

## 基于代谢组学和网络药理学探讨薏苡附子散治疗类风湿性关节炎的作用机制

张芳芳, 李晓凯, 李 雪, 王玉玉, 武君珂, 王玉明\*, 李遇伯\*

(天津中医药大学中药学院, 天津 301617)

**摘要:** 本研究采用代谢组学和网络药理学相结合的方法研究薏苡附子散 (Yiyi Fuzi powder, YFZ) 对类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 大鼠的药效物质及作用机制。动物实验过程均遵循天津中医药大学实验动物伦理委员会要求 (批准号: TCM-LAEC2021241)。采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术进行代谢组学分析发现花生四烯酸、色氨酸、亚油酸、苯丙氨酸等 22 个代谢物为 YFZ 治疗 RA 的生物标志物, 并在 YFZ 治疗后显著回调。同时对 YFZ 入血成分分析发现次乌头碱、苯甲酰次乌头碱、脱氧乌头碱等 11 个入血成分可能是 YFZ 体内直接发挥药效的成分, 进一步将入血成分进行网络药理学分析获得 YFZ 可能通过作用于 PI3K/Akt 信号通路、雌激素信号通路、血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 信号通路表现出抗炎作用。本研究结果为 YFZ 的临床应用提供了借鉴。

**关键词:** 类风湿性关节炎; 薏苡附子散; 代谢组学; 网络药理学; 作用机制

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)07-1802-10

## Study on the mechanism of Yiyi Fuzi powder in the treatment of rheumatoid arthritis based on metabolomics and network pharmacology

ZHANG Fang-fang, LI Xiao-kai, LI Xue, WANG Yu-yu, WU Jun-ke, WANG Yu-ming\*, LI Yu-bo\*

(School of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)

**Abstract:** In this study, a combination of metabolomics and network pharmacology was used to study the pharmacodynamic substances and mechanism of action of Yiyi Fuzi powder (YFZ) on rheumatoid arthritis (RA) rats. The animal experiments were conducted in accordance with the requirements of the Experimental Animal Ethics Committee of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (approval number: TCM-LAEC2021241). The metabolomic analysis using UPLC-Q-TOF/MS technique identified 22 metabolites, including arachidonic acid, tryptophan, linoleic acid, phenylalanine, as significant biomarkers for the treatment of RA with YFZ, and they were significantly regressed after YFZ treatment. The analysis of YFZ blood components also revealed that 11 blood components, including hypaconitine, benzoylhypaconitine, and deoxyaconitine, may be the components that exert direct pharmacological effects in YFZ *in vivo*, and further network pharmacological analysis of blood components obtained that YFZ may exhibit anti-inflammatory effects through acting on PI3K/Akt signaling pathway, estrogen signaling pathway, vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway. The results of this study provide implications for the clinical application of YFZ.

**Key words:** rheumatoid arthritis; Yiyi Fuzi powder; metabolomics; network pharmacology; mechanism

收稿日期: 2022-10-30; 修回日期: 2023-03-10.

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (81903938); 国家中医药管理局青年岐黄学者支持项目.

\*通讯作者 Tel: 86-22-59591974, E-mail: wangyuming226@163.com; yaowufenzi001@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1146

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 通过侵入纤维血管组织导致软骨和骨侵蚀, 主要表现为肿胀、疼痛以及进行性骨损伤<sup>[1,2]</sup>。现有的统计分析表明, RA 不仅是一个医学特征, 而且是一个公共卫生问题。在国外, 关节炎是导致行动功能丧失的一个重要原因, 患病率为 1%<sup>[3]</sup>。在国内, 患病率约为 0.37%<sup>[4]</sup>。目前非甾体类抗炎药、糖皮质激素或生物制剂是主要的抗风湿药物。但是易感染和高昂的成本以及对各种脏器伴有的不良反应限制了处方制剂的应用, 所以选择合适的治疗方法尤为重要。

薏苡附子散 (Yiyi Fuzi powder, YYFZ) 出自《金匱要略》, 由薏苡仁和附子两味中药组成。方中薏苡仁利水渗湿, 附子温阳散寒。两药合用, 可温阳除湿, 通痹散寒。已有研究表明, 薏苡仁通过抑制促炎因子和氧化应激来抑制炎症反应<sup>[5,6]</sup>。附子通过作用于 RA 关键靶点和代谢通路抑制炎症反应<sup>[7]</sup>, 并且附子生物碱通过抑制 RA 中核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路的激活来抑制炎症介质的表达和合成<sup>[8]</sup>。然而目前尚不清楚两者合用对胶原诱导的关节炎 (CIA) 大鼠的作用机制。

代谢组学和网络药理学是阐明复方潜在机制的有效工具<sup>[9]</sup>。代谢组学被定义为在各种刺激的作用下和某些生理因素改变的条件下, 检测生物体的整体代谢变化及规律<sup>[10]</sup>。而网络药理学对中药复方治疗疾病的作用机制提供了新的研究思路<sup>[11]</sup>, 通过构建“药物-成分-靶点-通路”的虚拟筛选和分析, 可以快速获得 YYFZ 治疗疾病的关键靶点及代谢通路。本研究首先建立 CIA 大鼠模型评估其药效作用, 并对血浆样本进行代谢组学分析, 揭示潜在生物标志物及代谢通路; 其次, 通过对 YYFZ 体内成分分析获得直接作用于生物体的活性成分, 并利用网络药理学对其进行作用靶点及通路预测, 为深入研究 YYFZ 治疗 RA 的物质基础及作用机制提供支持。

