论 著

基于网络药理学和分子对接分析黄芩治疗类风湿关节炎的作用机制

孙宇洁，付书璠，赵永璐，李 慧，黄 莉
安徽中医药大学 中医学院（合肥 230038）

【摘要】 目的 利用网络药理学和分子对接探索黄芩治疗类风湿关节炎（rheumatoid arthritis，RA）的作用机制。**方法** 运用中药系统药理学分析平台（TCMSP）筛选黄芩的有效成分及相应的靶蛋白，通过Genecards、OMIM数据库筛选出RA的靶点，利用Venn在线软件获取药物与疾病的共同靶点，并使用Cytoscape3.7.2软件构建“有效成分-靶点-疾病”网络图。使用String数据库绘制蛋白互作（PPI）网络，利用Cytoscape中的CytoNCA对RA靶点进行打分，得到网络核心靶蛋白，并与筛选后的黄芩潜在有效成分逐一进行分子对接。最后利用David数据库对有效作用靶点进行GO功能和KEGG通路富集分析。**结果** 筛选出黄芩化合物共计36个，有效作用靶点96个。通过Venn图获得44个药物-疾病共同靶点，PPI网络发现IL-6、VEGFA、PTGS2、FOS、JUN、MMP9等为黄芩治疗RA的关键靶点。GO功能分析发现75个条目，涉及生长因子活性、生物合成过程调控、酶活性、转录因子活性及受体活性、细胞因子活性等方面。KEGG通路分析发现24个条目，涉及细胞凋亡、PI3K-AKT、MAPK、HIF-1、破骨细胞分化、细胞衰老、趋化因子等信号通路。分子对接结果显示PTGS2、ESR1、RELA分别与黄连碱、表小檗碱、刺槐素等多个黄芩活性成分具有较好的结合性，提示黄芩可通过PTGS2、ESR1、RELA干预RA的活动。**结论** 黄芩通过多成分、多靶点、多途径发挥治疗RA作用，为研究其物质基础及作用机制奠定了基础，为临床用药提供了新思路。

【关键词】 黄芩 类风湿关节炎 网络药理学 作用机制 信号通路
【中图分类号】 R285.5 **文献标志码** A doi：10.3969/j.issn.2096-3351.2021.04.003

Mechanism of action of Scutellaria baicalensis in treating rheumatoid arthritis: An analysis based on network pharmacology and molecular docking

SUN Yu-jie, FU Shu-fan, ZHAO Yong-lu, LI Hui, HUANG Li
School of T.C.M, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China

【Abstract】 Objective To analyze the mechanism of action of Scutellaria baicalensis in the treatment of rheumatoid arthritis (RA) using network pharmacology and molecular docking. **Methods** We screened for effective components of S. baicalensis and the corresponding target proteins through the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, and screened for the targets of RA through the GeneCards and Online Mendelian Inheritance in Man databases. Online Venn software was used to determine the common targets of the drug and the disease. Cytoscape 3.7.2 software was used to visualize the effective component-target-disease network. A protein-protein interaction (PPI) network was plotted using the String database. CytoNCA, a plugin of Cytoscape, was used to score the targets of RA to determine the core target proteins of the network. Molecular docking was conducted for the core target proteins and the potential active components of S. baicalensis screened out. GO functional enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis were performed on the effective targets using

基金项目：安徽中医药大学大学生创新创业重点项目（202006180204）
第一作者简介：孙宇洁，本科生。
通信作者：黄 莉，研究生，讲师。Email：371303616@qq.com

the DAVID database. **Results** We screened out 36 compounds of S. baicalensis and 96 effective targets. The Venn diagram showed 44 common targets of the drug and the disease. The PPI network found that IL-6, VEGFA, PTGS2, FOS, JUN, and MMP9 were the key targets for S. baicalensis treating RA. GO functional analysis found 75 terms, involving growth factor activity, regulation of biosynthesis, enzyme activity, transcription factor activity and receptor activity, and cytokine activity. KEGG pathway analysis revealed 24 terms, involving apoptosis, the PI3K-Akt pathway, the MAPK pathway, the HIF-1 pathway, osteoclast differentiation, cell senescence, and chemokine pathways. Molecular docking showed that PTGS2, ESR1, and RELA had a good binding affinity with coptisine, epiberberine, and acacetin (active components of S. baicalensis), respectively, suggesting that S. baicalensis can interfere with RA through PTGS2, ESR1, and RELA. **Conclusion** Multiple components, targets, and pathways are involved in the mechanism of action of S. baicalensis in treating RA. This finding lays a foundation for in-depth exploration of its material basis and mechanism of action, and provides new ideas for clinical use of medication.

【Key words】 Scutellaria baicalensis Rheumatoid arthritis Network pharmacology Mechanism of action Signaling pathway

黄芩(scutellaria baicalensis),又名空心草、黄金茶,唇形科植物。黄芩的根,《药性论》载其:“能治热毒骨蒸……去关节烦闷”。黄芩性寒味苦,归肺、心、胆、大肠经,具有清热燥湿、泻火解毒等功效。现代药理研究发现,黄芩的主要活性成分为黄酮及其苷类、萜类化合物及挥发油等,具有抗炎、解热、杀灭微生物、抑制肿瘤生长等作用,对消化系统、心血管系统、神经系统等多系统的疾病均具有治疗作用[1]。

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis,RA)是一种发病机制十分复杂的滑膜关节自身免疫病,典型临床表现为关节滑膜的慢性炎症和关节外血管翳的形成,进一步可累及关节软骨和骨,最终可致关节畸形和功能丧失[2]。由于RA的发病机制目前尚未明确,治疗原则主要是通过延缓疾病进展和降低风湿活动性来减少关节损伤和预防长期残疾,并无规范的治疗方案。临床主要采用非甾体抗炎药、地塞米松、甲氨蝶呤等,然而这些药物长期服用会引起胃、肝、肾等多个脏腑功能的不良反应,对机体伤害较大[3]。因此,开发高疗效、低副作用、低毒性的新型RA药物具有重要的临床应用价值。中药在治疗RA方面的优势亟待开发,具有广阔的研究前景。本文旨在运用网络药理学技术初步探究黄芩治疗RA的生物学过程,从靶点、信号通路的角度揭示其治疗机制,为实验研究及未来临床应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 药物活性成分及作用靶点的筛选

通过检索中药系统药理学分析平台(traditional chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP)(http://lsp.nwsuaf.edu.cn/tcmsp.php)检索黄芩的化学成分,以口服生物利用度(oral bioavailability,OB)≥ 30%和药物相似性(drug likeness,DL)≥ 0.18作为筛选条件,时间截止至2020年4月10日,筛选出活性成分较高的化合物,同时利用此平台下载相关有效成分对应的蛋白作用靶点。

1.2 RA相关靶点的筛选

将“rheumatoid arthritis”作为关键词,对GeenCards数据库(https://www.genecards. org/)、OMIM数据库(http://www.omim.org/)进行检索,将两个数据库的检索结果合并后去除重复后作为疾病靶点数据库备用。

1.3 黄芩-RA靶点网络的建立及可视化

利用Venn在线软件(http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/)将药物与疾病靶点取交集,通过Venn图的形式展现黄芩与RA靶点间存在的交集靶点,运用Cytoscape 3.7.2(http://www.Cytoscape.org/)软件构建黄芩治疗RA的“化合物-靶点-疾病”相互作用网络图。

1.4 蛋白相互作用网络(PPI网络)的构建

将筛选得到的药物-疾病共同靶蛋白上传至String(https://string-db.org/)在线平台数据库进行蛋白质与蛋白质相互作用(protein-protein interaction,PPI)分析,限定研究物种为“人”(“homo sapiens”),参数保持默认设置,获得PPI网络。

