

引用:呼格吉乐,王青虎,张小峰,康秀荣,高明霞.基于网络药理学及实验验证探讨黑沙蒿有效物质群治疗类风湿关节炎的作用机制[J].中医药导报,2025,31(8):31-40,52.

基于网络药理学及实验验证探讨黑沙蒿有效物质群治疗类风湿关节炎的作用机制^{*}

呼格吉乐¹,王青虎¹,张小峰¹,康秀荣²,高明霞¹

(1.内蒙古民族大学蒙医药学院,内蒙古 通辽 028000;

2.通辽职业学院,内蒙古 通辽 028000)

[摘要] 目的:从网络药理学、分子对接及细胞验证实验探讨黑沙蒿有效物质群(HSH)治疗类风湿关节炎(RA)作用机制。方法:利用Pubchem(化合物数据库)、BATMAN-TCM(中药分子机制生物信息学分析工具)、DisGeNet(疾病基因关联网络数据库)、GeneCards(基因卡片数据库)、NCBI(美国国家生物技术信息中心)、OMIM(在线人类孟德尔遗传数据库)、PharmGKB(药理基因组知识库)、GEO(基因表达综合数据库)等数据库及R语言获得HSH核心成分和成分靶点、疾病靶点及HSH治疗RA的潜在靶点。建立蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络,进行基因本体(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)富集分析,选取核心成分和核心靶点进行分子对接。采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)和CFSE标记法检测HSH的无毒浓度和作用浓度。采用流式细胞技术、流式液相多重蛋白定量技术(CBA)、逆转录PCR(RT-PCR)等实验技术检测白细胞介素(IL)-17/T细胞受体信号通路相关细胞、关键性炎症因子及蛋白的变化。结果:对羟基肉桂酸、邻羟基肉桂酸、o-hydroxycapillene等3个核心成分与RA的关联度最高,其成分靶点有90个;经疾病相关靶点及RA差异表达基因交集获得875个RA疾病靶点。将RA疾病靶点与成分靶点相交,得到36个RA的潜在靶点;经PPI构建获取5个核心靶点,核心靶点与核心成分之间具有一定的结合活性;GO和KEGG富集分析显示IL-17/T细胞受体信号通路与HSH抗RA密切相关,HSH参与炎症反应及细胞因子产生和调节等多种生物过程,进而调控机体炎症和免疫反应发挥抗RA的作用。HSH的作用浓度为16 μg/mL,HSH能下调辅助性T细胞1型(Th1)水平,上调调节性T细胞(Treg)水平,降低Th17/Treg的比值,也能显著降低IL-21、IL-6、IL-2、γ干扰素(IFN-γ)、转化生长因子β1(TGF-β1)水平。RT-PCR实验结果显示,HSH显著下调维甲酸相关孤儿受体γt(RORγt)mRNA的表达,而又头翼状螺旋转录因子(Foxp3)mRNA的表达升高无显著性差异。结论:HSH对RA具有良好的治疗作用,其作用机制可能与降低Th1,升高Treg,调节Th17/Treg的平衡和降低IL-21、IL-6、IL-2、IFN-γ、TGF-β1及RORγt表达水平有关。

[关键词] 类风湿关节炎;黑沙蒿;有效物质群;网络药理学;分子对接;细胞验证实验

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)08-0031-10

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.08.006

Mechanism of the Effective Substance Groups from Artemisia Ordosica Krasch in the Treatment of Rheumatoid Arthritis by Network Pharmacology and Experimental Verification

Hugejile¹, WANG Qinghu¹, ZHANG Xiaofeng¹, KANG Xiurong¹, GAO Mingxia¹

(1. College of Traditional Mongolian Medicine, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao Inner Mongolia 028000, China; 2. Tongliao Vocational College, Tongliao Inner Mongolia 028000, China)

[Abstract] Objective: To explore the mechanism of the effective substance groups from Artemisia ordosica Krasch in the treatment of rheumatoid arthritis (RA) by network pharmacology, molecular docking and cell validation experiments. Methods: The databases such as Pubchem, BATMAN-TCM, DisGeNet, GeneCards,

*基金项目:内蒙古自治区自然科学基金项目(2023MS08027);内蒙古自治区教育厅一流学科科研专项项目子课题(YLXKZX-NMD-002)

通信作者:王青虎,男,教授,研究方向为蒙药有效物质基础及其药理

NCBI, OMIM, PharmGKB, GEO, and R language were used to obtain HSH core components and component targets, disease targets, and potential targets for HSH treatment of RA. The protein–protein interaction (PPI) network was established and the gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis were conducted to select core components and core targets for molecular docking. The CCK-8 and CFSE labeling method were used to detect the non-toxic concentration and effective concentration of HSH. The experimental techniques such as flow cytometry, CBA, and RT-PCR were used to detect changes in cells, key inflammatory factors, and proteins related to the interleukin (IL)-17/T cell receptor signaling pathway. Results: The three core components, namely hydroxycinnamic acid, o-hydroxycinnamic acid, and o-hydroxy-capillene, had the highest correlation with RA, with 90 target points. Totally 875 RA disease targets were obtained by intersecting disease-related targets and differentiable expressed genes in RA. Intersection of RA disease targets with component targets resulted in 36 potential targets for RA. A total of 5 core targets were obtained through PPI construction, and there was a certain binding activity between the core targets and the core components. GO and KEGG enrichment analysis results showed that the IL-17/T cell receptor signaling pathway was closely related to the anti-RA effect of HSH, which also participated in regulating various biological processes such as inflammatory response, cytokine production, and regulation, thereby regulating the body's inflammation and immune response to exert anti-RA effects. The effective concentration of HSH was 16 μ g/mL. HSH could down-regulate Th1 levels, up-regulate Treg levels, reduced Th17/Treg ratios, and significantly reduced the levels of IL-21, IL-6, IL-2, interferon- γ (IFN- γ), and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). The RT-PCR experiment results showed that HSH significantly down-regulated the expression of ROR γ t mRNA, while there was no significant difference in the expression of Foxp3 mRNA. Conclusions: HSH has good therapeutic effect on RA, and its mechanism may be related to reducing Th1, increasing Treg, regulating Th17/Treg balance, and reducing the expression levels of IL-21, IL-6, IL-2, IFN- γ , TGF- β 1, and ROR γ t.

[Keywords] rheumatoid arthritis; Artemisia ordosica Krasch; effective substance groups; network pharmacology; molecular docking; cell validation experiment

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性和对称的多发性关节炎,最常累及手、脚和膝盖的关节^[1-2]。RA在我国是常见病、多发病,尤其是内蒙古严寒地区发病率不断上升^[3]。RA在蒙医学中被称为“协日乌素”病或“套来病”^[4],由于三邪、四缘之影响,三热能不足,消化力减弱,血液糟粕的分解受到阻碍而穿入精华之远行道,使精华混浊,则“协日乌素”随即增盛。病变的“协日乌素”与血、希拉、赫依相结合,降至各个关节即形成“协日乌素”病^[5]。根据蒙医燥“协日乌素”功效理论,其辨证施治原则是选择具燥“协日乌素”功效的蒙药,调三根、扶胃火,促进精化与糟粕的分解,燥“协日乌素”^[6]。

蒙医药在防治RA方面具有独特的用药经验和丰富的开发前景药材。黑沙蒿系菊科植物黑沙蒿(*Artemisia ordosica* Krasch.)的地上部分,是蒙古族民间习用特色的具有燥“协日乌素”功效蒙药之一^[7]。据民间相传黑沙蒿治疗关节肿胀和疼痛有明显效果,尤其对“协日乌素”病疗效可达到90%以上^[7],但至今尚未见到相关研究报道。课题组已从黑沙蒿中分离鉴定了45个化合物^[8-14],并采用等量不等强度活性追踪法比较黑沙蒿水提物、乙醇提取物及其经硅胶柱色谱处理后精制物[乙醇提取物按常规硅胶色谱柱法,先用石油醚、乙酸乙酯脱脂后,再用乙酸乙酯洗脱,洗脱液合并,回收溶剂得到的物质]对胶原诱导RA大鼠的治疗作用。预试结果显示,经硅胶柱色谱

处理后精制物[黑沙蒿有效物质群(HSH)]能明显改善胶原诱导RA大鼠的一般情况,减轻关节肿胀程度,但其对RA通过何种机制发挥治疗作用仍有待探索。

本研究通过对文献^[15-17]和课题组从HSH中分得的化学成分进行整理,并经Pubchem平台和BATMAN-TCM(中药分子机制生物信息学分析工具)数据库揭示其活性成分及靶点,再经疾病靶点及RA差异表达基因交集获得RA的潜在靶点。然后,将RA潜在靶点与成分活性靶点构建“成分-靶点”网络获得RA的作用靶点,并通过作用靶点的基因本体(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)富集分析预测相关信号通路,再构建蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络获得RA的关键靶点。随后,采用分子对接技术和体外细胞实验证网络药理学预测的作用,旨在为后续HSH治疗RA研究提供理论基础和研究方向。

