基于网络药理学和分子对接探讨黑骨藤追风活络胶囊治疗类风湿关节炎的作用机制

喻杨[1]，吴红[2]，邓颖[1]，李娜娜[1]，何吉[1]，罗进芳[1*]

（1.贵州中医药大学，贵州 贵阳，550025；2.贵州中医药大学第二附属医院，贵州 贵阳，550003）

摘要：目的 基于网络药理学和分子对接探讨黑骨藤追风活络胶囊（HZC）治疗类风湿关节炎（RA）的作用机制。**方法** 通过 ETCM 数据库和文献查阅获得复方活性成分，运用 Swiss Target Prediction 平台进行靶点预测。用 GeneCards、DisGeNET、OMIM 数据库筛选 RA 相关靶点，绘制韦恩图获取药物和疾病交集靶点。采用 STRING 平台构建蛋白质-蛋白质相互作用（PPI）网络，利用 Cytoscape3.9.1 软件中 centiscape2.2 插件筛选潜在关键靶点。用 DAVID 数据库对关键靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析，用 Cytoscape3.9.1 软件绘制药物-活性成分-靶点-通路网络图。最后选取核心成分与核心靶点进行分子对接。**结果** 共筛选出 32 个有效成分，药物与疾病交集靶点 91 个，主要活性成分为槲皮素、盐酸青藤碱和杠柳苷元，核心靶点为肿瘤坏死因子（TNF）、信号转导与转录激活因子 3（STAT3）、表皮生长因子受体（EGFR）。作用机制可能与 HIF-1 信号通路、TNF 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、JAK-STAT 信号通路等有关。分子对接显示主要活性成分与关键靶点具有很好的对接活性。**结论** HZC 可通过多靶点、多通路的作用机理治疗 RA。

关键词：黑骨藤追风活络胶囊；类风湿关节炎；网络药理学

中图分类号： R285　**文献标志码：** A　**文章编号：** 2096-1413(2024)01-0012-06

Exploring the mechanism of action of Heiguteng Zhuifeng Huoluo capsule in the treatment of rheumatoid arthritis based on network pharmacology and molecular docking

YU Yang[1], WU Hong[2], DENG Ying[1], LI Nana[1], HE Ji[1], LUO Jinfang[1*]

(1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025; 2. the Second Affiliated Hospital of Guizhou University of TCM, Guiyang 550003, China)

ABSTRACT: Objective To explore the mechanism of Heiguteng Zhuifeng Huoluo capsule (HZC) in the treatment of rheumatoid arthritis (RA) based on network pharmacology and molecular docking. Methods The active ingredients of the compound were obtained through ETCM database and literature review, and the Swiss Target Prediction platform was utilized for target prediction. The GeneCards, DisGeNET, and OMIM databases were utilized to screen RA-related targets, and Venn diagrams were drawn to obtain drug-disease intersection targets. The protein-protein interaction (PPI) network was constructed using the STRING platform, and the potential key targets were screened using the centiscape2.2 plug-in in Cytoscape3.9.1 software. GO function and KEGG pathway enrichment analysis of key targets were performed using the DAVID database, and the drug-active ingredient-target-pathway network was mapped using Cytoscape3.9.1 software. Finally, the core components were selected for molecular docking with the core targets. Results A total of 32 effective components were screened, and 91 targets of drug and disease intersection were identified. The main active components were Quercetin, Tuduranine Hydrochloride and Periplogenin. The core targets were tumor necrosis factor (TNF), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), and epidermal growth factor receptor (EGFR). The mechanism of action may be related to HIF-1 signaling pathway, TNF signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, JAK-STAT signaling pathway and so on. Molecular docking showed that the main active components had good docking activity with the key targets. Conclusion HZC can treat RA through a multi-target and multi-pathway mechanism of action.

KEYWORDS: Heiguteng Zhuifeng Huoluo capsule; rheumatoid arthritis; network pharmacology

---

DOI：10.19347/j.cnki.2096-1413.202401003

基金项目：国家自然科学基金资助项目（No.82160779）；贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题（No.QZYY-2021-012）。

作者简介：喻杨（1997— ），女，硕士在读。研究方向：中药抗炎免疫药理研究。

* 通讯作者：罗进芳，E-mail:497880740@qq.com.

