

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.20.012

实验研究

基于网络药理学比较黄芪桂枝五物汤和四神煎治疗类风湿关节炎的作用机制

马慧莱¹, 侯宇芯¹, 王爱成¹, 刘海鑫¹, 李青山¹✉, 王任小²✉

1. 山西中医药大学, 山西省晋中市榆次区大学街 121 号, 030619; 2. 复旦大学药学院



[摘要] **目的** 探讨黄芪桂枝五物汤和四神煎治疗类风湿关节炎(RA)的可能作用机制。**方法** 首先采用网络药理学研究方法,收集 RA 疾病靶点和黄芪桂枝五物汤、四神煎中药成分靶点,并收集中药归经和证候信息。通过 Cytoscape 3.9.0 软件构建“中药-成分-靶点-疾病”网络、中药-归经网络和中药-证候网络。基于 STRING 数据库构建蛋白质相互作用网络,进行 KEGG 通路富集分析。由“中药-成分-靶点-疾病”网络筛选关键化合物,蛋白相互作用网络筛选核心靶点,基于关键化合物和靶点进行分子对接。再进行细胞实验验证:采用 10 ng/ml 白细胞介素 1 β (IL-1 β) 诱导成纤维样滑膜细胞 (FLS) 建立细胞炎症模型后,用不同浓度的黄芪桂枝五物汤及其拆方、四神煎及其拆方分别干预 24h 后,通过 MTT 实验和 ELISA 法检测细胞存活率和白细胞介素 6 (IL-6) 水平。建立 RAW264.7 细胞炎症模型,经关键化合物分别干预 24 h 后,检测细胞上清中一氧化氮 (NO) 含量及细胞中 P53 基因表达。**结果** 药靶网络筛选得到黄芪桂枝五物汤和四神煎治疗 RA 的十种关键化合物包括槲皮素、山柰酚、异鼠李素、刺芒柄花素、没食子酸、儿茶素、花旗松素、木犀草素、黄芩素、汉黄芩素;据蛋白相互作用筛选得到核心靶点 AKT1、PIK3CA、HRAS、NCOA1、TP53、STAT3、CCNA2;其中 P53 靶点与十种关键化合物亲和力较强。此外,富集分析结果表明,黄芪桂枝五物汤和四神煎通过调控 PI3K-AKT、MAPK、JAK/STAT 等多种信号通路发挥治疗作用。细胞实验表明,不同浓度黄芪桂枝五物汤、四神煎以及拆方均可抑制 FLS 细胞的炎性增殖和 IL-6 分泌 ($P<0.01$)。除儿茶素外,其余关键化合物均可抑制 RAW264.7 细胞上清液 NO 分泌,且刺芒柄花素还可促进 P53 基因表达 ($P<0.01$)。**结论** 黄芪桂枝五物汤配伍由桂枝、白芍协同辅助黄芪,作用于 AKT1、PIK3CA、TP53 等核心靶点调控 PI3K-AKT、MAPK 等信号通路发挥治疗 RA 的作用;四神煎以金银花、牛膝、石斛制约黄芪的温补之力,作用于 AKT1、STAT3、TP53 等核心靶点调控 PI3K-AKT、JAK/STAT 等信号通路发挥治疗 RA 的作用,而黄芪活性成分刺芒柄花素可能通过调节 P53 靶点治疗 RA。

[关键词] 类风湿关节炎;黄芪;黄芪桂枝五物汤;四神煎;网络药理学;炎症因子;刺芒柄花素

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性自身免疫性疾病,具有多关节病变的特点,常伴多种并发症。中医学认为,类风湿关节炎发病的根本原因在于机体正气不足,外邪侵袭留滞关节,治疗以益气行气为主,用药以味甘、辛,性温为主,常用中药有白芍、黄芪、桂枝等^[1]。黄芪是补气固表之圣药,其多种复方可有效治疗类风湿关节炎,主要有黄芪桂枝五物汤^[2-3]、四神煎^[4]

等。黄芪桂枝五物汤出自《金匮要略》,具有活血化瘀、疏经通络的作用,可调节免疫,治疗风寒痹阻型类风湿关节炎^[5]和阳虚寒凝型多种风湿病^[6]。四神煎首载于《验方新编》,可以缓解气阴两虚型类风湿关节炎病程^[7],在改善患者疾病症状、降低患者体内异常的免疫炎症反应等方面优势突出^[4]。类风湿性关节炎的发病机制通常为患者体内白细胞介素 6 (IL-6)、一氧化氮 (NO) 等炎症因子升高,激活丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路和核因子 κ B (NF- κ B) 通路,产生肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和 IL-6^[8]。本研究运用网络药理学方法,进行黄芪桂

基金项目:中国科学院上海有机化学研究所生命有机化学国家重点实验室开放基金

✉ 通讯作者: sxlqs2012@163.com; wangrx@fudan.edu.cn

枝五物汤和四神煎两种中药复方治疗类风湿关节炎的机制对比分析,并探讨两个复方中君药黄芪在复方中发挥疗效的可能分子机制;通过细胞实验验证其配伍特点,并进一步筛选发挥该作用机制的有效成分,为类风湿关节炎的相关研究提供理论依据。

1 网络药理学分析

1.1 类风湿关节炎靶点的收集

通过在线孟德尔人类遗传数据库 (OMIM, <https://omim.org/>)、综合性的基因-疾病关联关系数据库 (DisGeNET, <http://www.disgenet.org/>)、Gene Cards (<https://www.genecards.org/>) 和人类疾病数据库 (MalaCards, <https://www.malacards.org/>),以“Rheumatoid arthritis”为关键词进行检索,去重整理得到类风湿关节炎的疾病靶点。

1.2 黄芪、黄芪桂枝五物汤和四神煎活性成分的筛选

通过中药系统药理学数据库及分析平台 (TCMSP, <http://tcmsp.w.com/tcmsp.php>)、中药综合数据库 (TCMID, <http://www.megabionet.org/tc-mid/>) 和中医药百科全书数据库 (ETCM, <http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/Home/>) 分别以“黄芪”“桂枝”“白芍”“生姜”“大枣”“牛膝”“远志”“金银花”“石斛”为关键词进行检索,并按照条件口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (DL) ≥ 0.18 进行筛选,得到黄芪、黄芪桂枝五物汤、四神煎的活性成分。

1.3 黄芪、黄芪桂枝五物汤和四神煎治疗类风湿关节炎的靶点预测

将筛选得到的活性成分通过 ETCM 和 STITCH 数据库 (<http://stitch.embl.de/>) 以置信度分数 0.8 为条件筛选靶点。通过 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 筛选文献中的化合物-基因共现、与蛋白质结合的三维结构、药物-基因相互作用三个部分和生物活性结果不超过 $100\ \mu\text{mol/L}$ 的作用靶点,靶点物种来源须为“人”。经 DrugBank 数据库 (<http://www.drugbank.ca>) 收集全部靶点,去除重复部分整理后得到各成分的对应该靶点。经由 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 标准化靶点基因名,得到黄芪、黄芪桂枝五物汤和四神煎的成分靶点,并利用 Venny 2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 将成分靶点与疾病靶点进行匹配映射分别得到三者治疗类风湿关节炎的作用靶点。