1 材料与方法

1.1 细胞 人乳腺上皮细胞(HMEC)购自武汉原生原代生物医药科技有限公司;外周血单个核细胞(PBMC)购自成都莱弗赛特生物技术有限公司。

1.2 试剂与药物 内皮细胞(ECM)培养基(批号:23HF05G)购自美国ScienCell公司;胎牛血清(批号:20220105)购自美国OriCell公司;RPMI1640培养基(批号:2537174)、0.25%胰酶(批

号:2366123)、CD3-FITC(批号:2550022)、CD8-PE(批号:2504504)、IFN γ -PerCP-Cy5.5(γ干扰素-藻红蛋白-花青素)(批号:2681431)、IL17A-APC(批号:2681431)、CD4-FITC(批号:2475457)、CD25-PE(批号:2652804)、CD127-APC(批号:2525829)、流式细胞术染色缓冲液(flow cytometry staining buffer, FCSB)(批号:2674298)均购自美国Thermo Fisher公司;0.4%台盼蓝染色液(批号:2310003)购自北京索莱宝科技有限公司;植物凝集素(PHA)溶液(500×)(批号:2434415)、CFSE(羧基荧光素二乙酸盐琥珀酰亚胺酯)(批号:BCBM9752V)购自美国Sigma Aldrich公司;CD45-PerCP(批号:3324073)、白细胞活化混合液(含BD GolgiPlug)(leukocyte activation cocktail, with BD GolgiPlug)(批号:299784)、固定/透化试剂盒(fixation/permeabilization kit)(批号:2550866)、人白细胞介素-2弹性检测试剂盒(human IL-2 flex set)(批号:2045198)、human IL-1 β flex set(批号:2796278)、human IL-17A flex set(批号:3178793)、human IFN- γ flex set(批号:3146944)均购自美国Becton Dickinson公司;human IL-6 flex set(批号:2524274)、human IL-21 flex set(批号:2460254)、人肿瘤坏死因子弹性检测试剂盒(human TNF flex set)(批号:2489255)、人源转化生长因子 β 1单重检测试剂盒(human TGF- β 1 singleplex flex set)(批号:3451322)购自美国Becton Dickinson公司。黑沙蒿采集于内蒙古通辽市奈曼旗,由内蒙古民族大学蒙医药学院拉喜那木吉拉教授鉴定为菊科蒿属植物黑沙蒿(*Artemisia ordosica* Krasch.)的干燥地上部分,药材样品(批号:20220617)保存于内蒙古民族大学蒙医药大楼313室。

1.3 主要仪器 MCO-15AC型二氧化碳培养箱(日本三洋公司);SDS-2B倒置显微镜(重庆重光实业有限公司);SW-CJ-2D型净化工作台(上海苏净实业有限公司);DZKW-D型恒温水浴锅(河北省黄骅航天仪器厂);TD4A型水平离心机(长沙英泰仪器有限公司);H1650-W型台式高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);DNM-9602型酶标分析仪(北京普朗新技术有限公司);Calibur II型流式细胞仪(美国BD公司);QL-902型涡旋振荡仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);Centrifuge 5415D型离心机(德国Eppendorf公司);NAN-ODROP 2000型分光光度计(美国赛默飞世尔科技有限公司);ABI7500型荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystems公司)。

1.4 化学成分获取和成分靶点预测 通过对文献[15-17]及课题组前期从HSH中分得的化学成分进行整理,获得候选成分,并采用Chem draw 14.0软件绘画其结构式,转化为标准的Canonical SMILES格式保存。通过Pubchem平台(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)检索候选成分的CID号或InChI信息。以score cutoff(分数截断值)≥20且P≤0.05为选择标准,用CID号或InChI信息在BATMAN-TCM数据库(<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm>)中检索核心成分及其成分靶点^[18]。

1.5 疾病靶点预测

1.5.1 RA相关靶点检索 以“rheumatic arthritis”为关键词,通过DisGeNet(疾病基因关联网络数据库)、GeneCards(基因卡片数据库)、NCBI(美国国家生物技术信息中心)、OMIM(在

线人类孟德尔遗传数据库)和PharmGKB(药理基因组知识库)等数据库获得RA相关靶点。随后,使用UniProt数据库(通用蛋白质数据库)将目标名称转换为基因名称。

1.5.2 差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)的筛选 在GEO数据库(基因表达综合数据库)中输入“rheumatic arthritis”,Top Organisms(主要生物体)里选择Homo sapiens(智人),并在同一平台上选取2个与RA相关的微阵列芯片GSE55235和GSE93272,搜索获得具有GEN symbol(基因符号)的数据集,使用R语言的“sva”软件去除这两个数据集的批次处理效果。接着用R语言“limma”软件筛选出RA与健康对照人群的DEGs,以FDR.P<0.05和|log₂FC|>1作为DEGs的筛选阈值,最后以log₂FC>1或<1分别确定表达上调或下调的基因^[19]。

从DisGeNet、GeneCards、NCBI、OMIM和Pharm GKB数据库中获得的RA相关靶点与GEO数据库中得到的DEGs结合,并筛选至少在两个数据库中出现的靶点,即为疾病靶点。

1.6 HSH治疗RA的潜在靶点预测 通过Venn(文氏图)工具对HSH成分靶点和RA疾病靶点进行分析,获得HSH治疗RA的潜在靶点。

1.7 PPI网络的构建 以物种设置为人,置信度设置为最高,将HSH治疗RA的潜在靶点通过STRING数据库,剔除离散蛋白后获得蛋白互作网络信息。利用Cytoscape软件构建PPI网络,并根据度值进一步筛选核心靶点。

1.8 GO和KEGG富集分析 为了更好地分析HSH治疗RA的可能分子机制,采用R语言对潜在靶点进行了GO和KEGG富集分析^[20],并对获得结果进行排序。此外,使用ggplot2程序对Top 10的GO条目和Top 20的KEGG通路结果进行可视化处理。

1.9 分子对接 通过Pubchem网站(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)检索活性成分对羟基肉桂酸、邻羟基肉桂酸、o-hydroxyacetophenone的结构文件,并以其三维结构作为配体,选择PPI网络中TNF、IL-6、IL-1 β 、IL-4和IL-17A等前5个关键靶点作为受体,从PDB数据库(蛋白质数据库)中筛选其人源蛋白质结构文件,其筛选条件为以蛋白含小分子配体和分辨率小于0.25 nm。利用PYMOL 2.3.4软件对受体蛋白进行删除水分子和小分子配体等操作,采用“AutoDock Tools”软件对受体蛋白进行加氢、平衡电荷等修饰,将受体蛋白和配体小分子分别转化为pdbqt格式。最后,利用AutoDock Vina 1.1.2对受体蛋白与配体小分子进行分子对接。以结合能大于4.0 kcal/mol为亲和力良好,利用PLIP(蛋白质-配体相互作用分析器)工具分析对接结果,并使用PYMOL 2.3.4软件对打分最高的5次结果进行可视化^[21]。

1.10 体外细胞验证实验

1.10.1 HSH的制备 按照课题组前期研究^[14]中所建立的方法制备黑沙蒿有效物质群,即黑沙蒿20 kg,用95%乙醇回流提取,提取液回收乙醇,得到乙醇提取物。乙醇提取物上硅胶色谱柱,先用体积比为80:1的石油醚、乙酸乙酯混合溶剂脱脂后,再用体积比为20:1的石油醚、乙酸乙酯混合溶剂洗脱,洗脱液合并,回收溶剂得到黑沙蒿有效物质群,并储存于4℃冰

箱中备用。

1.10.2 细胞培养 PBMC细胞用RPMI1640培养基,添加2 mmol/L L-谷氨酰胺、10% FCS,在37℃、5% CO₂的条件下培养,定期更换培养基,以维持适宜的细胞生长环境。

1.10.3 细胞计数试剂盒-8(CCK-8)检测HSH对细胞的无毒浓度 将PBMC细胞孔接种于96孔板中,培养24 h。分别加入不同浓度(2 000.0、1 000.0、500.0、250.0、125.0、62.5、32.0、16.0和8.0 μg/mL)的HSH处理24 h,对照组加入不含药物的培养基,另设置不接种细胞不含药物的空白孔。每孔加入10 μL CCK-8试剂,孵育2 h,采用酶标仪检测450 nm处各孔的吸光度(A)值,并计算细胞抑制率。抑制率5%以下的浓度为最大无毒浓度。

细胞抑制率=[(对照组OD值-实验组OD值)/对照组OD值]×100%。

1.10.4 CFSE标记法检测HSH对细胞的作用浓度 将细胞分为5组,模型组(PBMC-CFSE+PHA),CFSE标记的PBMC细胞用5 μg/mL PHA刺激;给药组(PBMC-CFSE+PHA+HSH),CFSE标记的PBMC细胞用5 μg/mL PHA刺激,同时加入无毒浓度HSH(16、8、4和2 μg/mL)。

