

基于网络药理学探讨文冠木-3 汤治疗 RA 作用机制

吴海军, 何金玲*

科尔沁右翼中旗蒙医医院, 内蒙古兴安盟, 中国

*通讯作者

【摘要】采用网络药理学与分子对接技术探讨文冠木-3 汤治疗 RA 的作用机制。基于 HERB、TCMSP 数据库筛选活性成分及靶点, 联合 GeneCards、OMIM 数据库获取 RA 靶点, 交集得 223 个共同靶点。经 STRING 及 Cytoscape 筛选核心靶点, 微生信平台行 GO 与 KEGG 富集分析, Autodock 1.5.7 验证分子对接。共获 54 个活性成分、557 个药物靶点及 1604 个 RA 靶点。GO 显示生物过程富集于酪氨酸磷酸化、VEGF 及 EGF 信号通路; 分子功能以蛋白酪氨酸激酶活性为核心。KEGG 涉及 EGFR 耐药、Th17 分化及 AGE-RAGE 等通路。对接表明木犀草素与 SRC、PIK3R1、PIK3CD, 槲皮素与 PIK3CA, 里查酮 G 与 AKT1 结合能均小于-5。文冠木-3 汤可能通过木犀草素调控上述通路及靶点发挥抗 RA 作用, 具有开发潜力。

【关键词】类风湿性关节炎; 文冠木-3 汤; 网络药理学; 分子对接; 作用机制

1.引言

风湿性关节炎(rheumatoidarthritis, RA)是一种病理损害不仅限于关节和软骨, 而且可累及全身多系统、多器官的全身性自身免疫病[1], 病因不明。从组织病理学上看, RA 主要表现为滑膜炎, 内衬层细胞异常增生, 炎性细胞浸润, 自身抗体生成, 微血管新生, 并伴有进行性软骨和骨组织的破坏[2]。鉴于发病机制极其复杂, 现阶段 RA 还无法彻底治愈, 但是有文献已经证实[3], 早诊断早治疗可以明显提高疾病的预后效果。而在 RA 治疗方案发展历史上, 改善病情的抗风湿药(DMARDs)依然是早期治疗的重点及基础。而近些年来, 随着对 RA 免疫病理机制认识的不断深入, 靶向治疗逐渐成为大家关注的焦点, 而生物制剂的应用给临床治疗的选择提供了很大空间[4]。然而, 尽管生物制剂和非甾体抗炎药比传统的 DMARDs 具有更好的疗效, 但其潜在的风险不容忽视--包括安全性问题, 如结核的再激活, 严重的感染, 以及高昂的治疗费用和多种多样的不良反应[5]。因此, 在目前的 RA 研究领域, 研制出疗效确切、安全性好的新型治疗药物仍然是一个重要课题。在此基础上, 蒙药对于 RA 治疗具有自身优势, 因蒙药整体调控是多成分、多靶点。研究表明, 蒙药可发挥多种治疗作用, 例如对滑膜组织异常增生起到抑制的作用, 可调节炎症反应, 并可保护软骨及关节结构等等[6], 从而为临床治疗 RA 提供了新的研究思

路以及可能的解决办法。

文冠木三味汤是根据《古代经典名方目录》[7]以及蒙医药经典文献记载而来的经验方, 有清热燥湿、祛风止痛、祛瘀生新之功[8], 主要由文冠木、土木香、苦参三味药物组成, 用于治疗热性和如病(类似风湿病), 属蒙医清热燥湿类方剂中的代表方剂[9,10]。文冠木三味汤被历代蒙医药经典文献所载入。本课题利用网络药理学并辅以分子对接技术从整体上对文冠木三味汤的活性成分以及潜在作用靶点进行筛选, 建立 RA 涉及的相关基因和通路之间的相互关系网络, 并通过分子对接验证关键组分与核心靶点间的亲和力, 从而为进一步实现多种靶点干预设计以及蒙药现代化奠定基础。