1.5 GO功能分析和KEGG通路富集分析

将黄芩的有效作用靶点上传至David 6.8(database for annotation, visualization and integrated discovery)数据库(https://david.ncifcrf.gov/, version 6.8),指定研究对象为人类进行基因功能(GO,gene ontology)分析,获取靶点主要的作用过程,同时基于京都

基因与基因组百科全书(KEGG,kyoto encyclopedia of genes and geomes)(https://www.kegg.jp/)进行通路富集分析,观察黄芩与RA共同靶点在通路中的分布情况。以$P<0.01$进行靶基因筛选,得到黄芩靶点主要的生物过程和药理作用机制中可能性较大的通路,并进一步筛选与RA相关的信号通路。

1.6 分子对接

检索RSCB PDB数据库(http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do)并下载RA靶蛋白的3D结构,检索并下载TCMSP数据库黄芩活性成分的2D结构,利用Chem 3D对活性成分小分子逐个进行结构优化。利用PyMOL 2.4.0软件对RA靶蛋白进行除水、分离原配体等预处理。利用AutoDock的可视化软件AutoDock Tools 1.5.6软件设置GridBox各项参数,寻找活性口袋,并将活性小分子、预处理后的靶蛋白都转换成pdbqt格式文件,应用AutoDock Vina软件进行分子对接,最后运用PyMOL、LigPlot+软件对对接结果进行三维和二维可视化分析。

2 结果

2.1 黄芩活性成分的筛选

在TCMSP数据库中搜索黄芩化学成分,共得到143个化学成分,再对其ADME参数进行筛选,以OB≥30和DL≥0.18为筛选条件,同时筛去无对应靶点的成分,最终共获得36个黄芩潜在的有效成分,见表1。

表1 黄芩潜在有效成分

分子ID	化合物名称	OB(%)	DL
MOL002934	黄芩新素(neobaicalein)	104.34	0.44
MOL002932	降穿心莲黄酮(panicolin)	76.26	0.29
MOL012246	5,7,4'-三羟基-8-甲氧基黄酮(5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavanone)	74.24	0.26
MOL002927	头骨黄酮(skullcapflavone ii)	69.51	0.44
MOL002911	2,6,2',4'-四羟基-6'-甲氧基酞酮(2,6,2',4'-tetrahydroxy-6'-methoxychaleone)	69.04	0.22
MOL002937	帝多罗辛林(dihydrooroxylin)	66.06	0.23
MOL000228	(2r)-7-羟基-5-甲氧基-2-苯基染色体-4-酮((2r)-7-hydroxy-5-methoxy-2-phenylchroman-4-one)	55.23	0.2
MOL002915	丹参碱(salvigenin)	49.07	0.33
MOL000073	表儿茶酸(ent-epicatechin)	48.96	0.24
MOL002917	5,2',6'-三羟基-7,8-二甲氧基黄酮(5,2',6'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone)	45.05	0.33
MOL008206	苏芹黄酮(moslosooflavone)	44.09	0.25
MOL000449	豆甾醇(stigmasterol)	43.83	0.76
MOL001490	双[(2s)-2-乙基己基]苯-1,2-二羧酸盐(bis[(2s)-2-ethylhexyl] benzene-1,2-dicarboxylate)	43.59	0.35
MOL002879	邻苯二甲酸二异辛酯(diop)	43.59	0.39
MOL002897	表小檗碱(epiberberine)	43.09	0.78
MOL002928	千层纸素(oroxylin a)	41.37	0.23
MOL002914	乙二醇(黄酮)(eriodyctiol (flavanone)	41.35	0.24
MOL002910	红花素(carthamidin)	41.15	0.24
MOL002913	二氢黄芩苷(dihydrobaicalin_qt)	40.04	0.21
MOL000525	诺瓦戈宁(norwogonin)	39.4	0.21
MOL010415	11,13-二十碳二烯酸,甲酯(11,13-eicosadienoic acid, methyl ester)	39.28	0.23
MOL002926	二氢氧基蛋白(adihydrooroxylin a)	38.72	0.23
MOL012266	半枝莲素(rivularin)	37.94	0.37
MOL002908	5,8,2'-三羟基-7-甲氧基黄酮(5,8,2'-trihydroxy-7-methoxyflavone)	37.01	0.27
MOL002925	5,7,2',6'-泰特拉羟基黄酮(5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone)	37.01	0.24
MOL000359	β-谷甾醇(β-sitosterol)	36.91	0.75
MOL000359	谷甾醇(sitosterol)	36.91	0.75
MOL012245	5,7,4'-三羟基-6-甲氧基黄酮(5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavanone)	36.63	0.27
MOL002933	5,7,4'-三羟基-8-甲氧基黄酮(5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavone)	36.56	0.27
MOL001689	刺槐素(acacetin)	34.97	0.24
MOL002909	5,7,2,5-四羟基-8,6-二甲氧基黄酮(5,7,2,5-tetrahydroxy-8,6-dimethoxyflavone)	33.82	0.45
MOL001506	鲨烯(supraene)	33.55	0.42
MOL002714	黄芩甙元(baicalein)	33.52	0.21
MOL000552	5,2'-二羟基-6,7,8-三甲氧基黄酮(5,2'-dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone)	31.71	0.35
MOL000173	汉黄芩素(wogonin)	30.68	0.23
MOL001458	黄连碱(coptisine)	30.67	0.86

2.2 黄芩活性成分-RA靶点预测

将从数据库得到的所有成分和靶点去重整合,得到36种活性成分及483个靶点,靶点数较多的活性成分的潜在靶基因见表2(靶点数≥11),通过Unipot数据库进行标准化处理,汇总去重后得到96个靶点。设置relevance score≥7,由GeneCards、OMIM数据库检索整合去重后得到RA靶点共计1 085个,将黄芩活性成分与RA各自对应靶点取交集,得到活性成分-疾病靶点44个,对应的韦恩图见图1。

表2 黄芩活性成分的潜在靶基因和靶点数(靶点数≥11)

分子ID	靶基因	靶点数
MOL000173	NOS2、PTGS1、ESR1、AR、SCN5A、PPARG、PTGS2、RXRA、MAPK14、GSK3B、CHEK1、PRSS1、ADRB2、GABRA1、RELA、AKT1、CCND1、BCL2、CDKN1A、EIF6、BAX、CASP9、KDR、TNFSF15、JUN、IL6、AHSA1、CASP3、TP63、BBC3、TEP1、MMP1、CCL2、PRKCD、PTGER3、FN1、CXCL8、MCL1	38
MOL002714	PTGS1、AR、PTGS2、PRSS1、NCOA2、NCOA1、RELA、AKT1、VEGFA、BCL2、FOS、BAX、MMP9、CASP3、TP63、HIF1A、FOSL1、FOSL2、CCNB1、MPO、AHR、IGF2、CYCS、ALOX12、NFATC1、TDRD7、EGLN1、NOX5、APOD	29
MOL000358	PGR、NCOA2、PTGS1、PTGS2、KCNH2、CHRM3、CHRM1、SCN5A、CHRM4、ADRA1A、CHRM2、ADRA1B、ADRB2、CHRNA2、SLC6A4、OPRM1、GABRA1、BCL2、BAX、CASP9、JUN、CASP3、CASP8、PRKCA、PON1、MAP2、	26
MOL000449	PGR、NR3C2、NCOA2、ADH1C、RXRA、NCOA1、PTGS1、PTGS2、ADRA2A、SLC6A2、SLC6A3、ADRB2、AKR1B1、PLAU、LTA4H、MAOB、MAOA、CTRB1、CHRM3、CHRM1、ADRB1、SCN5A、ADRA1A、CHRM2、ADRA1B、GABRA1、	26
MOL001689	NOS2、PTGS1、AR、PTGS2、PRSS1、NCOA2、NCOA1、CHEK1、ADRB2、RELA、BCL2、CDKN1A、BAX、CASP3、TP63、CASP8、FASN、FASLG	18
MOL002928	NOS2、PTGS1、AR、SCN5A、PTGS2、RXRA、ADRA1B、ADRB2、PRSS1、NCOA1、NCOA2、PKIA、BCL2、IL6、CASP3、CYP1A2、CCNB1、CYP2C9	18
MOL008206	NOS2、PTGS1、AR、SCN5A、PPARG、PTGS2、RXRA、ESR2、GABRA1、MAPK14、GSK3B、CHEK1、PRSS1、NCOA1、ADRA1B、ADRB2、	16
MOL000228	PTGS1、CHRM3、CHRM1、ESR1、SCN5A、PTGS2、RXRA、ADRA1A、ADRA1B、SLC6A3、ADRB2、SLC6A4、GABRA1、PKIA、MAOB	15
MOL002934	NOS2、KCNH2ESR1、AR、SCN5A、PPARG、PTGS2、F7、ESR2、PYGM、GSK3B、CHEK1、PRSS1、NCOA2	14

