

基于网络药理学、分子对接及实验验证探讨 黄柏治疗痛风的作用机制

李敏^{1,2}, 李莉², 全云云²,
曾瑾², 赵军宁^{1,2}, 毛九州², 龚晓丽², 尹竹君^{2,3*}

¹成都中医药大学药学院, 成都 610075; ²四川省中医药科学院 四川省中医药转化医学中心, 成都 610041;

³长沙医学院 新型药物制剂研发湖南省重点实验室, 长沙 410219

摘要:采用网络药理学、分子对接和体外细胞实验探讨黄柏抗痛风(gout)的物质基础与潜在作用机制。首先通过TCMSP数据库获得黄柏主要活性成分及其对应作用靶点信息;通过GeneCards、OMIM、TTD数据库获得痛风相关疾病靶点;将黄柏有效成分对应靶点与痛风靶点取交集,借助STRING平台及Cytoscape3.9.0软件,绘制交集基因蛋白互作(PPI)网络图;利用基因注释与分析平台(Metascape)数据库对核心靶点进行基因本体(GO)功能及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,通过微信信云平台对富集结果可视化;借助AutoDock Tools软件对核心成分及关键靶点基因进行分子对接,并对核心化学成分抗痛风炎症作用进行实验验证。共筛选出25个黄柏抗痛风活性成分和70个关键交集靶点,PPI网络分析获得5个关键靶点包括蛋白激酶B1(AKT1)、肿瘤坏死因子(TNF)、过氧化物酶体增生激活受体 γ (PPAR γ)、白介素6(IL-6)、前列腺素内过氧化物合酶(PTGS2);GO功能和KEGG通路富集显示,黄柏作用于细胞迁移的正向调控、细胞分化的负调控、炎症反应等生物学过程,调控PI3K-Akt、MAPK等信号通路,进而发挥抗痛风作用。分子对接结果显示,黄柏的5个主要活性成分与关键靶点间存在分子结合位点且结合能较强,均小于-5 kcal/mol;体外实验显示核心化学成分对尿酸钠诱导的炎症反应有较好的抑制作用,本研究初步揭示了黄柏具有多种潜在的抗痛风活性成分,其作用机理可能是通过作用于多靶点和多通路来实现的。

关键词:黄柏;痛风;网络药理学;分子对接;实验验证;抗炎

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)7-1235-12

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.7.015

Mechanism of Phellodendri Chinensis Cortex in the treatment of gout based on network pharmacology, molecular docking and experimental validation

LI Min^{1,2}, LI Li², QUAN Yun-yun²,
ZENG Jin², ZHAO Jun-ning^{1,2}, MAO Jiu-zhou², GONG Xiao-li², YIN Zhu-jun^{2,3*}

¹School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China;

²Sichuan Institute for Translational Chinese Medicine, Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China;

³Hunan Provincial Key Laboratory of the Research and Development of Novel Pharmaceutical Preparations, Changsha Medical University, Changsha 410219, China

Abstract: To investigate the potential pharmacodynamic material basis and mechanism of Phellodendri Chinensis Cortex (PCC) in the treatment of gout by combining network pharmacology prediction, molecular docking validation and experimental validation. The active ingredients and action targets of PCC were obtained through TCMSP databases, gout-related disease

收稿日期:2023-01-16 接受日期:2023-06-25

基金项目:四川省自然科学基金面上项目(2023NSFSC0669);四川省中医药管理局创新团队专项(2022CF009);四川省中医药管理局中药药理学重点学科专项(ZDXK2020-1)

* 通信作者 E-mail:17780651009@163.com

targets were obtained from GeneCards, OMIM and TTD databases. The corresponding targets of the active ingredients of PCC were intersected with the gout targets, and the protein-protein interaction (PPI) network of the intersected genes was mapped with the help of STRING platform and Cytoscape 3.9.0 software. The analysis of gene ontology (GO) function and Kyoto gene and gene targets (KEGG) pathway enrichment were performed by using String and MetaScape databases and visually presented through the platform of bioinformatics. Furthermore, molecular docking technology was performed to validate the binding pattern and affinity between the key ingredients and the crucial targets by using AutoDock Tools software. A total of 25 active ingredients and 70 potential key targets for the treatment of gout was screened in PCC. The enrichment of GO function and KEGG pathway showed that PCC might positively regulate cell migration, negatively regulate cell differentiation, inflammatory response, positively regulate cell adhesion, protein phosphorylation, DNA transcription and other biological processes. The most crucial biotargets of PCC against gout were protein kinase B1 (AKT1), tumor necrosis factor (TNF), peroxisome proliferative activated receptor gamma (PPAR γ), interleukin-6 (IL-6), prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), and KEGG enrichment analysis revealed that PCC possessed anti-gout activity by regulating PI3K-Akt signaling pathway, MAPK signaling pathway. The molecular docking results showed that the binding energy between the key biotargets and the five potential active components were much less than -5 kcal/mol. *In vitro* experiments showed that the core chemical components exhibited potent inhibitory effect on the inflammatory response induced by sodium urate crystal. This study initially revealed PCC has a variety of potential anti-gout active components, and its mechanism may be achieved by modulating multiple biotargets and multiple signal transduction pathways.

Key words: Phellodendri Chinensis Cortex; gout; network pharmacology; molecular docking; experimental validation; anti-inflammatory

痛风 (gout) 是单钠尿酸盐 (monosodium urate, MSU) 沉积于骨关节引发的急、慢性关节炎, 与嘌呤代谢紊乱及 (或) 尿酸排泄减少导致的高尿酸血症 (hyperuricemia, HUA) 直接相关^[1,2]; 主要表现为高尿酸血症, 并伴有急性关节炎发作、痛风石形成、关节畸形、肾脏等脏器损害等^[3], 病程后期可能还会并发高血压、高血脂及代谢综合征等疾病^[4,5]。亚洲、欧洲和北美等地成人痛风患病率为 0.68% ~ 3.90%, 我国痛风患病率为 0.86% ~ 2.20%, 呈逐年上升趋势, 并趋向于年轻化^[6,7]。研究认为, MSU 晶体激活巨噬细胞 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体信号通路释放活性的白介素-1 β (IL-1 β) 是痛风性关节炎的核心致病机制^[8-10]; 临床用于防治痛风的药物通常有非甾体类抗炎药、秋水仙碱、糖皮质激素等, 然而其因存在各种不良反应及临床禁忌症限制以上药物的应用。因此, 寻找新型抗炎药物及抗痛风药物具有重要意义。

黄柏 (Phellodendri Chinensis Cortex, PCC) 为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮, 习称“川黄柏”, 具有清热燥湿、泻火除蒸、解毒疗疮等功效^[11,12], 现代药理研究表明, 黄柏及其中药复方具有抗炎、镇痛、降尿酸、抗痛风等作用^[13-16], 但其抗痛风物质基础及其具体机制尚不清楚。本研究采用网络药理学方法预测黄柏抗痛风的活性成分及核心靶点, 再利用生物信息学方法构建

