

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2026.05.014

基于网络药理学、分子对接及实验验证探讨益肾祛痹通络方治疗类风湿关节炎的作用机制

徐刘平^{1,2}, 杨璨宇², 卢莹², 莫丽莎^{1,2}, 池强^{1,2}, 夏媛^{1,2}, 刘水娟^{1,2}, 邱明亮^{1,2}✉

1. 江西中医药大学附属医院, 江西省南昌市八一大道 445 号, 330006; 2. 江西中医药大学临床医学院



[摘要] **目的** 探讨益肾祛痹通络方治疗类风湿关节炎(RA)的作用机制。**方法** 采用网络药理学方法,使用TCMSP、BATMAN、ETCM、GEO等数据库检索并筛选益肾祛痹通络方中药物活性成分、作用靶点以及RA相关靶点,对药物活性成分靶点和RA靶点取交集,构建蛋白相互作用(PPI)网络图,进行GO和KEGG通路富集分析,并构建益肾祛痹通络方治疗RA的药物-活性成分-共同靶点网络。将益肾祛痹通络方核心活性成分与核心靶点进行分子对接验证。将人RA滑膜成纤维细胞株MH7A细胞分为空白组、模型组、甲氨蝶呤组、益肾祛痹通络方组。空白组予10%胎牛血清,其余三组均予浓度为10 μg/L的重组人肿瘤坏死因子-α(TNF-α)刺激24 h制备RA细胞模型;甲氨蝶呤组在模型组基础上加入20 μmol/L浓度的甲氨蝶呤混悬液,益肾祛痹通络方组加入10%益肾祛痹通络方含药血清。干预48 h后采用ELISA法检测细胞上清液TNF-α、白细胞介素-17A(IL-17A)水平,RT-qPCR法检测磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、蛋白激酶B(AKT)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)mRNA表达。**结果** 网络药理学分析显示,得到益肾祛痹通络方209个药物活性成分和583个靶点基因,RA相关靶点818个;将药物活性成分和RA靶点基因取交集后获得29个共同靶点;槲皮素、β-谷甾醇、山柰酚、豆甾醇、木犀草素是益肾祛痹通络方治疗RA的核心活性成分,基质金属蛋白酶9(MMP9)、前列腺素内过氧化物合酶2(PTGS2)、Toll样受体4(TLR4)、肿瘤蛋白p53(TP53)、转录因子AP-1亚基(JUN)是核心靶点;GO和KEGG通路富集分析结果涉及抗氧化反应、PI3K-AKT信号通路、Toll样受体(TLR)信号通路等。分子对接结果显示,MMP9、PTGS2分别与槲皮素、β-谷甾醇、山柰酚、豆甾醇、木犀草素,TLR4与β-谷甾醇、豆甾醇、木犀草素,TP53与木犀草素均具有高结合活性。细胞实验结果表明,与空白组比较,模型组细胞IL-17A、TNF-α水平以及AKT、mTOR mRNA表达升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,益肾祛痹通络方组上述各指标均降低,甲氨蝶呤组TNF-α水平、AKT mRNA表达降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 益肾祛痹通络方治疗RA的作用机制与减少炎症因子分泌、抑制PI3K-AKT-mTOR信号通路激活有关。

[关键词] 类风湿关节炎;网络药理学;分子对接;细胞实验;益肾祛痹通络方

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以关节滑膜慢性炎症、多关节功能活动障碍且伴有关节骨质破坏为主要临床特征的自身免疫性疾病^[1]。益肾祛痹通络方是江西中医药大学附属医院风湿病科常用经验方,具有益肾壮骨、祛寒胜湿的功效,前期研究表明该方对肾虚寒湿痹阻型RA具

有缓解临床症状、改善关节功能活动的作用^[2],且可能通过调控miR-150-5p/细胞因子信号抑制因子1(SOCS1)通路以抑制细胞因子表达,改善关节炎症^[3]。网络药理学和分子对接技术对研究中药复方治疗疾病多成分、多靶点、多通路的作用机制提供了系统、可行的方法和工具^[4]。为进一步探讨益肾祛痹通络方治疗RA的潜在作用机制,本研究采用网络药理学和分子对接技术从分子作用机制层面进行研究,并结合细胞实验验证,为该方治疗RA的相关研究和新药研发提供科学依据。本研究动物实

基金项目:国家自然科学基金(82260912,82560917);江西省应用研究培育项目(20212BAG70038);江西省卫生健康委中医药科研项目(2024A0105,2024B0332)

✉ 通讯作者:mingliangqiu@126.com

验已通过江西中医药大学实验动物伦理委员会审批(批件号: TEMPOR20250093)。

1 材料与方法

1.1 网络药理学研究

1.1.1 益肾祛痹通络方药物活性成分和靶点筛选 通过 TCMSp 数据库 (<https://www.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)、BATMAN 数据库 (<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/>)、ETCM 数据库 (<http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/>)、Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 和 PharmMapper 数据库 (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper>) 检索益肾祛痹通络方中淫羊藿、补骨脂、续断、熟地黄、羌活、独活、青风藤、威灵仙、桂枝、白芷、黄芪、当归、制乳香、制没药 14 种药物的活性成分和相应靶点。TCMSp、BATMAN、ETCM 数据库筛选标准为口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 且类药性 (DL) ≥ 0.18 , Swiss Target Prediction 与 PharmMapper 数据库筛选标准为概率值 > 0.1 , 匹配分数 > 3.0 [5]。将筛选得到药物活性成分和相应靶点取交集作为高置信度结果, 以多数据库交叉验证构建高质量、可信的化合物-靶点数据集。通过 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 将蛋白质靶点转换为基因名称。

1.1.2 RA 相关靶点筛选 在 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 中以 “rheumatoid arthritis” 为关键词检索相关基因表达谱数据, 注意设置不同生物体类别 “Organism” 为 “Homo sapiens” 来查找符合条件的基因芯片数据集, 旨在深入解析 RA 病理机制中的分子生物学基础。下载目标基因芯片数据集, 并上传至 HOME for Researchers 平台 (<https://www.aclbi.com/static/index.html/>) 进行对数变换 (Log 化) 处理, 将数据进行快速探索和差异表达基因分析, 使用 R 语言环境下 limma 包构建实验设计矩阵进行精细分析。创建设计矩阵分组 (RA 组和健康组), 拟合线性模型并创建对比矩阵, 计算 RA 相对于健康组的差异表达基因, 将对比矩阵应用到拟合线性模型上, 以经验贝叶斯平滑法缩小标准误差, 提取差异表达基因结果, 作为 RA 相关靶点。