1.4 药靶网络和归经、证候网络的构建

通过软件 Cytoscape 3.9.0 (<http://cytoscape.org/>) 进行网络的可视化处理和拓扑分析。据共同靶点分别构建黄芪、黄芪桂枝五物汤、四神煎与类风湿关节炎的“药物-成分-靶点-疾病”网络及复合药靶网络。据中医药证候关联数据库 SymMap (<http://www.symmap.org/>) 和 ETCM 数据库分别收集黄芪桂枝五物汤和四神煎复方中各药味对应的中医症状、药性归经等信息,构建“中药-证候”网络和“中药-归经”网络。

1.5 中药重叠靶点分析

基于黄芪桂枝五物汤、四神煎治疗类风湿关节炎的作用靶点,分别计算两个复方中其他各味中药成分靶点与黄芪成分靶点的重叠靶点数占各自中药成分靶点数的比值。

1.6 蛋白质相互作用网络的构建与通路富集分析

将黄芪、黄芪桂枝五物汤、四神煎与类风湿关节炎的共同靶点分别导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>),设置物种为“Homo Sapiens”,为保证数据可靠性,在 Settings 模块选择可靠性分值为 0.99,选择隐藏单个节点,其他参数均为默认值,分别得到三者与类风湿关节炎共同靶点的蛋白-蛋白相互作用关系网络,保存为 TSV 格式,并使用 STRING 数据库的 Analysis 模块进行 KEGG 通路富集分析。

1.7 分子对接

根据构建的“药物-成分-靶点-疾病”网络分别选取黄芪、黄芪桂枝五物汤、四神煎药理网络中度值排名前 7 个活性成分,整理去重得到 10 个候选化合物。采用 Chem3D 17.1 软件构建并优化活性成分的分子结构,输出为 mol2 格式文件。根据三者蛋白-蛋白相互作用网络筛选度值排名前 5 的蛋白靶点,整理去重得到 7 个靶点,从 Protein Data Bank 数据库 (<https://www.rcsb.org/pdb/>) 下载靶点蛋白的 PDB 格式结构文件,包括 6HHF (AKT1)、4A55 (PIK3CA)、4Q95 (HRAS)、5MWY (NCOA1)、4GWG (TP53)、1Q1M (STAT3) 和 3EOC (CCNA2)。利用 PyMOL 2.3.4 软件去除蛋白质晶体复合物中的水和小分子。利用 AutoDock 4.2.6 软件 (<https://autodock.scripps.edu/>) 对蛋白进行加氢、计算电荷、添加原子类型等预处理并转换为 pdbqt 格式。根据以上复合物晶体结构中的原配体所在位置为中心定义活性口袋,根据作用位点,调整对接盒子的位置和尺寸。分子对接中设置

构象数量为 100，设置计算精度为默认，采用拉马克遗传算法进行分子对接。结果以对接分数显示，对接分数绝对值越大，化合物与靶点亲和力越强。

2 网络药理学分析结果

2.1 药物与疾病共同靶点的收集

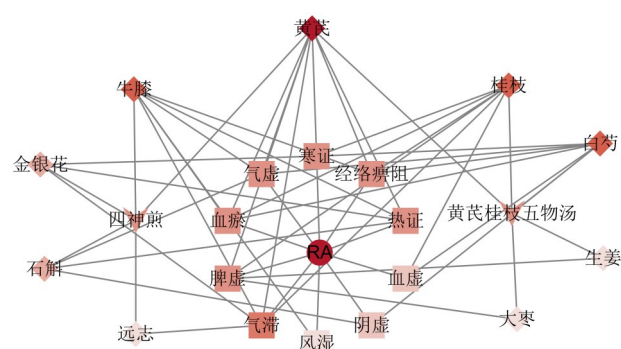
收集到 5387 个类风湿关节炎疾病靶点。将收集的中药活性成分靶点与类风湿关节炎靶点进行匹配映射，得到活性成分与疾病的共同靶点。其中，黄芪靶点数为 260 个，去掉各药物成分间的重叠靶点后，黄芪桂枝五物汤复方靶点数为 378 个，四神煎复方靶点数为 332 个。

2.2 “药物-成分-靶点-疾病”网络的构建

根据 Cytoscape3.9.0 软件网络拓扑分析，黄芪成分中网络度值大于均值 5.76 的有 16 个，介数中心性和接近中心性数值大于均值的成分有 6 个，包括山柰酚、异鼠李素、刺芒柄花素、豆甾醇、常春藤皂苷元和白桦脂酸；介数中心性和接近中心性数值大于均值的靶点有 6 个，按度值排序依次为 CASP3、IL6、CASP9、TYR、ACHE、INS。黄芪桂枝五物汤成分中网络度值大于均值 7.76 的有 50 个，介数中心性和接近中心性数值大于均值的成分只有槲皮素；靶点有 12 个，包括 CASP3、IL6、ACHE、INS、TYR、CASP9、AR、CASP8、ESR1、NR1I2、VDR、NFE2L2。四神煎成分中网络度值大于均值 8.12 的有 38 个，介数中心性和接近中心性数值大于均值的成分有 14 个，包括木犀草素、黄芩素、山柰酚、异鼠李素、刺芒柄花素、汉黄芩素、 β -谷甾醇、豆甾醇、常春藤皂苷元、硫酸小檗碱、 α -菠菜甾醇、吴茱萸次碱、白桦脂酸和吴茱萸碱；靶点有 12 个，包括 IL6、INS、CASP3、ACHE、TYR、CASP9、CASP8、NR3C1、ALDH1A1、NFKB1、SHBG、NR1I3。黄芪、黄芪桂枝五物汤、四神煎与类风湿关节炎的“药物-成分-靶点-疾病”网络见附图 1（请扫描本文二维码获取）。