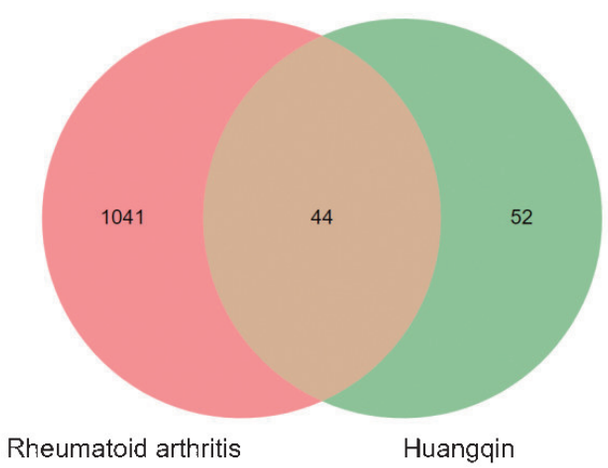


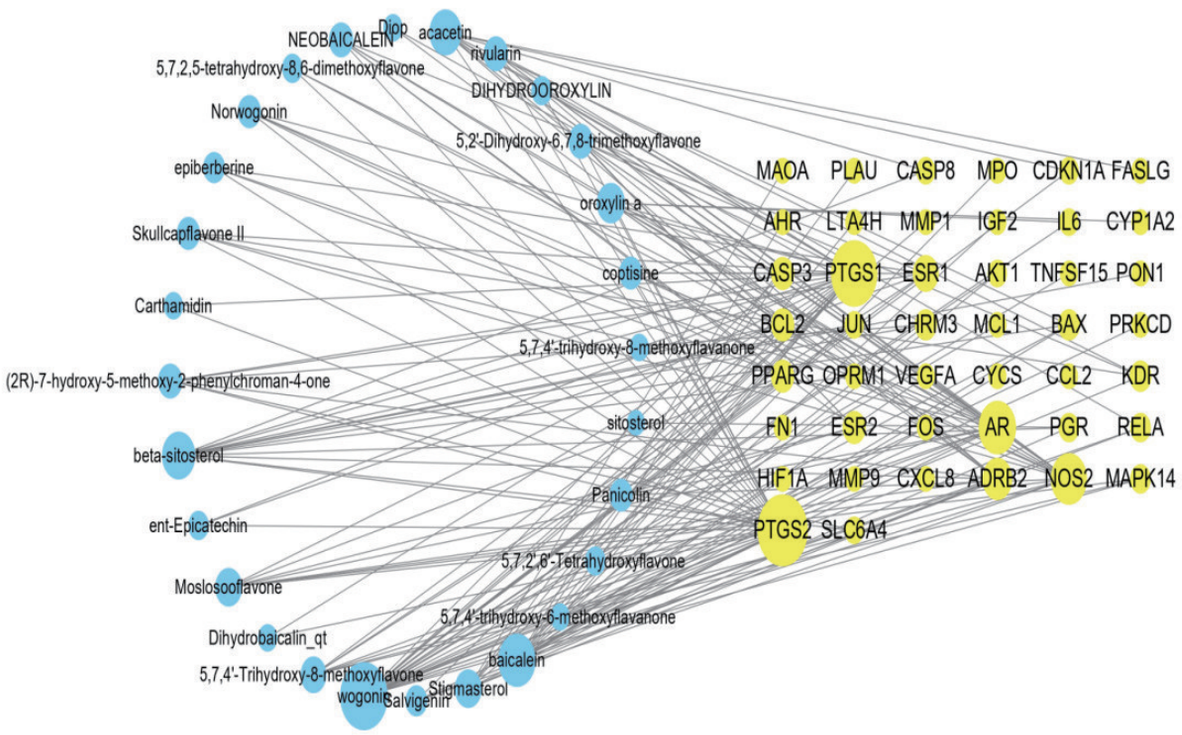
图1 黄芩活性成分与RA基因靶点映射Venn图

2.3 “化合物-靶点-疾病”的网络构建及可视化分析

为更直观的显示黄芩有效成分、靶点与疾病之间的相互作用关系,利用Cytoscape 3.7.2软件构建黄芩与RA的44个共同靶点的“化合物-靶点-疾病”可视化网络图(见图2),结果显示,黄芩中发挥抗RA作用的化学成分主要有豆甾醇(stigmasterol)、β-谷甾醇(beta-sitosterol)、黄芩甙元(baicalein)、汉黄芩素(wogonin)等,协同作用于一氧化氮合酶2(NOS2)、雄激素受体(AR)、前列腺素内过氧化物合成酶1(PTGS1)、前列腺素内过氧化物合成2(PTGS2)、β-2肾上腺素能受体(ADRB2)、胱天蛋白酶3(CASP3)等靶点。

2.4 黄芩治疗RA的PPI网络

设置置信度大于0.4,将Venn图获得的44个药物-疾病共同靶点上传至STRING在线数据库平台得到PPI网络(见图3)。据Count值筛选列举出黄芩治疗RA的关键靶点蛋白(见图4),主要包括白细胞介素-6(IL-6)、磷酸化蛋白激酶1(AKT1)、血管内皮生长因子A(VEGFA)、Jun激酶(JUN)、胱天蛋白酶3(CASP3)、前列腺素内过氧化物合成2(PTGS2)、基质金属蛋白酶9(MMP9)等。