2.资料与方法

2.1 文冠木三味汤靶点预测

TCMSP 数据库对苦参化合物进行采集, TCMSP 数据库将筛选标准设定为生物利用度 $OB \geq 30\%$ 、类药性 $DL \geq 0.18$ 、活性成分筛选; HERB 数据库获取文冠木和土木香化合物, SWISSADME 数据库采用 GIABSORPTION 为 HIGH, DRUGLIKENESS 为两个 YES 为筛选条件, 筛选出活性成分。通过 SwissTargetPrediction 预测核心药物组合活性成分的靶基因。

2.2 类风湿性关节炎(RA)相关靶标筛选

GeneCards 和 OMIM 数据库以“Rheumatoidarthritis”为关键词进行检索, 筛选与疾病相关的靶标。在目标集合合并后脱

重, RA 相关目标的取得。

2.3 文冠木三味汤-RA 的交集靶点构建

将 RA 疾病相关靶标与文冠木三味汤靶标进行交叉, 利用 Venny2.1 软件(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/>)取交集, 所得交集为治疗 RA 潜在作用靶点的文冠木三味汤。

2.4 文冠木三味汤-成分-RA-靶标调控网络构建

将“2.2”项所得文冠木三味汤靶标和“2.3”项中药疾病靶标数据进行整合, 构建网络文件, 导入 Cytoscape3.10.3 软件, 组成调控网络, 包括中药, 活性成分, 疾病, 目标四大类节点。

2.5 文冠木三味汤-RA 靶标蛋白相互作用网络的构建与核心靶点筛选

采用 STRING 软件(<http://www.string-db.org/>), 输入分析物种“Homo sapiens”, 置信度设为 0.900, 创建关键药对相关蛋白互作图(Protein Protein Interaction Networks, PPI)。然后将所得到的结果导入到 Cytoscape 3.9.1 中, 根据网络拓扑学参数进行分析, 即介导中心性(Betweenness Centrality, BC), 接近中心性(Closeness Centrality, CC)和度中心性(Degree Centrality, DC) 3 个指标值大于等于各指标值中位数为筛选条件, 得到核心靶点。

利用 STRING 数据库(<http://www.string-db.ORG/>)选择物种为“HOMOSAPIENS”, 置信度设定为 0.900, 构建核心药物组合的蛋白相互作用网络(PPI)。将以上步骤得到的数据导入 Cytoscape3.9.1, 通过网络拓扑参数分析, 设定中介中心(BC)、紧密中心(Closeness Centrality, CC)、基因度中心性(DC), 三者筛选的大于或等于中位值, 得到核心靶点信息。

2.6 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

把得到的交叉靶点输入 David 数据库中, 设置 species 项定义为 Geneontology 的“Homosapiens”, 利用微生信在线生物信息学分析及可视化云平台对以上结果进行 GO 功能富集分析的可视化呈现并同时同时进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析。

2.7 文冠木三味汤关键活性成分与核心靶点分子对接

根据所得 PDB 数据库中的靶蛋白 PDB 文件在 RA 的 PPI 网络中筛选得到关键靶

点, 再选取其中的核心活性成分与其核心靶点进行分子对接操作。将活性成分 SDF 格式文件下载后输入到 PDB 中, 利用 OpenBamboo 软件转化为 PDB 格式。将主要活性成分及主要作用靶点进行 Autodock 1.5.7 分子对接, 在 PyMOL 软件中观察对接后形成的结合效果。

3.结果

3.1 文冠木三味汤的活性成分和靶点蛋白

经 TCMSP 数据库对药物活性成分进行筛选, 去除靶点外活性成分后, 可以得到 38 种苦参活性成分、10 种文冠木活性成分和 6 种土木香活性成分。用 SwissTargetPrediction 数据库预测药物靶标, 取 Probabilit0 靶标, 得文冠木三味汤共有 557 个靶标。

3.2 RA 疾病相关靶标筛选结果

应用 GeneCards, OMIM, TTD, DruGBank 数据库, 以“Rheumatoidarthritis”为关键词搜索 RA 相关靶点, GeneCards 数据库以 Relevancescore 中的位数为条件卡值。合并去重取疾病靶点 1604 个。