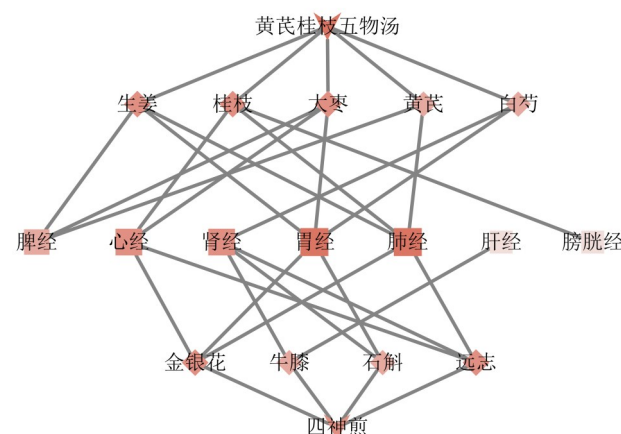
2.3 黄芪桂枝五物汤、四神煎中药-证候网络及中药-归经网络

图 1、图 2 示，黄芪桂枝五物汤归经为肺经、胃经和脾经，与黄芪、桂枝、生姜、大枣均有连线的证候有脾虚，与黄芪、桂枝、白芍均有连线的证候有血瘀、寒证、经络痹阻。四神煎归经于肺经和肾经，与黄芪、牛膝、金银花、远志均有连线的证候有气滞，与黄芪、牛膝、金银花、石斛均有连线的证候有热证。



注：RA，类风湿关节炎；◆代表中药；▼代表复方；●代表疾病；■代表中医证候。节点颜色越深代表度值越大。

图 1 黄芪桂枝五物汤和四神煎的中药-证候网络



注：◆代表中药；▼代表复方；■代表归经。节点颜色越深代表度值越大。

图 2 黄芪桂枝五物汤和四神煎的中药-归经网络

2.4 黄芪桂枝五物汤和四神煎其他中药组成与黄芪重叠靶点结果

黄芪桂枝五物汤中桂枝、白芍为臣药，其靶点中与黄芪相同的靶点占比分别为 86.6%、91.9%，均与黄芪存在大部分的重叠靶点；生姜、大枣与黄芪重叠靶点占比分别为 69.3%、72.9%。在四神煎中，以石斛为臣药，其靶点中与黄芪相同的靶点占 67.5%；金银花、牛膝与黄芪重叠靶点较多，占比分别为 87.2%、85.4%，远志与黄芪相同靶点的占比为 84.6%。

2.5 黄芪桂枝五物汤和四神煎的关键化合物筛选结果

黄芪桂枝五物汤、四神煎方中中药成分按中药名称首字母编号。经 Cytoscape 3.9.0 软件构建黄芪桂枝五物汤、四神煎治疗类风湿关节炎的复合药物靶点网络（见附图 2，请扫描本文二维码获取），得到 10 个关键化合物（见表 1）。

2.6 黄芪、黄芪桂枝五物汤和四神煎的关键靶点

据网络拓扑分析，高于度值和介数中心性均值

表1 黄芪桂枝五物汤、四神煎的治疗类风湿关节炎的
10个关键化合物

来源药物	关键化合物	度值
黄芪/大枣/金银花/牛膝	槲皮素	178
金银花	木犀草素	110
牛膝	黄芩素	81
黄芪/白芍/金银花/牛膝	山柰酚	61
桂枝	花旗松素	52
白芍	没食子酸	51
桂枝	儿茶素	50
黄芪	异鼠李素	49
黄芪	刺芒柄花素	47
牛膝	汉黄芩素	46

的关键靶点黄芪有 11 个, 包括 AKT1、NCOA1、PIK3CA、TP53、PIK3R1、CCND1、ESR1、CASP8、CDK2、JUN、CASP9; 黄芪桂枝五物汤有 19 个, 包括 AKT1、PIK3CA、HRAS、NCOA1、TP53、SRC、CDK2、CCND1、CYBA、ESR1、MYC、APOB、CYBB、CASP9、LDLR、APOE、STAT6、IL13、PTPN1; 四神煎有 18 个, 包括 AKT1、NCOA1、STAT3、CCNA2、JUN、TP53、HSP90AA1、PIK3R1、MYC、CASP8、CDK2、CCND1、SRC、ESR1、APOB、CASP9、LDLR、APOE。黄芪、黄芪桂枝五物汤和四神煎与类风湿关节炎共同靶点的蛋白-蛋白相互作用关系网络见附图 3 (请扫描本文二维码获取)。以上靶点均按在网络中重要度排序, 选择每组度值最高的前 4 个靶点, 整合得到 AKT1、PIK3CA、HRAS、NCOA1、TP53、STAT3、CCNA2 这 7 个核心靶点作为受体进行分子对接。

2.7 黄芪桂枝五物汤、四神煎关键化合物与核心靶点的分子对接研究结果

将药理网络筛选得到的 10 个关键化合物与蛋白相互作用网络中的 7 个核心靶点进行分子对接, 对接分数见表 2。结果显示, 靶点 TP53 与大部分关

键化合物的对接分数绝对值最大。其中, 黄芪 4 个成分槲皮素、山柰酚、异鼠李素和刺芒柄花素均占前五。

2.8 KEGG 通路富集分析结果

黄芪桂枝五物汤富集到 207 条信号通路, 四神煎富集到 205 条信号通路, 其中黄芪桂枝五物汤包含共有靶点数前 10 位的信号通路为代谢途径、磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K-AKT) 信号通路、环磷酸腺苷 (cAMP) 信号通路、端粒结合蛋白 (Rap1) 信号通路、丝裂原活化的蛋白激酶 (MAPK) 信号通路、细胞凋亡、缺氧诱导因子 (HIF-1) 信号通路、信号转导 (Ras) 信号通路、雌激素信号通路、趋化因子信号通路; 四神煎为 PI3K-AKT 信号通路、代谢途径、cAMP 信号通路、细胞凋亡、HIF-1 信号通路、雌激素信号通路、肿瘤坏死因子 (TNF) 信号通路、甲状腺激素信号通路、松弛素信号通路、Rap1 信号通路。

3 细胞实验

3.1 细胞培养

小鼠单核巨噬细胞 (RAW264.7) 和小鼠成纤维样滑膜细胞 (FLS) 均购自中国科学院上海细胞库, 采用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基在 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中培养。

3.2 药物及制备

黄芪桂枝五物汤组成: 黄芪、桂枝、白芍、生姜、大枣, 比例为 1:1:1:2:1。加 10 倍量的水浸泡 30 min, 水煎提取 1 h, 放冷过滤, 剩余药渣再加入 8 倍量的水继续煎煮 40 min, 合并两次滤液, 浓缩制成 200 mg/ml 药液。根据网络药理学结果, 黄芪桂枝五物汤中与黄芪存在重叠靶点最多的药物为桂枝、白芍组成黄芪桂枝五物汤拆方, 黄芪、桂枝、白芍比例为 1:1:1, 采用黄芪桂枝五