类风湿关节炎（rheumatoid arthritis, RA）是一种主要累及关节的慢性炎症性疾病。RA 会对骨和软骨造成进行性损害，并与残疾水平、生活质量的降低以及合并症的风险增加有关[1]。RA 在全球范围内的发病率为 0.5%~1.0%，是成人最常见的慢性炎症性疾病之一[2]。目前临床治疗 RA 的药物包括糖皮质激素、非甾体抗炎药和生物制剂等，虽可缓解症状，但其毒副作用大。中医药治疗 RA 有着悠久的历史和丰富的经验。研究表明，中医药可抑制炎症，缓解 RA 症状，延缓关节骨损害的进展[3]。黑骨藤追风活络胶囊（Heiguteng Zhuifeng Huoluo capsule, HZC）由黑骨藤、青风藤、追风伞 3 种药物构成，均来源于民间的苗族，具有祛风除湿、通络止痛的功效[4]。HZC 临床常用于治疗风寒湿痹、肩臂腰腿疼痛，但其治疗机制仍不完全清楚。本文通过网络药理学的方法预测 HZC 治疗 RA 的活性成分、潜在靶点与信号通路，并通过分子对接进一步验证 HZC 活性成分干预 RA 关键靶点的有效性，为其临床应用提供新的科学依据。

1 资料与方法

1.1 HZC 有效成分筛选

HZC 中青风藤化学成分来源于 ETCM 数据库（http://www.tcmip.cn/ETCM/），黑骨藤及追风伞的化学成分来源于文献分析。

1.2 HZC 靶点基因预测

通过 PubChem 数据库（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）获得 HZC 活性成分的 SMILES 式，输入 Swiss Target Prediction 数据库（http://www.swisstargetprediction.ch/）检索潜在靶点，删除重复靶点，得到 HZC 活性成分的作用靶点。

1.3 疾病靶点和交集靶点收集

以“rheumatoid arthritis”为关键词，限定条件为人，在 GeneCards 数据库（https://www.genecards.org/）、DisGeNET 数据库（https://www.disgenet.org/）和 OMIM 数据库（https://omim.org/）中检索，去重整理后，将药物和 RA 的靶点上传至微生信在线作图工具绘制韦恩图，将两者的交集靶点作为 HZC 治疗 RA 的潜在作用靶点。

1.4 构建蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein interaction, PPI）网络

将交集基因上传至 STRING（https://string-db.org/）在线分析平台构建 PPI 网络图。利用 Cytoscape3.9.1 软件进行可视化，借助 centiscape2.2 插件计算该网络连接度（degree）、紧密度（closeness）和介度（betweenness），根据其均大于中位数筛选出核心靶点。

1.5 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

利用 DAVID 数据库（https://david.ncifcrf.gov/）对关键靶点进行 GO 富集和 KEGG 富集分析。GO功能富集分析包括生物过程（biological process, BP）、细胞成分（cellular component, CC）和分子功能（molecular function, MF）3 个方面。KEGG 通路富集分析筛选与 RA 相关通路做条形图，能够表明 HZC 治疗 RA 的潜在作用机制。

1.6 药物-活性成分-靶点-通路网络图

通过 Cytoscape3.9.1 软件绘制 HZC-活性成分-核心靶点-通路图，点击 Analyse Network 分析成分和靶点的 degree、closeness、betweenness，进一步判断主要活性成分及作用靶点。

1.7 核心活性成分及核心靶点分子对接验证

将获得的核心成分作为配体及核心靶点作为受体进行分子对接，通过 PDB 数据库（http://www.rcsb.org/）下载核心靶点蛋白结构，在 PubChem 数据库获得核心成分蛋白 3D 结构，利用 CB-Dock2 对上述配体和受体进行分子对接，以自由结合能的数值为评价标准，选取最优结果进行可视化处理。

2 结果

2.1 流程图

本研究的分析流程图见图 1。

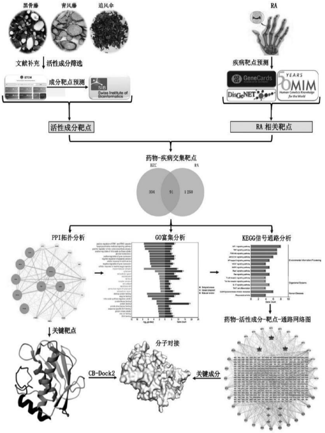

图 1 流程图

2.2 HZC 活性成分和靶点

以 ETCM 数据库及文献查找收集青风藤 13 个化学成分、追风伞[5]12 个化学成分、黑骨藤[6]7 个化学成分，3 味药材共 32 个有效成分（表 1）。用PubChem 和 Swiss Target Prediction 数据库预测 HZC 潜在活性化合物靶点，共得 913 个靶标，去重筛选后得 395 个。