## 材料与方 法

**药品和试剂** 薏苡仁 (湖南药圣堂中药科技有限公司, 批号: A190502)、附子 (河北美威药业有限公司, 批号: 1801068-16), 经天津中医药大学李天祥教授鉴定薏苡仁为禾本科植物薏米 *Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* (Roman.) Stapf. 的干燥成熟种仁, 附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的子根的加工品, 所有饮片均符合 2020 版《中华人民共和国药典》规定。弗氏不完全佐剂、牛二型胶原 (批号分别为 210144 和 210112) 均购自美国 Sigma 公司; 大鼠 IL-1 $\beta$

试剂盒、大鼠 IL-6 试剂盒、大鼠 TNF- $\alpha$  试剂盒 (批号分别为 TY20220328、TY20220512、TY20220415) 均购自天津伊特生命科学研究有限公司。甲氨蝶呤片 (上海上药信谊药厂有限公司, 批号: H31020644); 戊巴比妥钠 (上海麦克林生化科技有限公司, 批号: C12330784); 大鼠 RF 试剂盒 (四川省维克奇生物科技有限公司, 批号: WKQ22090502)。

**仪器** Waters Acquity UPLC 液相色谱仪, Waters Xevo G2 Q-TOF/MS 质谱仪, UPLC BEH C18 色谱柱 (2.1 mm  $\times$  100 mm, 1.7  $\mu$ m), 美国 Waters 公司; ALLLEGRATM-64R 高速冷冻离心机, 美国 Beckman 公司; TecanInfiniteF50 酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; 足趾容积测量仪, 安徽正华生物仪器设备有限公司; 数显游标卡尺, 金华市世匠工具有限公司。

**实验动物** 清洁级 6 周龄 (180~200 g) 雄性 Wistar 大鼠购于北京华阜康生物科技股份有限公司 [合格证号: SCXK (京) 2019-0008], 本研究经天津中医药大学动物伦理委员会批准 (批准号: TCM-LAEC2021241)。

**样品的制备** 精密称取薏苡仁、附子, 按照 5:3 的比例<sup>[12]</sup>混合, 置于圆底烧瓶, 加入 10 倍量水浸泡 45 min, 回流提取 1 h, 趁热过滤; 药渣加 8 倍量水回流 45 min, 趁热过滤, 合并滤液, 浓缩至黏稠浸膏 (以生药计, 浓度为 1 g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>), 保存在 4  $^{\circ}$ C 冰箱。阳性药的制备: 取一定质量的甲氨蝶呤片, 置于离心管内加水溶解并超声 10 min, 最终配制成浓度为 1 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup> 的药液。牛 II 型胶原乳剂 (C II) 的制备: 将弗氏不完全佐剂与酸性牛 II 型胶原溶液 1:1 混合均匀, 直至形成稳定的乳剂体系。

**动物实验** 经过一周的适应后, 随机取 10 只大鼠作为空白组, 剩余大鼠在足趾注射 0.2 mL 的 C II 造模, 进行初次免疫, 造模当天记为实验第 0 天。第 7 天在大鼠足趾相同位置注射 0.1 mL C II, 进行第二次免疫; 空白组 (control group, NS) 大鼠注射等量的生理盐水。之后将大鼠分为模型组 (model)、甲氨蝶呤组 (methotrexate group, MTX)、薏苡附子散高 (YYFZ high dose group, YYFZ-H)、中 (YYFZ medium dose group, YYFZ-M)、低 (YYFZ low dose group, YYFZ-L) 剂量组, 每组 10 只。第二次免疫后第 2 天开始给药干预。MTX 组灌胃剂量 1 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>, 每周给药 2 次, 剩余 5 天灌胃等体积蒸馏水; YYFZ-H、YYFZ-M、YYFZ-L 组分别灌胃给予 YYFZ 水煎液 5.30、2.65 和 1.33 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup>, 空白组和模型组给予等量生理盐水。在初次免疫后的第 45 天采用 1.5% 戊巴比妥钠麻醉后腹主动脉取血, 静置 30 min 后将血浆样品在 4  $^{\circ}$ C, 3 500 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 的条件下离心 10 min, 吸取上清液冻存于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱中, 以备后续代谢组学

及生化指标分析。并在采血后取大鼠的双侧踝关节,置于4%中性福尔马林固定液中进行病理切片分析。

**指标观察与检测** 用电子数显游标卡尺、足趾容积测量仪测量大鼠造模前的足趾宽度和足趾容积,造模后第1、3、7天各测量一次;第7天起每隔3天测量一次足趾宽度与足趾容积直至取材。每个足趾平行测量3次取平均值。

**代谢组学分析** 将冻存的血浆样本室温解冻,以血浆:乙腈(1:3)的比例涡旋混匀,以4℃,13 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min,吸取上清液进行UPLC-Q-TOF/MS分析。取每组血浆样本(约50 μL),按照上述操作制备质量控制样本(quality control, QC),其包含所有样品的生物学信息<sup>[13]</sup>。

**色谱条件** Waters ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm),柱温为45℃,进样量5 μL,流速为0.3 mL·min<sup>-1</sup>。流动相为0.1%甲酸水(A)和0.1%甲酸乙腈(B)。梯度洗脱条件:0~0.5 min, 1% B; 0.5~2 min, 1%~50% B; 2~9 min, 50%~99% B; 9~10 min, 99% B; 10~11 min, 99%~1% B; 11~13 min, 1% B。