蛋白质-蛋白质相互作用网络 (protein-protein interaction networks, PPI) 以分析黄柏的药效机制。同时采用分子对接技术验证活性成分与潜在靶蛋白的结合, 并基于体外实验验证核心化学成分的抗痛风作用, 从而揭示黄柏抗痛风的可能物质基础与作用机制。本文的研究将丰富川产道地药材黄柏的药理学研究, 为以黄柏为组方的中药复方防治痛风及其并发症提供理论依据, 同时为以黄柏及其活性成分为组方的创新中药新药的开发奠定坚实的基础。

1 方法

1.1 黄柏潜在化学成分的获取及靶点筛选

在中药系统药理学数据库与分析平台 (TCM-SP, <https://tcmspw.com>) 中, 检索中药材“黄柏”, 设定条件为口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$, 类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 进行初步筛选, 并通过文献检索收集黄柏活性成分信息, 整理数据, 删除重复和结构不明的成分。通过 TCMSP 和 DrugBank (<https://go.drugbank.com>) 数据库, 预测化合物所有靶点。并将靶点数据上传至 UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 数据库, 设定物种名称为“Human”, 将靶点转换为对应的基因 Symbol, 删除重复及无对应人类基因名的靶点。

1.2 疾病痛风作用靶点筛选

在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org>)、OMIM 数据库 (<https://www.omim.org>) 及 TTD

数据库 (<http://db.idrblab.net/ttd/>) 中输入关键词“gout”“gouty arthritis”,同时设定物种为人,选择基因,收集相关靶点信息,将以上3个数据库检索获得的信息删除重复项后汇总,得到最终靶点。

1.3 构建黄柏-成分-疾病靶点的网络

使用在线网络绘图工具 (psb.ugent.be/webtools/Venn/) 绘制黄柏活性成分靶点与疾病靶点的 Venn 图,找出成分与疾病的交集靶点;将黄柏的关键化学成分、对应疾病靶点导入 Cytoscape 3.9.0 软件,绘制“黄柏-成分-靶点基因”网络图,进行 Network Analyzer 分析。

1.4 PPI 网络分析

将黄柏-痛风交集核心靶点上传至 String 数据库 (<https://www.string-db.org/>),将生物类别设定为“Homo sapiens”,保持默认最高置信度 > 0.4 以提高数据的可信性,去除断开的节点,最终生成 PPI 网络图。将生成的“TSV”文件导入 Cytoscape 3.9.0 软件,绘制核心靶点间的相互作用网络图。

1.5 GO 和 KEGG 富集分析

将黄柏-痛风交集核心靶点导入 Metascape 数据库 (<https://metascape.org/>) 进行 GO 生物功能富集分析及 KEGG 通路富集分析,获得数据并绘制图表。选择物种“H. sapiens”,点击“Custom Analysis”进行分析,保留 $P < 0.05$ 且 Count > 3 的富集条目,结合文献研究,删除不相关的通路。将所得富集条目按照 P 值由小到大顺序排列,选择 Top 16 通路输入微生物信云平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn>),进行可视化处理。

1.6 黄柏核心成分与关键靶基因的分子对接验证

在 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库检索活性成分的 3D 结构,在 RCSB PDB 数据库中下载蛋白激酶 B (AKT1)、肿瘤坏死因子 (TNF)、过氧化物酶体增生激活受体 γ (PPAR γ)、白介素 6 (IL-6)、前列腺素内过氧化物合酶 (PTGS2) 蛋白靶点,采用 PyMOL 对 PDB 蛋白分子进行处理;使用 AutoDock Tools 软件进行分子对接,选取最合适的构象,使用 PyMOL 和 Discovery Studio 软件进行可视化分析。

1.7 体外实验活性成分筛选

1.7.1 主要药物、试剂及细胞株

槲皮素 (批号:PS010462, HPLC 纯度 $\geq 98\%$)、吴茱萸次碱 (批号:PS012145, HPLC 纯度 $\geq 98\%$)、盐酸小檗碱 (批号:PS020505, HPLC 纯度 $\geq 98\%$)、

黄柏碱 (批号:PS000447, HPLC 纯度 $\geq 98\%$) 均购于成都普思生物有限公司; β -谷甾醇 (批号:DG0004, HPLC 纯度 $\geq 98\%$, 成都德思特生物有限公司);人 IL-1 β ELISA 试剂盒 (批号:22A229, Excellbio 公司);人 IL-6 ELISA 试剂盒 (批号:22B213, Excellbio 公司);CCK8 试剂盒 (货号:202411, Cellcook 公司);RPMI-1640 培养液 (批号:8122663, Gibco 公司);胎牛血清 (批号:2022057, BI 公司);佛波酯 (phorbol 12-myristate 13-Acetate, PMA, 批号:SLCD3659, Sigma-aldrich 公司);单钠尿酸盐 (monosodium urate, MSU, 货号:Tlrl-msu-25, InvivoGen 公司);脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS, 货号:L4005-100MG, Sigma-aldrich 公司)。人单核细胞 (THP-1) 细胞株购于广州赛库生物技术有限公司,细胞株用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。

1.7.2 实验方法

1.7.2.1 CCK8 法检测药物对细胞活力影响

取对数生长期 THP-1 细胞,以 5×10^4 个/孔,每孔体积为 100 μ L 铺于 96 孔板中。每孔加入 100 ng/mL PMA 工作液,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 24 h,待 THP-1 细胞诱导分化为巨噬细胞后,更换为完全培养基静息培养 24 h。细胞随机分为 27 组,即空白组、对照组,黄柏碱组 (25、50、100、150、200 μ mol/L)、槲皮素组 (12.5、25、50、100、200 μ mol/L)、小檗碱组 (12.5、25、50、100、200 μ mol/L)、吴茱萸次碱组 (2.5、5、10、25、50、100 μ mol/L)、 β -谷甾醇组 (1.125、2.25、4.5、9 μ mol/L),每组设置 5 个复孔,加入对应药物培养 24 h 后,每孔加入 10 μ L CCK8 溶液,放入培养箱孵育 2 h,待培养液颜色变成橘黄色,用酶标仪测定 450 nm 处每孔 OD 值。按公式计算细胞存活率:细胞存活率 = $(OD_{\text{实验}} - OD_{\text{空白}}) / (OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

1.7.2.2 ELISA 法验证药物对炎症因子释放的影响

为验证化合物单体的体外抗痛风作用,选取活性成分中度值较高的成分槲皮素、吴茱萸次碱、 β -谷甾醇与黄柏特征性成分黄柏碱、小檗碱进行对比;据“1.7.2.1”结果在安全浓度范围内设置槲皮素、 β -谷甾醇、吴茱萸次碱、黄柏碱、小檗碱高、中、低三个给药浓度,以探究核心成分对 LPS + MSU 诱导的 THP-1 细胞炎症因子 IL-1 β 、IL-6 释放的影响。将对数生长期的细胞以 2.5×10^5 个/孔均匀铺于 24 孔板。根据“1.7.2.1”实验方法培养分化成 THP-1 巨噬细