PBMC细胞按上述方法培养3 d后,收集细胞,转入1.5 mL离心管,500×g离心5 min;弃掉细胞上清液,用1 000 μL FCSB重悬细胞沉淀,500×g离心5 min;弃上清,用100 μL FCSB重悬细胞沉淀,加入10 μL CD45-PerCP,室温避光反应30 min;500×g离心5 min,细胞上清弃去后,用500 μL FCSB重悬细胞,流式细胞仪检测收集总细胞数为50 000个,CD45-PerCP荧光通道为FL3,CFSE荧光通道为FL1-H,通过CellQuest软件分析结果,CD45-PerCP/SSC散点图圈出CD45+细胞,CFSE直方图分析CD45+细胞群中CFSE的增殖率,筛选HSH的作用浓度。

1.10.5 流式细胞技术检测HSH对细胞增殖的影响 根据“1.10.4”结果,将细胞分为4组,正常组(PBMC-CFSE),CFSE标记的PBMC细胞;模型组(PBMC-CFSE+PHA),CFSE标记的PBMC细胞用5 μg/mL PHA刺激;给药组(PBMC-CFSE+PHA+HSH),CFSE标记的PBMC细胞用5 μg/mL PHA刺激,同时加入16 μg/mL HSH;阳性对照组(PBMC-CFSE+PHA+MTX),CFSE标记的PBMC细胞用5 μg/mL PHA刺激,同时加入10 μmol/L 甲氨蝶呤(methotrexate,MTX)。

用完全培养基把PBMC细胞浓度调整到1×10⁶个/mL后,加入CFSE储存液(5 mmol/L),再用完全培养基把PBMC细胞终浓度调到1 μmol/L,放入37℃的培养箱中染料孵育10 min后,加入细胞悬液5倍体积的4℃预冷培养基淬灭染料,放入4℃的冰箱孵育5 min,500×g离心5 min,弃去上清液,用5 mL培养基重悬细胞沉淀,重复3次,用适量的完全培养基将PBMC细胞密度调整为2.5×10⁵个/mL,铺于细胞培养板内,上机检测并通过CellQuest软件分析结果。

1.10.6 流式细胞技术检测HSH对细胞中Th1、Th17、Treg的影响 将细胞分为4组,正常组(PBMC),单独培养的PBMC细胞;模型组(PBMC+PHA),PBMC细胞用5 μg/mL PHA刺激;给

药组(PBMC+PHA+HSH),PBMC细胞用5 μg/mL PHA刺激,同时加入16 μg/mL HSH;阳性对照组(PBMC+PHA+MTX),PBMC细胞用5 μg/mL PHA刺激,同时加入10 μmol/L MTX。将PBMC细胞密度调整为2.5×10⁵个/mL,以1 500 μL/孔的量铺于细胞培养板内,按上述分组方法进行培养。

PBMC细胞FCSB重悬细胞沉淀,分别加入IFN-γ-PerCP-Cy5.5和IL17A-APC抗体各5 μL,室温条件避光反应30 min,500×g离心5 min,弃上清液;用500 μL FCSB重悬细胞沉淀,500×g离心5 min,弃上清液;取500 μL FCSB重悬细胞沉淀。流式细胞仪检测收集总细胞数为50 000个,CD3-FITC荧光通道为FL1-H,CD8-PE荧光通道为FL2-H,IFN-γ-PerCP-Cy5.5荧光通道为FL3-H,IL17A-APC荧光通道为FL4-H。通过CellQuest软件分析结果,CD3-FITC/SSC散点图圈出CD3+细胞,CD8-PE/IFN-γ-PerCP-Cy5.5散点图分析Th1细胞(CD8-IFN-γ+)比例,CD8-PE/IL17A-APC散点图分析Th17细胞(CD8-IL17A+)比例。

PBMC细胞FCSB重悬细胞沉淀,加入5 μL FoxP3-APC抗体,室温条件避光反应30 min;500×g离心5 min,弃上清;用500 μL FCSB重悬细胞沉淀;500×g离心5 min,弃上清,细胞沉淀用500 μL FCSB重悬,流式细胞仪检测收集总细胞数为50 000个,CD25-PE荧光通道为FL2-H,CD4-PerCP-Cy5.5荧光通道为FL3-H,FoxP3-APC荧光通道为FL4-H。通过CellQuest软件分析结果,CD4-FITC/SSC散点图圈出CD4+细胞,CD25-PE/FoxP3-APC散点图分析Treg细胞(CD25+FoxP3+)比例。

1.10.7 CBA法检测细胞上清液中细胞因子水平 按“1.10.6”项下分组方法处理细胞,收集上清液,照试剂盒说明书要求,采用流式细胞仪检测各样本中IL-21、IL-2、IFN-γ、IL-6、TNF、IL-17、IL-1β和TGF-β1表达水平。

1.10.8 RT-PCR检测细胞中RORγt及Foxp3基因表达水平 按“1.10.6”项下分组方法处理细胞,收集细胞,使用TRIzol法提取总RNA^[22],并使用反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA,进行qRT-PCR分析^[23]。引物序列见表1,结果以β-actin为内参进行归一化处理,并用2^{-ΔΔCt}法计算各基因的相对表达量。

表1 基因引物序列

引物名称		引物序列(5'-3')
Foxp3	上游引物	ATCGGACCCCTTCACCTCA
	下游引物	TGGCGATGGCGTTCTTC
RORγt	上游引物	GGCTCCCTGGATGAATAGAATG
	下游引物	AGGCAGAGGCAGAAATGTAAAG
β-actin	上游引物	ATGGATGACGATATCGCTGC
	下游引物	CTTCTGACCCATACCCACCA
	下游引物	AGTGATGGCATGGACTGTGG

1.10.9 数据分析 使用Graph Pad Prism 8.0.2软件对实验数据进行绘图,计量资料以“均数±标准差”($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,随后执行Tukey事后多重比较检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

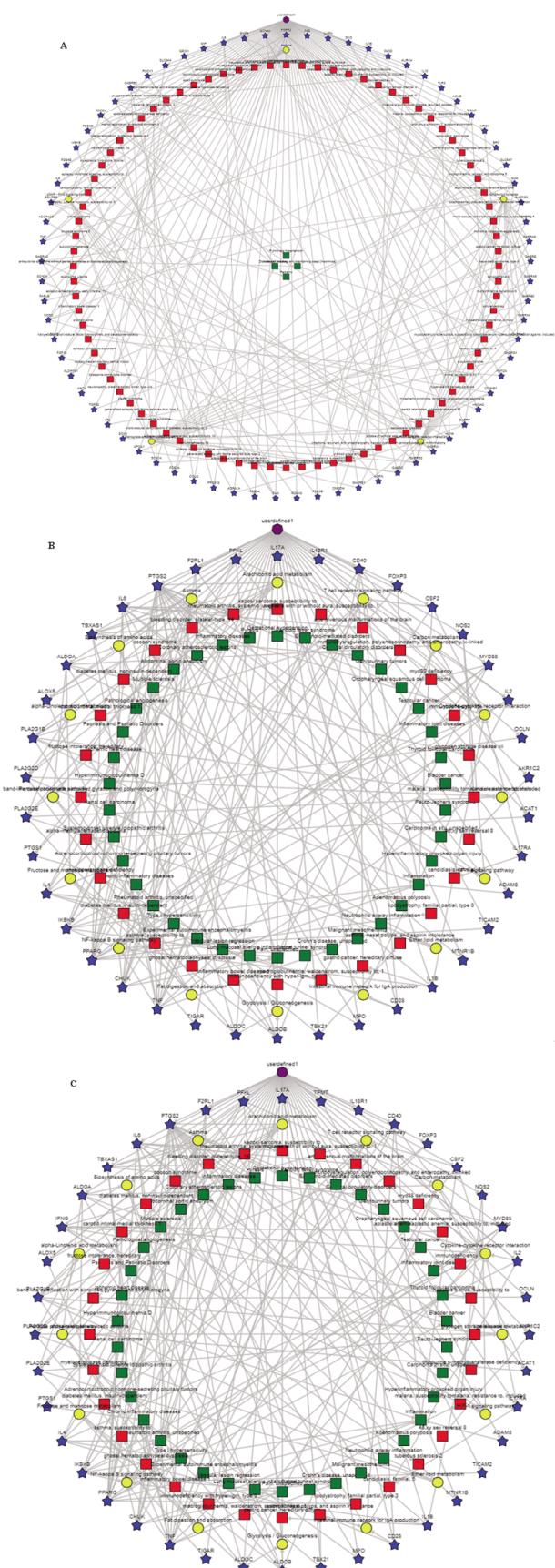
2 结 果

2.1 化学成分获取和成分靶点预测 通过前期研究和文献收集,从HSH中获得40个候选成分(见表2),并经BATMAN-

TCM数据库预测,其中36个成分有活性靶点,与RA有关的成分5个,分别为对羟基肉桂酸、邻羟基肉桂酸、o-hydroxycapillene、Malabaricano、3,4-二羟基苯甲醛,剔除重复靶点后5个成分共有156个潜在靶点。潜在靶点再经BATMAN-TCM数据库富集分析,结果显示对羟基肉桂酸、邻羟基肉桂酸、o-hydroxycapillene等3个成分与RA的关联度最高(即为核心成分),剔除重复项后成分靶点有90个。(见图1)