表 1 HZC 活性成分表

青风藤			追风伞			黑骨藤		
标记	化合物名称	中文名称	标记	化合物名称	中文名称	标记	化合物名称	中文名称
QFT1	Sitosterol	β-谷甾醇	ZFS1	Adenosine	腺苷	HGT1	Periplogenin	杠柳苷元
QFT2	Stigmasterol	豆甾醇	ZFS2	Citric Acid	柠檬酸	HGT2	Periplocoside	杠柳毒苷
QFT3	Methyl Hexadecanoate Methyl Palmitate	棕榈酸甲酯	ZFS3	Protocatechuic Acid	原儿茶酸	HGT3	Emodin	大黄素
QFT4	Syringaresinol	丁香树脂酚	ZFS4	Protocatechuic Aldehyde	原儿茶醛	HGT4	Ursolic Acid	熊果酸
QFT5	Stepharine	光千金藤碱	ZFS5	Luteolin	木犀草素	HGT5	Daucosterol	胡萝卜苷
QFT6	Disinomenine	双青藤碱	ZFS6	Icariin	淫羊藿苷	HGT6	Kaempferol	山萘酚
QFT7	Isosinomenine	异青藤碱	ZFS7	Acacetin	刺槐素	HGT7	Quercetin	槲皮素
QFT8	Michelalbine	白兰花碱	ZFS8	Cinnamic Acid	肉桂酸			
QFT9	Sinoacutine	青风藤碱	ZFS9	Hyperin	金丝桃苷			
QFT10	Sinactine	四氢表小檗碱	ZFS10	Gallic Acid	没食子酸			
QFT11	Sinomenine	青藤碱	ZFS11	Betulonic Acid	路路通酸			
QFT12	Tuduranine Hydrochloride	盐酸青藤碱	ZFS12	Citric Acid	柠檬酸			
QFT13	Magnoflorine	木兰花碱						

2.3 疾病靶点的筛选和交集靶点收集

通过 GeneCards、DisGeNET、OMIM 数据库分别收集到 RA 疾病靶点 412、1 205、42 个，合并去重后共获得 1 341 个，将收集到的活性成分靶点与疾病靶点绘制韦恩图，得到 HZC 治疗 RA 的潜在作用靶点共 91 个，见图 2。

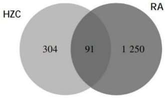

图 2 HZC-RA-韦恩图

2.4 构建 PPI 网络

利用 STRING 数据库构建交集靶点 PPI 网络。同时将其数据导入 Cytoscape3.9.1 进行可视化处理。利用 centiscape2.2 插件计算该网络 degree、closeness、betweenness 值，以大于中位数作为筛选条件，得到 18 个核心靶点，degree 较大的前 3 位基因分别为：肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor, TNF）（17）、信号转导与转录激活因子 3（signal transducer and activator of transcription 3, STAT3）（17）、表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor, EGFR）（17）。见图 3。

2.5 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

GO 功能富集分析显示，主要包括细胞凋亡、基因表达的正调控等 174 个 BP，细胞质、细胞核等 24 个 CC，蛋白质结合、酶结合等 34 个 MF，取各项排名前 10 的条目绘制柱状图，见图 4。KEGG 通路富集分析显示，主要通路涉及 HIF-1 信号通路、TNF 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、JAK-STAT 信号通路、MAPK 信号通路，取前 15 条通路制作条形图，见图 5。

2.6 药物-活性成分-靶点-通路网络图

通过运用 Cytoscape3.9.1 构建药物-活性成分-靶点-通路网络图（图 6）。图中正三角形为药物，圆形为药物活性成分，正方形为靶点，四边形为通路。使用 Cyto NCA 插件计算各成分靶点的介数中心性、紧密中心性及连接度。网络图中显示有 436 个节点，984 条边。取 Degree 值排名前 3 位的活性成分槲皮素、盐酸青藤碱、杠柳苷元作为 HZC 抗 RA 的核心成分。