3.3 文冠木三味汤活性成分潜在靶点-RA 相关靶点交集获取

得到 223 个类风湿性关节炎与药物的交集靶点基因, 将药物的作用靶点与类风湿性关节炎的靶点基因进行交叉。结果如图 1。

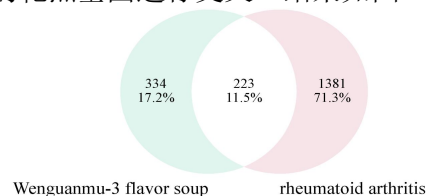


图 1. 交集靶点韦恩图

3.4 利用 Cytoscape3.10.3 软件构建中药-成分-疾病靶标调控网络

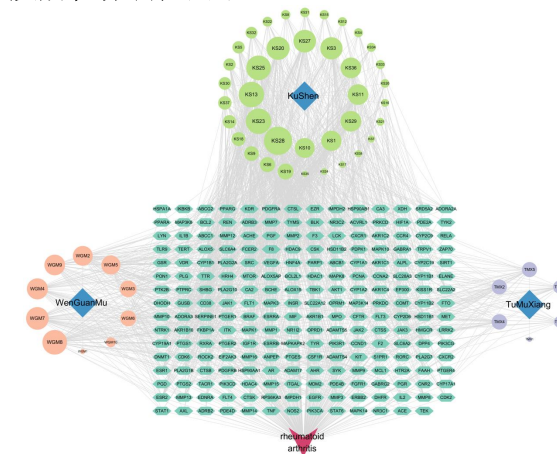


图 2. 药物-成分-靶点图

利用药物-靶点数据, 构建

“Network.xlsx”文件和“type.xlsx”文件，将文件导入 cytoscape3.9.1，用于绘图。结果如图 2 所示。

3.5PPI 构建结果

在 STRING 数据库中导入交集基因文件，选择物种为“Homo sapiens”，置信度设定为 0.900，得到蛋白互作网络。结合 Cytoscape 集中分析评估所有靶点基因信息，设置中介中心性(Betweenness)、紧密中心性(Closeness)、基因度中心性(Degree)均大于等于中位值进行筛选，Betweenness 中位数为 483.23636，Closeness 中值为 0.001634439，Degree 中位数为 0.001.00164439，Degree 中值为 6.41212，得出该网络有 32 个节点，条边 103。将上述药物活性成分及疾病靶点交叉得到的基因导入 STRING 数据库绘制蛋白互作网络图，进一步探究文冠木三味汤治疗类风湿关节炎的作用机理。其中，节点大小和颜色深浅一般代表着其 degree 大小，即该蛋白质在整个网络中的重要程度，在整个网络中各靶点蛋白之间的复杂相互作用关系如图所示。见图 3。如图 4 所示，许多连接程度较大的核心节点聚集在中间位置，相互间构成一个互动群体。位于网络最中心的 SRC 是一种重要的调节下游信号传导的关键枢纽蛋白；其次为组成经典 PI3K/AKT 通路的 PIK3R1、PIK3CA 和 AKT1，是细胞存活、增殖及炎性反应的主要通路；还有 ESR1(雌激素受体 1)、HSP90AA1(热休克蛋白 90)、EGFR 的连接度较高。这些核心靶点并非孤立存在，而是通过多条边紧密相连，表明文冠木三味汤可能重点介入关键信号模块，如 PI3K/AKT、SRC 激酶和热休克蛋白等，通过“多成分-多靶点”的协同模式，达到抑制滑膜细胞异常增殖、调节免疫炎症反应、最终发挥抗 RA 药理作用的目的。