表2 HSH 的候选成分

编号	成分名称	分子式	CAS号	结构类型
1	Arteordoyan A	C ₁₇ H ₂₄ O ₂	-	炔类
2	(3S,8S)-16,17-脱氢法林二醇	C ₁₇ H ₂₂ O ₂	301298-94-2	炔类
3	镰叶芹醇	C ₁₇ H ₂₄ O	21852-80-2	炔类
4	o-hydroxycapillene	C ₁₅ H ₁₀ O	-	炔类
5	反-去氢母菊酯	C ₁₁ H ₈ O ₂	692-94-4	炔类
6	茵陈素	C ₁₅ H ₁₀ O ₂	3570-28-3	炔类
7	Arteordocoumarin A	C ₁₀ H ₁₀ O ₅	-	香豆素类
8	6,7-二甲氧基香豆素	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	120-08-1	香豆素类
9	6,7,8-三甲氧基香豆素	C ₁₂ H ₁₀ O ₅	60796-65-8	香豆素类
10	6-羟基-7-甲氧基香豆素	C ₁₀ H ₈ O ₄	776-86-3	香豆素类
11	对羟基苯乙酮	C ₈ H ₈ O ₂	99-93-4	苯乙酮类
12	3-甲氧基-4-羟基苯乙酮	C ₉ H ₁₀ O ₃	498-02-2	苯乙酮类
13	桉油烯醇	C ₁₅ H ₂₄ O	6750-60-3	倍半萜类
14	乌发醇	C ₃ H ₈ O ₂	545-46-0	三萜类
15	对羟基苯甲醛	C ₇ H ₆ O ₂	123-08-0	苯甲醛类
16	香兰素	C ₈ H ₈ O ₃	121-33-5	苯甲醛类
17	3,4-二羟基苯甲醛	C ₇ H ₆ O ₃	139-85-5	苯甲醛类
18	5-羟基-7,4'-二甲氧基二氢黄酮	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	29424-96-2	黄酮类
19	二氢松柏醇	C ₁₀ H ₁₄ O ₃	2305-13-7	苯丙素类
20	5,4'-二羟基-7-甲氧基二氢黄酮	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	-	黄酮类
21	5,4'-二羟基-7,3'-二甲氧基二氢黄酮	C ₁₇ H ₁₆ O ₆	-	黄酮类
22	Arteordosin A	C ₁₅ H ₂₀ O ₅	-	苯丙素类
23	Arteordosin B	C ₁₅ H ₂₀ O ₅	-	苯丙素类
24	松柏醇	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	458-35-5	苯丙素类
25	5-羟基-7,4'-二甲氧基黄酮	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	5128-44-9	黄酮类
26	金合欢素	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	480-44-4	黄酮类
27	5,7,4'-三羟基-3'-甲氧基黄酮	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	-	黄酮类
28	5,7,4'-三羟基黄酮	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	520-36-5	黄酮类
29	邻羟基肉桂酸	C ₉ H ₈ O ₃	614-60-8	苯丙素类
30	对羟基肉桂酸	C ₉ H ₈ O ₃	501-98-4	苯丙素类
31	Integrin A	C ₁₅ H ₁₈ O ₄	-	苯丙素类
32	Integrin B	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	-	苯丙素类
33	Ordosacid A	C ₁₂ H ₁₆ O ₅	-	苯丙素类
34	Ordosacid B	C ₁₂ H ₁₆ O ₅	-	苯丙素类
35	Ordosicin A	C ₃₉ H ₃₈ O ₉	-	苯丙素类
36	Ordosicin B	C ₂₅ H ₂₈ O ₉	-	苯丙素类
37	肉桂酸	C ₉ H ₈ O ₂	621-82-9	苯丙素类
38	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	1135-24-6	苯丙素类
39	咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	331-39-5	苯丙素类
40	Malabaricano	C ₂₉ H ₂₄ O ₅	74683-16-2	木脂素



注:A.对羟基肉桂酸;B.邻羟基肉桂酸;C.o-hydroxycapillene。

图1 活性成分富集分析网络图

2.2 疾病靶点预测 在DisGeNet、GeneCards、NCBI、OMIM和Pharm GKB疾病数据库检索“Rheumatic arthritis”，分别获得疾病相关靶点2 723、1 110、99、184和91个。

从GEO数据库中获得的3个与RA相关的大数据集,利用R语言“limma”软件,在排除批次效应后筛选出193个DEGs。在图2中显示了与RA相关的前20个DEGs表达排名。经193个DEGs与上述疾病相关靶点进行Venn分析(见图3),以至少在两个数据库中出现的靶点为筛选条件,获得疾病靶点875个。

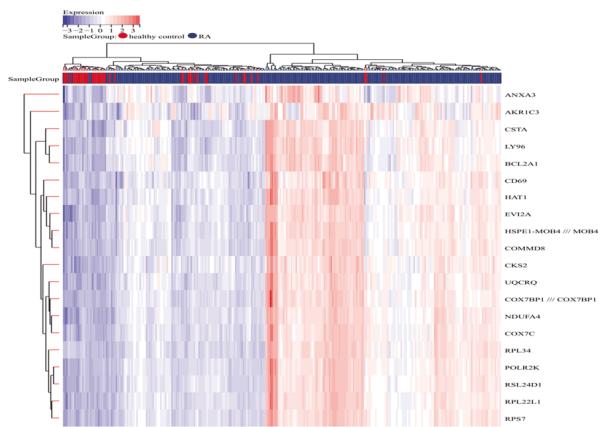


图 2 与 RA 相关的 DEGs 热图

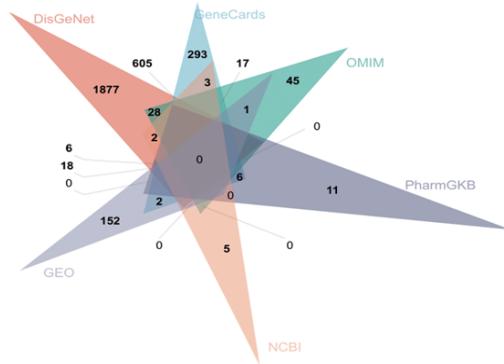


图 3 DEGs 与疾病相关靶点的 Venn 图

2.3 HSH治疗RA的潜在靶点预测 经90个活性成分靶点与875个疾病靶点的Venn分析,得到了36个HSH治疗RA的潜在靶点。(见图4)

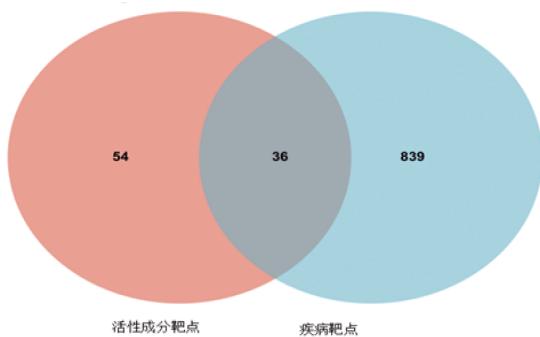


图 4 活性成分靶点与疾病靶点的 Venn 分析

2.4 PPI构建及核心靶点筛选 利用STRING数据库和Cytoscape 3.9.1软件构建HSH治疗RA的潜在靶点的PPI网络(见图5)。图中节点颜色越深,节点面积越大,程度和重要性就越高。然后,根据Degree值筛选核心靶点,Degree较高的核心靶点

点为TNF、IL-6、IL-1 β 、IL-4和IL-17A。

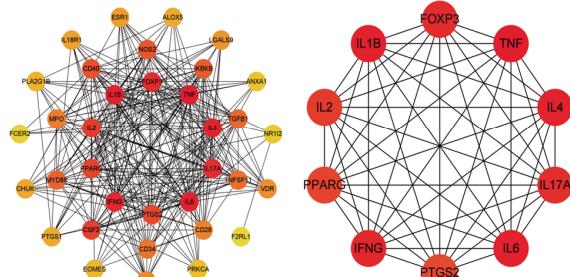


图 5 PPI 网络分析图

2.5 GO和KEGG富集分析结果 GO结果显示,生物过程主要富集于炎症反应、细胞因子产生的正向调节、细胞因子产生、细胞因子介导的信号通路、调节细胞因子产生等;细胞组分主要富集在膜的一侧、质膜的外侧、质膜的组成部分、CD40受体复合物、质膜的固有成分等;分子功能主要富集于信号受体的结合、细胞因子受体结合、细胞因子的活性、受体调节活性等。(见图6)这些结果表明HSH治疗RA主要涉及的生物过程为炎症反应及细胞因子产生和调节。KEGG富集分析发现, HSH治疗RA的潜在靶点主要富集于IL-17信号通路、T细胞受体信号通路、NF- κ B信号通路、Th17细胞分化等。(见图7)

