention and treatment of rheumatoid arthritis (鼠曲草提取物在制备防治类风湿性关节炎药物中的应用): CN102133253A [P]. 2011-07-27.