**质谱条件** 电喷雾电离源(ESI源),在正离子模式下进行分析,设置分子量扫描范围 $m/z$  50~1 000;毛细管电压3.0 kV;干燥气温度325℃;干燥气体流速10 mL·min<sup>-1</sup>;离子源温度120℃;去簇电压为60 V/-60 V;碰撞能量为35/-35 eV。

**数据处理** 将原始数据经过Masslynx 4.1软件(美国Waters公司)导出,经过80%修约后导入Simca-P软件(瑞典Umetrics公司)进行多元统计分析,分别建立主成分分析(principal component analysis, PCA)和偏最小二乘判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA),筛选得到可变重要性(VIP) > 1和 $t$ 检验( $P < 0.05$ )的数据作为生物标志物,并将生物标志物与HMDB数据库(<http://www.hmdb.ca>)及文献信息进行匹配确定。此外,通过热图及受试者工作特征曲线(ROC)分析标志物的变化趋势。最后通过MetaboAnalyst(<https://www.metaboanalyst.ca/>)<sup>[14]</sup>数据库对已鉴定的生物标志物进行代谢通路分析。

**统计学分析** 数据采用SPSS软件进行单因素方差分析,所有数值均以means ± SD表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

**YYFZ入血成分分析** 将6只大鼠随机分为空白组和给药组,每组3只。给药组每天以2.65 g·kg<sup>-1</sup>的剂量灌胃YYFZ水煎液,空白组灌胃等量生理盐水,给药5天。最后一次给药1 h后,使用1.5%戊巴比妥钠麻醉大鼠后腹主动脉收集血液,静置30 min后,将血样在

4℃,3 500 r·min<sup>-1</sup>条件下离心10 min,吸取上清液,贮存于-80℃冰箱,备用。

**色谱条件** 色谱柱为Waters ACQUITY UPLC BEH C18(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm);流速为0.3 mL·min<sup>-1</sup>;进样量为10 μL;流动相为0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈溶液(B),梯度洗脱条件为0~1 min, 1% B; 1~2 min, 1%~5% B; 2~5 min, 5%~15% B; 5~10 min, 15%~30% B; 10~15 min, 30%~50% B; 15~20 min, 50%~70% B; 20~24 min, 70%~99% B; 24~25 min, 99%~1% B。

**质谱条件** 采用ESI源,在正离子模式下分析,质谱扫描范围 $m/z$  50~1 000;毛细管电压3.0 kV;干燥气体流速10 mL·min<sup>-1</sup>;离子源温度120℃;脱溶剂气体温度350℃;锥孔气流速50 L·h<sup>-1</sup>,扫描范围50~2 000。

**YYFZ入血成分及靶点筛选** 基于对YYFZ入血成分的研究,将鉴定出的入血成分信息在TCMSP数据库(<https://tcmospw.com/tcmosp.php>)检索相关靶点信息,上传至PharmaMappe(<http://lilab-ecust.cn/pharmmapper/index.html>)及SwissTargetPrediction数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)预测各成分靶点,经Uniprot数据库<sup>[15]</sup>转换为Gene name后去重。

**RA相关靶点筛选** 以“rheumatoid arthritis”为检索词检索疾病靶点。通过Genecards(<http://www.genecards.org/>)、TTD(<http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/>)<sup>[16]</sup>、OMIM(<https://omim.org/>)<sup>[17]</sup>数据库互相补充,合并去重。将入血成分靶点与RA疾病靶点筛选交集靶点,即为YYFZ治疗RA的潜在靶点。

**“入血成分-靶点-通路”网络图的构建** 将YYFZ治疗RA靶点导入STRING数据库(<https://string-db.org/>)<sup>[18]</sup>获得靶点相互作用的蛋白相互作用(PPI)网络图,并将结果导入Cytoscape 3.8.3<sup>[19]</sup>构建拓扑网络,利用cytohubba功能对网络进行分析,计算节点自由度(degree)、接近中心性(betweenness)。为进一步探讨其生物学意义,使用DAVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)<sup>[20]</sup>进行GO(Gene Ontology)功能和KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)通路富集分析,获得生物学过程及潜在信号通路。

## 结果

### 1 YYFZ对RA大鼠的治疗作用

为研究YYFZ的药效作用,本研究测定了大鼠体重、足趾容积及足趾宽度变化趋势。结果如图1所示,与空白组相比,模型组大鼠体重增长缓慢,足趾容积及足趾宽度在C II处理后显著升高,说明大鼠造模效果较好。给药后MTX组及YYFZ各剂量组体重显著增

加 ( $P < 0.05$ ), 足趾容积及足趾宽度显著下降 ( $P < 0.05$ ), 并且模型组大鼠足趾容积在 5 周左右达到高峰, YYFZ 各剂量组在 3 周左右达到高峰, 总体呈下降趋势。说明 YYFZ 对 RA 有潜在治疗作用。

## 2 生化分析

为研究 YYFZ 对 CIA 大鼠的抗炎作用, 本研究检测了血清中的 RF、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量, 结果如图 2 所示, 与空白组相比, 模型组 RF、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量有显著性的升高 ( $P < 0.05$ ), 而与模型组相比, YYFZ-H 和 MTX 组有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 其余各组也有回调趋势。提示 YYFZ 高剂量组可以起到显著的治疗作用。