注：蓝色圆形节点代表药对黄芩有效成分化合物，黄色圆形节点代表作用靶点，灰色线条代表相互作用关系，节点大小与其对应评分成正比

图2 “化合物-靶点-疾病”可视化网络图

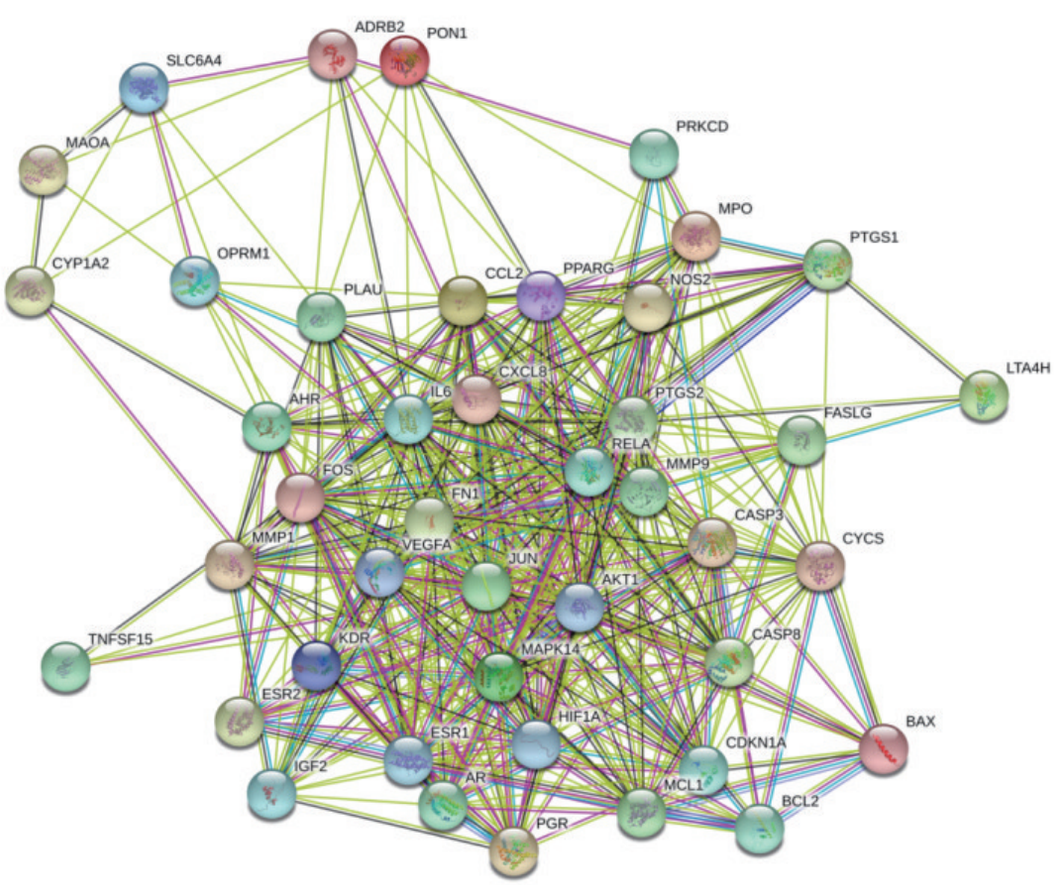
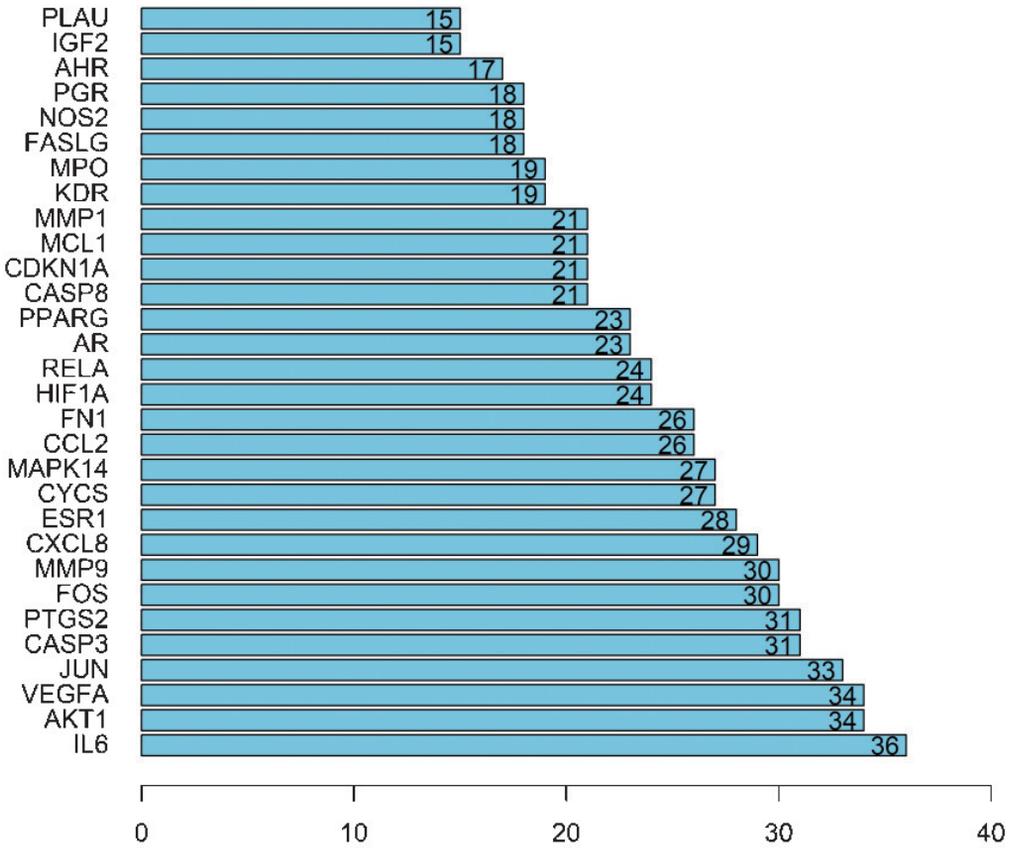


图 3 黄芩治疗RA相关靶点的PPI网络



注:横坐标为对应关键靶点出现频次

图4 黄芩治疗RA的关键靶点

2.5 黄芩有效成分-靶点-分子功能的GO富集分析

将黄芩有效组分与RA的共同44个靶点导入DAVID 6.8数据库,筛选物种为人源(homo sapiens),获得GO生物学过程条目75条,涉及到生长因子活性、生物合成过程调控、酶活性、转录因子活性及受体活性、细胞因子活性等各方面,选取GO富集分析结果所得出的前20位相关靶点分子功能,绘制相应的黄芩有效成分-靶点-对应分子功能的GO富集分析柱状以及气泡图,见图5。结果显示黄芩活性成分与靶点对应的分子功能主要为核受体活性、转录因子活性、细胞因子受体结合、类固醇激素受体活性、血红素结合等方面、蛋白质异源二聚体活动、四吡咯结合、RNA聚合酶II近端启动子序列特异性DNA结合、BH域结合、近端启动子序列特异性DNA结合。

2.6 黄芩治疗RA的KEGG通路富集分析

在DAVID 6.8在线数据库中对44个靶点进行富集分析,以$P<0.01$为筛选标准,最终得出24条通路富集结果,见表3,主要是细胞凋亡、PI3K-Akt信号通路、内分泌抵抗、MAPK信号通路、铂类耐药、HIF-1信号通路、p53信号通路、EGFR酪氨酸激酶抑制剂耐药、破骨细胞分化、细胞衰老、焦点粘连、Ras信号通路、细多种胞凋亡、VEGF信号通路、NF-kappa B信号通路、鞘脂类信号通路、FoxO信号通路、趋化因子信号通路等信号通路。

2.7 黄芩活性成分治疗RA分子对接结果分析

使用Cytoscape中的CytoNCA对RA靶点进行打分,得到网络核心靶点,Degree ≥ 13的潜在靶点有14个,分别为:FOS、JUN、IL6、VEGFA、CXCL8、RELA、CASP3、MMP9、ESR1、CYCS、AKT1、MAPK14、PTGS2、CCL2。结合能小于0提示配体与受体可自发结合,且结合构象越稳定,所需结合能越低,本研究选取结合能 ≤ -9.0 kcal/mol作为筛选条件,见表4。