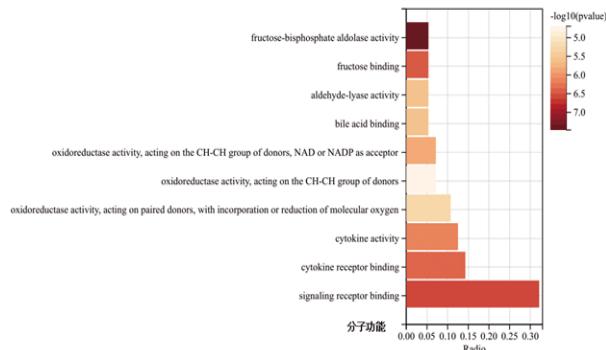
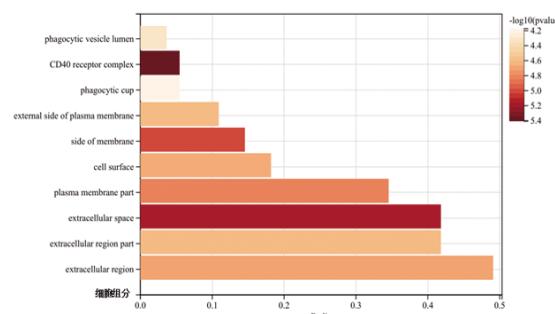
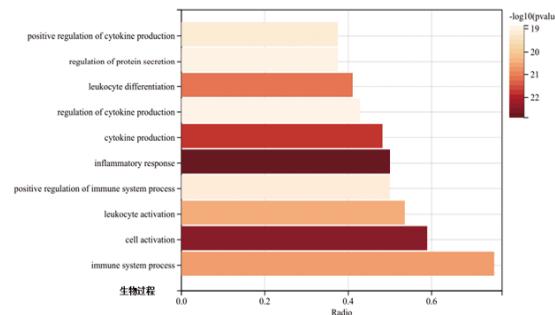


图 6 GO 富集分析

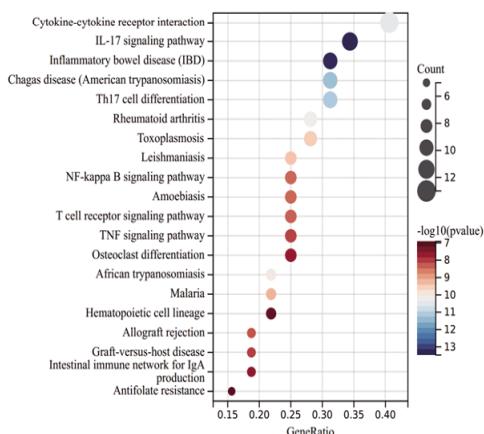
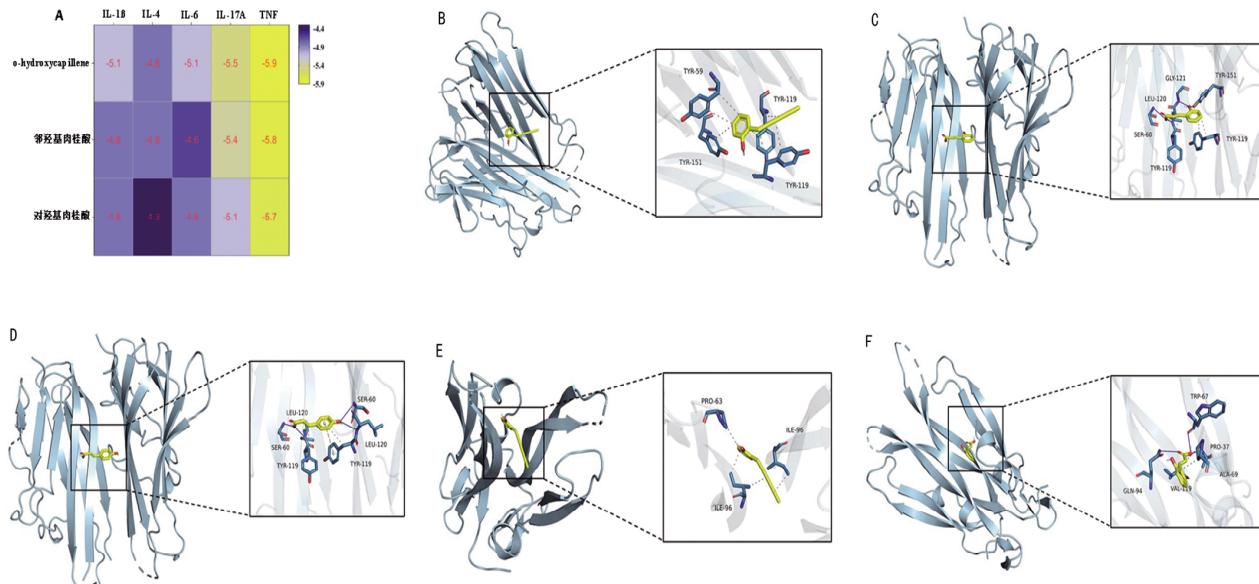


图7 KEGG富集分析

2.6 分子对接 选择PPI网络中TNF、IL-6、IL-1 β 、IL-4和IL-17A等5个核心靶点,与3个核心成分(对羟基肉桂酸、邻羟基肉桂酸、 α -hydroxycapillene)进行分子对接,获取靶点及其对应的核心成分的分子对接数据(见图8A),并对打分前5次结果进行可视化(见图8B~F)。结果显示5个核心靶点与3个核心成分的结合能均大于4 kcal/mol,说明核心成分与核心靶点之间的结合良好。TNF、IL-17A蛋白与小分子结合活性最高,其中TNF蛋白与 α -hydroxycapillene对接的结合能为-5.9 kcal/mol,活性位点附近的TYR-59、TYR-119、TYR-151氨基酸与该化合物有疏水键作用;与邻羟基肉桂酸对接的结合能为-5.8 kcal/mol,邻羟基肉桂酸与活性位点附近的TYR-119氨基酸有疏水键,与SER-60、LEU-120、GLY-121、TYR-151氨基酸有氢键作用;与对羟基肉桂酸对接的结合能为-5.7 kcal/mol,对羟基肉桂酸与TYR-119氨基酸有疏水键,与SER-60、LEU-120氨基酸有氢键作用,与TYR-119氨基酸有 π - π 相互作用。IL-17A蛋白与 α -hydroxycapillene对接的结合能为-5.5 kcal/mol,



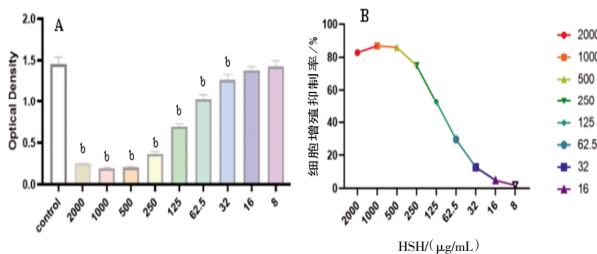
注: A.活性成分与核心靶点的结合能(kcal/mol)图; B.TNF与 α -hydroxycapillene的3D结合构象; C.TNF与邻羟基肉桂酸的3D结合构象; D.TNF与对羟基肉桂酸的3D结合构象; E.IL-17A与 α -hydroxycapillene的3D结合构象; F.IL-17A与邻羟基肉桂酸的3D结合构象。

图8 分子对接结果

与PRO-63、ILE-96氨基酸有疏水键;与邻羟基肉桂酸对接的结合能为-5.4 kcal/mol,邻羟基肉桂酸与PRO-37、VAL氨基酸有疏水键,TRP-67、ALA-69、GLN-94氨基酸有氢键作用。

2.7 体外细胞验证实验

2.7.1 HSH对细胞的无毒浓度 用不同浓度(2 000.0、1 000.0、500.0、250.0、125.0、62.5、32.0、16.0和8.0 μ g/mL)的HSH处理PBMC细胞24 h后,对细胞的增殖均具有抑制作用,且随着浓度的增加而增加。HSH浓度为16 μ g/mL和8 μ g/mL的OD值与空白对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),细胞增殖抑制率均小于5%,故选择16 μ g/mL以下浓度的HSH用于后续的作用浓度实验。(见图9)