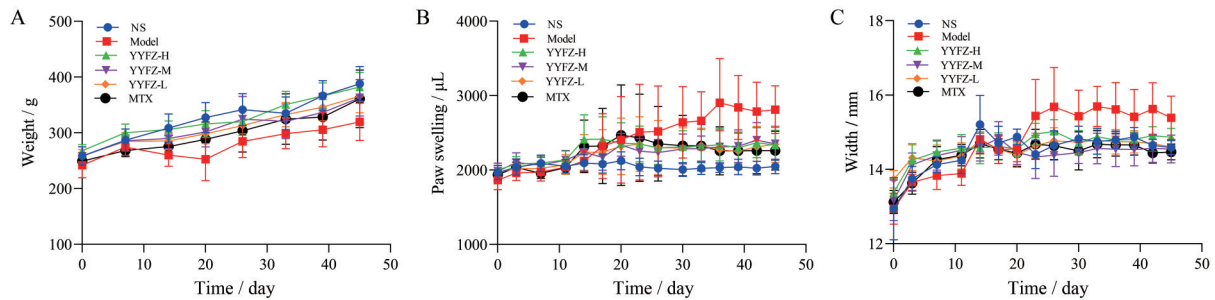
## 3 组织病理学评价

踝关节切片如图 3 所示, 空白组 (图 3A) 大鼠踝关节组织较为完整, 滑膜细胞排列规则, 多数为单层, 未

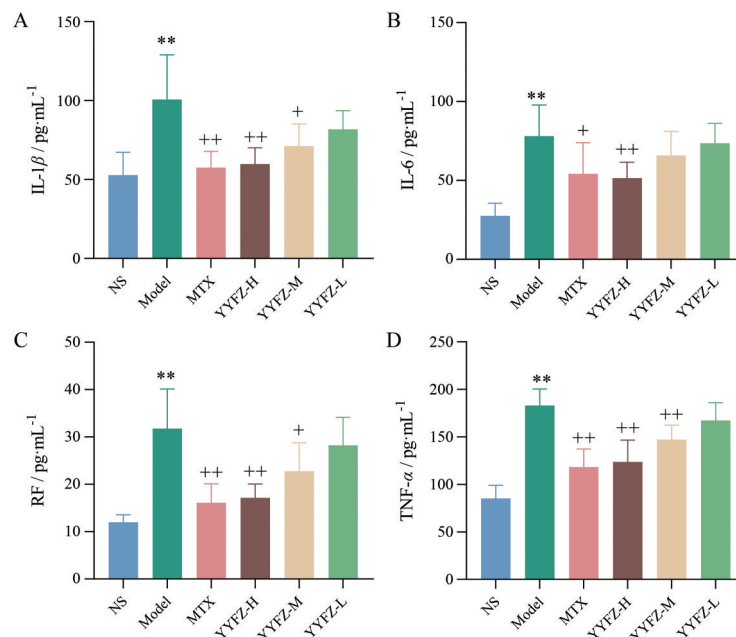
见炎症细胞浸润, 关节软骨表面平滑、完好。模型组 (图 3B) 大鼠的滑膜细胞出现了明显的异常增生 (黑色的箭头), 层数增多, 细胞的分布紊乱, 同时还伴随着炎症细胞的渗入, 在软骨中可以看到滑膜组织的渗透 (蓝色的箭头), 软骨表面出现了裂痕, 血管增生 (红色的箭头), 周围有炎症细胞浸润。MTX 组 (图 3C)、YYFZ-H (图 3D) 剂量组可以观察到滑膜细胞排列较为整齐, 存在轻度增生或无增生, 炎症细胞浸润较少; 而 YYFZ-M 组 (图 3E) 可见不同程度的关节滑膜炎症和血管新生的形态改变。YYFZ-L 组 (图 3F) 中有明显的滑膜组织异常增生, 并且入侵软骨, 伴有血管增生和炎症细胞浸润。

## 4 代谢组学的多元统计分析

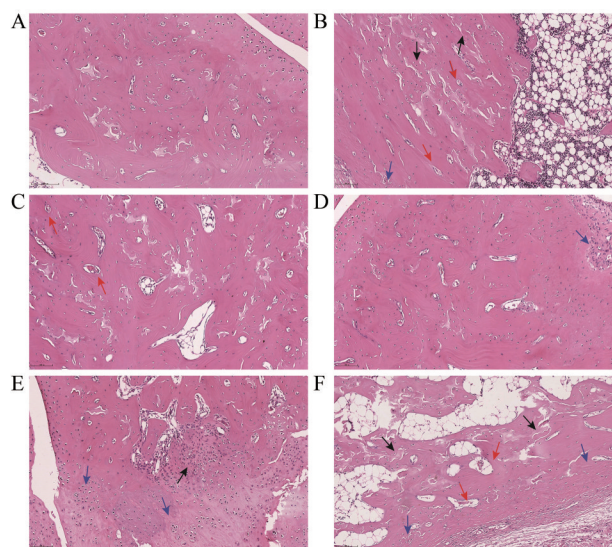
采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术对 QC 样品进行考察, 在正离子模式下得到总离子流色谱图 (图 4A), 其峰面积小于 15%, 则方法学考察结果可靠, 可以进行后续操



**Figure 1** The trend of changes in body weight (A), toe volume (B) and toe width (C).  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ . YYFZ: Yiyi Fuzi powder; NS: Control group; Model: Model group; MTX: Methotrexate group; YYFZ-H: YYFZ high dose group ( $5.30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ); YYFZ-M: YYFZ medium dose group ( $2.65 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ); YYFZ-L: YYFZ low dose group ( $1.33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )



**Figure 2** Changes in rat serum biochemical parameters. Effect of YYFZ on IL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B), RF (C), and TNF- $\alpha$  (D) of serum.  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$  vs control group; + $P < 0.05$ , ++ $P < 0.01$  vs model group; IL-1 $\beta$ : Interleukin-1 $\beta$ ; IL-6: Interleukin-6; RF: Rheumatoid factor; TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$



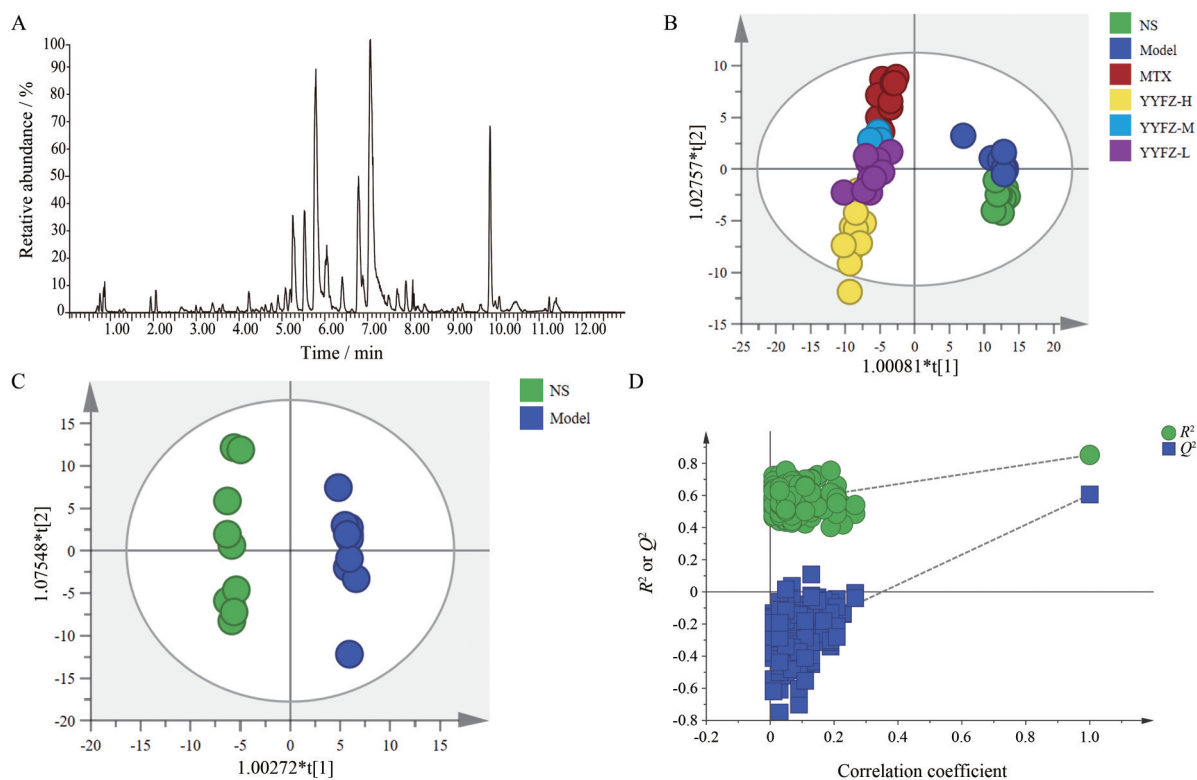
**Figure 3** Pathological section of rat ankle joint. NS group (A), Model group (B), MTX group (C), YYFZ-H group (D), YYFZ-M (E), and YYFZ-L group (F).  $\times 200$ . Red arrows indicate vascular proliferation, blue arrows indicate infiltration of synovial tissue, and black arrows indicate abnormal proliferation of synovial cells

作。PCA (图4B) 结果显示, 空白组和模型组、模型组和给药组的分布有一定趋向性。OPLS-DA 显示 (图4C), 空白组与模型组代谢轮廓显著分离, 并且交叉验

证结果 (图4D) 显示  $R^2X = 0.55$ ,  $Q^2Y = 0.33$ , 说明所建模型预测能力良好。根据 VIP 值结合  $t$  检验 ( $P < 0.05$ ), 并汇总文献和 HMDB 数据库信息确认潜在的生物标志物。结果血浆样本中共筛选出 22 个生物标志物, 具体信息见表 1, 其中肌酸酐、色氨酸、亚油酸、*D*-苯丙氨酸、鸟氨酸、左旋肉碱、溶血卵磷脂类、花生四烯酸等 15 个标志物的含量均显著上升;  $\alpha$ -酮戊二酸、棕榈酸、*DL*-2-羟基丁酸、十四烷二酸、苯丙酮酸等 7 个标志物含量显著下降。提示这 22 种生物标志物可能是 CIA 大鼠潜在生物标志物。而给予药物干预后, YYFZ 高剂量组有显著的回调趋势 ( $P < 0.05$ )。

为了更直观地观察标志物在各组中的变化, 采用分层聚类分析及 ROC 曲线图对 22 个生物标志物进行分析; 图 5 可见, 与空白组相比, 模型组血浆标志物含量出现显著性变化, 提示标志物有一定判别能力。并且通过 ROC 曲线分析, 曲线下面积分布在 0.93~0.74 (95% 置信区间), 说明 22 个标志物具有诊断能力。