选取结合最稳定的7对配体受体组合(结合能 ≤ -9.4 kcal/mol,进行可视化分析,相对应三维与二维对接模式图,见图6。

表3 KEGG通路富集

ID	通路	pvalue	基因数量
hsa04210	Apoptosis	1.17E−09	11
hsa04151	PI3K−Akt signaling pathway	1.96E−05	11
hsa01522	Endocrine resistance	7.51E−10	10
hsa04010	MAPK signaling pathway	2.33E−05	10
hsa01524	Platinum drug resistance	2.60E−08	8
hsa04066	HIF−1 signaling pathway	6.14E−07	8
hsa04115	p53 signaling pathway	8.69E−06	6
hsa01521	EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	1.49E−05	6
hsa04380	Osteoclast differentiation	2.26E−04	6
hsa04218	Cellular senescence	7.50E−04	6
hsa04510	Focal adhesion	2.32E−03	6
hsa04014	Ras signaling pathway	4.96E−03	6
hsa04215	Apoptosis − multiple species	2.23E−06	5
hsa04370	VEGF signaling pathway	4.84E−05	5
hsa04064	NF−kappa B signaling pathway	7.06E−04	5
hsa04071	Sphingolipid signaling pathway	1.30E−03	5
hsa04068	FoxO signaling pathway	1.99E−03	5
hsa04062	Chemokine signaling pathway	9.49E−03	5
hsa04024	cAMP signaling pathway	1.62E−02	5
hsa04211	Longevity regulating pathway	3.23E−03	4
hsa04140	Autophagy − animal	1.46E−02	4
hsa00590	Arachidonic acid metabolism	9.32E−03	3
hsa04137	Mitophagy − animal	1.02E−02	3

表4 黄芩活性成分与靶蛋白的结合能

靶蛋白	活性成分	Grid box（x×y×z）	活性中心	结合能
PTGS2	coptisine	70×80×80	（31.054，24.187,23.582）	−10.7
	epiberberine	66×78×80		−10.2
	acacetin	70×92×84		−9.4
	5,7,2',6'−Tetrahydroxyflavone	60×78×80		−9.4
	5,7,4'−trihydroxy−6−methoxyflavanone	68×80×80		−9.4
	baicalein	64×90×80		−9.3
	oroxylin a	66×86×80		−9.3
	panicolin	74×80×82		−9.3
	norwogonin	66×86×80		−9.3
	ent−epicatechin	66×90×90		−9.3
	salvigenin	68×80×80		−9.2
	dihydroorox ylin	80×90×80		−9.2
	(2R)−7−hydroxy−5−methoxy−2−phenylchroman−4−one	66×80×78		−9.0
ESR1	epiberberine	50×56×58	（8.996,46.781，17.765）	−9.7
RELA	baicalein	90×92×92	（62.502，11.629,37.997）	−9.4
	acacetin	86×78×82		−9.2
	wogonin	88×102×104		−9.1
MAPK14	wogonin	62×46×36	（−6.84，3.852,−15.66）	−9.1

3 讨论

本研究运用网络药理学方法探讨研究了黄芩治疗类风湿关节炎的相互作用网络与潜在治疗机制，综合表1、表2及图2可得出黄芩主要有效化合物有36个，其治疗类风湿关节炎的关键成分有6个，为豆甾醇、β−谷甾醇、黄芩甙元及汉黄芩素。豆甾醇可改善RA大鼠的临床严重程度关节破坏和组织结构，还可下调关节中NF−κBp65和p38MAPK的表达，显著抑制促炎介质（TNF−抑制剂、IL−6、IL−1抑制剂、iNOS和COX−2）在机体内的表达，增加抗炎细胞因子（IL−10）的表达[4]。当RA组织内巨噬细胞被高度激活时局部炎症增强，可加速RA的发展。β−谷甾醇可抑制巨噬细胞促炎症因子的产生，降低特异性抗体IgG的浓度，以此机制达到治疗RA的作用[5]。黄芩甙元对肿瘤坏死因子−α（TNF−α）所介导的类风湿关节炎成纤维（RAFLS）增殖过程有显著的抑制作用，能够被巨噬细胞游走抑制（MIF）逆转并呈剂量依赖性，提示黄芩甙元可能通过抑制MIF信号通路来实现对TNF−α介导的RAFLS增殖的抑制作用[6]。汉黄芩素可抑制RA的成纤维样滑膜细胞（FLS）中IL−6 mRNA的表达，对RA的FLS增殖有明显的抑制作用[7]。以上研究提示豆甾醇、β−谷甾醇、黄芩甙元及汉黄芩素为黄芩治疗RA的重要活性成分。

结合图1、2、3、4可知，黄芩对应96个有效作用靶点，类风湿关节炎对应1 085个靶点，二者共有44个交集靶点，其中关键作用靶点有IL−6、VEGFA、PTGS2、FOS、JUN、MMP9等。IL−6可诱导中性粒细胞产生血小板活化因子（PAF），PAF可通过扩大炎症反应刺激FLS增殖，促进血瘀形成，从而间接影响RA药物在体内的吸收、代谢、分布[8]。此外，RA发病的关键机制之一是IL−6对骨组织的多效性作用，IL−6可促使核因子κB受体活化配体（RANKL）的表达[9]。有研究显示，功能单核苷酸多态性VEGFA的等位基因的表达可能降低老年患者和环瓜氨酸抗体（ACPA）阴性患者患RA的风险[10]。在RA中，PTGS2可促进FLS增殖和炎症反应，PTGS2的降低可起到挽救被抑制的miR−101−3p在RA大鼠滑膜损伤和FLS表型改变的作用[11]。有研究显示，许多参与促炎/促破坏特性的关键蛋白，如趋化因子/细胞因子和基质降解酶，都受到AP−1及其亚基JUN、JUNB、JUND和FOS的转录调控。FOS启动子（rs2239615、rs7101）和JUN启动子（rs4647009）的功能变异在RA病例、