1.1.3 益肾祛痹通络方与 RA 共同靶点获取和蛋白相互作用 (PPI) 网络构建 将筛选出的益肾祛痹通络方中药物活性成分靶点与 RA 靶点导入 Venny 2.1.0 软件, 利用 R 4.2.2 软件包 “ggvenn” 将靶点基因取交集, 绘制韦恩图, 获得药物、疾病

共同靶点, 即益肾祛痹通络方治疗 RA 的预测靶点。将药物、疾病共同靶点数据导入 String 数据库 (<https://string-db.org/>) 中, 设置中等置信度=0.400 作为最小互作分数, 将所得分析数据导入 Cytoscape 3.7.2 软件进行可视化, 构建益肾祛痹通络方治疗 RA 的 PPI 网络图。

1.1.4 基因本体 (GO) 富集与京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析 将药物、疾病共同靶点导入 Metascape 平台 (<https://metascape.org/>) 进行 GO 富集与 KEGG 通路富集分析, 设定 $P < 0.01$, 对 GO 富集分析的生物过程、细胞组分、分子功能条目以及 KEGG 通路进行筛选, 获得与 RA 相关的分子生物学过程和信号通路。

1.1.5 药物-活性成分-共同靶点网络构建 通过 Cytoscape 3.7.2 软件绘制益肾祛痹通络方药物-活性成分-共同靶点之间的复杂关系网络图, 采用拓扑学方法分析网络中的连接度、紧密度、介度等关键指标的中位数值, 以此为基础筛选药物活性成分与共同靶点网络中的核心靶点 [6]。

1.2 分子对接技术

1.2.1 配体分子和受体蛋白的选择 选择 “药物-活性成分-共同靶点” 网络分析中度值排名前 5 位的药物核心活性成分作为本次对接的配体, PPI 网络分析中排名前 5 位的靶点蛋白作为对接受体。

1.2.2 分子对接方法 通过 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取药物核心活性成分结构, 通过 RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载靶点蛋白的高分辨率晶体结构, 采用 AutoDock Tools 1.5.7 软件对核心活性成分和靶点蛋白去水、加氢等处理并转换为 pdbqt 格式, 使用 AutoDock Vina 1.1.2 软件对化合物和靶点蛋白进行分子对接, PyMOL 2.6.0 软件对能量最低的结合模式进行可视化分析。

1.3 细胞实验

1.3.1 细胞与动物 人 RA 滑膜成纤维细胞株 MH7A 细胞 (编号: E0326, 中国 Biovector NTCC 公司), 37 °C、5% CO₂ 培养箱, 采用 RPMI-1640 培养基+10% 胎牛血清+链霉素 100 μg/ml+青霉素 100 U/ml 的培养基培养。

SPF 级 30 只 SD 大鼠, 6 周龄, 体质量 (200±20) g, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 实验动物使用许可证编号: SYXK (赣) 2022-0002。饲养条件: 适应性饲养 7 天, 温度 (25±2) °C, 相对湿度 50%~60%, 12 h/12 h 明暗交替, 自由进食及饮水。

1.3.2 药物、试剂及仪器 益肾祛痹通络方组成：淫羊藿 10 g，补骨脂 10 g，续断 12 g，熟地黄 10 g，羌活 15 g，独活 15 g，桂枝 10 g，青风藤 15 g，醋乳香 5 g，醋没药 5 g，白芷 10 g，威灵仙 10 g，黄芪 15 g，当归 15 g。中药饮片购自江西省中医院中药房，将药物加入 8 倍体积超纯水浸泡 30 min，大火煮沸后小火煎煮 40 min，滤出药液再加 6 倍体积超纯水煎煮 30 min，去渣，混合两次药液制备成浓度为 2 g/ml 的混悬液，-20℃冰箱保存备用。甲氨蝶呤片（国药准字：H20074246，广东岭南制药有限公司），加入 PBS 溶液制备成浓度为 20 mmol/L 的混悬液，用时稀释，-80℃冰箱保存备用。

重组人肿瘤坏死因子-α（TNF-α，批号：10602-HNAE），中科生物股份有限公司，-20℃~70℃存储；人白细胞介素-17A（IL-17A，批号：MM-70049R1）ELISA 试剂盒，江苏酶免实业有限公司；人 TNF-α（批号：JL10208-96T）ELISA 试剂盒，上海江莱生物科技有限公司；RNA 提取液（Trizol，批号：G3013），赛维尔生物科技有限公司；逆转录预混液（Hifair®III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR，批号：11141ES60）、荧光染料（Hieff®qPCR SYBR Green Master Mix，批号：11188ES08），翌圣生物科技股份有限公司。

恒温培养箱（型号：LRH），上海一恒科学仪器有限公司；台式离心机（型号：AllegraX-30R Centrifuge），贝克曼库尔特有限公司；高速冷冻离心机（型号：Neofuge13R），力新仪器（上海）有限公司；多功能酶标仪（型号：Perkin Elmer），安世亚太科技股份有限公司；超微量分光光度计（型号：NanoDrop One），莫赛飞世尔科技公司；梯度型 PCR 仪（型号：T100™ Thermal Cycler）、实时荧光定量 PCR 仪（型号：CFX96 Touch，BIO-RAD），伯乐（上海）生命科学研究发展有限公司。

1.3.3 含药血清制备 适应性喂养大鼠 7 天后，采用随机数字表法将其分为含药血清组和空白血清组，每组 15 只。根据大鼠与成人临床等效剂量 6.3 倍换算^[7]，含药血清组大鼠每次予益肾祛痹通络方混悬液 14.13 g/kg 灌胃，空白血清组大鼠每次予生理盐水 1 ml/100 g 灌胃，均每天早晚各 1 次，连续 7 天。于末次灌胃 2 h 后行腹主动脉取血，取血前禁食 12 h。将血液先 4℃冷藏 2~4 h，再行 4℃、1500 r/min 离心（离心半径 8 cm）10 min，取上清液制备含药血清，56℃水浴锅灭活 30 min，以 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后分装，-80℃冰箱保存备用，用时稀释。

1.3.4 细胞模型制备及分组 将对数生长期 MH7A 细胞分为空白组、模型组、甲氨蝶呤组、益肾祛痹通络方组，采用 6 孔板铺板细胞密度 70%。空白组予 10% 胎牛血清，其余三组均予浓度为 10 μg/L 的重组人 TNF-α 刺激 24 h 制备 RA 细胞模型^[8]。甲氨蝶呤组在模型组基础上加入 20 μmol/L 浓度的甲氨蝶呤混悬液 2 ml，益肾祛痹通络方组加入 10% 益肾祛痹通络方含药血清 20 μl（使用 1800 μl 完全培养基稀释配置），干预 48 h 后检测相关指标。益肾祛痹通络方含药血清对 MH7A 细胞存活率的影响在同期课题研究中已探明。