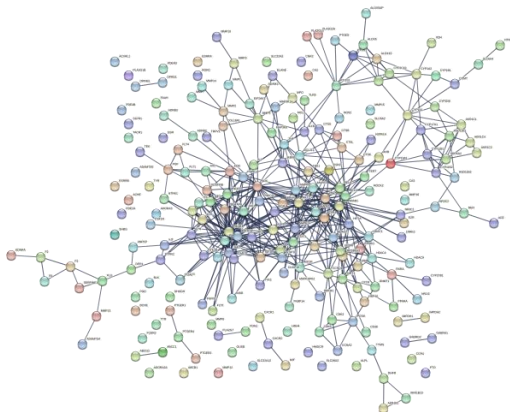


图 3. 交集靶点网络图

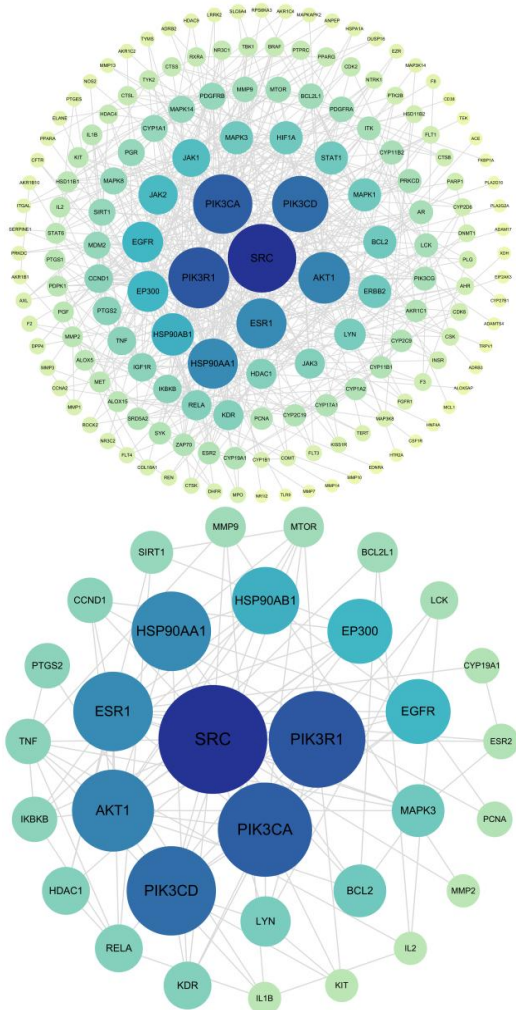


图 4. 核心靶点 PPI 网络图

3.6 GO 与 KEGG 功能富集分析

交叉靶点导入 David 数据库进行富集分析，发现 Go 条目 925 个，其中与生物过程(BP)相关的有 625 个，与细胞组成(CC)相关的有 82 个，与分子功能(MF)相关的有 218 个；如图 5 所示，选择 BP、CC、MF 前 10 个 GO 输入作图。其中，富集到的主要通路有：前列腺癌、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药、胰腺癌、内分泌耐受、TH17 细胞分化、C 型凝集素受体信号通路、AGE-RAGE 介导的糖尿病并发症相关信号、乙型肝炎、细胞凋亡、麻疹、脂质代谢及动脉粥样硬化、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、化学致癌-受体激活、RAS 信号通路、肿瘤相关蛋白聚糖、Epstein-Barr 病毒感染、人巨细胞病毒感染、PI3K-AKT 信号通路、肿瘤信号通路，MAPK 信号通路等。Keggpathway 分析得出药物治疗疾病的途径 153 条，按 P 值选取 20 条途径，提示中药通过上述途径可能对疾病进行调节和干预。气泡图绘制前 20 个 KEGG 代