2.7 核心活性成分及核心靶点分子对接验证

将活性成分槲皮素、盐酸青藤碱、杠柳苷元分别与 TNF、STAT3、EGFR 进行分子对接验证，结果见表 2。一般结合能<0 kJ/mol 可自发结合，结合能<-7.0 kJ/mol 提示有强烈的结合活性[7]。其中，杠柳苷元通过与 STAT3 蛋白活性中心的 ASN257、SER514、ASP334 和 CYS251 氨基酸残基形成氢键，与 ALA250、ARG325、CYS251 和 PRO336 形成烷基建，与周围 GLU324、GLN247 等非连接氨基酸残基形成范德华力而稳定结合（-8.2 kcal/mol）（图 7A）；杠柳苷元通过与 TNF 蛋白活性中心的 ASN112、THR105 和 SER99 氨基酸残基形成氢建，与 CYS69 和 CYS101 形成烷基建，与周围 ARG98、GLU116 等非连接氨基酸残基形成范德华力而稳定结合（-10.7 kcal/mol）（图 7B）；

杜柳苷元通过与 EGFR 蛋白活性中心的 MET422 和 HIS401 氨基酸残基形成氢键，与 ASP855、THR790 和 THR854 氨基酸残基形成氢键，与氨基酸采残基 VAL726、CTS797、LEU718、LEU844、LYS745 和 ALA743 形成烷基键，与 GLY796、LEU788 等非连接氨基酸残基形成范德华力而稳定结合（-9.6 kcal/mol）（图7C）。