1.3.5 观察指标及方法 1）ELISA 法检测细胞上清液 TNF-α、IL-17A 水平。收集 2 个样本的细胞上清液，4℃、1000 r/min 离心（离心半径 8 cm）20 min 后取上清。采用 ELISA 试剂盒检测各组细胞上清液样品中 TNF-α、IL-17A 水平，操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

2）RT-qPCR 法检测磷脂酰肌醇 3-激酶（PI3K）、蛋白激酶 B（AKT）、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mTOR）mRNA 表达。取 3 个样本，在细胞混悬液中加入 RNA 提取液吹打，收集细胞悬液提取总 RNA，使用超微量分光光度计测量总 RNA 浓度。通过逆转录试剂合成 cDNA。配置 qPCR 反应体系为 8.2 μl 的 RNase Free dH₂O、1 μl 的 cDNA、0.4 μl 的上游引物、0.4 μl 的下游引物、10 μl 的 2×Hieff®qPCR SYBR Green Master Mix。扩增靶基因反应条件：95℃预变性 30 s，95℃变性 15 s，55~60℃退火 10 s，72℃延伸 30 s，循环 40 次。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）为内参基因，通过 2^{-ΔΔCT} 法计算目的基因 PI3K、AKT、mTOR mRNA 相对表达量。引物由通用生物系统有限公司合成，引物序列见表 1。

表 1 细胞 PI3K、AKT、mTOR mRNA 引物序列
Table 1 Primer sequences expression of PI3K, AKT and mTOR mRNA in the cell experiment

基因	引物序列（5'~3'）	产物长度/bp
PI3K	上游：TGGACGGCGAAGTAAAGCATT	226
	下游：ACTGTGACATTGAGGGAGTCC	
AKT	上游：GCCAACAGCCTCAAGCA	376
	下游：CATACTCCATCACAAAGCACAG	
mTOR	上游：AGAGCACAATCCCCAAAGTG	333
	下游：GGGTTTTGGACAGATCCTCAG	
GAPDH	上游：TGACTTCAACAGCGACACCCA	121
	下游：CACCTGTGCTGTAGCCAAA	

注：PI3K，磷脂酰肌醇 3-激酶；AKT，蛋白激酶 B；mTOR，哺乳动物雷帕霉素靶蛋白；GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

1.3.6 统计学方法 采用 SPSS 24.0 软件进行统计分析, 计量资料符合正态分布且方差齐性以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析; 非正态分布以中位数 (四分位数) [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示, 采用 Kruskal-Wallis 检验, 继以 Dunn's 事后检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 益肾祛痹通络方药物活性成分和靶点筛选结果

将 TCMS、ETCM、BATMAN 数据库和 Swiss Target Prediction、PharmMapper 数据库中得到的对应药物活性成分的靶点蛋白及其基因, 取并集、去除重复, 共得到益肾祛痹通络方 209 个主要药物活性成分和 583 个靶点基因。

2.2 RA 相关靶点筛选结果

从 GEO 数据库获得 RA 数据集 GSE93777 基因芯片表达数据, 该数据集包含滑膜组织样本, 共 36 个样本, 其中 RA 患者样本 24 个, 该研究纳入的 RA 患者年龄在 40~65 岁之间, 男女比例约为 3:1, 均处于疾病活动期, 28 个关节疾病活动度 (DAS28) 评分 >3.2 分, 且未接受过生物制剂治疗。差异性分析以 $|\log_2FC|>1$, $P<0.05$ 作为筛选标准, 得到 818 个 RA 相关靶点基因, 其中上调表达基因 680 个, 下调表达基因 138 个。

2.3 药物、疾病共同靶点与 PPI 网络分析结果

将药物活性成分和 RA 靶点基因取交集后, 共获得 29 个交集基因记为药物、疾病共同靶点, 包括肿瘤蛋白 p53 (TP53)、转录因子 AP-1 亚基 (JUN)、基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、干扰素 α 诱导蛋白 27 (IFI27)、白细胞分化抗原 14 (CD14)、氨肽酶 N (ANPEP)、抗菌肽 (CAMP)、糖皮质激素受体 (NR3C1)、B 细胞淋巴瘤因子 2 样蛋白 1 (BCL2L1)、Toll 样受体 4 (TLR4)、过氧化氢酶 (CAT)、前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2)、醛酮还原酶 1C3 (AKR1C3)、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 2 (CAMKK2)、二酰基甘油酰基转移酶 2 (DGAT2)、电压依赖性钙通道亚基 $\alpha_2\delta_3$ (CACNA2D3)、细胞色素 P4501B1 (CYP1B1)、白细胞分化抗原 86 (CD86)、分泌性白细胞蛋白酶抑制剂 (SLPI)、凝血因子 VII (F7)、Toll 样受体 2 (TLR2)、转录因子 E2F-2 (E2F2)、中性粒细胞胞

质因子 1 (NCF1)、C-C 基序趋化因子受体 7 (CCR7)、转化生长因子 α (TGFA)、棕榈酰蛋白硫酯酶 1 (PPT1)、角蛋白 1 (KRT1)、Dysferlin 蛋白 (DYSF)、醛脱氢酶 1 家族成员 A1 (ALDH1A1)。去除 8 个孤立的靶点, 绘制成益肾祛痹通络方治疗 RA 的 PPI 网络图, 见图 1。使用 Cytoscape 3.7.2 软件中 cytoHubba 插件的最大团中心性算法 (MCC) 算法, 筛选出 PPI 网络 MCC 评分排名前 5 位的靶点基因 MMP9、PTGS2、TLR4、JUN、TP53 作为最终核心靶点。研究的靶点均具有明确的 RA 病理背景, 最终筛选出的核心靶点具有较高的度中心性与介数中心性, 在 RA 相关的信号网络中具有核心调控作用。

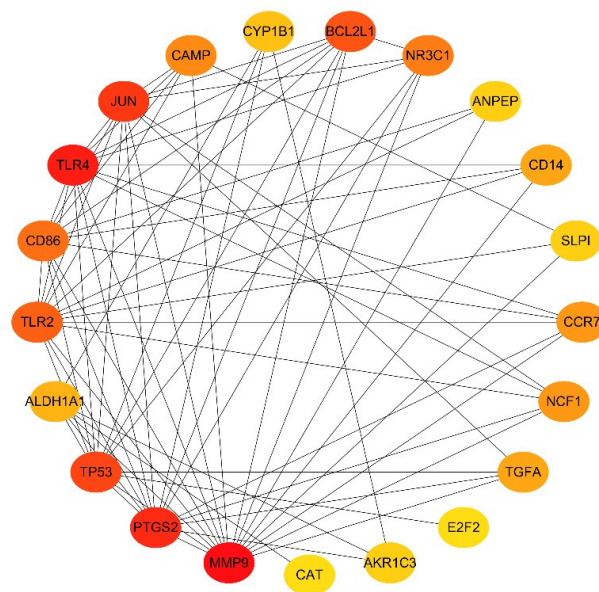


图 1 益肾祛痹通络方治疗类风湿关节炎的蛋白相互作用网络图

Figure 1 Protein-protein interaction network of Yishen Qubi Tongluo Formula in the treatment of rheumatoid arthritis