表2 黄芪桂枝五物汤、四神煎治疗类风湿关节炎的关键化合物-潜在核心靶点分子对接分数

关键化合物	AKT1	PIK3CA	HRAS	NCOA1	TP53	STAT3	CCNA2
槲皮素	-7.34	-8.09	-6.70	-7.94	-9.67	-7.45	-8.91
木犀草素	-7.95	-7.61	-6.60	-8.06	-9.54	-7.40	-8.21
黄芩素	-7.36	-7.71	-7.74	-7.70	-8.47	-7.41	-8.42
山柰酚	-7.31	-7.93	-6.49	-7.83	-9.22	-7.27	-8.70
花旗松素	-6.55	-7.94	-5.30	-7.65	-8.37	-4.42	-8.08
没食子酸	-4.88	-6.83	-5.18	-4.51	-6.13	-5.47	-5.79
儿茶素	-6.30	-7.56	-6.22	-6.84	-7.61	-4.44	-7.82
异鼠李素	-7.52	-8.12	-6.72	-7.63	-8.98	-7.30	-7.66
刺芒柄花素	-7.35	-8.36	-7.02	-8.02	-9.63	-6.81	-8.91
汉黄芩素	-7.35	-7.61	-6.63	-7.19	-8.58	-7.36	-8.06

物汤制备方法制成 200 mg/ml 药液。四神煎组成：黄芪 10 g、金银花 10 g(后下)、石斛 10 g、川牛膝 10 g、远志 3 g。按上述药物，加 14 倍量的水，水煎提取 40 min 后，加入金银花继续煎煮 20 min，放冷过滤，剩余药渣再加入 12 倍量的水煎煮 1 h，合并两次滤液，浓缩制成 200 mg/ml 药液。四神煎中与黄芪存在重叠靶点最多的药物为牛膝、金银花组成四神煎拆方，黄芪、牛膝、金银花比例为 1:1:1，采用四神煎制备方法制成 200 mg/ml 药液。中药饮片均购于北京同仁堂。

槲皮素(批号: MUST-20101104)、山柰酚(批号: MUST-20082818)、刺芒柄花素(批号: MUST-21033005)、异鼠李素(批号: MUST-21010510)、木犀草素(批号: MUST-20102418)、黄芩素(批号: MUST-20101105)、汉黄芩素(批号: MUST-21030911)、没食子酸(批号: MUST-21030805)、花旗松素(批号: MUST-20070818)、儿茶素(批号: MUST-20073012)，成都曼斯特生物科技有限公司；白细胞介素 1 β (IL-1 β) 蛋白粉(批号: LC15AP0814)，北京义翘神州科技股份有限公司；甲氨蝶呤(批号: 65795)，MedChemExpress 公司。

3.3 主要试剂及仪器

DMEM(高糖)干粉(批号: 2312930)，美国 Gibco 公司；小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒(批号: 9680028101)，ABelonal 公司；脂多糖(LPS，批号: L8880)、噻唑蓝(MTT，批号: 1223G0535)，北京索莱宝科技有限公司；NO 检测试剂盒(批号: 022421210608)，碧云天生物技术有限公司；Trizol(批号: AJ11039A)、PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA(批号: RR047A)、TB Green Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus，批号: RR820A)，Takara 公司；小鼠内参 GAPDH(批号: B661304)，生工生物工程(上海)股份有限公司；姜黄素(批号: A0086)，成都曼思特生物科技有限公司。

倒置光学显微镜(型号 AE2000)，德国麦克奥迪 Motic；连续多波长功能化学发光荧光酶标仪(型号 SpectraMax13x)，美国赛默飞世尔科技公司；高速冷冻离心机(型号 TGL-16.5M)，上海 Gene-speed 公司；荧光定量 PCR 仪(型号 ABI A28567 QS3)，美国 Thermo 公司。

3.4 FLS 细胞分组、给药及观察指标方法

采用 10 ng/ml 的 IL-1 β 干预成纤维样滑膜细胞 24 h 建立炎症模型^[9]。据 MTT 预实验结果，调整细胞密度为 6 $\times$ 10⁴ 个/ml，以每孔 100 μ l 接种于无菌 96

孔板中，于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 24 h。实验分为两个实验：1) 将细胞分为空白组，模型组，甲氨蝶呤组，黄芪桂枝五物汤低、中、高剂量组，黄芪桂枝五物汤拆方低、中、高剂量组。2) 将细胞分为空白组，模型组，甲氨蝶呤组，四神煎低、中、高剂量组，四神煎拆方低、中、高剂量组。每组 3 个复孔。两个实验独立进行，除空白组外，其余各组细胞建立炎症模型。各组细胞造模同时给药，给药浓度均根据预实验选取，甲氨蝶呤组给药浓度为 5 μ mol/L；黄芪桂枝五物汤低、中、高剂量组给药浓度分别为 600、800、1000 μ g/ml；黄芪桂枝五物汤拆方低、中、高剂量组给药浓度分别为 300、400、500 μ g/ml；四神煎低、中、高剂量组给药浓度分别为 600、800、1000 μ g/ml；四神煎拆方低、中、高剂量组给药浓度分别为 419、558、698 μ g/ml。空白组和模型组给予 100 μ l 培养基，各给药组均制成终浓度为上述浓度的培养基溶液，每孔 100 μ l。

给药后继续培养 24 h 后进行指标观察：1) 采用 MTT 法检测，用酶标仪检测 OD 值，计算各组细胞存活率，评价药物对细胞炎性增殖的影响，实验重复 3 次，取平均值。细胞存活率=实验组 OD 值/空白组 OD 值 $\times$ 100%。2) 收集细胞上清液，按 ELISA 试剂盒说明书检测各组细胞上清 IL-6 表达，实验重复 3 次，取平均值。

3.5 RAW264.7 细胞分组、给药及指标观察方法

根据 MTT 预实验结果，取对数生长期 RAW 264.7 细胞，调整细胞数为 1 $\times$ 10⁵ 个/ml，每孔 100 μ l 接种于 96 孔板中。培养 24 h 后，使用终浓度为 1 μ g/ml 的 LPS 刺激 RAW264.7 细胞建立炎症模型^[10]。继续培养 2 h 后，加入不同浓度的药液干预细胞。设置空白组，模型组，姜黄素组，黄芪桂枝五物汤低、中、高剂量组，四神煎低、中、高剂量组，10 个关键化合物高、中、低剂量组，每组 3 个复孔。黄芪桂枝五物汤及四神煎低、中、高剂量组给药浓度分别为 600、800、1000 μ g/ml；姜黄素组给药浓度为 25 μ mol/L。10 个关键化合物是“中药-成分-靶点-疾病”网络筛选得到的刺芒柄花素、槲皮素、山柰酚、异鼠李素、花旗松素、儿茶素、没食子酸、木犀草素、黄芩素、汉黄芩素，各给药浓度根据预实验选取。槲皮素高、中、低剂量组给药浓度分别为 16、8、4 μ mol/L，异鼠李素、没食子酸、儿茶素均分别为 40、20、10 μ mol/L，刺芒柄花素、黄芩素、花旗松素、汉黄芩素均分别为 20、10、5 μ mol/L，山柰酚给药浓度分别为 8、4、