谢通路，Foldenrichment 值为横轴，气泡大小表示富集到对应通路的基因数量，深浅颜色代表显著性，显著性富集信息可直观观察，见图 6。

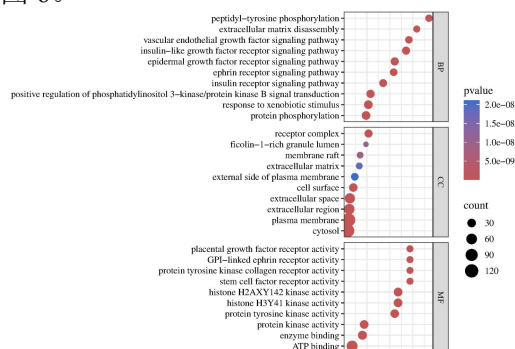


图 5 GO 富集分析柱状图

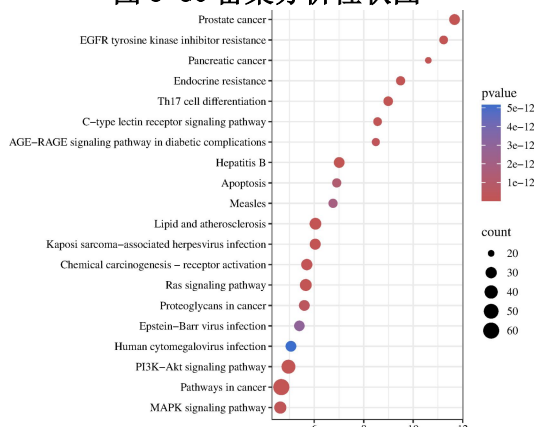


图 6. KEGG 通路富集气泡图

3.7 分子对接结果

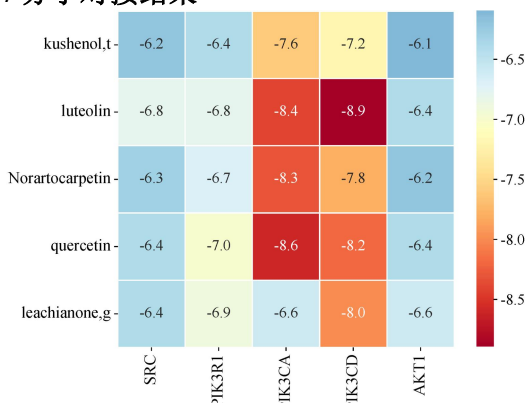


图 7. 结合能热图

分子对接使用 AutoDock 和 AutoDock_Vina 软件，对接得分越低，说明化合物与靶点结合的活性越好。以 SRC、PIK3R1、PIK3CA、PIK3CD、AKT1 为靶点基因，以 kushenol, t、luteolin、Norartocarpetin、quercetin、leachianone, g 为小分子。分子对接进行，整理后得出结果，见图 7。结合能量是衡量小分子与靶标蛋白结合程度的指标，小分子可在小于 -5 时自由

地与靶标蛋白结合，小分子与靶标蛋白结合的机会越大。模拟结果表明，小分子和目标蛋白结合得很好，选择最小结合体进行对接，并把它们画成图形，见图 8。

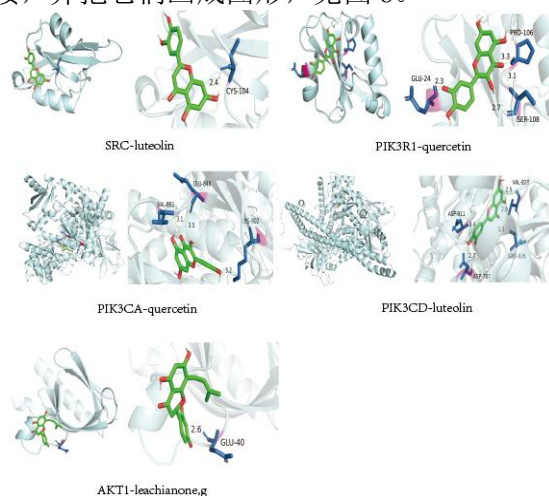


图 8. 各蛋白的分子对接图

4. 讨论

本文运用了网络药理学及分子对接的方法对蒙药经典名方文冠木三味汤(文冠木 3 汤)治疗 RA 的可能分子作用机制进行分析，该方主要成分有木犀草素、槲皮素等，其可能通过调控 SRC、PIK3R1、AKT1 等关键靶点，干预前列腺癌、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂、胰腺癌等多个信号通路发挥作用。进而发挥对 RA 发病机理的调控及治疗作用。该结果不仅在一定程度上从分子水平诠释了文冠木三味汤传统功能的科学内涵，也为开发治疗 RA 的多组分、多靶标新药提供了新的思路，即其可能存在的作用机制是“多成分一多靶点一多途径”整体调节。现就文冠木三味汤的作用机制进一步分析阐述，并将其与 RA 模式化病理及基于网络药理学的研究成果相结合。

文冠木三味汤多靶点调控与 RA 病理核心的关联类风湿性关节炎的发病涉及滑膜成纤维细胞异常活化、免疫细胞浸润、新生血管形成和关节软骨与骨的进行性破坏[11]，文冠木三味汤与 RA 的发病关系密切，与 RA 的功能富集显著指向酪氨酸磷酸化、细胞外基质解聚和多种生长因子受体信号通路等，与 RA 的核心病理特征高度吻合，因此，本研究筛选出的 223 个文冠木三味汤-RA 共同靶点，其功能富集显著指向酪氨酸磷酸化、细胞外基质解聚包括众多生长因子受体信号通路，与 RA 的主要病理特点相符，例如 SRC 激酶作为细胞内信号传导的重要环节，