2.4 GO 和 KEGG 通路富集分析结果

将 29 个药物、疾病共同靶点进行 GO 和 KEGG 通路富集分析。GO 富集分析共得到 400 个生物过程、12 个细胞组分、20 个分子功能, 分别取 P 值排名前 5 位的生物学过程、细胞组分、分子功能绘制 GO 富集柱状图。图 2 示, 生物过程主要涉及抗氧化反应、细胞对化学压力的反应、细胞对氧化应激的反应、酮反应、细胞对活性氧的反应等, 细胞成分变化主要在细胞核、质膜、蛋白质复合物等, 分子功能主要涉及脂多糖结合、模式识别受体活性、脂肽结合、多肽结合、核苷酶活性等。

KEGG 通路富集分析共获得 58 条 KEGG 信号通路, 选择富集基因数量排名前 20 位的 KEGG 通路

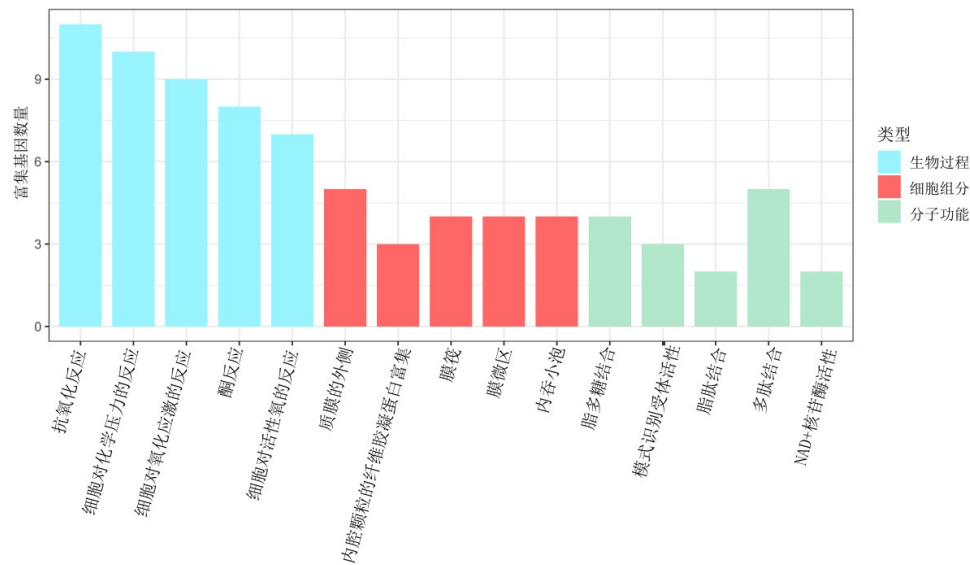


图2 益肾祛痹通络方治疗类风湿关节炎药物与疾病共同靶点的基因本体富集分析

Figure 2 GO enrichment analysis of common targets of *Yishen Qubi Tongluo Formula* and rheumatoid arthritis

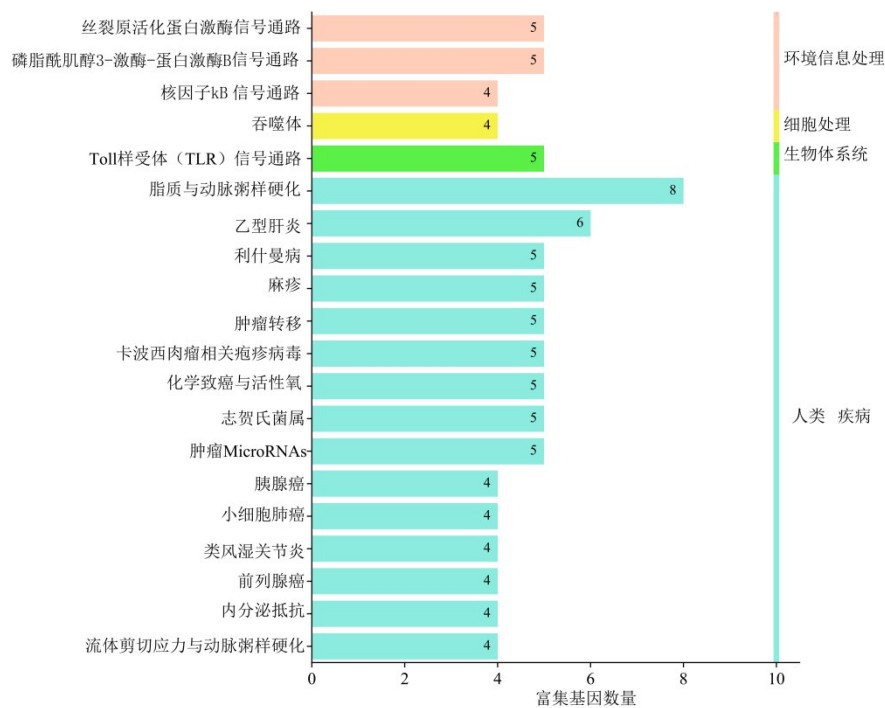


图3 益肾祛痹通络方治疗类风湿关节炎药物与疾病共同靶点的京都基因和基因组百科全书通路富集分析

Figure 3 KEGG pathway enrichment analysis of common targets of *Yishen Qubi Tongluo Formula* and rheumatoid arthritis

绘制柱状图。图3示，KEGG 信号通路涉及丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）信号通路、磷脂酰肌醇3-激酶-蛋白激酶B（PI3K-AKT）信号通路、吞噬体、Toll样受体（TLR）信号通路、脂质和动脉粥样硬化、化学致癌与活性氧、乙型肝炎、RA、内分泌抵抗等。

2.5 药物-活性成分-共同靶点网络分析结果

将 29 个药物、疾病共同靶点基因匹配到益肾祛痹通络方中，得到 14 味药物的 98 个主要活性化合物（化合物中英文对照见附表1，请扫描本文二维码获取），度值排名前 5 位的成分为槲皮素、β-谷甾醇、山柰酚、豆甾醇、木犀草素。益肾祛痹