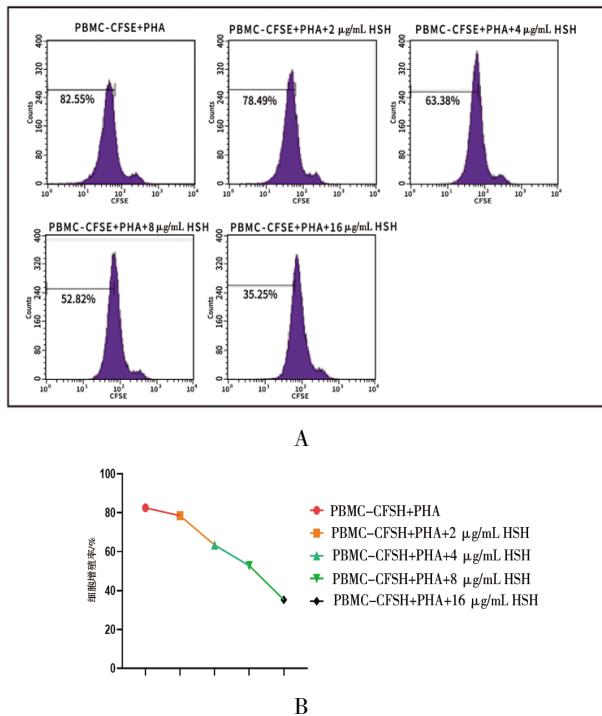


注: A.各组PBMC细胞的OD值; B.HSH对PBMC细胞增殖抑制率;与空白组比较,^b $P<0.01$ 。

图9 HSH的无毒浓度检测结果

2.7.2 HSH对细胞的作用浓度 利用CFSE标记法检测了HSH对PBMC细胞体外增殖的影响,实验结果(见图10)显示, PBMC-CFSE+PHA组的增殖率为82.55%、PBMC-CFSE+PHA+2 μ g/mL HSH组的增殖率为78.49%、PBMC-CFSE+PHA+4 μ g/mL HSH组的增殖率为63.38%、PBMC-CFSE+PHA+8 μ g/mL HSH组的增殖率为52.82%、PBMC-CFSE+PHA+16 μ g/mL HSH组的增殖率为35.25%。这一结果说明质量浓度为16 μ g/mL HSH组的增殖率为35.25%。这一结果说明质量浓度为16 μ g/mL HSH组的增殖率为35.25%。

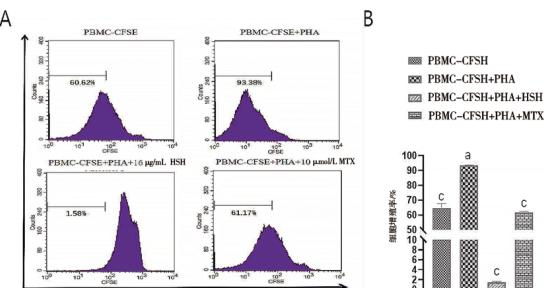
的HSH对PBMC细胞增殖抑制作用最强,故选择此浓度作为HSH的作用浓度。



注:A.各组细胞的荧光强度;B.各组细胞的增殖率。

图 10 HSH 的作用浓度检测结果

2.7.3 HSH对细胞增殖的影响 实验结果(见图11)显示,与PBMC-CFSE组比较,PBMC-CFSE+PHA组细胞增殖率显著升高($P<0.001$);与PBMC-CFSE+PHA组比较,PBMC-CFSE+PHA+HSH组和PBMC-CFSE+PHA+MTX组细胞增殖率显著降低($P<0.001$);与PBMC-CFSE+PHA+MTX组比较,PBMC-CFSE+PHA+HSH组细胞增殖率也显著降低($P<0.001$)。



注:A.各组细胞的荧光强度;B.各组细胞的增殖率;与PBMC-CFSE组比较,^a $P<0.001$;与PBMC-CFSE+PHA组比较,^c $P<0.001$ 。

图 11 HSH 对细胞增殖影响的结果

2.7.4 HSH对细胞中Th1、Th17、Treg的影响 实验结果(见表3)显示,PBMC+PHA组Th1、Th17和Th17/Treg的水平明显高于PBMC组($P<0.001$),而Treg的水平显著低于PBMC组($P<0.001$);与PBMC+PHA组比较,PBMC+PHA+HSH组和PBMC+PHA+MTX组Th1和Th17/Treg的水平显著降低($P<0.001$),Treg的水平显著升高($P<0.001$),而PBMC+PHA+MTX组Th17的水平显著降低($P<0.001$),PBMC+PHA+HSH组Th17水平降低,但差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 3 黑沙蒿有效物质群对 Th1、Th17、Treg 细胞的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Th1/%	Th17/%	Treg/%	Th17/Treg
PBMC	3	0.40±0.15	0.64±0.16	19.62±0.70	3.23±0.71
PBMC+PHA	3	2.67±0.10 ^a	1.12±0.08 ^a	5.58±0.39 ^a	20.05±1.18 ^a
PBMC+PHA+HSH	3	0.75±0.08 ^c	1.05±0.10	12.97±0.62 ^c	8.10±0.76 ^c
PBMC+PHA+MTX	3	0.43±0.07 ^c	0.58±0.04 ^c	18.02±1.05 ^c	3.20±0.17 ^c

注:与PBMC组比较,^a $P<0.001$;与PBMC+PHA组比较,^c $P<0.001$ 。

2.7.5 HSH对细胞上清液中细胞因子水平的影响 实验结果(见表4)表明,与PBMC组比较,PBMC+PHA组细胞上清液中IL-21、IL-2、IL-6、TGF-β1、IFN-γ、IL-17水平显著升高($P<0.001$);与PBMC+PHA组比较,PBMC+PHA+HSH组细胞上清液中IL-21、IL-2、IL-6、TGF-β1、IFN-γ水平显著降低($P<0.001$),IL-17水平的差异无统计学意义($P>0.05$);PBMC+PHA+MTX组细胞上清液中IL-21、IL-2、IL-6、TGF-β1水平显著降低($P<0.01$ 或 $P<0.001$),IFN-γ和IL-17水平的差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 4 黑沙蒿有效物质群对 PBMC 细胞上清中细胞因子含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

细胞因子	n	PBMC	PBMC+PHA	PBMC+PHA+HSH	PBMC+PHA+MTX
IL-21	3	31.26±1.47	4 818.00±124.80 ^a	38.84±4.39 ^a	3 857.00±552.30 ^b
IL-2	3	6.86±0.35	48.37±0.93 ^a	8.76±0.39 ^a	33.02±1.80 ^c
IL-6	3	8.69±1.06	120.60±0.97 ^a	12.56±0.17 ^c	71.37±2.77 ^c
TGF-β1	3	7.23±0.24	383.00±5.73 ^a	9.70±0.53 ^a	281.60±42.61 ^c
IFN-γ	3	359.00±21.87	2 632.00±137.40 ^a	80.56±4.20 ^c	2 603.00±1.76
IL-17	3	33.51±2.16	45.50±5.31 ^a	41.69±2.91	44.98±3.74

注:与PBMC组比较,^a $P<0.001$;与PBMC+PHA组比较,^b $P<0.01$;与PBMC+PHA组比较,^c $P<0.001$ 。

2.7.6 HSH对细胞中ROR γ t mRNA及Foxp3 mRNA表达水平的影响 实验结果(见表5)表明,与PBMC组比较,PBMC+PHA组细胞中ROR γ t mRNA的表达显著升高($P<0.01$),而Foxp3 mRNA的表达明显降低($P<0.01$);与PBMC+PHA组比较,PBMC+PHA+HSH组细胞中ROR γ t mRNA的表达显著降低($P<0.001$),而PBMC+PHA+MTX组细胞中Foxp3 mRNA的表达明显升高($P<0.05$),PBMC+PHA+HSH组细胞中Foxp3 mRNA的表达差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 5 黑沙蒿有效物质群对淋巴细胞 ROR γ t mRNA、Foxp3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ROR γ t mRNA	Foxp3 mRNA
PBMC	3	0.996 0±0.027 2	1.197 0±0.171 4
PBMC+PHA	3	2.115 0±0.016 3 ^a	0.176 0±0.042 6 ^a
PBMC+PHA+MTX	3	0.707 3±0.280 4 ^c	0.701 7±0.372 2 ^b
PBMC+PHA+HSH	3	0.524 7±0.019 7 ^c	0.289 7±0.086 2

注:与PBMC组比较,^a $P<0.01$;与PBMC+PHA组比较,^b $P<0.05$;与PBMC+PHA组比较,^c $P<0.001$ 。

3 讨 论

RA是一种常见的自身免疫性炎症疾病,其病理基础是滑膜炎,并最终可能导致关节畸形而丧失关节正常的功能^[24]。据统计,全球约1%的人患有不同程度的RA^[25]。目前,RA没有彻

底治愈的药物,如果早期得不到及时治疗,将导致关节不可逆或永久性的破坏,给患者生活带来不便和痛苦。抗风湿药(如甲氨蝶呤)虽有一定疗效,但伴随多种不良反应^[29],故天然药物中寻找预防和治疗RA药物已成为医药界研究重点和热点。

RA归属于蒙医“协日乌素”病,燥“协日乌素”类似于现代医学中的抗炎消肿作用。根据蒙医燥“协日乌素”功效理论,药物和药浴治疗RA时,辨证选择具燥“协日乌素”功效的蒙药。其辨证施治原则,调三根、扶胃火,促进精化与糟粕的分解,燥“协日乌素”。黑沙蒿是在蒙古族民间习用治疗RA的蒙药材之一,具有燥“协日乌素”、清热、愈伤、生肌、消肿之功效^[30]。课题组前期研究中分析了黑沙蒿主要物质基础^[8-14],其主含成分有苯丙素、黄酮及小分子酚酸类。苯丙素具有良好的抗炎作用,既能抑制IL-1 β 、IL-6和TNF- α 等促炎因子的表达^[27-29],又能调节RA小鼠模型Th1/Th2淋巴细胞平衡^[30]。黄酮和小分子酚酸类化合物具有良好的抗炎和抗氧化作用,既能显著降低类风湿因子(rheumatoid factor, RF)、TNF- α 、IL-17及其他促炎因子的水平^[31],又能抑制氧化应激^[32]。综上所述,黑沙蒿充分具备治疗RA的可行性。前期活性筛选中也发现HSH对RA具有良好的治疗作用,但其抗RA的关键成分和作用机制尚未清楚。