胞,设置对照组,模型组,槲皮素、 β -谷甾醇、吴茱萸次碱、黄柏碱、小檗碱高、中、低浓度组,每组3个复孔。根据以上分组预先给予对应药物孵育1 h,再进行体外痛风炎症模型的构建^[17,18]:除空白对照组外,每孔加入LPS(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理1 h后,加入MSU(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)孵育24 h,收集细胞上清液。根据ELISA试剂盒说明书检测上清液中炎症因子IL-1 β 、IL-6的释放量,按同法用IL-1 β 标准品作吸光值-质量浓度的标准曲线: $Y = -0.000\ 01\ X^2 + 0.010\ 5\ X + 0.046\ 7$ ($R^2 = 0.999$);用IL-6标准品作吸光值-质量浓度的标准曲线: $Y = -0.000\ 04\ X^2 + 0.206\ 1\ X + 0.106\ 8$ ($R^2 = 0.996$)。通过标准曲线计算细胞上清液中IL-1 β 、IL-6的浓度。

1.7.3 统计学方法

采用Graph Pad Prism 8.0进行分析和统计。正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用两样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统

计学意义。

2 结果

2.1 黄柏活性成分靶点及疾病靶基因筛选结果

通过TCMSP和文献检索共获得140个黄柏活性成分;以 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 为标准进行筛选得到25个潜在活性成分,剔除经UniProt数据库校验未找到对应人类基因名的化合物获得185个靶点蛋白。以“gout”“gouty arthritis”为关键词在GeneCards、OMIM、TTD数据库中共整理得到1592个潜在靶点;将上述疾病靶点与黄柏靶点蛋白取交集并绘制Venn图,得到核心靶点70个(见图1),以筛选出关键化合物及核心靶点为基础,通过Cytoscape 3.9.0软件将药物-成分-靶点基因网络进行可视化处理(见图2),该网络图包括94个节点、243条边;图形填充颜色越深,表明其相连的靶点越多,即节点的度值(degree值)越高。其中degree值 >5 的活性成分如表1所示。

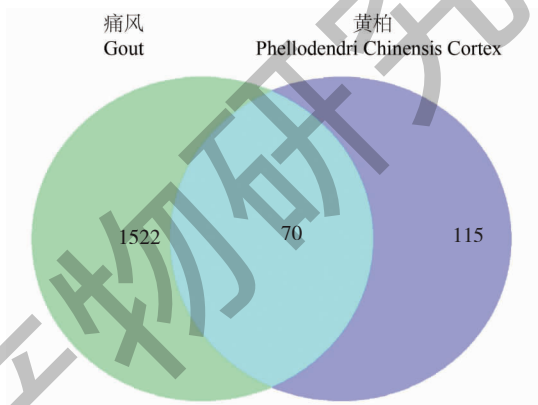


图1 中药黄柏与痛风靶点基因的交互靶点信息

Fig. 1 Interactive target information of PCC and gout

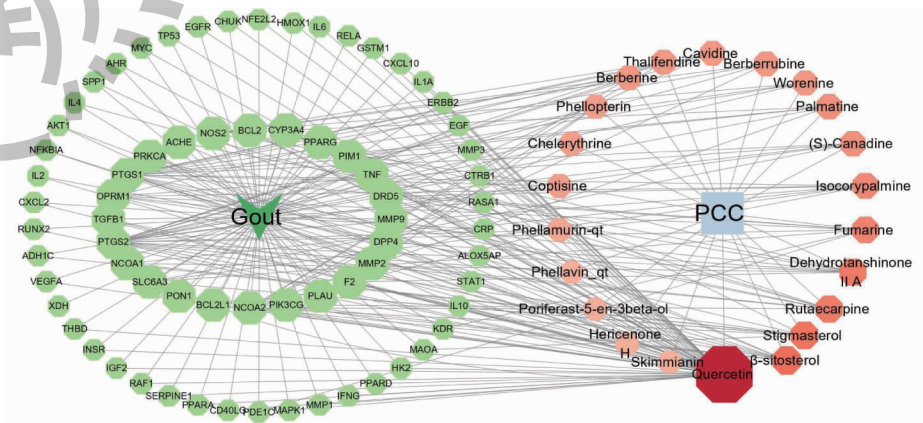


图2 化学成分-疾病靶点网络图

Fig. 2 Component-target-disease network diagram

表 1 黄柏活性成分度值表格 (度值 ≥ 5)

Table 1 Table of degree values for the active ingredients of PCC (degree ≥ 5)

活性成分 Active component	度值 Degree	中心接近度 Closeness centrality	介数中心性 Betweenness centrality
槲皮素 Quercetin	59	0.983 050	0.021 956
β-谷甾醇 β-Sitosterol	11	0.916 666	0.001 380
豆甾醇 Stigmasterol	10	0.909 091	0.002 040
吴茱萸次碱 Rutaecarpine	9	0.900 000	0.001 639
去氢丹参酮 II A Dehydrotanshinone II A	9	0.900 000	0.001 639
蓝萆碱 Fumarine	8	0.888 889	0.001 285
异紫堇啡碱 Isocorypalmine	7	0.875 000	0.000 503
黄藤素 Palmatine	6	0.857 143	0.000 430
(S)-Canadine	6	0.857 143	0.000 344
甲基黄连碱 Worenine	5	0.833 333	0.000 380
小檗碱 Berberine	5	0.833 333	0.000 193

2.2 PPI 网络的构建

将疾病与活性成分的核心靶点导入 String 数据库,采用 Cytoscape 3.9.0 软件绘制 PPI 网络图(见图 3),该网络图包括 70 个节点数,838 个边数;同时根据度值对各节点进行排序,颜色由蓝色向绿色渐

变,图中节点代表交集基因所对应的蛋白,度值越大,颜色越深,表示蛋白之间的关系越密切。每条边代表蛋白相互作用关系如图 3 所示。推测靶点蛋白主要包括 TNF、IL6、AKT1、PPARG、PTGS2 等(见表 2),表明其可能为黄柏治疗痛风的潜在核心靶点。

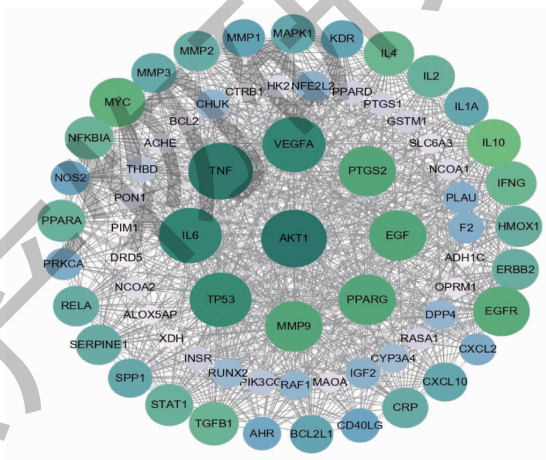


图 3 疾病与化合物之间蛋白的相互联系特征

Fig. 3 Characterization of protein interconnections between diseases and compounds