通络方治疗 RA 的药物-活性成分-共同靶点网络图见附图 1 (请扫描本文二维码获取)。

2.6 益肾祛痹通络方核心活性成分与核心靶点分子对接验证结果

益肾祛痹通络方核心活性成分槲皮素、 β -谷甾醇、山柰酚、豆甾醇、木犀草素与核心靶点 MMP9、PTGS2、TLR4、JUN、TP53 进行分子对接。对蛋白结构处理, 移除水分子、无关配体及离子, 保留功能必需的非蛋白组分、添加氢原子, 其中 MMP9 保留活性中心的关键锌离子及其配位的氨酸残基 His401/405/411, PTGS2 保留关键血红素辅因子记录为 HEM 残基, TLR4 对接使用其胞外域与辅助蛋白 MD-2 形成的复合物, TP53 完整保留与 Cys176、His179、Cys238 和 Cys242 配位的锌离子, JUN 选择 c-JUN 蛋白链删除其他组件。根据结合口袋特征定义活性口袋与格点盒子, 以原晶体结构中的共结晶配体为中心, 盒子大小设置为 88 Å 的正方体, 格点间距设置为 0.375 Å, 调整参数覆盖整个结合通道。表 2 示, MMP9、PTGS2 分别与槲皮素、 β -谷

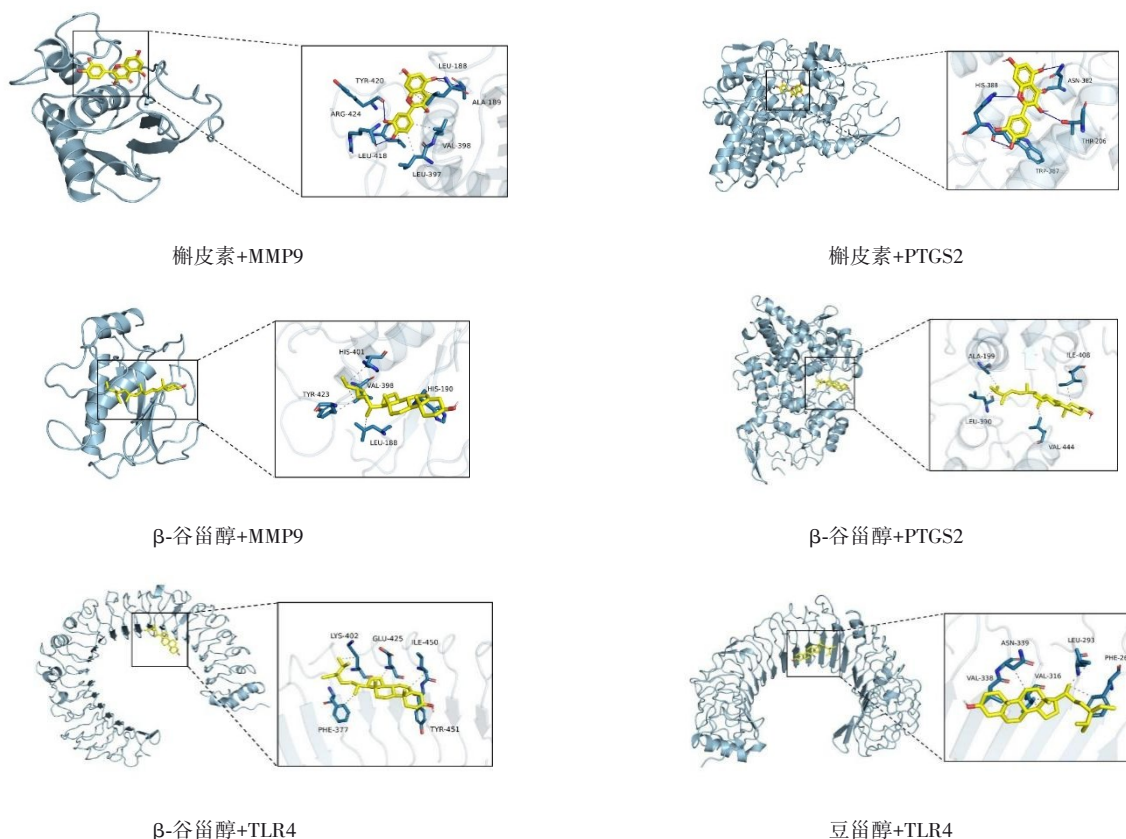
甾醇、山柰酚、豆甾醇、木犀草素, TLR4 与 β -谷甾醇、豆甾醇、木犀草素, TP53 与木犀草素均具有高结合活性 (结合能 < -7.0 kcal/mol)。选取对接结果中强结合构象通过 Pymol 展示 3D 对接示意图及对接分子口袋图, 见图 4。

表 2 益肾祛痹通络方治疗类风湿关节炎核心活性成分与核心靶点结合能预测结果

Table 2 Predicted binding energies of core active components and key targets of *Yishen Qubi Tongluo Formula* in the treatment of rheumatoid arthritis

编号	核心活性成分	结合能 (kcal/mol)				
		MMP9	PTGS2	TLR4	TP53	JUN
mol000098	槲皮素	-8.90	-9.00	-6.40	-4.50	-5.20
mol000359	β -谷甾醇	-7.90	-8.40	-7.60	-4.70	-5.50
mol000422	山柰酚	-8.50	-8.40	-6.00	-4.50	-5.00
mol000449	豆甾醇	-7.60	-8.80	-7.60	-5.93	-5.65
mol000006	木犀草素	-7.01	-7.34	-7.39	-7.46	-6.83

注: MMP9, 基质金属蛋白酶 9; PTGS2, 前列腺素内过氧化物合酶 2; TLR4, Toll 样受体 4; TP53, 肿瘤蛋白 p53; JUN, 转录因子 AP-1 亚基。



注: MMP9, 基质金属蛋白酶 9; PTGS2, 前列腺素内过氧化物合酶 2; TLR4, Toll 样受体 4。

图 4 益肾祛痹通络方治疗类风湿关节炎核心活性成分与核心靶点的分子对接结合模式图

Figure 4 Molecular docking binding patterns of core active components and key targets of *Yishen Qubi Tongluo Formula* in the treatment of rheumatoid arthritis

2.7 各组细胞上清液中 IL-17A、TNF-α 水平比较

表 3 示, 与空白组比较, 模型组细胞上清液中 IL-17A、TNF-α 水平升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 益肾祛痹通络方组细胞上清液中 IL-17A、TNF-α 水平降低, 甲氨蝶呤组仅 TNF-α 水平降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 3 各组细胞上清液中 IL-17A、TNF-α 水平比较