2 $\mu\text{mol/L}$, 木犀草素分别为 10、5、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 。空白组和模型组给予 100 μl 培养基, 各给药组均制成终浓度为上述浓度的培养基溶液, 每孔 100 μl 。药物干预 24 h 后收集细胞上清, 利用 NO 试剂盒检测 RAW 264.7 细胞上清中 NO 的含量。

基于 NO 检测结果, 以各药物高剂量干预 RAW264.7 细胞, 检测 P53 基因的表达。设置空白组、模型组以及 10 个关键化合物组, 其中槲皮素为 16 $\mu\text{mol/L}$; 异鼠李素、没食子酸、儿茶素均为 40 $\mu\text{mol/L}$; 刺芒柄花素、黄芩素、花旗松素、汉黄芩素均为 20 $\mu\text{mol/L}$; 山柰酚为 8 $\mu\text{mol/L}$; 木犀草素为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。干预方法同上, 药物干预 24 h 后提取每组 RNA 并测定其浓度。采用 SYBR 荧光定量 PCR 试剂盒、TB Green Premix Ex Taq™ II, 参照说明书配制反应体系进行检测。计算各靶基因的 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 值, 并以正常组的 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 值作为基线计算各目的基因的相对表达水平。靶基因引物序列和内参均由生工生物工程股份有限公司合成。P53 引物序列为 TGGAAGGAAATTTGTATCCCGA, GTGGATGG-TGGTATACTCAGAG, 长度 110 bp; TNF- α 引物序列为 ATGTCTCAGCCTCTTCTCATTC, GCTTGTCACCTCGAATTTTGAGA, 长度 179 bp。

3.6 统计学方法

数据均采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析 & 图形绘制。计量资料均符合正态分布及方差齐性, 各组数据均以均值 $\pm$ 标准差表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

4 细胞实验结果

4.1 各组 FLS 细胞存活率比较

表 3、表 4 示, 与空白组比较, 模型组细胞存活率显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 甲氨蝶呤组、黄芪桂枝五物汤及其拆方各剂量组、四神煎各剂量组、四神煎拆方高剂量组细胞存活率均显著降低 ($P<0.01$)。与甲氨蝶呤组比较, 四神煎拆方低、中、高剂量组和四神煎低剂量组细胞存活率显著升高 ($P<0.01$)。与四神煎高剂量组比较, 四神煎拆方低、中、高剂量组细胞存活率显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。黄芪桂枝五物汤和四神煎各剂量组组间细胞存活率差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

4.2 各组 FLS 上清 IL-6 表达比较

表 5、表 6 示, 与空白组比较, 模型组 IL-6 的分泌显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 甲氨

表 3 不同剂量黄芪桂枝五物汤及其拆方对成纤维样滑膜细胞细胞存活率的影响 (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	细胞存活率
空白组	3	100
模型组	3	107.03 $\pm$ 0.04 ^{a)}
黄芪桂枝五物汤低剂量组	3	95.41 $\pm$ 0.01 ^{b)}
黄芪桂枝五物汤中剂量组	3	93.69 $\pm$ 0.05 ^{b)}
黄芪桂枝五物汤高剂量组	3	91.05 $\pm$ 0.02 ^{b)}
黄芪桂枝五物汤拆方低剂量组	3	96.42 $\pm$ 0.02 ^{b)}
黄芪桂枝五物汤拆方中剂量组	3	94.48 $\pm$ 0.04 ^{b)}
黄芪桂枝五物汤拆方高剂量组	3	92.04 $\pm$ 0.05 ^{b)}
甲氨蝶呤组	3	88.68 $\pm$ 0.06 ^{b)}

注: a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

表 4 不同剂量四神煎及其拆方对成纤维样滑膜细胞细胞存活率的影响 (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	细胞存活率
空白组	3	100
模型组	3	109.75 $\pm$ 0.02 ^{a)}
四神煎低剂量组	3	99.31 $\pm$ 0.01 ^{b) c)}
四神煎中剂量组	3	95.25 $\pm$ 0.08 ^{b)}
四神煎高剂量组	3	91.39 $\pm$ 0.02 ^{b)}
四神煎拆方低剂量组	3	105.75 $\pm$ 0.03 ^{c) d)}
四神煎拆方中剂量组	3	104.74 $\pm$ 0.01 ^{c) d)}
四神煎拆方高剂量组	3	100.14 $\pm$ 0.04 ^{b) c) e)}
甲氨蝶呤组	3	82.06 $\pm$ 0.04 ^{b)}

注: a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与甲氨蝶呤组比较, $P<0.01$; d) 与四神煎高剂量组比较, $P<0.01$; e) 与四神煎高剂量组比较, $P<0.05$ 。

蝶呤组、黄芪桂枝五物汤及其拆方和四神煎各剂量组、四神煎拆方高剂量组 IL-6 的分泌均显著降低 ($P<0.01$)。与甲氨蝶呤组比较, 四神煎拆方低、中剂量组 IL-6 的分泌显著升高 ($P<0.01$)。与四神煎拆方低剂量组比较, 四神煎各剂量组及其拆方高剂量组 IL-6 的分泌显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<$

表 5 不同剂量黄芪桂枝五物汤及其拆方对成纤维样滑膜细胞上清 IL-6 水平的影响 (pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	IL-6
空白组	3	73.02 $\pm$ 10.04
模型组	3	159.39 $\pm$ 10.50 ^{a)}
黄芪桂枝五物汤低剂量组	3	108.27 $\pm$ 11.07 ^{b)}
黄芪桂枝五物汤中剂量组	3	104.61 $\pm$ 10.52 ^{b)}
黄芪桂枝五物汤高剂量组	3	96.40 $\pm$ 4.85 ^{b)}
黄芪桂枝五物汤拆方低剂量组	3	112.74 $\pm$ 12.95 ^{b)}
黄芪桂枝五物汤拆方中剂量组	3	106.84 $\pm$ 10.64 ^{b)}
黄芪桂枝五物汤拆方高剂量组	3	98.21 $\pm$ 7.15 ^{b)}
甲氨蝶呤组	3	88.08 $\pm$ 3.32 ^{b)}

注: IL-6, 白细胞介素 6。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

0.01)。黄芪桂枝五物汤及四神煎各剂量组组间 IL-6 水平差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 6 不同剂量四神煎及其拆方对成纤维样滑膜细胞上清 IL-6 水平的影响 (pg/ml, $\bar{x}\pm s$)		
组别	样本数	IL-6
空白组	3	60.38±8.73
模型组	3	159.27±3.06 ^{a)}
四神煎低剂量组	3	114.20±3.13 ^{b) d)}
四神煎中剂量组	3	108.94±6.42 ^{b) e)}
四神煎高剂量组	3	95.96±6.12 ^{b) e)}
四神煎拆方低剂量组	3	143.20±11.01 ^{c)}
四神煎拆方中剂量组	3	128.43±8.39 ^{c)}
四神煎拆方高剂量组	3	112.21±5.42 ^{b) d)}
甲氨蝶呤组	3	97.57±12.74 ^{b)}