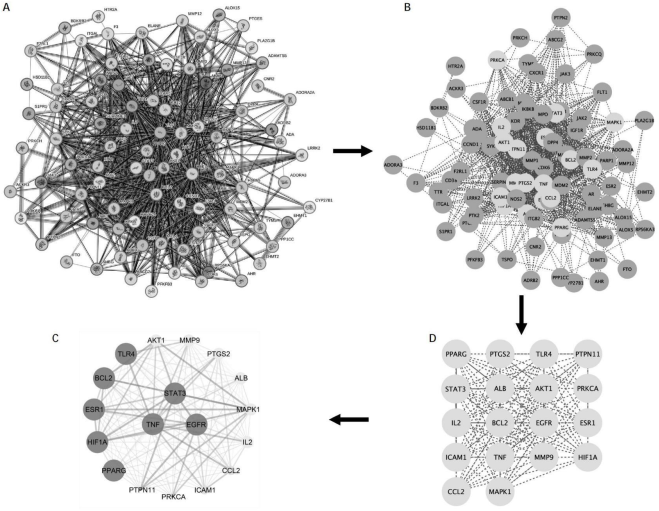

图 3　核心靶点 PPI 网络图

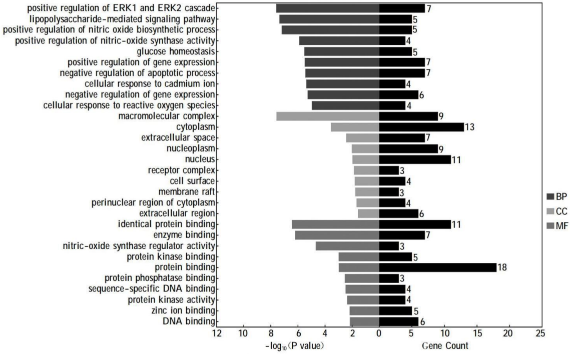

图 4　核心靶点的 GO 功能富集分析

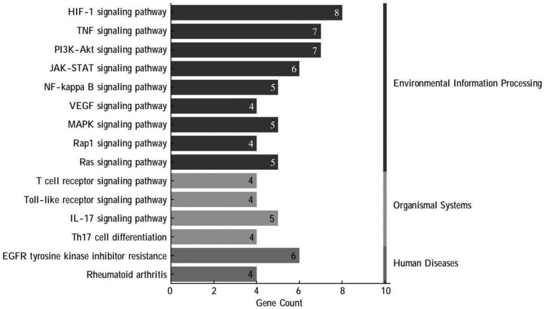

图 5　KEGG 通路富集分析

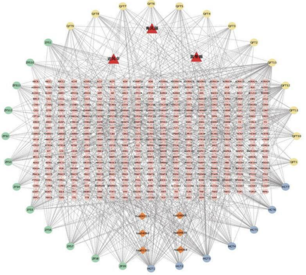

图 6　HZC-成分-靶点-通路网络图

表 2　HZC 活性化合物与 RA 关键靶点的结合能

蛋白	PDB ID	活性位点大小	活性位点坐标	化合物	对接分数
TNF	2E7A	1 038	(-2, -7, 3) (21, 21, 21)	槲皮素	-9.0
		1 038	(-2, -7, 3) (20, 20, 20)	盐酸青藤碱	-7.9
		1 038	(-2, -7, 3) (22, 22, 22)	杠柳苷元	-10.7
STAT3	6TLC	607	(14, 49, 66) (21, 21, 21)	槲皮素	-7.4
		539	(18, 27, 58) (20, 20, 20)	盐酸青藤碱	-7.2
		539	(18, 27, 58) (22, 22, 22)	杠柳苷元	-8.2
EGFR	3POZ	678	(17, 33, 19) (21, 21, 33)	槲皮素	-8.6
		678	(17, 33, 19) (20, 20, 33)	盐酸青藤碱	-8.0
		678	(17, 33, 19) (22, 22, 33)	杠柳苷元	-9.6

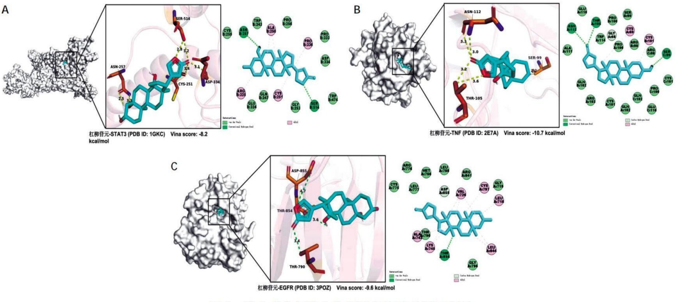
A
SER-514
ASN-257
CYS-251
ASP-334
杠柳苷元-STAT3 (PDB ID: 1GKC)　Vina score: -8.2 kcal/mol
B
ASN-112
SER-99
THR-105
杠柳苷元-TNF (PDB ID: 2E7A)　Vina score: -10.7 kcal/mol
C
ASP-855
THR-854
THR-790
杠柳苷元-EGFR (PDB ID: 3POZ)　Vina score: -9.6 kcal/mol

图 7　核心成分与核心作用靶点分子对接示意图

注：图 A 为杠柳苷元与 STAT3 对接结果图；图 B 为杠柳苷元与 TNF 对接结果图；图 C 为杠柳苷元与 EGFR 对接结果图。左边为对接结果宏观图，中间为对接结果 3D 相互作用图（蓝色为小分子化合物配体，黄色为氨基酸残基），右边为对接结果 2D 相互作用图。

3 讨论

RA最终会导致持续性的滑膜炎和关节软骨损伤[8]。尽管目前临床上采取的治疗药物可以减轻患者的不良症状，但会出现明显毒副作用，因此探究安全有效的治疗方法十分重要。HZC属于苗族抗风湿药，能减轻关节疼痛的症状，提高关节活动度，改善关节功能。

本文通过网络药理学分析筛选出HZC的32个活性成分，其发挥作用的关键活性成分为槲皮素、盐酸青藤碱以及杠柳苷元。研究发现，槲皮素能抑制白细胞介素-17（interleukin-17, IL-17）刺激的RA成纤维样滑膜细胞核因子-κB（nuclear factor kappa-B, NF-κB）配体受体激活剂产生和破骨细胞的形成，减少辅助性T细胞17（T helper cell 17, Th17）分化，从而起到抗RA作用[9]。有研究表明，盐酸青藤碱能够缓解胶原诱导性关节炎（collagen-induced arthritis, CIA）小鼠软骨和骨质破坏，减少炎性细胞在关节滑膜组织中的浸润，降低炎性细胞因子在血清中的表达水平[10]。杠柳苷元对体外培养的肥大细胞以及整体动物的肥大细胞均可产生明显抑制脱颗粒和组胺释放作用[11]。

PPI网络分析发现TNF、STAT3、EGFR是排名前3的靶点。TNF主要由激活的巨噬细胞、T细胞和免疫B细胞等产生，结合TNF受体1和TNF受体2，通过NF-κB或丝裂原活化蛋白激酶途径去诱导炎症、组织变性和细胞凋亡[12]。STAT3是参与细胞增殖、分化、存活、炎症反应、免疫、血管生成等多种生物学过程的转录因子[13]。相关研究报道，EGFR在RA进展中的具体作用是由于其促进内皮细胞增殖和滑膜成纤维细胞的细胞因子产生以及抑制破骨细胞的形成[14]。分子对接结果表明，槲皮素、盐酸青藤碱和杠柳苷元与TNF、STAT3、EGFR可以自发结合。上述研究提示，槲皮素、盐酸青藤碱和杠柳苷元等成分可能是HZC治疗RA的主要活性成分。