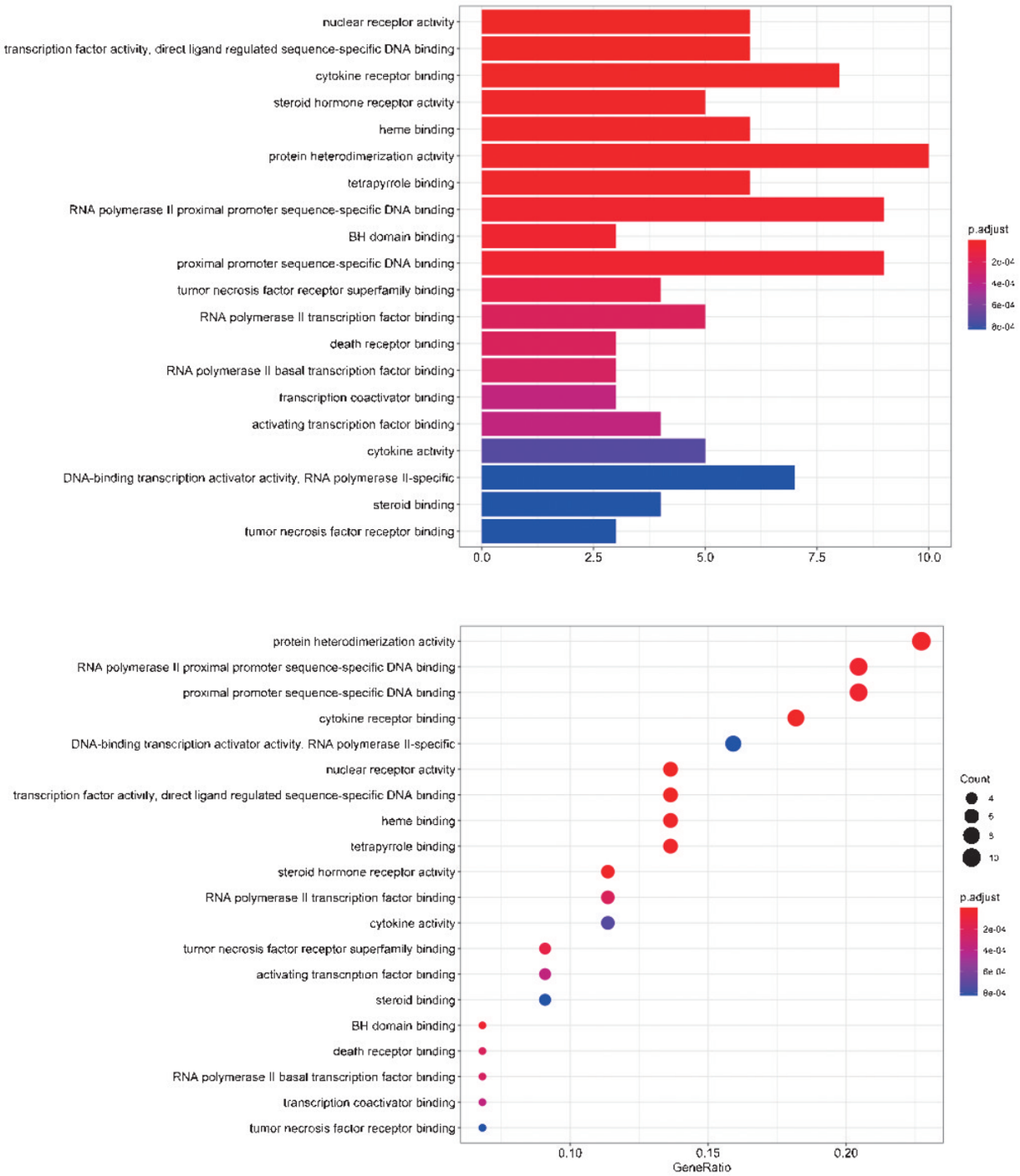
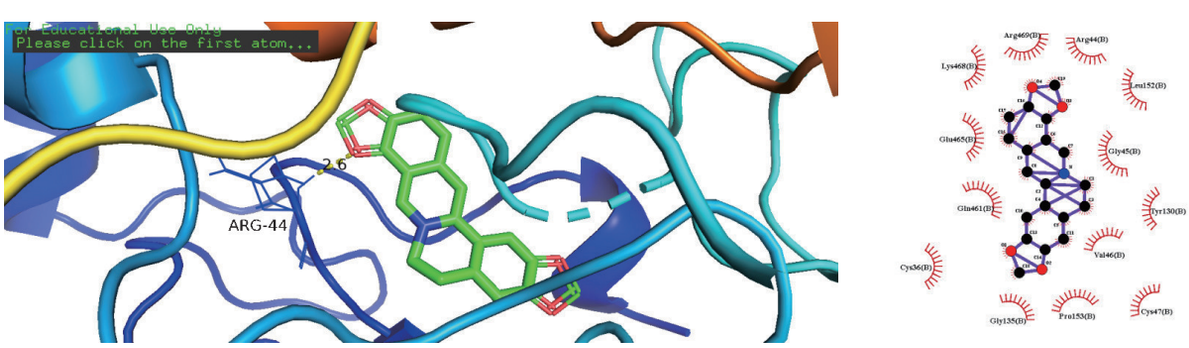
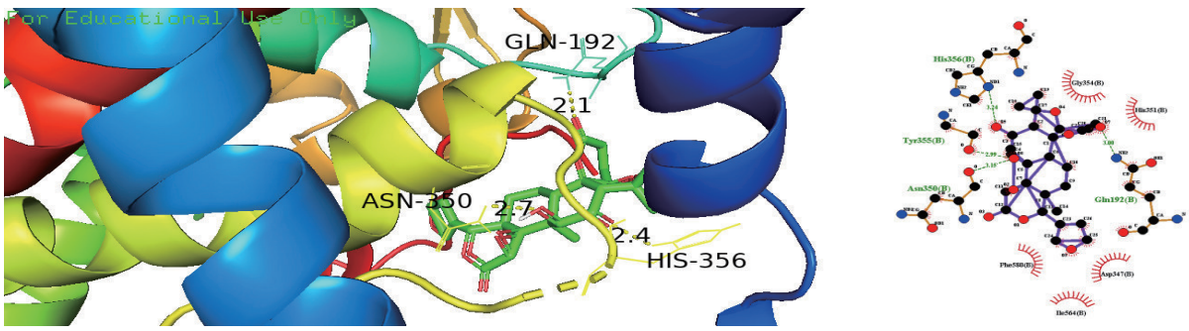