为了明确HSH抗RA的核心成分和作用机制,本研究通过文献^[15-17]和前期研究^[8-14]中收集HSH化学成分,在BATMAN-TCM数据库中检索核心成分及其成分靶点。从DisGeNet、GeneCards、NCBI、OMIM和Pharm GKB数据库中获得的RA相关靶点与GEO数据库中得到的DEGs结合,筛选疾病靶点。通过对成分靶点和疾病靶点的Venn分析,获得HSH治疗RA的潜在靶点。对潜在靶点的PPI网络分析明确了3个核心成分抗RA的核心靶点,包括TNF、IL-6、IL-1 β 、IL-4和IL-17A。这些促炎细胞因子在RA的发病机制中起着关键作用,它们参与了关节炎症和骨破坏的过程。研究^[33-34]发现下调IL-17A,或者上调TGF- β 的表达可以抑制自身反应性T细胞的活化减轻RA的免疫失衡和炎症反应;还有研究发现RA患者外周血IL-6、IL-1 β 、IL-17、IL-21表达量随疾病活动程度增加而增加^[35]。本研究结果显示,HSH能显著降低细胞上清液中IL-6、TGF- β 1、IL-21、IL-2、IFN- γ 水平。

分子对接结果显示5个核心靶点与3个核心成分的结合能均大于4 kcal/mol,说明核心成分与核心靶点之间的结合良好。对羟基肉桂酸、邻羟基肉桂酸、 α -hydroxycapillene的结构类型属于苯丙素和酚酸类化合物,这些成分已被报道具有良好的抗炎和免疫调节作用^[27-28]。HSH的抗炎作用可能与其含有多个类核心成分的化学成分有关,如Ordosacid A、Ordosacid B、Ordosicin A、Ordosicin B、Arteordosin A、Arteordosin B等。苯丙素类化合物是课题组前期从黑沙蒿中分离得到的新天然产物,有必要对这些成分的抗RA作用给予更多关注,但我们的推测还需进一步实验验证。

GO分析结果表明,HSH可参与炎症反应及细胞因子产生和调节等多种生物过程,进而调控机体炎症和免疫反应发挥抗RA的作用。有研究^[36]显示,CD4+Th细胞产生的细胞因子可

导致持续性炎症,其中Th1和Th17分泌促炎因子,引起滑膜炎症,而Th2分泌抗炎因子,Treg则分泌免疫抑制因子,缓解RA炎症反应。研究^[37-38]发现调节Th1/Th2、Th17/Treg细胞平衡对改善RA造成的关节肿胀及关节滑膜炎性反应有重要意义。本研究结果显示,HSH能明显降低Th1和Th17/Treg的水平,显著升高Treg的水平。这一结果说明HSH可能通过调节Th17/Treg平衡,减轻RA的炎症反应。

KEGG分析结果显示,IL-17信号通路和T细胞受体信号通路在HSH抗RA过程中起着重要作用。研究表明Th17/Treg细胞的免疫失衡在RA的发病机制中起着关键作用^[39]。ROR γ t是Th17细胞分化的关键转录因子,而Foxp3是Treg细胞的特异性标记^[40]。ROR γ t表达增多能促进Th17细胞分化和IL-17的分泌,促进RA炎症级联反应的发生与发展^[41-43]。Foxp3可促进IL-10、TGF- β 等抑制性细胞因子分泌,具有抗炎和对免疫负性调节功能^[44]。另外,ROR γ t/Foxp3比例能决定初始T细胞受抗原刺激后向Th17或Treg方向分化,从根本上影响Th17/Treg的平衡^[45]。本研究结果显示,HSH能显著下降细胞中ROR γ t mRNA的表达,而Foxp3 mRNA的表达升高,差异无统计学意义($P>0.05$)。因此,本研究认为HSH可能通过调节ROR γ t/Foxp3的比例对RA起到治疗作用。

总之,HSH可能通过降低Th1,升高Treg,调节Th17/Treg的平衡,抑制炎症因子,调节ROR γ t/Foxp3的比例,抑制RA进展。

参考文献

- [1] VAN RAEMDONCK K, UMAR S, PALASIEWICZ K, et al. Interleukin-34 reprograms glycolytic and osteoclastic rheumatoid arthritis macrophages via syndecan 1 and macrophage colony-stimulating factor receptor[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2021, 73(11):2003-2014.
- [2] 余琪婷,余琪祥.类风湿性关节炎治疗的研究进展[J].临床医学进展,2024,14(7):79-83.
- [3] 刘志刚.蒙医药辨证治疗类风湿性关节炎的临床疗效[J].中国民族医药杂志,2019,25(10):10-11.
- [4] 亚男,包哈申.论《医经八支》中记载的“协日乌素”病的治疗[J].中国蒙医药,2018(10):45-49.
- [5] 刘青海.蒙医治疗类风湿性关节炎63例疗效观察[J].世界最新医学信息文摘,2018,18(12):148,150.
- [6] 乌兴荣.蒙医辨证治疗类风湿性关节炎的临床疗效[J].中国民族医药杂志,2019,25(8):11-12.
- [7] 乌兰,特木其乐,玉兰,等.蒙药治疗膝关节骨性关节炎疗效分析[J].内蒙古医学杂志,2011,43(6):654-655.
- [8] 郝俊生,王青虎,巴森吉日嘎拉,等.黑沙蒿化学成分研究[J].中国药学杂志,2019,54(11):863-866.
- [9] WU G-H, WANG Q-H, HE X, et al. Structural elucidation of two new compounds from *Artemisia ordosica* and their antioxidative activity[J]. *Z Für Naturforschung B*, 2019, 74(10):699-702.
- [10] TONG Q, WANG Q, PA B, et al. Two new compounds from *Artemisia ordosica krasch*[J]. *Nat Prod Res*, 2020,