通过分析KEGG通路富集得出的排名前15条通路，发现HIF-1信号通路、TNF信号通路、PI3K-Akt信号通路、JAK-STAT信号通路可能是HZC治疗RA的潜在信号通路。HIF-1α通过提高细胞间接触介质表达，促进RA成纤维样滑膜细胞与B细胞和T细胞之间的细胞间接触，增强了白细胞介素-1β、白细胞介素-6、白细胞介素-8、TNF-α等炎性因子的分泌，从而加剧滑膜炎症[15]。PI3K-Akt信号通路是由酶联受体介导的参与细胞增殖、迁移、存活和血管生成的经典信号通路[16]。

综上所述，HZC的主要成分为槲皮素、盐酸青藤碱和杠柳苷元，主要靶点为TNF、STAT3、EGFR，主要通路涉及HIF-1信号通路、TNF信号通路PI3K-Akt信号通路、JAK-STAT信号通路等多条信号通路。分子对接显示关键活性成分与关键靶点能形成稳定的对接模型，本研究为后续的实验研究提供了新的理论基础和科学依据。

参考文献：

[1] SMOLEN JS,LANDEWÉ R,BIJLSMA J,et al.EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update[J].Ann Rheum Dis,2017,76(6):960-977.

[2] TANAKA Y.A review of upadacitinib in rheumatoid arthritis [J].Mod Rheumatol,2020,30(5):779-787.

[3] WANG Y,CHEN SJ,DU KZ,et al.Traditional herbal medicine: therapeutic potential in rheumatoid arthritis[J].J Ethnopharmacol,2021,279:114368.

[4] 何畑林,刘育辰,刘刚.苗药黑骨藤追风活络胶囊研究进展及质量标志物预测分析[J].亚太传统医药,2023,19(6):86-91.

[5] 李煦照,张帅男.追风伞化学成分与药理作用的研究进展及治疗潜能的预测分析[J].时珍国医国药,2021,32(3):708-711.

[6] 李雪峰,刘育辰,刘刚,等.苗药黑骨藤化学成分及药理作用研究进展[J].中成药,2018,40(4):904-912.

[7] PINZI L,RASTELLI G.Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery[J].Int J Mol Sci,2019,20(18):4331.

[8] JANG S,KWON EJ,LEE JJ.Rheumatoid arthritis: pathogenic roles of diverse immune cells[J].Int J Mol Sci,2022,23(2):905.

[9] KIM HR,KIM BM,WON JY,et al.Quercetin, a plant polyphenol, has potential for the prevention of bone destruction in rheumatoid arthritis[J].J Med Food,2019,22(2):152-161.

[10] 胡明月,朱俊秀,徐艳明,等.盐酸青藤碱治疗性给药对胶原诱导性关节炎小鼠的保护作用[J].中药新药与临床药理,2022,33(1):33-38.

[11] 卫银盘,赵丽迎,邓雁如.杠柳的化学成分及药理作用研究进展[J].天津中医药大学学报,2009,28(3):165-166.

[12] ZHANG YW,GU XF,LI D,et al.METTL3 regulates osteoblast differentiation and inflammatory response via Smad signaling and MAPK signaling[J].Int J Mol Sci,2019,21(1):199.

[13] WANG YY,WU LL,CAI HY,et al.Sinomenine derivative YL064: a novel STAT3 inhibitor with promising anti-myeloma activity[J].Cell Death Dis,2018,9(11):1093.

[14] XIE W,WU ZY.Identifying the hub genes and immune infiltration related to pyroptosis in rheumatoid arthritis[J]. Medicine (Baltimore),2021,100(50):e28321.

[15] HU FL,LIU HJ,XU LL,et al.Hypoxia-inducible factor-1α perpetuates synovial fibroblast interactions with T cells and B cells in rheumatoid arthritis[J].Eur J Immunol,2016,46(3): 742-751.

[16] 蔡鑫,唐芳,马武开,等.类风湿关节炎与骨质疏松症的生物信息学分析[J].中国骨质疏松杂志,2022,28(3):386-391,402.