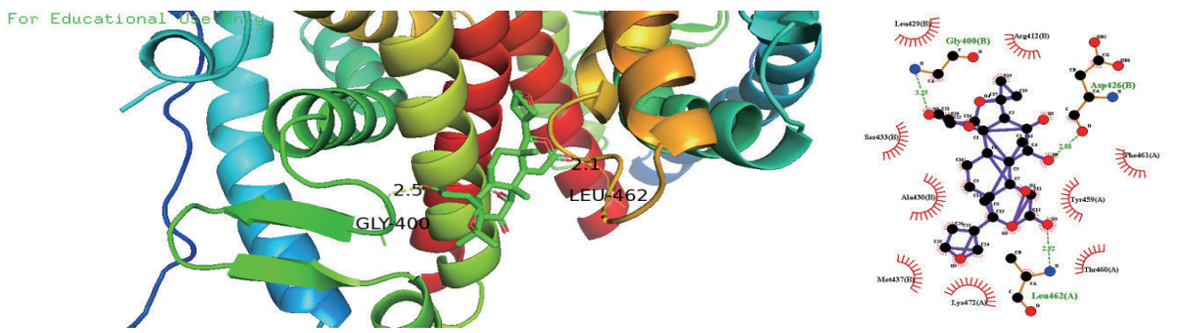
图5 有效组分-基因靶点-分子功能的GO富集分析柱状和气泡图



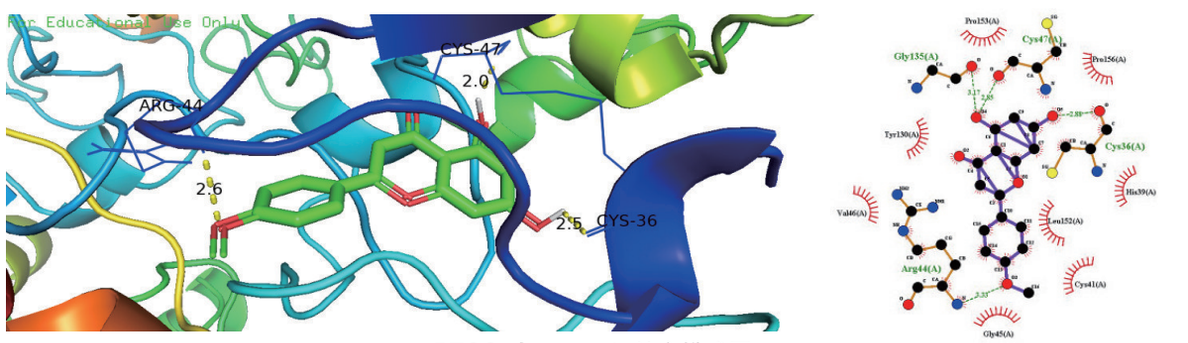
PTGS2与coptisine结合模式图



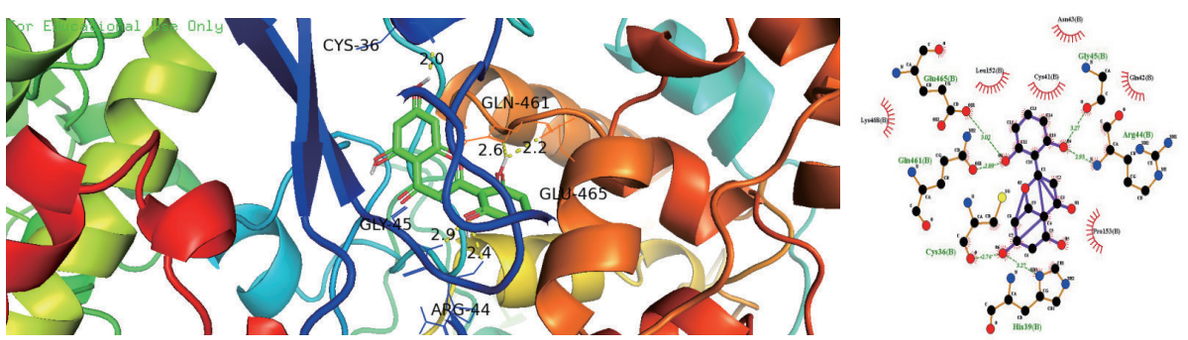
PTGS2与epiberberine结合模式图



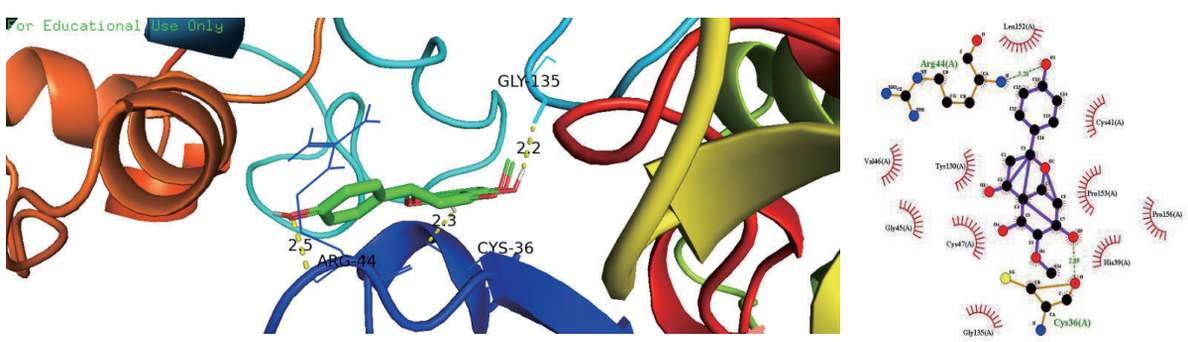
ESR1与epiberberine结合模式图



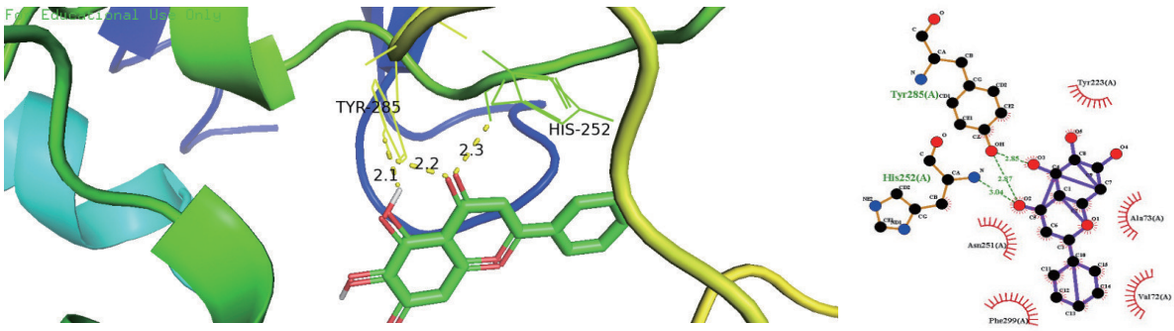
PTGS2与acacetin结合模式图



PTGS2与5,7,2',6'-Tetrahydroxyflavone结合模式图



PTGS2与5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavanone结合模式图



RELA与baicalein结合模式图

图6 黄芩活性成分与靶蛋白对接二维及三维图(结合能 ≤ −9.4 kcal/mol)

膝关节炎病例和NC人群中频繁出现[12]。MMP9可浸润滑膜和软骨下骨组织(包括破骨细胞)中的炎症细胞、血管膜组织和多核细胞[13]。MMP9参与RA中关节的破坏,激活细胞因子和趋化因子,并通过降解上皮基底膜和血管系统促进组织破坏[14]。

对关键靶点进行GO功能富集分析和KEGG通路富集分析,对探究黄芩治疗RA的作用机制进一步进行探究。结果显示,富集的生物学过程主要包括核受体活性、转录因子活性、细胞因子受体结合、类固醇激素受体活性、血红素结合、蛋白质异源二聚体活动、四吡咯结合、RNA聚合酶II近端启动子序列特异性DNA结合、BH域结合、近端启动子序列特异性DNA结合等方面。KEGG通路富集分析得出,这些共同靶点参与了细胞凋亡、PI3K-AKT信号通路、MAPK信号通路、HIF-1信号通路、破骨细胞分化、细胞衰老、趋化因子信号通路等信号通路的功能的调控。在有关RA病机的研究中,研究人员在细胞凋亡时发现存在冲动可在病理细胞的大量积累时,可通过不同类型的干扰,致使正常滑膜细胞进一步凋亡,经体外研究证实,这种由细胞凋亡干扰所引起的滑膜细胞集聚被认为是TNF和其他细胞因子的来源[15]。PI3K-AKT信号通路已被证实与免疫系统介导的疾病存在相关性[16]。MAPK信号通路负责调节产生促炎细胞因子的过程,该过程最终可导致关节发炎和破坏[17]。RA患者滑膜组织可能通过下调MAPK通路负向调节成骨细胞增殖[18]。Xue等[19]研究表明,在关节软骨细胞的自噬和骨关节炎炎症反应过程中,PI3K-AKT信号降低,该现象从侧面反映了PI3K-AKT信号通路与RA发病的关联性。Malemud[20]的研究成果也显示PI3K-AKT信号在RA细胞死亡中起关键作用。抗RA的药物通过调节MAPK和VEGF信号通路来抑制炎症细胞因子的产生和表达,来减少胶原蛋白的产生、抑制滑膜细胞增殖并减弱其侵袭能力,从而发挥抗RA的作用。HIF-1参与了多条细胞信号通路的作用过程[21],B细胞中HIF-1α的高表达可通过促使机体内IL-6的产生进而影响T细胞的分化[22]。骨细胞分化通路与RA滑膜中许多物质改变的通路有联系。已有证据表明,RA滑膜中所含有的破骨细胞可导致相应受累关节的骨降解。Harshan等[23]证明了中性粒细胞胞浆因子(NCF)复合物在RA滑膜中可产生活性氧(ROS)来驱动破骨细胞形成的信号通路上调。证明了T细胞受体信号通路的增强促进了受影响组织中破骨细胞的分化。类风湿关节炎发病早期,淋巴结间质细胞(LNSCs)的衰老可能加速病情的发展,LNSCs是外周耐受性的重要调节因子,与淋巴细胞的接触密切,因此,功能失调的衰老LNSCs会潜在地导致外周耐受性缺陷病和全身性自身免疫病的发病[24]。由趋化因子及其受体所介导的白细胞迁移在类风湿滑膜类炎症的迁延过程中发挥了重要的作用,该途径可致RA滑膜细胞和破骨细胞对软骨和骨的破坏[25]。