- 34(21):3061–3065.
- [11] BAO W, WANG Q H, HAO J S. Structural elucidation of a coumarin with new skeleton from *Artemisia ordosica*[J]. *RecNat Prod*, 2019, 13(5):413–417.
- [12] WANG Q H, PA B, GONG J H, et al. Phenylpropanoids, flavonoids, and terpenoids from *Artemisia ordosica krasch*[J]. *Magn Reson Chem*, 2019, 57(6):326–330.
- [13] WANG Q H, HAO J S, GONG J H, et al. Isolation and structure elucidation of two new compounds from *Artemisia Ordosica Krasch*[J]. *Nat Prod Res*, 2020, 34(13): 1862–1867.
- [14] KANG X R, WANG Q H, AO S, et al. HPLC analysis of 16 compounds from *Artemisia ordosica*[J]. *Chin Herb Med*, 2023, 15(2):337–342.
- [15] 赵东保,杨玉霞,张卫,等.黑沙蒿黄酮类化学成分研究[J].中国中药杂志,2005,30(18):1430–1432.
- [16] 张卫,赵东保,李明静,等.黑沙蒿黄酮类化学成分研究Ⅱ[J].中国中药杂志,2006,31(23):1959–1961.
- [17] ZHAO D B, JIANG Y F, XI C J, et al. Isolation and identification of capillarin from *Artemisia ordosica kraschen*[J]. *Jiegou Huaxue*, 2005, 24(6).
- [18] 郭子奕,杨扬,何忠梅,等.基于网络药理学的鹿茸治疗骨关节炎作用的机制[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(4): 194–204.
- [19] 李方舟,郗雪艳,杜伯雨,等.基于GEO数据库筛选阿尔茨海默病的关键基因[J].现代医药卫生,2023,39(17):2893–2898,2904.
- [20] 肖立康,董永辉,郑稼.激素性股骨头坏死的关键基因筛选及发病机制探索:基于生物信息学分析[J].中华骨与关节外科杂志,2023(10):897–906.
- [21] 隋银海,郝磊,霍志鹏,等.九味化斑丸化学成分及其治疗银屑病的作用机制分析[J].海南医学院学报,2023,29(14): 1082–1092.
- [22] DAWOD B, LIU J H, GEBREMESKEL S, et al. Myeloid-derived suppressor cell depletion therapy targets IL-17A-expressing mammary carcinomas[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):13343.
- [23] JOULIA R, GUERRERO-FONSECA I M, GIRBL T, et al. Neutrophil breaching of the blood vessel pericyte layer during diapedesis requires mast cell -derived IL-17A[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1):7029.
- [24] 吴梦娟,聂安政,朱春胜,等.秦皮水煎液干预类风湿性关节炎的作用研究[J].中医药信息,2024,41(6):9–12.
- [25] KOROL I, BAUMEISTER R H. Treating rheumatoid arthritis[J]. *Jaapa*, 2023, 36(9):1–5.
- [26] Lehmann J, Kyburz D. Rheumatoid arthritis[J]. *Ther Umsch*, 2023, 80(1):27–33.
- [27] LIAO Y, LIN X, LI J C, et al. Nodakenin alleviates renal ischaemia–reperfusion injury via inhibiting reactive oxygen species-induced NLRP3 inflammasome activation[J]. *Nephrology (Carlton)*, 2021, 26(1):78–87.
- [28] ZHOU Y, WANG J, YANG W D, et al. Bergapten prevents lipopolysaccharide –induced inflammation in RAW264.7 cells through suppressing JAK/STAT activation and ROS production and increases the survival rate of mice after LPS challenge[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 48:159–168.
- [29] PERRI M R, PELLEGRINO M, AQUARO S, et al. Cachrys spp. from southern Italy: Phytochemical characterization and JAK/STAT signaling pathway inhibition[J]. *Plants (Basel)*, 2022, 11(21):2913.
- [30] 张引红,李美宁,王春芳,等.补骨脂素对类风湿性关节炎小鼠模型的免疫调节作用[J].中国实验动物学报,2017, 25(2):207–210.
- [31] SHAABAN H H, HOZAYEN W G, KHALIEFA A K, et al. Diosmin and trolox have anti–arthritic, anti–inflammatory and antioxidant potencies in complete Freund’s adjuvant –induced arthritic male wistar rats: Roles of NF–κB, iNOS, Nrf2 and MMPs[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(9):1721.
- [32] MEI Z G, DU L P, LIU X L, et al. Diosmetin alleviated cerebral ischemia/reperfusion injury in vivo and in vitro by inhibiting oxidative stress via the SIRT1/Nrf2 signaling pathway[J]. *Food Funct*, 2022, 13(1):198–212.
- [33] CHINEN T, KANNAN A K, LEVINE A G, et al. An essential role for the IL–2 receptor in Treg cell function[J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(11):1322–1333.
- [34] ZHANG X M, OLSEN N, ZHENG S G. The progress and prospect of regulatory T cells in autoimmune diseases[J]. *J Autoimmun*, 2020, 111:102461.
- [35] 李鑫,蔡雄,刘良.Th17细胞在类风湿关节炎发病机制中的作用研究进展[J].中国药理学通报,2020,36(3):309–312.
- [36] 邱安琪,彭新国.细胞因子在类风湿关节炎发病机制中的研究进展[J].检验医学与临床,2023,20(6):830–834.
- [37] 王金凤,黄海量,刘杰,等.中药调控Th17/Treg平衡治疗类风湿关节炎的研究现状[J].中国药房,2023,34(6):763–768.
- [38] JIN S W, CHEN H J, LI Y S, et al. Maresin 1 improves the Treg/Th17 imbalance in rheumatoid arthritis through miR-21[J]. *Ann Rheum Dis*, 2018, 77(11):1644–1652.
- [39] HARRINGTON L E, MANGAN P R, WEAVER C T. Expanding the effector CD4 T –cell repertoire: The Th17 lineage[J]. *Curr Opin Immunol*, 2006, 18(3):349–356.
- [40] 蒋宇,汤郁,陈頣,等.类风湿关节炎患者CD4⁺CD25⁺CD127–调节性T细胞CXCR4的研究[J].(下转第52页)

- 效及安全性分析[J].浙江中医药大学学报,2022,46(6):677-685.
- [12] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. Cell,2012,149(5):1060-1072.
- [13] HUANG G Q, CAI Y W, REN M H, et al. Salidroside sensitizes Triple-negative breast cancer to ferroptosis by SCD1-mediated lipogenesis and NCOA4-mediated ferritinophagy[J]. J Adv Res,2024:S2090-S1232.
- [14] YE S Y, HU X Y, SUN S W, et al. Oridonin promotes RSL3-induced ferroptosis in breast cancer cells by regulating the oxidative stress signaling pathway JNK/Nrf2/HO-1[J]. Eur J Pharmacol,2024,974:176620.
- [15] ZHOU T J, ZHANG M M, LIU D M, et al. Glutathione depletion and dihydroorotate dehydrogenase inhibition actuated ferroptosis-augment to surmount triple-negative breast cancer[J]. Biomaterials,2024,305:122447.
- [16] LEI M, ZHANG Y L, HUANG F Y, et al. Gankyrin inhibits ferroptosis through the p53/SLC7A11/GPX4 axis in triple-negative breast cancer cells[J]. Sci Rep,2023,13:21916.
- [17] JI H, MA W, ZHENG A Y, et al. The role and molecular mechanism of Trametes Robiniophila Murr (Huaier) in tumor therapy[J]. J Ethnopharmacol,2024,334:118578.
- [18] 李丽品,马素艳,安入征.槐耳多糖调节SPHK1/S1P/S1PR3信号通路对宫颈癌细胞恶性生物学行为的影响[J].河北医学,2024,30(3):411-416.
- [19] 雷蕾,高彦茹,蔡洲,等.槐耳多糖通过抑制AKT/GSK3β/Snail信号通路抑制胰腺癌细胞增殖和上皮间质转化[J].现代肿瘤医学,2023,31(24):4536-4541.
- [20] YANG L, SONG Z, WANG X, et al. Huaier extract enhances the treatment efficacy of paclitaxel in breast cancer cells via the NF-κB/IκBα pathway[J]. Oncol Rep,2017,38(6):3455-3464.
- [21] HU B, YAN W, WANG M, et al. Huaier polysaccharide inhibits the stem-like characteristics of ERα-36high triple negative breast cancer cells via inactivation of the ERα-36 signaling pathway[J]. Int J Biol Sci,2019,15(7):1358-1367.
- [22] DING Y, CHEN X, LIU C, et al. Identification of a small molecule as inducer of ferroptosis and apoptosis through ubiquitination of GPX4 in triple negative breast cancer cells[J]. J Hematol Oncol,2021,14(1):19.
- [23] ZHOU Q, MENG Y, LI D, et al. Ferroptosis in cancer: From molecular mechanisms to therapeutic strategies[J]. Signal Transduct Target Ther,2024,9(1):55.
- [24] SUN Y, REN Y, SONG L Y, et al. Targeting iron-metabolism: A potential therapeutic strategy for pulmonary fibrosis[J]. Biomed Pharmacother,2024,172:116270.
- [25] LEI G, ZHUANG L, GAN B Y. The roles of ferroptosis in cancer: Tumor suppression, tumor microenvironment, and therapeutic interventions[J]. Cancer Cell,2024,42(4):513-534.
- [26] XU X, XU X D, MA M Q, et al. The mechanisms of ferroptosis and its role in atherosclerosis[J]. Biomed Pharmacother,2024,171:116112.
- [27] WEN Y Y, LI K M, NI M N, et al. Dendritic polylysine with paclitaxel and triptolide codelivery for enhanced cancer ferroptosis through the accumulation of ROS[J]. ACS Appl Mater Interfaces,2024,16(16):14.
- [28] ZHANG H, PAN J N, HUANG S Y, et al. Hydrogen sulfide protects cardiomyocytes from doxorubicin-induced ferroptosis through the SLC7A11/GSH/GPx4 pathway by Keap1 S-sulfhydration and Nrf2 activation[J]. Redox Biol,2024,70:103066.
- [29] ZHANG W, LIU Y, LIAO Y, et al. GPX4, ferroptosis, and diseases[J]. Biomed Pharmacother,2024,174:116512.
- [30] 张超男,李洪霖,刘素彤,等.虎七散诱导食管癌EC9706细胞线粒体凋亡和铁死亡的研究[J].中医药理与临床,2024,40(8):19-28.
- [31] QIN X, CHEN X, WANG F, et al. Huaier inhibits autophagy and promotes apoptosis in T-cell acute lymphoblastic leukemia by down-regulating SIRT1[J]. Heliyon,2024,10(17):e37313.

(收稿日期:2024-12-17 编辑:罗英姣)

(上接第40页)南京医科大学学报(自然科学版),2023,43(4):459-467.

- [41] BETTELLI E, OUKKA M, KUCHROO V K. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity[J]. Nat Immunol,2007,8(4):345-350.
- [42] VELDHOEN M, HOCKING R J, ATKINS C J, et al. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells[J]. Immunity,2006,24(2):179-189.
- [43] 程浩,李雪飞,赵文鹏,等.ROR α 和ROR γ 特性和介导Th17

细胞分化研究新进展[J/OL].中华临床医师杂志(电子版),2015,9(8):1413-1417.

- [44] 赵启航,梁瑞,李丹,等.Foxp3+调节性T细胞分化发育及其功能稳定性研究进展[J].南京医科大学学报(自然科学版),2017,37(1):1-9,80.
- [45] 韩玉生,李东东,侯志涛,等.丹溪痛风胶囊对胶原诱导性关节炎大鼠ROR γ 和Foxp3蛋白表达的影响[J].实用医药杂志,2018,35(9):818-820.

(收稿日期:2024-12-27 编辑:刘国华)