在细胞增殖、迁移以及炎症中发挥作用，其过度激活与 RA 滑膜细胞浸润以及破骨细胞形成相关[12]。PIK3R1、PIK3CA 和 AKT1 构成 PI3K/AKT 信号通路，对 RA 滑膜细胞的过度增殖及抵抗凋亡起重要作用，是调节细胞生存、新陈代谢及炎症反应的重要中心[13]。

关键信号路径解读与蒙药介入的“异病同治”逻辑 KEGG 富集分析揭示，文冠木三味汤的潜在功效路径包括前列腺癌、胰腺癌、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂的抗药性等，这些都与 RA 看似毫无关系。但这恰恰反映了“异病同治”这一蒙药的互联网药理优势和深刻内涵。这些通路本质上是细胞增殖、凋亡、迁移、血管生成和炎症反应等基本生物学过程的共同调控网络[14]，是细胞增殖、凋亡、迁移、血管生成和炎症反应等基本生物学过程的共同调控网络。例如，EGFR 通路不仅驱动肿瘤生长，而且其异常活化还参与了 RA 滑膜细胞的过度增殖和炎症因子的生成[15]。AGE-RAGE 信号通路通过促进氧化应激和慢性炎症导致组织损伤，在糖尿病并发症和 RA 中均被激活[16]。TH17 细胞分化通路是连接自身免疫和肿瘤微环境的重要桥梁，TH17 细胞及其分泌的 IL-17 在 RA 关节破坏和多种肿瘤进展过程中都起着促炎作用[17]TH17 细胞分化通路是连接所以，文冠木三味汤对这些路径的调控，不是直接“治癌”，而是对体现中药系统调控、纠偏扶正特点的 RA 分享给这些疾病的病理学生物学模块进行干预。

主要有效成分药效及配伍效应探讨大量的研究表明在许多植物中含有较多的黄酮类化合物—木犀草素和槲皮素有着很强的抗炎、抗氧化以及免疫调节和增殖活性[18]。有研究指出木犀草素可以抑制 NF- κ B 和 MAPK 这样的炎症相关的信号通路而减少 TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β 的产生，并且在多类型的 RA 动物模型上显示了其对于关节有保护效果[19]。而槲皮素则具有调节 T 细胞亚群平衡、抑制 TH17 细胞分化、促进调节 Treg 功能等作用，使免疫耐受能力恢复[20]。值得注意的是，分子对接提示槲皮素可与 PIK3R1 和 PIK3CA 同时结合，木犀草素可与 SRC 和 PIK3CD 结合，而里查酮 G 则将目标指向 AKT1。这种“一成分多靶点”和“多成分协同作用于同一路径不同节点”的现象(如 PI3K/AKT 路径)，可能是文冠木三味汤比单

一靶点抑制剂更好地发挥整体疗效、有望降低耐药性生成的分子基础[21]。

创新、不足及展望本文的创新性在于为阐明经典名方的现代化科学内涵提供数据支撑，并在蒙药文冠木三味汤抗 RA 的研究中率先使用了网络药理学和分子对接技术，将蒙医传统的“清热燥湿，祛风止痛”功效描述转化为可视化的“成分-靶点-路径”定量网络模型，为中西医学提供了一座相互了解的桥梁[22]。但本研究也存在一定不足之处。一是数据库筛选以活性成分的体内吸收、分布和代谢过程(ADME)，基于化学成分和靶点预测，没有充分考虑，其代谢产物可能是实际起作用的[23]。其次，网络分析呈现静态关联，在药物干预下未能体现出动态的时序调控网络。最后，必须通过体外细胞实验和体内动物实验来验证所有的计算预测。

综上所述，这项研究表明，文冠木三味汤可能通过多种活性成分，如木犀草素、槲皮素等，协同作用于 SRC、PIK3R1、AKT1 等关键靶点，调控多条信号通路，这些信号通路与细胞增殖、炎症、免疫密切相关，从而对 RA 的病理过程进行多层次的干预。这为现代中药制剂的研制提供了重要的理论依据和研究方向，将文冠木三味汤发展为治疗 RA 今后的研究要以核心成分的体内药效学验证、最佳配伍比例的优化、具体作用机制的深入阐明为重点，以促进这一蒙医瑰宝的现代化与国际化[24]。