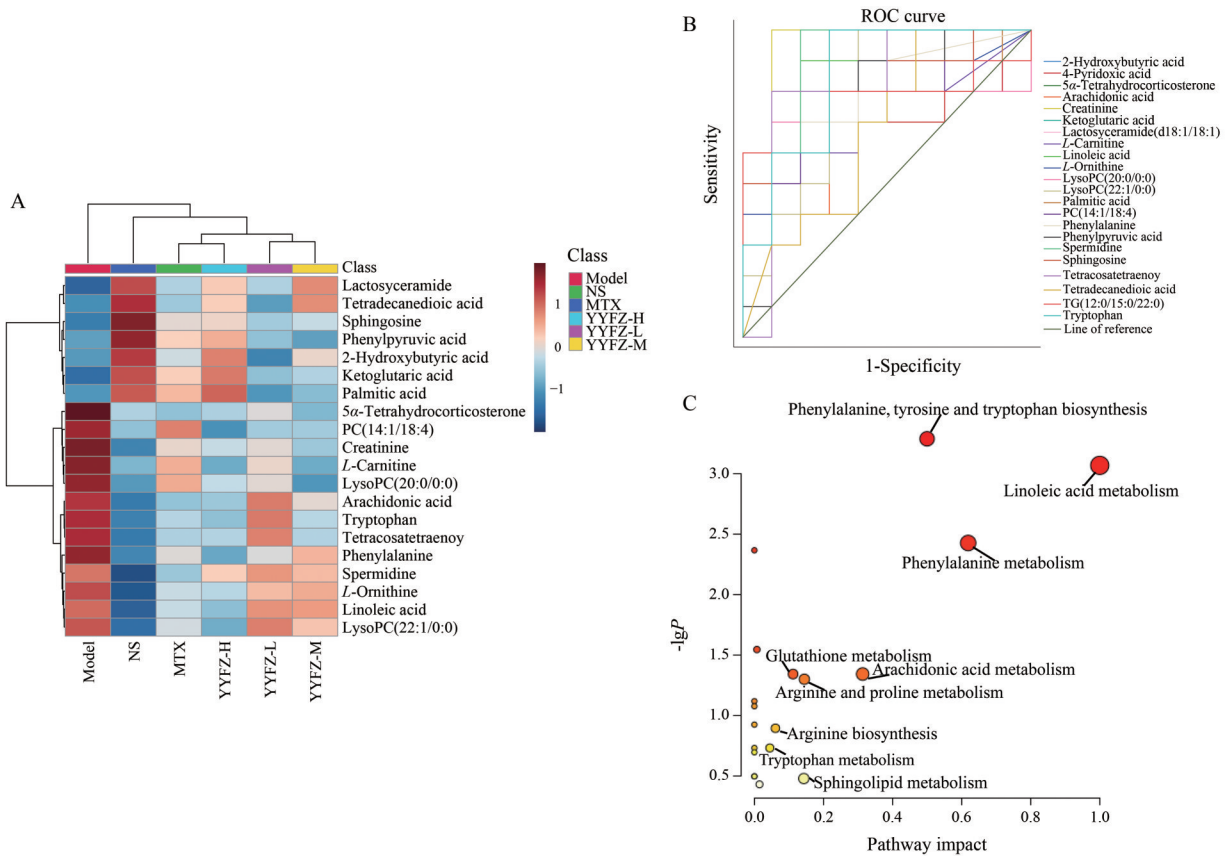
为进一步推测 RA 代谢紊乱机制, 将 22 个生物标志物进行代谢通路分析, 结果如图 5 所示, 其中苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成; 亚油酸代谢; 苯丙氨酸代谢以及花生四烯酸代谢是主要涉及的代谢通路, 提示脂质代谢和氨基酸代谢是 RA 需要关注的通路。



**Figure 4** Multivariate statistical analysis of plasma metabolites of rat samples. Base peak chromatogram (BPI) diagram of positive ion mode of quality control (QC) sample (A); PCA score plot of YYFZ group and MTX group (B); OPLS-DA score plot of the control group vs model group (C), model validation map (D)

**Table 1** YYFZ biomarker information. ↑ and ↓ represent higher and lower level; <sup>##</sup>*P* < 0.05 vs control group; <sup>\*\*</sup>*P* < 0.05, <sup>\*</sup>*P* < 0.01 vs model group