注: IL-6, 白细胞介素 6。
a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$;
c) 与甲氨蝶呤组比较, $P<0.01$; d) 与四神煎拆方低剂量组比较, $P<0.05$; e) 与四神煎拆方低剂量组比较, $P<0.01$ 。

4.3 各组 RAW264.7 细胞上清 NO 含量比较

表 7 示, 与空白组比较, 模型组细胞上清 NO 显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 姜黄素组、黄芪桂枝五物汤各剂量组、四神煎各剂量组细胞上清 NO 均显著降低 ($P<0.01$)。各给药组细胞上清 NO 含量差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

4.4 10 种关键化合物对 RAW264.7 细胞上清 NO 的影响

表 8 示, 与空白组比较, 各模型组细胞上清 NO 显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 槲皮素、异鼠李素、刺芒柄花素、山柰酚、黄芩素、没食子酸、花旗松素、木犀草素、汉黄芩素各剂量组细胞上清 NO 的含量均显著降低 ($P<0.01$); 儿茶素各剂量组细胞上清 NO 含量差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 7 不同剂量黄芪桂枝五物汤和四神煎对 RAW264.7 细胞上清 NO 含量的影响 ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	NO
空白组	3	0.48±0.02
模型组	3	0.82±0.07 ^{a)}
黄芪桂枝五物汤低剂量组	3	0.56±0.02 ^{b)}
黄芪桂枝五物汤中剂量组	3	0.53±0.02 ^{b)}
黄芪桂枝五物汤高剂量组	3	0.52±0.03 ^{b)}
四神煎低剂量组	3	0.49±0.05 ^{b)}
四神煎中剂量组	3	0.48±0.05 ^{b)}
四神煎高剂量组	3	0.45±0.04 ^{b)}
姜黄素组	3	0.44±0.06 ^{b)}

注: NO, 一氧化氮。
a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

4.5 10 种关键化合物对 RAW264.7 细胞中 P53 和 TNF- α 基因表达影响

表 9 示, 与空白组比较, 模型组 P53 基因表达显著降低、TNF- α 基因表达显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 刺芒柄花素组细胞中 P53 基因表达显著升高 ($P<0.01$), 其余各组 P53 基因表达无显著变化 ($P>0.05$); 除汉黄芩素组外, 其余各组 TNF- α 基因表达较模型组显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

5 讨论

本研究采用网络药理学方法对黄芪桂枝五物汤和四神煎治疗类风湿关节炎的作用机制, 以及两个复方中君药黄芪可能作用进行研究。网络药理学筛选到黄芪主要活性成分 16 个, 作用于 260 个靶点; 黄芪桂枝五物汤的主要成分 50 个, 作用于 378 个靶点; 四神煎的 38 个成分, 作用于 332 个靶点。基于中医药理论, 结合中药-归经网络、中药-证候网络

表 8 不同剂量关键化合物对 RAW264.7 细胞上清 NO 含量影响 ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	槲皮素	异鼠李素	刺芒柄花素	山柰酚	黄芩素
空白组	3	2.00±0.11	1.34±0.01	3.64±0.06	1.34±0.01	3.64±0.06
模型组	3	3.55±0.23 ^{a)}	2.19±0.11 ^{a)}	7.64±0.19 ^{a)}	2.19±0.11 ^{a)}	7.44±0.31 ^{a)}
低剂量组	3	2.59±0.19 ^{b)}	1.37±0.04 ^{b)}	5.60±0.13 ^{b)}	1.61±0.08 ^{b)}	6.43±0.18 ^{b)}
中剂量组	3	2.27±0.22 ^{b)}	1.27±0.03 ^{b)}	4.97±0.48 ^{b)}	1.56±0.02 ^{b)}	5.85±0.23 ^{b)}
高剂量组	3	1.90±0.05 ^{b)}	1.14±0.06 ^{b)}	4.60±0.33 ^{b)}	1.40±0.05 ^{b)}	5.81±0.17 ^{b)}
组别	样本数	没食子酸	花旗松素	木犀草素	汉黄芩素	儿茶素
空白组	3	2.46±0.07	3.64±0.06	3.64±0.06	2±0.11	2.23±0.24
模型组	3	4.24±0.14 ^{a)}	7.44±0.31 ^{a)}	7.44±0.31 ^{a)}	3.55±0.23 ^{a)}	4.13±0.28 ^{a)}
低剂量组	3	3.11±0.18 ^{b)}	5.85±0.10 ^{b)}	5.14±0.44 ^{b)}	2.92±0.03 ^{b)}	4.46±0.38
中剂量组	3	2.98±0.37 ^{b)}	5.54±0.06 ^{b)}	4.84±0.44 ^{b)}	2.59±0.08 ^{b)}	4.37±0.21
高剂量组	3	2.85±0.29 ^{b)}	5.35±0.32 ^{b)}	3.52±0.15 ^{b)}	1.64±0.12 ^{b)}	4.17±0.40

注: NO, 一氧化氮。
a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

表9 10种关键化合物对RAW264.7细胞中P53
和TNF- α 基因表达影响 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	P53	TNF- α
正常组	3	1	1
模型组	3	0.69 $\pm$ 0.15 ^{a)}	2.56 $\pm$ 0.61 ^{a)}
刺芒柄花素组	3	1.02 $\pm$ 0.12 ^{b)}	1.17 $\pm$ 0.38 ^{b)}
槲皮素组	3	0.55 $\pm$ 0.14	1.18 $\pm$ 0.35 ^{b)}
木犀草素组	3	0.62 $\pm$ 0.23	1.43 $\pm$ 0.42 ^{b)}
没食子酸组	3	0.77 $\pm$ 0.07	1.29 $\pm$ 0.13 ^{b)}
山柰酚组	3	0.69 $\pm$ 0.15	1.33 $\pm$ 0.53 ^{b)}
异鼠李素组	3	0.54 $\pm$ 0.11	1.19 $\pm$ 0.53 ^{b)}
黄芩素组	3	0.67 $\pm$ 0.15	1.33 $\pm$ 0.43 ^{b)}
汉黄芩素组	3	0.77 $\pm$ 0.16	1.79 $\pm$ 0.17
花旗松素组	3	0.60 $\pm$ 0.10	1.42 $\pm$ 0.15 ^{c)}
姜黄素组	3	0.86 $\pm$ 0.10	1.33 $\pm$ 0.12 ^{b)}