Table 3 Comparison of IL-17A and TNF-α levels in cell supernatants among different groups (pg·ml⁻¹, $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	IL-17A	TNF-α
空白组	2	212.10±14.61 ^{a)}	74.75±29.81 ^{a)}
模型组	2	279.40±11.77	694.41±119.38
甲氨蝶呤组	2	245.38±12.98	210.17±27.58 ^{b)}
益肾祛痹通络方组	2	205.65±28.71 ^{a)}	35.00±16.97 ^{b)}

注: IL-17A, 白细胞介素-17A; TNF-α, 肿瘤坏死因子-α。

a) 与模型组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

2.8 各组细胞悬液中 PI3K、AKT、mTOR mRNA 表达比较

表 4 示, 与空白组比较, 模型组细胞悬液中 AKT、mTOR mRNA 表达升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 益肾祛痹通络方组细胞悬液中 AKT、mTOR mRNA 表达降低, 甲氨蝶呤组仅 AKT mRNA 表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 两组 PI3K mRNA 表达均无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 讨论

RA 属于中医学“尪痹”“顽痹”等范畴, 肾虚邪实是其关键病机, 肾虚则筋骨失养, 风寒湿等外邪侵袭阻滞于经络、关节之中, 气血运行不畅, 终致 RA^[9]。益肾祛痹通络方中淫羊藿、补骨脂、续断、熟地黄补益肝肾, 强筋壮骨; 羌活、独活、青风藤、威灵仙祛风胜湿; 桂枝温经散寒, 促进气血运行; 醋乳香、醋没药行气活血止痛; 白芷散寒祛风止痛; 黄芪、当归补气养血, 诸药共奏益肾壮骨、祛寒胜湿的功效。

本研究通过网络药理学筛选出益肾祛痹通络方

治疗 RA 的核心活性成分为槲皮素、β-谷甾醇、山柰酚、豆甾醇、木犀草素, 核心靶点为 MMP9、PTGS2、TLR4、JUN、TP53。研究表明, 槲皮素能够抑制 RA 破骨细胞的分化和成熟, 改善关节骨质破坏^[10]; β-谷甾醇具有抗氧化作用, 能够清除自由基抗氧化, 保护 RA 患者关节组织^[11]; 山柰酚能够抑制核因子-κB 信号通路, 减少 TNF-α 等炎症因子的释放, 从而减轻 RA 关节局部的炎症反应^[12]; 豆甾醇具有抗炎特性和调节免疫的功能, 通过调节炎症信号通路减轻关节炎症, 纠正免疫失衡抑制 RA 自身免疫反应^[13]; 木犀草素可抑制巨噬细胞释放炎症介质, 并调节淋巴细胞的增殖分化, 从而抑制 RA 多系统自身免疫反应^[14]。核心靶点中, MMP9 在 RA 滑膜和软骨中高表达, 能激活前炎症因子直接破坏关节软骨和骨基质, 导致 RA 关节结构性损伤^[15]; RA 滑膜细胞中炎症因子能诱导 PTGS2 表达, 催化花生四烯酸转化为前列腺素, 引起血管扩张、疼痛敏化和骨吸收^[16]; TLR4 在 RA 炎症反应中激活下游信号通路, 诱导大量促炎因子如 TNF-α、IL-17 和趋化因子的表达^[17]; TP53 在炎症环境下参与调控细胞衰老和炎症因子分泌, 其功能失活或突变会导致滑膜细胞凋亡受阻进而异常增殖^[18], 可见这些靶点均具有调节炎症反应的作用, 可通过介导炎症反应参与 RA 的发生过程。JUN 则在 RA 滑膜成纤维细胞中持续高表达, 驱动滑膜细胞的异常增殖与侵袭性生长, 是导致滑膜增生和血管翳形成的关键转录因子^[19]。分子对接结果提示上述核心活性成分与核心靶点蛋白之间结合能力高, 预测槲皮素、β-谷甾醇等与 MMP9、PTGS2, 豆甾醇、木犀草素等与 TLR4 之间可通过相互作用, 抑制 RA 炎症反应的异常激活, 发挥关节保护作用。GO 和 KEGG 通路富集分析结果表明, 益肾祛痹通络方治疗 RA 涉及 PI3K-AKT 信号通路、抗氧化反应等通路。综上, 本研究发现的靶点覆盖了 RA 炎症、免疫、滑膜增生、软骨破坏等病理环节, 而益肾祛痹

表 4 各组细胞悬液中 PI3K、AKT、mTOR mRNA 表达比较

Table 4 Comparison of PI3K, AKT and mTOR mRNA expression in cell suspensions among different groups

组别	样本数	AKT/ $\bar{x}\pm s$	mTOR/ $\bar{x}\pm s$	PI3K/M (P_{25}, P_{75})
空白组	3	1.14±0.61 ^{a)}	1.19±0.69 ^{a)}	0.94 (0.88, 1.21)
模型组	3	8.15±0.41	13.30±3.62	7.47 (5.76, 14.87)
甲氨蝶呤组	3	6.23±1.88 ^{b)}	11.94±3.45	2.23 (1.73, 3.27)
益肾祛痹通络方组	3	4.42±0.16 ^{a)}	8.14±4.49 ^{b)}	0.54 (0.37, 3.84)

注: AKT, 蛋白激酶 B; mTOR, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; PI3K, 磷脂酰肌醇 3-激酶。