No.	<i>t<sub>R</sub></i> /min	Metabolite	Formula	Ion	Predicted	Measured	Error /×10 <sup>-6</sup>	Model	MTX	YYFZ- H	YYFZ- M	YYFZ- L
1	0.72	Creatinine	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	114.066 8	114.067 2	3.50	↑ <sup>##</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓ <sup>*</sup>
2	0.74	Spermidine	C <sub>7</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	146.163 5	146.163 3	-1.36	↑ <sup>##</sup>	↓ <sup>**</sup>	↓ <sup>**</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓
3	0.86	Tryptophan	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	[M+Na] <sup>+</sup>	227.079 6	227.079 1	-2.20	↑ <sup>##</sup>	↓ <sup>**</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓
4	1.00	Linoleic acid	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	281.248 4	281.249 2	2.84	↑ <sup>##</sup>	↓ <sup>**</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓	↓
5	1.76	Phenylalanine	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	166.082 7	166.083 4	4.21	↑ <sup>##</sup>	↓ <sup>**</sup>	↓ <sup>**</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓ <sup>*</sup>
6	8.08	Ketoglutaric acid	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	[M+K] <sup>+</sup>	184.981 3	184.982 4	5.94	↓ <sup>##</sup>	↑ <sup>*</sup>	↑ <sup>*</sup>	↑	↓
7	3.00	L-Ornithine	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	133.099 1	133.097 4	-12.77	↑ <sup>##</sup>	↓ <sup>**</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓	↓
8	5.02	Lactosylceramide(d18:1/18:2)	C <sub>48</sub> H <sub>89</sub> NO <sub>13</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	888.631 5	888.635 2	4.16	↓ <sup>##</sup>	↑ <sup>*</sup>	↑ <sup>*</sup>	↑	↑
9	7.37	L-Carnitine	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>	[M+Na] <sup>+</sup>	184.096 9	184.099 7	15.21	↑ <sup>##</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓ <sup>**</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓ <sup>*</sup>
10	4.92	TG (12:0/15:0/22:1)	C <sub>52</sub> H <sub>100</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	821.755 2	821.759 8	5.59	↑ <sup>##</sup>	↓ <sup>**</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓ <sup>*</sup>
11	8.07	LysoPC (20:0/0:0)	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub> NO <sub>7</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	552.403 8	552.402 9	-1.62	↑ <sup>##</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓ <sup>**</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓ <sup>*</sup>
12	8.09	LysoPC (22:1/0:0)	C <sub>30</sub> H <sub>60</sub> NO <sub>7</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	578.412 8	578.418 6	10.03	↑ <sup>##</sup>	↓ <sup>**</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓	↓
13	7.36	Palmitic acid	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	[M+Na] <sup>+</sup>	279.232 0	279.233 5	5.37	↓ <sup>##</sup>	↑ <sup>**</sup>	↑ <sup>*</sup>	↑	↓
14	4.61	Sphingosine	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	300.290 3	300.290 2	-0.33	↓ <sup>##</sup>	↑ <sup>**</sup>	↑ <sup>**</sup>	↑ <sup>*</sup>	↑
15	6.38	4-Pyridoxic acid	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	184.069 2	184.067 2	10.86	↑ <sup>##</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓	↓
16	7.72	5α-Tetrahydrocorticosterone	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	[M+K] <sup>+</sup>	389.208	389.209 4	3.60	↑ <sup>##</sup>	↓ <sup>**</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓
17	11.25	Tetracosatetraenoy	C <sub>31</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>4</sub>	[M+K] <sup>+</sup>	542.366 8	542.369 2	4.42	↑ <sup>##</sup>	↓ <sup>**</sup>	↓ <sup>**</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓
18	0.72	2-Hydroxybutyric acid	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	[M+Na] <sup>+</sup>	127.038 8	127.040 1	10.23	↓ <sup>##</sup>	↑ <sup>*</sup>	↑ <sup>*</sup>	↑ <sup>*</sup>	↓
19	5.52	PC (14:1/18:4)	C <sub>40</sub> H <sub>70</sub> NO <sub>8</sub> P	[M+K] <sup>+</sup>	762.446 9	762.447 8	1.18	↑ <sup>##</sup>	↓	↓ <sup>*</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓
20	6.02	Tetradecanedioic acid	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O	[M+K] <sup>+</sup>	297.146 8	297.151 2	14.81	↓ <sup>##</sup>	↑ <sup>**</sup>	↑ <sup>*</sup>	↑ <sup>*</sup>	↓
21	0.82	Phenylpyruvic acid	C <sub>7</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	165.055 2	165.056 7	9.09	↓ <sup>##</sup>	↑ <sup>**</sup>	↑ <sup>**</sup>	↑ <sup>*</sup>	↓
22	7.69	Arachidonic acid	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	[M+K] <sup>+</sup>	343.200 6	343.201 9	3.79	↑ <sup>##</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓

**Figure 5** Results of metabolomics analysis of RA rats. Hierarchical clustering heat map (A); Receiver Operating Characteristic Curve (ROC) analysis of YYFZ intervening with identification of serum biomarkers with RA in rats (B); Metabolic pathway analysis of biomarkers in serum (C)



述得到的共同靶点运用 DAVID 数据库进行 GO 富集分析和 KEGG 通路分析, 结果显示生物过程 (biological process, BP) 获得 276 条富集结果, 主要涉及凋亡过程的负调控、蛋白质磷酸化等过程。细胞组成 (cellular component, CC) 获得 41 条富集结果, 主要涉及胞质溶胶、细胞外泌体、细胞外区等; 分子功能 (molecular function, MF) 获得 75 条富集结果, 主要涉及酶结合、类固醇激素受体活性、药物结合等 (图 6)。KEGG 通路分析以  $P < 0.05$  为筛选条件选取前 20 个绘制气泡图, 结果显示 YYFZ 治疗 RA 主要涉及 PI3K-Akt 信号通路、雌激素信号通路、VEGF 信号通路等。

## 讨论

RA 是一种以对称性关节滑膜炎为特征, 由免疫、环境、遗传等多种因素参与的慢性全身性自身免疫疾病。本研究以 CIA 大鼠为研究对象, 在关节部位产生炎症。据报道, RF 的存在或缺失对 RA 具有重要意义, 且参与形成的复合物可能进一步导致炎症细胞 (如巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞) 的聚集, 导致组织损伤<sup>[21]</sup>。关节滑膜组织驻留着静止状态的滑膜细胞, 在炎症因子刺激下巨噬细胞被激活分化, 形成 M1 型和 M2 型巨噬细胞, 其中 M1 型巨噬细胞能够分泌多种炎症因子促使炎症细胞浸润, 导致血管形成以及骨与软骨破坏<sup>[22]</sup>, TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 等促炎因子均是在 M1 巨噬细胞作用下大量产生。本研究结合组织病理学也证实 YYFZ 能够显著降低炎症因子的含量, 并且改善滑膜组织增生和炎症细胞浸润。