注: TNF- α , 肿瘤坏死因子 α 。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$;

c) 与模型组比较, $P<0.05$ 。

研究发现, 黄芪桂枝五物汤行肺、脾、胃经, 加强脾胃祛湿化痰之力, 从而化解滞留的外邪, 达到温中和血通痹的效果。四神煎行肾经以益气养阴, 加强气血运行之力, 以达到扶正养阴除痹、通利关节的效果。黄芪作为复方中君药, 具有较多的活性成分和靶点, 在复方中药里活性最强。据重叠靶点分析, 黄芪桂枝五物汤方中桂枝、白芍为臣药, 均与黄芪存在大部分的重叠靶点, 相同的靶点代表它们具有相同的功效和相似的药理学功能, 结合中药功效, 桂枝、白芍通过作用于与黄芪相同的靶点起协同增效的作用。在四神煎中, 以石斛为臣药, 其靶点中与黄芪相同的占67.5%, 说明石斛可能通过作用于不同的靶点以治疗兼证。另外, 方中佐使具有广泛的药理作用, 有协同、制约、解毒之功。四神煎中金银花、牛膝与黄芪重叠靶点较多, 但二者功效为清热、解毒、生津, 具有制约黄芪温补药力的作用, 可能说明二者以相同的靶点、不同的调节方式制约黄芪之力, 体现了黄芪桂枝五物汤和四神煎的处方特异性。另外, 中药复方治疗疾病具有多成分、多靶点、多途径的作用特点。对于多种中药成分与靶点组成的复杂作用网络, 需要从中提取关键的信息才能获得有用的结论。我们通过复合药靶网络筛选得到槲皮素、山柰酚、刺芒柄花素、异鼠李素、木犀草素、黄芩素、汉黄芩素、花旗松素、没食子酸和儿茶素十种关键化合物。

根据蛋白相互作用网络和分子对接筛选得到关键靶点P53, P53在自身免疫性肝炎、系统性红斑

狼疮、类风湿关节炎等多种自身免疫性疾病中均存在表达异常的现象^[11]。P53可以抑制类风湿关节炎在病情发生发展过程中的炎症反应^[12], 抑制P53的表达会导致滑膜炎性增殖, NF- κ B、MAPK等信号通路激活从而诱导IL-6等炎症因子的分泌^[13-14], 加重炎症反应。此外, 研究发现应用siRNA技术抑制类风湿关节炎患者滑膜细胞中P53基因的表达, 可引起患者CD4⁺T淋巴细胞内白细胞介素17(IL-17)和 γ -干扰素(IFN- γ)等炎症因子上调, 进一步说明P53基因可通过抑制炎症因子表达来阻止关节炎症性反应的扩散^[15]。因此, 促进P53表达可能是治疗类风湿关节炎的有效策略。

PI3K/AKT信号通路能响应细胞外信号并通过影响AKT等下游效应分子的激活状态, 抑制滑膜细胞增殖, 控制滑膜炎的发展^[16]。该通路中的AKT介导的MDM2会靶向抑制P53水平^[12], 从而影响p38MAPK等相关信号通路^[17]。此外, PI3K/AKT、MAPK信号通路位于黄芪桂枝五物汤治疗类风湿关节炎的作用靶点通路富集中的前十位, 说明这些信号通路与治疗作用机制密切相关。而四神煎中除与PI3K/AKT信号通路密切相关外, 其治疗类风湿关节炎的核心靶点STAT3蛋白与P53启动子间相互作用, STAT3激活可以负调节P53信号通路^[18], 参与类风湿关节炎的发生发展。结合通路富集分析, 黄芪桂枝五物汤主要通过核心靶点P53, 调控PI3K/AKT、MAPK等信号通路发挥治疗类风湿关节炎的作用; 四神煎通过核心靶点STAT3、P53之间的相互作用, 调节P53相关通路及PI3K/AKT等信号通路发挥治疗类风湿关节炎的作用。

细胞实验结果显示, 黄芪桂枝五物汤及其拆方和四神煎各剂量组均可显著抑制滑膜的炎性增殖和炎症因子IL-6的分泌, 四神煎拆方中只有高剂量可显著抑制; 相比黄芪桂枝五物汤各剂量组, 其拆方各剂量组差异不显著; 相比四神煎拆方低剂量组, 四神煎各剂量组IL-6分泌均显著降低。以上结果提示黄芪桂枝五物汤去掉生姜和大枣对于复方药效无明显影响; 而四神煎中去掉远志和石斛对复方药效影响较大。综合中药、归经、证候网络、重叠靶点分析以及细胞实验结果, 体现了二者治疗类风湿关节炎作用机制的差异性, 可根据不同作用特点对应治疗不同类型、不同阶段的类风湿关节炎。

NO结果显示, 黄芪桂枝五物汤和四神煎均可显著抑制RAW264.7细胞NO的分泌, 复方的10种

关键化合物中除儿茶素外均可抑制 LPS 诱导的细胞上清 NO 的分泌, 发挥其抗炎作用。通过检测关键化合物对 P53、TNF- α 基因的影响, 发现除汉黄芩素外, 槲皮素、山柰酚、刺芒柄花素、异鼠李素、木犀草素、黄芩素、花旗松素、没食子酸均可显著降低 TNF- α 基因表达; 而这些成分中只有刺芒柄花素可以显著升高脂多糖 LPS 诱导的小鼠单核巨噬细胞 RAW264. 7 中 P53 基因表达。

综上所述, 黄芪桂枝五物汤中以黄芪为君药, 协同桂枝、白芍发挥主要治疗作用; 四神煎方中虽以黄芪为君药, 但其余药味各有所长, 相辅相成, 相互制约。二者虽同样治疗类风湿关节炎, 但配方配伍各具特色, 可针对不同时期不同症状的类风湿关节炎辨证论治, 指导临床用药。此外, P53 靶点的发现为治疗类风湿关节炎的方向和靶向药物的研究提供了理论基础; 黄芪的关键化合物刺芒柄花素可以促进 P53 靶点基因的表达, 为类风湿关节炎临床用药提供了理论依据。需要指出的是, 本研究是依据现有数据库进行数据收集, 所得结果不可避免地受这些数据库本身内容的限制, 存在一定的局限性。但本研究得出的网络药理学分析结果以及细胞模型上获得的实验结果, 为既往研究获得的结论提供了有价值的补充。