表 2 PPI 网络核心靶点

Table 2 Core targets of PPI network

靶点名称 Target name	度值 Degree	中心接近度 Closeness centrality	介数中心性 Betweenness centrality
AKT1	54	0.819 277	0.080 493
TNF	53	0.809 524	0.062 474
IL-6	51	0.781 609	0.039 616
PTGS2	45	0.731 183	0.024 913
PPARG	45	0.731 183	0.040 031

2.3 基因功能 GO 分析和 KEGG 富集分析结果

由 Metascape 数据库进行 GO 功能分析,分别得出 20 个生物过程,20 个细胞成分和 20 个分子功能条目,选取排名前 10 的条目绘制 GO 功能分析图(见图 4);在生物过程(biological process, BP)中细胞迁移的正调控抗体占比最重,其次为细胞分化的负调控和炎症反应;在细胞组分(cellular component, CC)中,涉及膜筏(membrane raft)、转录调节复合体、受体复合体等;在分子功能(molecular func-

tion, MF) 中, 共同靶点基因表达涉及受体配体活性, 蛋白质二聚化活性以及 DNA 结合的转录因子结合等。

KEGG 通路富集分析得到 171 条信号通路, 剔除与本研究不相关的信号通路, 选取下载结果中 P

<0.05 的前 16 条通路进行可视化分析 (见图 5)。结果显示黄柏抗痛风的关键基因靶点富集在 PI3K-Akt、MAPK 等信号通路。表明以上这些富集的信号通路可能是黄柏抗痛风的潜在作用机制。

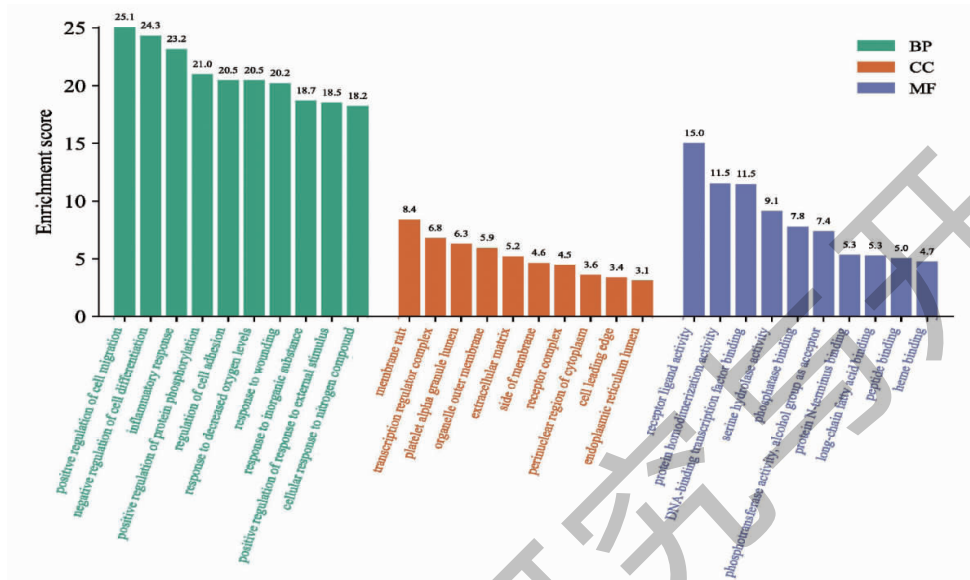


图 4 成分-疾病靶点的 GO 生物功能富集分析

Fig. 4 GO biological enrichment analysis of component-disease targets

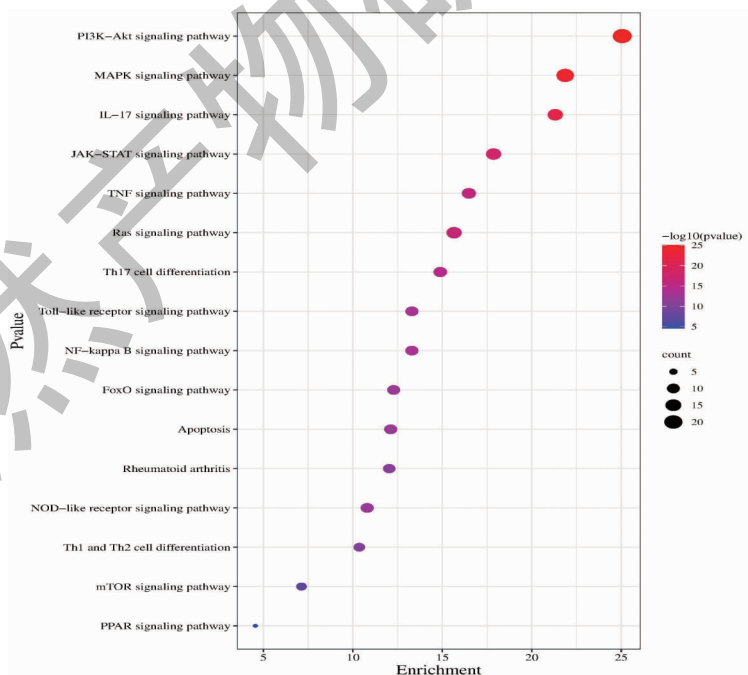


图 5 KEGG 富集分析气泡图

Fig. 5 Bubble diagram of KEGG enrichment analysis

注: 气泡大小代表富集基因个数, 气泡越大、颜色越红, 代表富集程度越显著。Note: The size of the bubble represents the number of enriched genes, the larger the bubble and the redder the color, the more significant the degree of enrichment.

2.4 黄柏活性成分与靶点分子对接验证

为明确核心靶蛋白与黄柏抗痛风潜在活性成分之间的结合能力,以度值排名前5的关键活性成分槲皮素、 β -谷甾醇、吴茱萸次碱、去氢丹参酮 II A、豆甾醇作为配体,5个核心靶点 AKT1、TNF、IL-6、PPARG、PTGS2 为受体,AutoDock Tools 软件进行分子对接,分子对接结果见表3。结合能值越小代表该分子与蛋白对接得越好,小于-5.0 kcal/mol 即药物成分与靶点具有强结合活性^[19]。由表3可知黄柏活性成分与核心靶点的结合能都 \leq -5.0 kcal/mol,且多数组合结合能 $<$ -7 kcal/mol,说明黄柏的潜在活性成分与疾病痛风的核心靶点之间关联性很强,即这些药效成分与核心靶点基因可能是黄柏治