a) 与模型组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$ 。

网络方可多靶点、多通路协同作用以治疗 RA。

网络药理学研究结果显示, PI3K-AKT 信号通路在益肾祛痹通络方治疗 RA 中发挥了作用, 而核心靶点 TLR4 亦与 PI3K-AKT 信号通路具有相关性。PI3K-AKT-mTOR 轴是 TLR4 响应炎症反应的关键点, TLR4 的激活是 PI3K-AKT 信号通路的重要上游信号, TLR4 的激活可通过允许衔接分子进入受体复合物导致 PI3K 的募集, 进而诱导炎症介质的产生^[20-21]。分子对接结果亦显示核心活性成分与 TLR4 具有高结合活性, 因此考虑益肾祛痹通络方治疗 RA 发挥作用的关键通路是 PI3K-AKT 信号通路, 选择该通路的相关因子进行细胞实验验证。PI3K-AKT 信号通路与 RA 发生发展密切相关^[22], mTOR 是该通路重要的下游靶点, 可通过功能复合物放大炎症信号深度参与 RA 病理环节^[23]。RA 滑膜组织增殖、炎症和新生血管翳形成依赖 PI3K-AKT-mTOR 信号通路的代谢调控功能^[24]。有研究表明, 中药干预 PI3K-AKT 信号通路具有免疫抑制作用, 可有效抑制 RA 滑膜增生, 减轻关节炎症反应^[25], 调控 mTOR 相关信号通路可增强细胞自噬活性, 使细胞增殖处于抑制状态, 进而减轻 RA 炎症反应^[26]。IL-17A 可通过释放前炎症因子促进 RA 炎症反应, TNF- α 由单核巨噬细胞产生, 参与滑膜成纤维细胞炎症介导、免疫调节等过程^[27], 故选此两个指标作为炎症指标。细胞实验验证结果显示, 采用益肾祛痹通络方含药血清干预 RA 模型细胞, 细胞上清液 IL-17A、TNF- α 水平显著降低, PI3K、AKT mRNA 表达降低, 表明该方能有效抑制炎症因子表达, 并抑制 PI3K-AKT-mTOR 信号通路关键分子表达, 从而抑制 RA 进展。因此我们认为, 益肾祛痹通络方可能通过多成分协同抑制 PI3K-AKT-mTOR 信号通路, 进而广泛抑制炎症介质的产生与释放, 以干扰 RA 滑膜细胞的异常改变。结合网络药理学分析结果, 核心靶点 TLR4 的激活作为 PI3K-AKT 信号通路的重要上游信号^[20], 提示益肾祛痹通络方可能通过作用于 TLR4 在源头抑制 PI3K-AKT-mTOR 通路的异常激活, 进而下调转录因子的活性, 减少炎症介质 TNF- α 、IL-17A 等合成, 干扰 RA 滑膜细胞的增殖进程。

综上, 益肾祛痹通络方通过槲皮素、 β -谷甾醇、豆甾醇、山柰酚、木犀草素等活性成分, 协同作用于 TLR4 等多靶点构成的网络, 有效抑制 PI3K-AKT-mTOR 信号通路激活, 减少 TNF- α 、IL-17A 等炎症因子分泌, 从而发挥治疗 RA 的作用。本研究

网络药理学算法未能充分考量中药成分间的拮抗, 对药效实际作用机制的评估可能存在偏差。目前仅构造细胞模型, 无法完全模拟药物在人体复杂内环境代谢过程。未来拟在现有细胞水平证据的基础上, 从动物水平验证益肾祛痹通络方调控 PI3K-AKT-mTOR 信号通路以抑制 RA 炎症反应的机制, 并检测关键靶蛋白在关节组织中的表达变化, 进一步广泛收集临床样本, 获取 RA 患者经过该方治疗前后的血清并进行通路蛋白磷酸化水平检测、关键转录因子核转位等实验, 以期更真实地解析益肾祛痹通络方的作用机制。

参考文献

- [1] 国家皮肤与免疫疾病临床医学研究中心(北京协和医院), 中国医师协会风湿免疫专科医师分会, 中国康复医学会风湿免疫病康复专业委员会, 等. 2024 中国类风湿关节炎诊疗指南[J]. 中华内科杂志, 2024, 63(11): 1059-1077.
- [2] 罗红梅, 贺东红, 冯伟, 等. 益肾祛痹通络汤治疗肾虚寒湿痹阻型类风湿关节炎 40 例[J]. 江西中医药大学学报, 2019, 31(5): 35-38.
- [3] 邱明亮, 李润洲, 肖晨晓, 等. 益肾祛痹通络方对肾虚寒湿痹阻型 CIA 大鼠 miR-150-5p/SOCS1 轴的调控作用[J]. 时珍国医国药, 2024, 35(4): 773-777.
- [4] 毛美玲, 卢健棋, 谢丽钰, 等. 基于网络药理学、分子对接探讨强心汤治疗慢性心力衰竭的潜在作用机制[J]. 中医杂志, 2023, 64(20): 2132-2137.
- [5] DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(W1): W357-W364.
- [6] BUZZAO D, STEININGER L, GUALA D, et al. The FunCoup Cytoscape App: multi-species network analysis and visualization[J]. Bioinformatics, 2024, 41(1): btac739.
- [7] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1103.
- [8] XU Z, SHANG W, ZHAO Z, et al. Curcumin alleviates rheumatoid arthritis progression through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway: an in vitro and in vivo study[J]. Bioengineered, 2022, 13(5): 12899-12911.
- [9] 中华中医药学会《类风湿关节炎病证结合诊疗指南》项目组. 类风湿关节炎病证结合诊疗指南(2025 年)[J]. 中医杂志, 2025, 66(17): 1842-1856.
- [10] 蒋海旭, 许杰, 陆清怡. 槲皮素治疗类风湿关节炎的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(5): 243-250.
- [11] 陈元堃, 曾奥, 罗振辉, 等. β -谷甾醇药理作用研究进

- 展[J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(1): 148-153.
- [12] 先梦麟, 耿娜娜, 邓琳, 等. 山柰酚调控细胞衰老治疗类风湿性关节炎的体外研究[J]. 陆军军医大学学报, 2023, 45(12): 1281-1291.
- [13] 吴力超, 李俊峰, 张婷婷, 等. 基于网络药理学和细胞实验探讨豆甾醇抗炎作用[J]. 中成药, 2022, 44(2): 609-615.
- [14] 李月平, 陈晓兰, 谢树才, 等. 基于网络药理学与体外实验探讨木犀草素治疗乳腺炎的作用机制[J]. 贵州科学, 2025, 43(1): 51-60.
- [15] LUO JF, YU Y, LIU JX. Mechanism of asperosaponin VI related to EGFR/MMP9/AKT/PI3K pathway in treatment of rheumtoid arthritis [J]. Chin J Integr Med, 2025, 31(2): 131-141.
- [16] TANAKA M, SHIRAKURA K, TAKAYAMA Y, et al. Endothelial ROBO4 suppresses PTGS2/COX-2 expression and inflammatory diseases[J]. Commun Biol, 2024, 7(1): 599.
- [17] LI X, LI X, HUANG P, et al. Acetylation of TIR domains in the TLR4-Mal-MyD88 complex regulates immune responses in sepsis [J]. EMBO J, 2024, 43(21): 4954-4983.
- [18] EBRAHIMIYAN H, MADRESEH E, AKHTARI M, et al. TP53 gene polymorphism (Rs1042522) in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: an updated systematic review and meta-analysis [J]. Curr Rheumatol Rev, 2025, 21(4): 468-476.
- [19] KINNE RW, BRÄUER R, STUHLMÜLLER B, et al. Macrophages in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res, 2000, 2(3): 189-202.
- [20] BOBKOVA T, BOBKOV A, LI Y. Pharmacological inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway in rheumatoid arthritis synoviocytes: a systematic review and meta-analysis (preclinical) [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2025, 18(8): 1152.
- [21] 朱浩, 胡丽娟, 万婧. 血府逐瘀合剂通过调控 TLR4/PI3K/AKT/mTOR 信号通路改善冠心病大鼠心肌损伤 [J]. 广州中医药大学学报, 2025, 42(10): 2539-2548.
- [22] VAN HUIZEN E, MCINERNEY GM. Activation of the PI3K-AKT pathway by old world alphaviruses [J]. Cells, 2020, 9(4): 970.
- [23] 李辉明, 邢涛, 魏国俊, 等. PI3K/Akt 信号通路在类风湿关节炎中的作用研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2024, 30(7): 1060-1066.
- [24] JOSHI L, AGNIHOTRI P, SAQUIB M, et al. The role of ITIH4 in regulating the PI3K/Akt signaling in rheumatoid arthritis [J]. Rheumatology (Oxford), 2025, 64(11): 5969-5980.
- [25] 王小玉, 孔佑虔, 李泽光. 中药单体调控 PI3K/Akt 信号通路干预类风湿关节炎的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2024, 21(18): 192-194.
- [26] 康勤龙, 李开杨, 高闻, 等. mTOR 信号通路在防治类风湿关节炎中的作用及中医外治法干预的研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2025, 59(7): 88-92.
- [27] CALABRESI E, PETRELLI F, BONIFACIO AF, et al. One year in review 2018: pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. Clin Exp Rheumatol, 2018, 36(2): 175-184.