参考文献

- [1] 陈甜甜, 陈杰, 王敏, 等. 基于《百年百名中医临床家丛书》的类风湿关节炎与风湿性关节炎用药规律比较分析[J]. 现代中医药, 2020, 40(6): 29-35.
- [2] WANG L, FAN Y, XIN P, et al. The efficacy and safety of Huangqi Guizhi Wuwu decoction for rheumatoid arthritis: a protocol for systematic review and meta-analysis[J]. Medicine, 2020, 99(36): e22011.
- [3] WANG Y, LIU Y, XI Z, et al. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial evaluating the efficacy and safety of Huangqi Guizhi Wuwutang granule in patients with rheumatoid arthritis[J]. Medicine, 2019, 98(11): e14888.
- [4] 王冰, 高明利. 四神煎治疗气阴两虚型类风湿关节炎的研究进展[J]. 风湿病与关节炎, 2018, 7(6): 76-80.
- [5] 杨俏雯, 李秀兰, 黄清春, 等. 黄芪桂枝五物汤治疗类风湿关节炎患者的疗效[J]. 世界中医药, 2018, 13(4): 861-864.
- [6] 李正富, 吴德鸿, 何兆春, 等. 范永升教授运用黄芪桂枝五物法治疗风湿病学术经验[J]. 浙江中医药大学学报, 2019, 43(10): 1074-1078.
- [7] 赵夜雨, 高明利. 基于益气养阴法理论探讨四神煎治疗类风湿关节炎研究进展[J]. 实用药物与临床, 2019, 22(5): 549-552.
- [8] 罗帅, 李小枫, 黄成, 等. 炎症因子在类风湿关节炎中的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(3): 330-338.
- [9] 蒋钦. IRAK-4 对 IL-1 β 刺激骨性关节炎成纤维样滑膜细胞增殖及炎症调控的研究[D]. 衡阳: 南华大学, 2020.
- [10] 余功旺, 黄文浩, 刘爱梅, 等. 小鼠腹腔巨噬细胞炎症模型的建立[J]. 广东药学院学报, 2014, 30(6): 766-770.
- [11] 庞琳娜, 徐连那, 董红宇. P53 基因在类风湿关节炎骨代谢中的作用[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(3): 327-330, 337.
- [12] ABRAHAM AG, O'NEILL E. PI3K/Akt-mediated regulation of p53 in cancer[J]. Biochem Soc Trans, 2014, 42(4): 798-803.
- [13] 杨蕾, 张正菊, 相瑞阳, 等. 藤莓汤改善 CIA 模型大鼠关节滑膜免疫炎性损伤的机制研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(4): 1207-1212.
- [14] ZHANG Q, LIU J, ZHANG M, et al. Apoptosis induction of fibroblast-like synoviocytes is an important molecular-mechanism for herbal medicine along with its active components in treating rheumatoid arthritis[J]. Biomolecules, 2019, 9(12): 795-795.
- [15] NAJM A, MASSON FM, PREUSS P, et al. MicroRNA-17-5p reduces inflammation and bone erosions in mice with collagen-induced arthritis and directly targets the JAK/STAT pathway in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. Arthritis Rheumatol, 2020, 72(12): 2030-2039.
- [16] 牛建均, 刘春艳, 晏朝操, 等. 基于 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路探讨土家药百棒七防治类风湿关节炎的潜在靶点[J]. 湖北民族大学学报(医学版), 2021, 38(4): 71-74.
- [17] STRAMUCCI L, PRANTEDA A, BOSSI G. Insights of crosstalk between p53 protein and the MKK3/MKK6/p38 MAPK signaling pathway in cancer[J]. Cancers(Basel), 2018, 10(5): 131.
- [18] PHAM TH, PARK HM, KIM J, et al. STAT3 and p53: dual target for cancer therapy[J]. Biomedicines, 2020, 8(12): 637.

Comparing the Mechanism of Action of *Huangqi Guizhi Wuwu Decoction* (黄芪桂枝五物汤) and *Si Shen Decoction* (四神煎) for Treatment of Rheumatoid Arthritis based on Network Pharmacology

MA Huilai¹, HOU Yuxin¹, WANG Aicheng¹, LIU Haixin¹, LI Qingshan¹, WANG Renxiao²

1. Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong, 030619; 2. School of Pharmacy, Fudan University

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Huangqi Guizhi Wuwu Decoction* (黄芪桂枝五物汤, HGWD) and *Si Shen Decoction* (SSD) in treating rheumatoid arthritis (RA). **Methods** The disease targets of RA and the herbal medicine components targets of HGWD and SSD, asnd the information on channel entry and syndromes were collected using network pharmacology. Cytoscape 3.9.0 software was used to construct herbal medicine-components-targets-disease network, herbal medicine-channel entry network, and herbal medicine-syndromes network. The protein interaction network was constructed based on the STRING database, and the KEGG pathway enrichment analysis was performed. The active components were selected using the “herbal medicine-ingredients-targets-disease” network, and the core targets were screened out by the protein interaction network. Molecular docking was conducted based on the components and the targets. Experimental cell research was performed for verification. Fibroblast-like synoviocytes (FLS) was induced by 10 ng/ml interleukin-1 β (IL-1 β) to establish a cellular inflammation model, and then different concentrations of HGWD, SSD and their disassembled formulas were administered for 24 hours. The survival rate of FLS cells and the level of IL-6 were detected by MTT assay and ELISA method. The RAW264.7 cell inflammation model was established, and the active components selected through the “herbal medicine-ingredients-targets-disease” network were administered for 24 hours, after which the nitric oxide (NO) content in the cell supernatant and the expression of P53 gene in the cells were detected. **Results** The main active components of HGWD and SSD in the treatment of rheumatoid arthritis included quercetin, kaempferol, isorhamnetin, formononetin, gallic acid, catechin, Taxifolin, luteolin, baicalein, and wogonin through drug target network analysis. According to the protein interaction analysis, the core targets including AKT1, PIK3CA, HRAS, NCOA1, TP53, STAT3, and CCNA2 were obtained, of which TP53 target had the strongest affinity with ten components. In addition, enrichment analysis showed that HGWD and SSD exerted their actions by regulating various signaling pathways such as PI3K-AKT, MAPK, and JAK/STAT. Experimental cell research found that HGWD, SSD and their disassembled formulas at different concentrations could inhibit the inflammatory proliferation and the secretion of IL-6 in FLS cells ($P < 0.01$). Except for catechin, the other active components could inhibit NO secretion in the supernatant of RAW264.7 cells, and additionally Formononetin could promote the expression of P53 gene ($P < 0.01$). **Conclusion** HGWD, with compositions of Guizhi (*Ramulus Cinnamomi*) and Baishao (*Radix Paeoniae Alba*) assisting Huangqi (*Radix Astragalii*), exerts its function by acting on core targets such as AKT1, PIK3CA, and TP53 to regulate PI3K/Akt and MAPK signaling pathways in the treatment of RA. SSD focuses on restricting the warming and supplementing function of Huangqi by using Jinyinhua (*Flos Lonicerae Japonicae*), Niuxi (*Radix Achyranthis Bidentatae*) and Shihu (*Caulis Dendrobii*), and plays its role of treating RA by acting on core targets such as AKT1, STAT3, and TP53 to regulate PI3K-AKT and JAK/STAT signaling pathways. Formononetin may treat RA by adjusting the TP53 target.

Keywords rheumatoid arthritis; Huangqi (*Radix Astragali*); *Huangqi Guizhi Wuwu Decoction* (黄芪桂枝五物汤); *Si Shen Decoction* (四神煎); network pharmacology; inflammatory factor; formononetin

(收稿日期: 2021-12-27; 修回日期: 2022-07-25)

[编辑: 王利芬]