疗痛风的药效物质基础与主要作用靶点。

使用 PyMol 和 Discovery studio 软件对代表性活性成分如黄酮类成分槲皮素、生物碱类成分吴茱萸次碱、甾醇类成分 β -谷甾醇与度值排名前二的靶点 AKT1、TNF 的分子对接结果进行 3D 和 2D 结构可视化分析(部分可视化分析结果见图6),发现活性成分与靶基因之间存在范德华力、 π - π 键、氢键等作用力。分子对接结果显示,槲皮素可与 AKT1 编码蛋白的 His-207(A)、Tyr-474(A)、Leu-213(A)、Leu-202(A)、Leu-210(A) 活性位点;与 TNF 编码蛋白 Gln-283(D)、Glu-343(D)、Gly-284(D)、Glu-259(D)、Ser-342(D) 活性位点通过氢键结合,与 TNF 蛋白氨基酸残基 Phe-287(D) 形成 π - π 键;吴茱萸次碱

表3 黄柏活性成分与关键靶点的最低结合能

Table 3 Minimum binding energy of active ingredients of PCC to key targets

靶点名称 Target name	PDB ID	结合能 Binding energy (kcal/mol)				
		槲皮素 Quercetin	β -谷甾醇 β -Sitosterol	豆甾醇 Stigmasterol	去氢丹参酮 II A Dehydrotanshinone IIA	吴茱萸次碱 Rutaecarpine
AKT1	3CQU	-7.56	-9.12	-9.19	-7.53	-8.13
TNF	1TNF	-7.23	-9.12	-9.67	-8.49	-8.04
IL-6	1ALU	-6.15	-6.70	-8.21	-6.91	-7.40
PPARG	1FM9	-7.52	-6.10	-8.48	-8.98	-6.29
PTGS2	5F19	-6.88	-6.85	-9.28	-9.19	-8.75

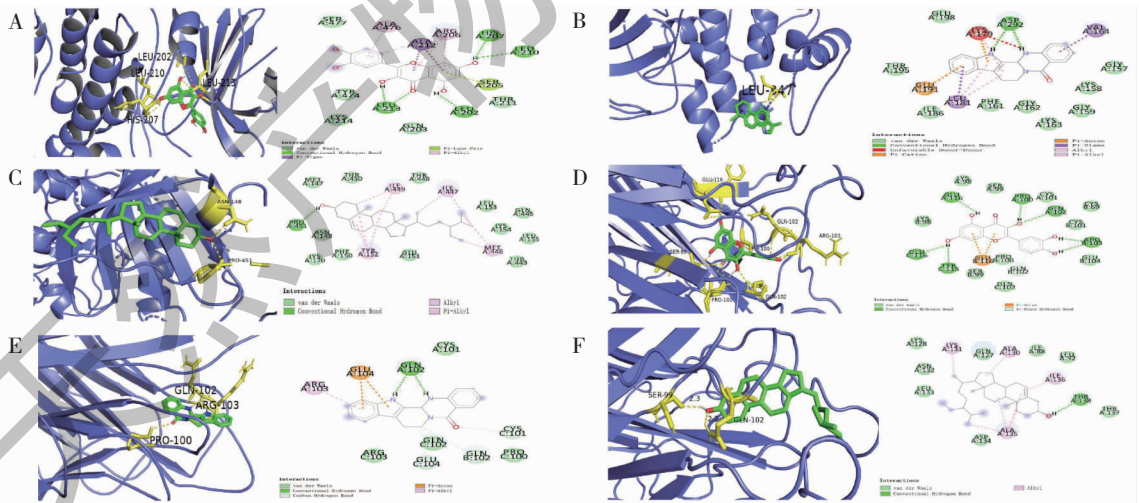


图6 部分活性成分与关键靶点的分子对接示意图

Fig. 6 Molecular docking between representative active ingredients and key targets

注:3D 结构图中,紫色表示配体,黄色表示与配体对接的氨基酸残基,黑色代表氢键,数字标记为键长;A、B、C 分别为 AKT1 蛋白与槲皮素、吴茱萸次碱、 β -谷甾醇对接结果;D、E、F 分别为 TNF 蛋白与槲皮素、吴茱萸次碱、 β -谷甾醇对接结果。Note:In the 3D structure picture, Purple indicates ligands,yellow indicates amino acid residues docked to ligands,black represents hydrogen bonds,and numbers are marked as bond lengths, A,B,C are the docking results of AKT1 protein with quercetin,rutaecarpine and β -sitosterol;D,E,F are the docking results of TNF protein with quercetin,rutaecarpine and β -sitosterol.

与 AKT1 蛋白的 Asp-292(A)、Lys-179(A) 活性位点形成氢键,与 Avl-164(A)、Leu-181(A) 形成两条 π - σ 键;与 TNF 蛋白的活性位点 Gln-102(A) 形成 2 条氢键; β -谷甾醇与 AKT1 编码蛋白的活性位点 Glu-278(A) 形成 1 条氢键;与 TNF 编码蛋白的活性位点 Gln-102(A) 形成 2 条氢键。

2.5 不同浓度药物对 THP-1 细胞活力的影响

如图 7 所示,与空白对照组(0 $\mu\text{mol/L}$) 比较,槲皮素(12.5 ~ 50 $\mu\text{mol/L}$)、黄柏碱(25 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$)、吴茱萸次碱(1.25 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$)、 β -谷甾醇(1.125 ~ 4.5 $\mu\text{mol/L}$)、小檗碱(12.5 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$)

L) 细胞存活率无明显改变。故可认为,在以上给药浓度范围内,药物对 THP-1 巨噬细胞无细胞毒性作用。与空白对照组(0 $\mu\text{mol/L}$) 比较,黄柏碱(200 $\mu\text{mol/L}$)、吴茱萸次碱(25 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$)、 β -谷甾醇(9 $\mu\text{mol/L}$)、小檗碱(200 $\mu\text{mol/L}$) 细胞存活率显著降低,表明以上给药浓度范围内,药物对 THP-1 巨噬细胞有显著的细胞毒性。因此,应采用槲皮素(12.5 ~ 50 $\mu\text{mol/L}$)、黄柏碱(25 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$)、吴茱萸次碱(1.25 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$)、 β -谷甾醇(1.125 ~ 4.5 $\mu\text{mol/L}$)、小檗碱(12.5 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$) 浓度范围内进行后续实验。