本研究通过分子对接,发现PTGS2与黄芩中黄连碱、表小檗碱、刺槐素、5,7,2',6'-泰特拉羟基黄酮、5,7,4'-三羟基-6-甲氧基黄酮、黄芩甙元和千层纸素等13种化学成分均与具有较好的结合性,对13种化学成分与PTGS2的结合模式进行分析,发现多个化合物与结合区域内的氨基酸残基Arg44、氨基酸残基Cys36形成了较强的分子间氢键。同时,图表显示ESR1、RELA与多个黄芩活性成分具有较好的结合性,提示黄芩可通过PTGS2、ESR1、RELA途径干预RA的活动。

4 结论

本文采用网络药理学为研究方法,构建"黄芩有效成分-靶点-RA"网络,同时从整体上分析了黄芩成分-靶点-信号通路之间的相互作用关系,推测中药黄芩可通过豆甾醇、β-谷甾醇、黄芩甙元、汉黄芩素等潜在药效成分协同作用于NOS2、PTGS1、AR、PTGS2、ADRB2、RELA、BCL2、CDKN1A、BAX、CASP3等多个靶点,通过细胞凋亡、PI3K-AKT信号通路、MAPK信号通路、HIF-1信号通路、破骨细胞分

化、细胞衰老、趋化因子信号通路等多个信号通路协同作用，共同发挥治疗类风湿关节炎的作用，初步揭示了黄芩治疗RA的作用机制。但由于数据库中纳入的数据来源于不同的试验条件以及研究领域的局限性，且中药在煎煮提取过程中可能产成新成分的或破坏原有成分，故纳入数据分析的成分不能完整全面反映其实际作用于人体的成分。因此，本文对于未来更深入的机制研究具有一定的参考价值，但黄芩治疗RA的具体机制有待更进一步的实验验证。

参 考 文 献

[1] 郑勇凤，王佳婧，傅超美，等. 黄芩的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中成药，2016，38(1)：141-147.

[2] Taylor PC，Atzeni F，Balsa A，*et al*. The key comorbidities in patients with rheumatoid arthritis：a narrative review[J]. J Clin Med，2021，10(3)：509.

[3] Littlejohn EA，Monrad SU. Early diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis[J]. Prim Care，2018，45(2)：237-255.

[4] Ahmad Khan M，Sarwar AHMG，Rahat R，*et al*. Stigmasterol protects rats from collagen induced arthritis by inhibiting proinflammatory cytokines[J]. Int Immunopharmacol，2020，85：106642.

[5] Liu R，Hao DL，Xu WY，*et al*. β-Sitosterol modulates macrophage polarization and attenuates rheumatoid inflammation in mice[J]. Pharm Biol，2019，57(1)：161-168.

[6] 赵云龙. 黄芩甙元抑制肿瘤坏死因子-α 介导的人类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖的作用机制研究[D]. 南京：南京大学，2016.

[7] 李曼，黄少芳，吴子安，等. 汉黄芩素对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞及白细胞介素6表达影响的体外研究[J]. 河北中医，2018，40(5)：746-749.

[8] 孙莉，王晓非. 血常规指标判断类风湿关节炎活动性意义的研究进展[J]. 山东医药，2019，59(2)：104-106.

[9] 徐鹏，邹任玲，张冬青. BMP和IL-6信号分子在类风湿关节炎中研究进展[J]. 中国免疫学杂志，2017，33(4)：611-614，620.

[10] Zhang Y，Qiu H，Zhang H，*et al*. Vascular endothelial growth factor A (VEGFA) polymorphisms in Chinese patients with rheumatoid arthritis[J]. Scand J Rheumatol，2013，42(5)：344-348.

[11] Wei QF，Lv F，Zhang HJ，*et al*. MicroRNA-101-3p inhibits fibroblast-like synoviocyte proliferation and inflammation in rheumatoid arthritis by targeting PTGS2[J]. Biosci Rep，2020，40(1)：BSR20191136.

[12] Huber R，Kirsten H，Näkki A，*et al*. Association of human FOS promoter variants with the occurrence of knee-osteoarthritis in a case control association study[J]. Int J Mol Sci，2019，20(6)：1382.

[13] Giani T，Margheri F，Del Rosso M，*et al*. P092/O15 Synovial derived Th17-lymphocytes from patients with juvenile idiopathic arthritis induce cartilage degradation by synovial fibroblasts mediated by MMP9 in an experimental animal model[J]. Ann Rheum Dis，2019，78:A40.

[14] Kim S，Carr B，Tong L，*et al*. OP0089 Combination therapy of selective MMP9 and TNF inhibitors are efficacious in the mouse CIA model of rheumatoid arthritis[J]. Ann Rheum Dis，2017，76：89.

[15] Fassbender HG，Strack K，Ernst N. Relevance of apoptosis and proliferation in rheumatoid arthritis[J]. Acta Clin Croat，2005，44(2)：223-224.

[16] Liang YJ，Li H，Gong XB，*et al*. Long Non-coding RNA THRIL mediates cell growth and inflammatory response of fibroblast-like synoviocytes by activating PI3K/AKT signals in rheumatoid arthritis[J]. Inflammation，2020，43(3)：1044-1053.

[17] Yang GL，Chang CC，Yang YW，*et al*. Resveratrol alleviates rheumatoid arthritis via reducing ROS and inflammation，inhibiting MAPK signaling pathways，and suppressing angiogenesis[J]. J Agric Food Chem，2018，66(49)：12953-12960.

[18] Zheng WW，Gu XP，Hu D，*et al*. Co-culture with synovial tissue in patients with rheumatoid arthritis suppress cell proliferation by regulating MAPK pathway in osteoblasts[J]. Am J Transl Res，2019，11(6)：3317-3327.

[19] Xue JF，Shi ZM，Zou J，*et al*. Inhibition of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway promotes autophagy of articular chondrocytes and attenuates inflammatory response in rats with osteoarthritis[J]. Biomed Pharmacother，2017，89：1252-1261.

[20] Malemud CJ. The PI3K/Akt/PTEN/mTOR pathway：a fruitful target for inducing cell death in rheumatoid arthritis?[J]. Future Med Chem，2015，7(9)：1137-1147.

[21] 滑雅娜，鲁芙爱，王永福. HIF-1相关信号通路及其在自身免疫性疾病中作用[J]. 中国免疫学杂志，2019，35(8)：1013-1017.

[22] 范超凡. HIF-1α 促进B细胞分泌IL-6诱导Tfh细胞分化参与RA发病[D]. 上海：上海交通大学，2019.

[23] Harshan S，Dey P，Ragunathan S. Effects of rheumatoid arthritis associated transcriptional changes on osteoclast differentiation network in the synovium[J]. PeerJ，2018，6：e5743.

[24] De Jong TA，Timmerman AL，Semmelink JF，*et al*. P112 Studying cellular senescence in human lymph node stromal cells during the earliest phases of rheumatoid arthritis[J]. Ann Rheum Dis，2019，78：A49-A50.

[25] Zhang L，Yu M，Deng JY，*et al*. Chemokine signaling pathway involved in CCL2 expression in patients with rheumatoid arthritis[J]. Yonsei Med J，2015，56(4)：1134-1142.

（2021-09-06 收稿）