Mechanism of *Yishen Qubi Tongluo Formula* (益肾祛痹通络方) in the Treatment of Rheumatoid Arthritis: Based on Network Pharmacology, Molecular Docking and Experimental Verification

XU Liuping^{1,2}, YANG Canyu², LU Ying², MO Lisha^{1,2}, CHI Qiang^{1,2}, XIA Yuan^{1,2}, LIU Shuijuan^{1,2}, QIU Mingliang^{1,2}

1. Affiliated Hospital of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang, 330006; 2. Clinical Medical College of Jiangxi University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the mechanism of *Yishen Qubi Tongluo Formula* (益肾祛痹通络方, YQTF) in the treatment of rheumatoid arthritis (RA). **Methods** Network pharmacology was employed to retrieve and screen the active components and potential targets of YQTF as well as RA-related targets using databases including TCMS, BATMAN, ETCM and GEO. The intersection of targets related to active components and RA-related targets was identified, and a protein-protein interaction (PPI) network was constructed. Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed, and a drug-active component-common target network of YQTF in the treatment of RA was established. The core components of YQTF were molecularly docked with key targets. Human rheumatoid arthritis synovial fibroblast cell line MH7A was divided into blank group, model group, methotrexate group and YQTF group. The blank group was cultured with 10% fetal bovine serum, while the other three groups were stimulated with 10 μg/L of recombinant human tumor necrosis factor-α (TNF-α) for 24 h to establish the RA cell model. On this basis, the methotrexate group

was treated with methotrexate suspension at a concentration of 20 $\mu\text{mol/L}$, and the YQTF group was treated with 10% YQTF-medicated serum. After 48 h of intervention, the levels of TNF- α and interleukin-17A (IL-17A) contents in cell supernatants were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and mRNA expressions of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase B (AKT) and mammalian target of rapamycin (mTOR) were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). **Results** Network pharmacological analysis identified 209 active components and 583 potential target genes of YQTF, as well as 818 RA-related targets. A total of 29 common targets were obtained from the intersection of drug-related targets and RA-related targets. Quercetin, β -sitosterol, kaempferol, stigmasterol and luteolin were the core active components of YQTF for the treatment of RA, while matrix metalloproteinase-9 (MMP9), prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), Toll-like receptor 4 (TLR4), tumor protein p53 (TP53) and transcription factor AP-1 subunit JUN were the key targets. The GO and KEGG pathway enrichment analysis showed that the involved biological processes and pathways were mainly associated with antioxidant responses, PI3K-AKT signaling pathway and Toll-like receptor (TLR) signaling pathway. Molecular docking results showed that MMP9 and PTGS2 exhibited high binding affinities with quercetin, β -sitosterol, kaempferol, stigmasterol and luteolin; TLR4 exhibited high binding activities with β -sitosterol, stigmasterol and luteolin; and TP53 showed high binding affinity with luteolin. The results of cell experiments showed that compared with the control group, the contents of TNF- α and IL-17A as well as the mRNA expressions of AKT and mTOR in the model group significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, all the above indicators significantly decreased in the YQTF group, while the contents of TNF- α and the mRNA expression of AKT significantly decreased in the methotrexate group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The mechanism of YQTF in the treatment of RA may be associated with reducing inflammatory cytokine secretion and inhibiting the activation of the PI3K-AKT-mTOR signaling pathway.

Keywords rheumatoid arthritis; network pharmacology; molecular docking; cell experiment; *Yishen Qubi Tongluo Formula* (益肾祛痹通络方)

(收稿日期: 2025-08-11; 修回日期: 2026-01-01)

[编辑: 姜 冰]

广告

《中医杂志(英文版)》欢迎投稿

Journal of Traditional Chinese Medicine [《中医杂志(英文版)》] (ISSN 0255-2922, CN 11-2167/R, 双月刊) 由中华中医药学会与中国中医科学院联合主办, 是我国中医药界具有权威的中医药英文科技期刊, 现发行和交换 90 多个国家和地区。

《中医杂志(英文版)》自 1981 年创刊以来一直坚持正确的办刊宗旨, 国际影响力不断提升。2010 年入选 SCI-E (《科学引文索引》扩刊版), 2011 年获得中国中医科学院自主选题项目资助, 2013 年获得“中国科技期刊国际影响力提升计划”资助, 自 2012 年起连续被评为“中国最具国际影响力学术期刊”, 2023 年再次入选“T1 级中医药英文科技期刊目录”。本刊先后被国际知名文献数据库 MEDLINE、《化学文摘》(CA)、《医学文摘》(EM) 等收录, 是 MEDLINE 收录的第一份中国出版的中医药期刊, 是 SCI 收录的 30 余种全科医学和替代医学期刊中的中国传统医学综合性学术期刊之一。

《中医杂志(英文版)》主要栏目包括循证研究、理论研究、基础研究、临床观察、中药研究、文献研究, 思路与方法、综述等。内容以报道中医药基础、临床研究成果和科研前沿进展为主, 覆盖中医药学科各个领域。欢迎广大专家学者积极投稿。作者可直接登录本刊网站 <http://www.journaltcm.cn> 投稿。

联系邮箱: jtcmen@126.com。联系电话: 010-64089190。

联系地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 邮政编码: 100700。