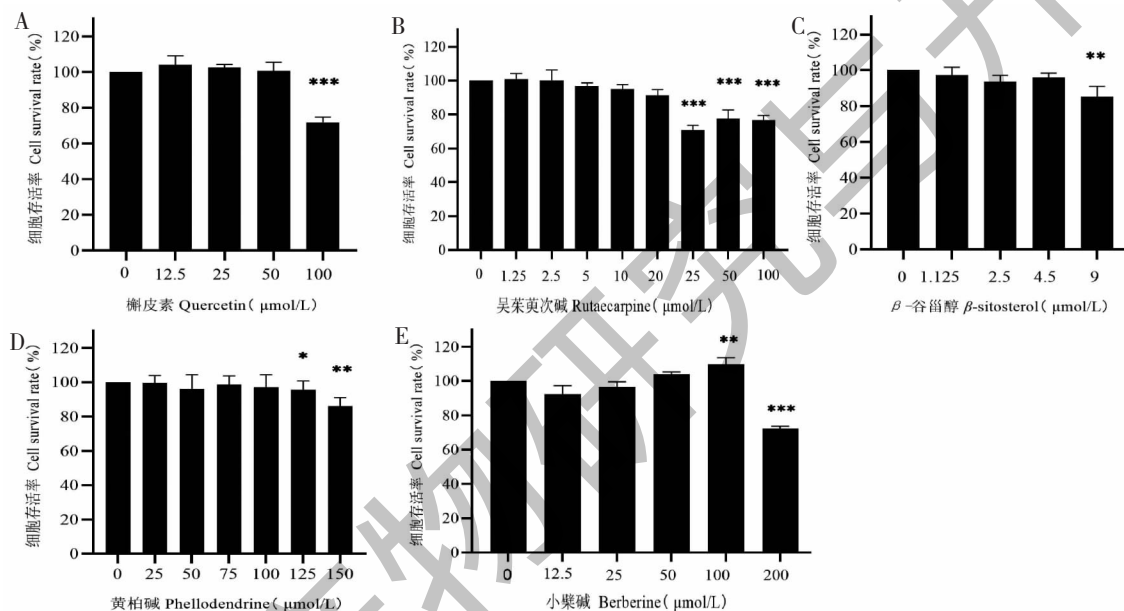


图7 黄柏活性成分对 THP-1 细胞增殖活力影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 7 Effect of active ingredients of PCC on the survival rate of THP-1 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

注:与空白对照组(0 $\mu\text{mol/L}$) 相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。Note: Compared with the blank control group(0 $\mu\text{mol/L}$), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

2.6 ELISA 法检测活性成分对炎症因子 IL-1 β 、IL-6 的影响

单核细胞株(THP-1 细胞)经诱导后可转变为巨噬细胞,能够分泌炎症细胞因子,被广泛用于痛风性关节炎相关的机制研究。由图 8 可知,与对照组相比,THP-1 巨噬细胞经 LPS + MSU 联合诱导后,细胞上清液中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 水平显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.001$)。与模型组相比,槲皮素(25、50 $\mu\text{mol/L}$) 浓度组、小檗碱(25、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 浓度组、吴茱萸次碱(5、10 $\mu\text{mol/L}$) 浓度组、 β -谷甾醇(1.125、2.25、4.50 $\mu\text{mol/L}$) 浓度组、黄

柏碱(100 $\mu\text{mol/L}$) 浓度组,可显著抑制 IL-1 β 水平(见图 8B),差异具有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,槲皮素组(25、50 $\mu\text{mol/L}$)、小檗碱组(25、50、100 $\mu\text{mol/L}$)、黄柏碱组(25、50、100 $\mu\text{mol/L}$)、吴茱萸次碱组(2.5、5.0、10 $\mu\text{mol/L}$)、 β -谷甾醇组(1.125、4.5 $\mu\text{mol/L}$), IL-6 水平显著降低(见图 8A),差异具有统计学意义($P < 0.05$)。ELISA 结果表明,网络药理学预测的黄柏抗痛风核心成分中,槲皮素、吴茱萸次碱、 β -谷甾醇、小檗碱具有显著的抗炎活性,且吴茱萸次碱在较低浓度下(5、10 $\mu\text{mol/L}$) 对 MSU 诱导的炎症因子的释放具有显著的抑制作用。

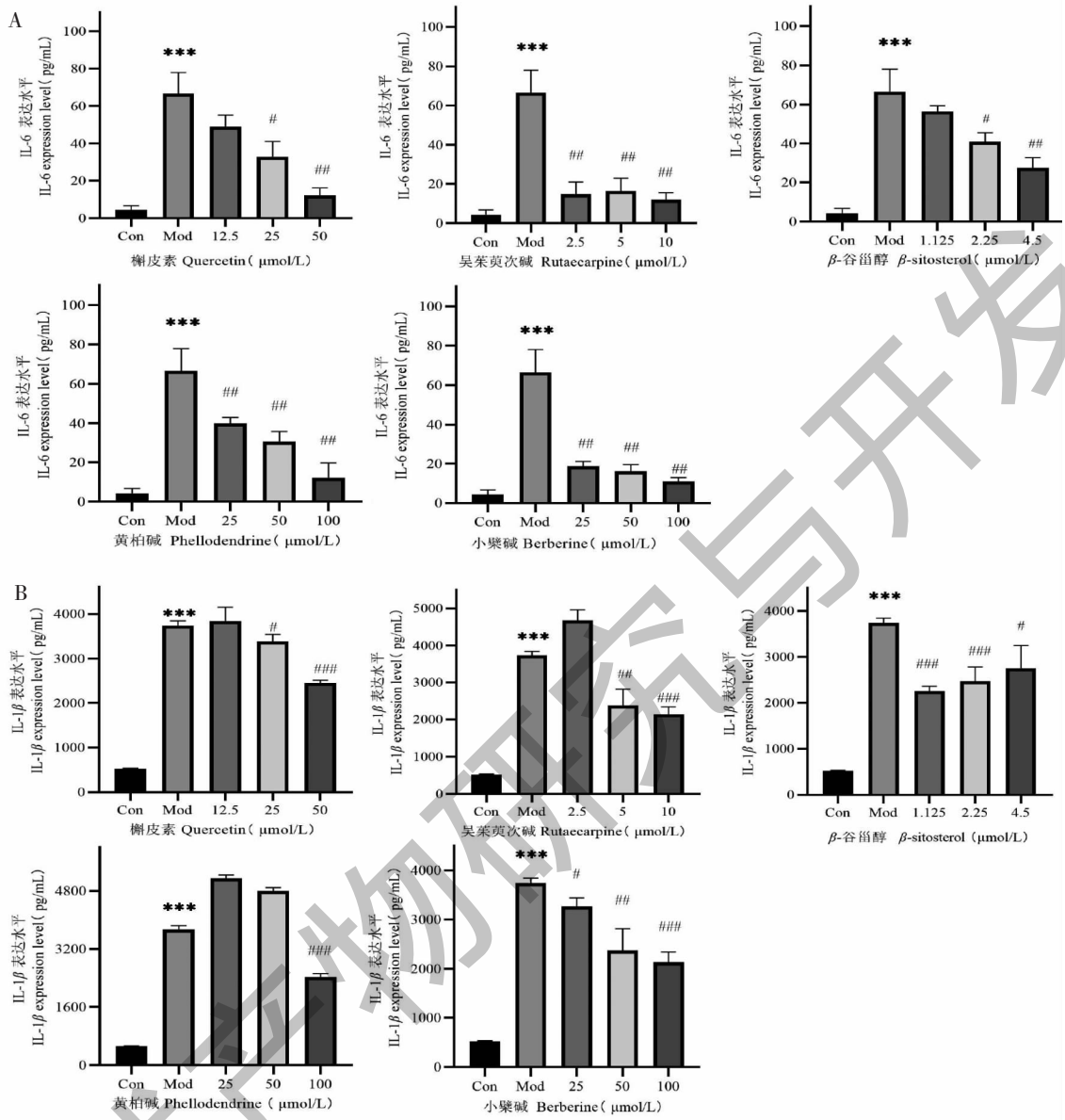


图 8 黄柏活性成分对 LPS + MSU 诱导的 THP-1 细胞 IL-6、IL-1 β 水平影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of active ingredients of PCC on IL-6 and IL-1 β levels in THP-1 cells induced by LPS + MSU ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注: Con: 对照组; Mod: 模型组; 与对照组相比, *** $P < 0.001$; 与模型组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 。Note: Con: Control group; Mod: Model group; Compared with the control group, *** $P < 0.001$; Compared with the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