参考文献

- [1]McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. N Engl J Med, 2011, 365(23): 2205-2219.
- [2]Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis[J]. Nature, 2003, 423(6937): 356-361.
- [3]田新平, 曾小峰, 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.
- [4]Smolen JS, Aletaha D, Barton A, et al. Rheumatoid arthritis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4: 18059.
- [5]Singh JA, Hossain A, Tanjong Ghogomu E, et al. 生物制剂治疗类风湿性关节炎的系统评价与 Meta 分析[J]. 北京中医药大学循证医学中心, 译. 2023.
- [6]赵子龙, 石慧, 杨夏. 蒙药三子汤治疗类风湿性关节炎的药效学及网络药理学研究[J].

- 西部中医药, 2024, 37 (9): 1-6.
- [7]王玉艳, 李晴晴, 王志昊, 等."一典二目"中少数民族药成方制剂的统计与分析[J].医药导报, 2025, 44 (5): 743-752.
- [8]王莉莉, 马挺, 巴俊杰.蒙药文冠木研究进展[J].内蒙古医学院学报, 2008, 30 (S2): 351-354.
- [9]斯琴其木格.文冠木三味汤治疗痤疮效果好[J].中国民间疗法, 1996 (6): 42.
- [10]那生桑, 陈香梅, 包晓华.蒙药文冠木的化学成分及临床应用研究进展[J].中国民族医药杂志, 2019, 25 (3): 55-58.
- [11]栗占国.类风湿性关节炎的发病机制研究进展[J].中华风湿病学杂志, 2023, 27 (3): 145-150.
- [12]刘巍, 王志强, 李明.Src 家族激酶在类风湿关节炎滑膜细胞信号转导中的作用[J].中国免疫学杂志, 2020, 36 (8): 1234-1238.
- [13]杨孝芳, 刘梨, 彭艳, 等.类风湿性关节炎发病机制中滑膜成纤维细胞的作用及其激活机制[J].中国组织工程研究, 2022, 26 (17): 2756-2762.
- [14]Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144 (5): 646-674.
- [15]陈勇, 张华, 李强.表皮生长因子受体信号通路在类风湿关节炎滑膜细胞增殖中的作用[J].细胞与分子免疫学杂志, 2019, 35 (6): 523-527.
- [16]王芳, 刘建国, 赵明.晚期糖基化终末产物及其受体在糖尿病并发症和炎症性疾病中的作用[J].中华内分泌代谢杂志, 2021, 37 (4): 312-316.
- [17]张晓明, 李华, 王磊.Th17/Treg 细胞失衡在类风湿关节炎发病机制中的研究进展[J].中华风湿病学杂志, 2022, 26 (8): 567-572.
- [18]韩宁馨, 张雯.木犀草素对氧化应激和炎症的调控机制研究进展[J].动物营养学报, 2022, 34 (5): 2856-2861.
- [19]刘圆, 李园园, 冯婷婷, 等.木犀草素镇痛抗炎作用的实验研究[J].齐齐哈尔医学院学报, 2010, 31 (15): 2401-2402.
- [20]李艳, 王建华, 张敏.槲皮素对 T 细胞亚群调节及 Th17/Treg 平衡的影响[J].中国免疫学杂志, 2021, 37 (12): 1456-1460.
- [21]李梢, 张卫东.网络药理学与中医药现代研究[J].中国中药杂志, 2020, 45 (1): 1-7.
- [22]张瑞, 陈凯, 王芳, 等.中医药网络药理学研究平台建设与应用[J].中草药, 2021, 52 (3): 672-678.
- [23]刘昌孝, 孙晓波.中药活性成分体内代谢过程及药效物质基础研究[J].中国中药杂志, 2019, 44 (8): 1423-1429.
- [24]姜泉, 王承德, 范永升.类风湿关节炎病证结合诊疗指南[J].中医杂志, 2023, 64 (2): 189-196.