3 讨论与结论

本研究的中药-活性成分-关键靶点网络图显示,黄柏的活性成分槲皮素、吴茱萸次碱、 β -谷甾醇、豆甾醇、去氢丹参酮 II A 在网络中度值较高,表明其可能是黄柏抗痛风的药效物质基础。槲皮素可通过上调 SIRT1 表达,抑制 NLRP3 炎症小体的活化来抑制炎症损伤^[20],还可作为 XO 抑制剂^[21],可开发为具有抗痛风作用的新型药物。吴茱萸次碱可通过抑

制 JNK/p38 MAPK 信号通路,抑制炎症反应与氧化应激;同时抑制半胱天冬酶-12 和 NF- κ B 途径改善脓毒症小鼠的腹腔巨噬细胞凋亡和炎症反应^[22]。 β -谷甾醇是一种天然植物甾醇和抗氧化剂,研究发现其可降低 LPS 诱导 IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等炎症介质的释放^[23]。豆甾醇与 β -谷甾醇同属于植物甾醇类化合物,能够显著减少 LPS 诱导的 COX-2、iNOS 基因表达^[24],提示该类化合物可能通

过抑制炎症因子的基因表达与释放发挥抗炎作用。去氢丹参酮 IIA 作为丹参酮 IIA 的活性代谢物,其抗炎及抗痛风作用目前未见报道。但根据 Zhou 等^[25]研究发现,丹参酮 IIA 可以抑制 LPS 诱导的炎症和软骨细胞凋亡,在减轻关节炎的炎症反应及保护关节软骨细胞方面疗效显著。还可降低 LPS 刺激巨噬细胞中线粒体活性氧(ROS)的产生,抑制 NLRP3 炎症小体的激活从而缓解痛风炎症^[23]。

PPI 网络分析与 KEGG 通路富集分析显示,黄柏治疗痛风的关键靶点有 AKT1、TNF、IL-6 等,主要涉及 PI3K-Akt、MAPK 等信号通路,其中 PI3K/Akt 作为富集程度最高的信号通路,在调控细胞增殖、凋亡、炎症反应、自噬中发挥重要作用^[26,27]。高尿酸水平可激活 AKT-PRAS40 信号通路,激活 mTOR,从

而抑制自噬,使得炎症因子 IL-1 β 的表达增加以及 IL-1 受体拮抗剂(IL-Ra)失调^[28,29],加剧炎症反应,因此 AKT1 可能是治疗痛风的重要靶点。研究表明,自噬抑制与炎症小体激活、IL-1 β 转录上调^[30]等密切相关。MAPK 信号通路富集程度仅次于 PI3K/Akt 信号通路,该通路与多种促炎过程密切相关。已证实,可溶性尿酸可以通过激活 p38 MAPK 和细胞外信号调节激酶(ERKs),进一步激活转录因子 NF- κ B 和 AP1,上调炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-6 等的转录^[31]。此外,MAPKs 作为 TNF 的下游信号通路可介导炎症级联反应,加重痛风。综上,我们推测,黄柏可能通过激活 PI3K/Akt 通路启动自噬,调控 MAPKs 等多条信号通路发挥抗痛风作用(见图 9)。

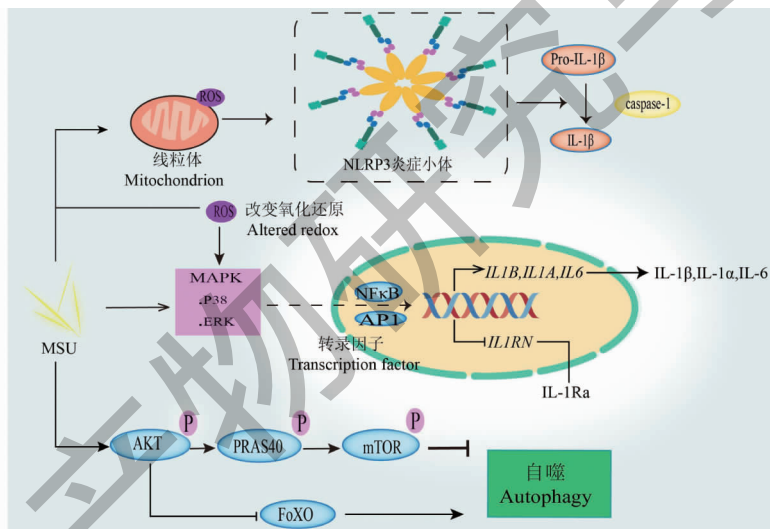


图 9 中药黄柏抗痛风信号转导通路图

Fig. 9 Potential signal transduction pathway of PCC against gout

本研究采用分子对接技术验证了网络药理学预测得到的黄柏活性成分与关键靶点 AKT1、TNF、IL-6、PPARG、PTGS2 的结合能力,发现活性成分与关键靶点间最低结合能在 -9.60 ~ -6.10 kcal/mol 之间,主要以氢键结合方式进行相互作用,具有较强的结合能力。基于上述研究结果,本课题采用 LPS 联合 MSU 诱导的体外炎症模型,选择代表性活性成分槲皮素、吴茱萸次碱、 β -谷甾醇与黄柏特征性成分黄柏碱、小檗碱来进行后续细胞实验,深入探讨并筛选抗炎作用强的活性成分。ELISA 结果发现,吴茱萸次碱在较低浓度下对 MSU 诱导的炎症因子 IL-1 β 、IL-

6 的释放具有显著的抑制作用,且其体外抗痛风作用优于黄柏质量标志物一小檗碱、黄柏碱^[32]。上述研究表明网络药理学预测的活性成分可能是潜在的抗痛风活性成分,可作为抗痛风中药新药或药物前体进行后续研究。

综上所述,本研究采用网络药理学、分子对接方法及体外实验验证对黄柏治疗痛风的物质基础及作用机制进行了探讨。尽管网络药理学通过多学科的交叉应用和整体生物网络分析,实现了对中药(复方)“多成分、多靶点、多通路”的高效预测,但其仍然存在各种有待解决的问题,如各类数据库信息良

莠不齐、获取成分靶点信息有限、多味中药的体内相互作用机制不明确等。后续研究团队将围绕其抗痛风药效物质及作用机制开展进一步研究,包括活性成分的作用靶点、信号通路及体内实验的验证等,以期为黄柏防治痛风的临床应用提供理论依据,同时为以黄柏及其活性成分为组方的创新中药新药的开发奠定坚实的基础。

参考文献

- Li L, Zhu XX, Dai YX, et al. Multidisciplinary expert consensus on the diagnosis and treatment of hyperuricemia-related diseases in China[J]. Chin J Intern Med(中华内科杂志), 2017, 56:22.
- Zhao J, Wei K, Jiang P, et al. Inflammatory response to regulated cell death in gout and its functional implications[J]. Front Immunol, 2022, 13:888306.
- Taylor WJ, Franssen J, Jansen TL, et al. Study for updated gout classification criteria: identification of features to classify gout[J]. Arthritis Care Res, 2015, 67:1304-1315.
- Ndrepepa G. Uric acid and cardiovascular disease[J]. Clin Chim Acta, 2018, 484:150-163.
- Punzi L, Scanu A, Galozzi P, et al. One year in review 2020: gout[J]. Clin Exp Rheumatol, 2020, 38:807-821.
- Chen XM, Yokose C, Rai SK, et al. Contemporary prevalence of gout and hyperuricemia in the united states and decadal trends: the national health and nutrition examination survey, 2007-2016[J]. Arthritis Rheumatol, 2019, 71:991-999.
- Zobbe K, Prieto AD, Cordtz R, et al. Secular trends in the incidence and prevalence of gout in Denmark from 1995 to 2015: a nationwide register-based study[J]. Rheumatology, 2019, 58:836-839.
- So AK, Martinon F. Inflammation in gout: mechanisms and therapeutic targets[J]. Nat Rev Rheumatol, 2017, 13:639-647.
- Jhang JJ, Cheng YT, Ho CY, et al. Monosodium urate crystals trigger Nrf2- and hemeoxygenase-1-dependent inflammation in THP-1 cells[J]. Cell Mol Immunol, 2015, 12:424-434.
- Kim SK, Choe JY, Park KY, et al. Enhanced p62 is responsible for mitochondrial pathway-dependent apoptosis and interleukin-1 β production at the early phase by monosodium urate crystals in murine macrophage[J]. Inflammation, 2016, 39:1603-1616.
- Commission Chinese Pharmacopoeia. Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020:318-319.
- Yan QY, Sun J, Zhang L, et al. Analysis on mechanisms and medication rules of herbal prescriptions for gout caused by heat-damp accumulation syndrome based on data mining and network pharmacology[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2018, 43:2824-2830.
- Yan C, Zhang YD, Wang XH, et al. Chemical constituents and anti-tumor activity from the fruits of *Phellodendron chinense* Schneid[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29:1270-1276.
- Tang JX. Screening study on the anti-inflammatory active site of *Phellodendron chinensis*[J]. J China Prescript Drug(中国处方药), 2016, 14:30-31.
- Xu L, Cheng J, Lu J, et al. Integrating network pharmacology and experimental validation to clarify the anti-hyperuricemia mechanism of cortex phellodendri in mice[J]. Front Pharmacol, 2022, 13:964593.
- Su M, Tan FX, Lyu J, et al. Study on the material basis of *Anemarrhena Rhizoma-Phellodendri Chinensis Cortex* against inflammation based on network pharmacology, molecular docking and experimental verification[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2022, 34:687-698.
- Jin XM. Study on the mechanism of total flavonoids of *Smilax glabra* Roxb. in treatment of gouty arthritis based on NLRP3/ASC/Caspase-1 axis[D]. Hangzhou: Zhejiang Chinese Medical University(浙江中医药大学), 2018.
- Zhang XY. The anti-gout effect and mechanism of flavonoids in *Selaginella moellendorfi* Hieron. via NLRP3 signaling[D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine(湖北中医药大学)2020.
- Hsin KY, Ghosh S, Kitano H, et al. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology[J]. PLoS One, 2013, 8:e83922.
- Tang X, Duan YF, Zhou XB, et al. Effects of quercetin on intestinal injury in experimental megacolon rats by regulating SIRT1/NLRP3 signaling pathway[J]. Drugs Clin(现代药物与临床), 2022, 37:673-680.
- Ruiz-Miyazawa KW, Staurengo FL, Mizokami SS, et al. Quercetin inhibits gout arthritis in mice: induction of an opioid-dependent regulation of inflammasome[J]. Inflammopharmacology, 2017, 25:555-570.
- Li Z, Yang M, Peng Y, et al. Rutaecarpine ameliorated sepsis-

- induced peritoneal resident macrophages apoptosis and inflammation responses [J]. *Life Sciences*, 2019, 228: 11-20.
- 23 Yue H, Yang Z, Ou Y, et al. Tanshinones inhibit NLRP3 inflammasome activation by alleviating mitochondrial damage to protect against septic and gouty inflammation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 97: 107819.
- 24 Gabay O, Sanchez C, Salvat C, et al. Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18: 106-116.
- 25 Zhou B, Li LH, Tan LM, et al. Tanshinone IIA ameliorates inflammation response in osteoarthritis via inhibition of miR-155/FOXO3 axis [J]. *Pharmacology*, 2021, 106: 20-28.
- 26 Sun LJ, Qiao W, Xiao YJ, et al. Naringin mitigates myocardial strain and the inflammatory response in sepsis-induced myocardial dysfunction through regulation of PI3K/AKT/NF- κ B pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 75: 105782.
- 27 Matsuda S, Nakanishi A, Wada Y, et al. Roles of PI3K/AKT/PTEN pathway as a target for pharmaceutical therapy [J]. *Open Med Chem J*, 2013, 7: 23-29.
- 28 Tatsiy O, Mayer TZ, Oliveira VD, et al. Cytokine production and NET formation by monosodium urate-activated human neutrophils involves early and late events, and requires upstream TAK1 and Syk [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2996.
- 29 Crişan TO, Cleophas MC, Novakovic B, et al. Uric acid priming in human monocytes is driven by the AKT-PRAS40 autophagy pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2017, 114: 5485-5490.
- 30 Crişan TO, Plantinga TS, van de Veerdonk FL, et al. Inflammasome-independent modulation of cytokine response by autophagy in human cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e18666.
- 31 Yu MA, Sánchez-Lozada LG, Johnson RJ, et al. Oxidative stress with an activation of the renin-angiotensin system in human vascular endothelial cells as a novel mechanism of uric acid-induced endothelial dysfunction [J]. *J Hypertens*, 2010, 28: 1234-1242.
- 32 Liu XL, Wu WP, Pan LY, et al. Fingerprint analysis and Q-marker prediction of salt-fried *Phellodendri Chinensis* Cortex [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2022, 34: 1647-1656.