通过对大鼠血浆样品进行代谢组学分析可知, YYFZ 治疗 RA 与脂质代谢及氨基酸代谢通路的紊乱有关。磷脂是生物膜结构主要构成分子, 在细胞层面辅助生物体功能。甘油磷脂是连接脂肪酸代谢和葡萄糖代谢的桥梁, 也是机体中含量最高的一类脂质。本研究检测到的脂肪酸主要为磷脂酰胆碱 (PC)、溶血磷脂酰胆碱 (LysoPC)、甘油三酯在模型组大鼠血浆中均有显著升高, 表明 CIA 大鼠影响了甘油磷脂代谢。当磷脂类成分紊乱时, 细胞膜功能也会受到影响, 造成组织生理状态功能异常。PC 和 LysoPC 在相关酶的催化下可以互相转换, 在磷酸酯酶的作用下磷脂会转变为亚油酸和花生四烯酸<sup>[23]</sup>。亚油酸还参与着机体胆固醇的代谢, 将小分子胆固醇转运至肝脏代谢成胆汁酸和类固醇激素, 若胆固醇代谢出现障碍, 体内胆固醇沉积, 导致甘油三酯乳化生成花生四烯酸<sup>[24]</sup>。本研究中甘油三酯含量下降, 因而胆固醇代谢受阻, 导致体内甘油三酯、花生四烯酸在体内沉积, 激活炎症通路。花生四烯酸是生物体内广泛分布的不饱和脂肪酸, 在病理

状态下花生四烯酸被分解成具有不同生物活性的衍生物, 参与机体炎症反应、细胞凋亡等生物过程<sup>[25]</sup>。前列腺素 (PGs) 由花生四烯酸经过环氧合酶 (COX) 通路代谢生成, 经过进一步代谢产生多种活性物质, 参与多种生物活动。PGs 可调控血管重塑与生成过程, 并能够控制血管张力, 影响 RA 的进程<sup>[26,27]</sup>。

氨基酸代谢途径紊乱与滑膜炎反应密切相关, 色氨酸可以对细胞的应激反应进行调节, 诱导 IL-6 的合成与释放<sup>[28]</sup>。本研究中色氨酸在 CIA 大鼠中的含量上升, 经 YYFZ 治疗后有明显的下调趋势, 表明 YYFZ 对色氨酸诱导的炎症因子的释放具有抑制作用。亚精胺是精氨酸通过鸟氨酸代谢途径产生的衍生物, 炎症的发展可影响多胺含量的发生<sup>[29]</sup>。亚精胺及其氧化物在 RA 患者的滑膜液、关节炎大鼠的血浆中表现出抗炎活性<sup>[30]</sup>。亚精胺还可通过增加抗炎性细胞因子 IL-10 的生成, 抑制促炎性细胞因子的表达, 从而保护巨噬细胞免受炎症损伤<sup>[31]</sup>。本研究中鸟氨酸含量在模型组大鼠显著升高, 同时促进精氨酸物质生成更多的亚精胺类物质, 这与模型组大鼠亚精胺类含量上升相一致。同时又会抑制促炎因子的释放对炎症进行负反馈调节。

通过对比空白血清和含药血清, 最终鉴定出 11 种入血成分。其中大部分为附子中的生物碱, 且多为低毒性的苯甲酰型生物碱, 有研究发现双酯型乌头碱与水解产物苯甲酰型生物碱具有相似的作用靶点, 因此推测二者具有相近的药理作用<sup>[32]</sup>。由于双酯型生物碱与蛋白亲和力更强因而表现出更强的药理活性, 但 Tong 等<sup>[33]</sup>将附子炮制脱毒后用于治疗碘乙酸单酯诱导骨关节炎模型大鼠, 发现脱毒附子对于关节损伤有一定改善作用, 且主要成分为无毒生物碱, 提示附子的水解产物对疾病存在治疗作用。

网络药理学与传统的单靶点作用模式相比, 更适合研究中药复方的复杂应用<sup>[34]</sup>。通过网络药理学预测发现, PI3K-AKT 信号通路、雌激素信号通路、VEGF 信号通路可能是 YYFZ 治疗 RA 的关键通路。RA 病变中, PI3K/AKT 信号转导途径的活化可诱导炎症因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ , 参与炎症反应, 参与滑膜炎、软骨破坏和骨侵蚀、血管翳的形成, 血管翳是 RA 进展过程中特征性病理产物<sup>[35]</sup>。雌激素等在 RA 中的含量与正常人相比有显著的差别, 激素水平的变化是判断 RA 病程的关键。激活雌激素受体可以调节 PI3K-Akt 信号通路和 ROS 信号通路, 从而促进细胞炎症和氧化损伤的发生<sup>[36]</sup>。另外, 雌激素还能直接或间接地抑制多种炎症因子、细胞因子和生长因子, 从而保护关节软骨<sup>[37]</sup>。VEGF 能够促进血管通透性, 使内皮细胞增殖

和迁移,产生趋化性和毛细血管高通透性,参与炎症的发展。同时血管翳包裹在关节软骨表面,导致关节液无法被软骨吸收,进而造成软骨和骨损伤<sup>[38]</sup>。

本研究通过整合代谢组学和网络药理学技术,从“多成分、多靶点”角度分析了YYFZ治疗RA的可能作用机制,发现YYFZ治疗RA的生物标志物主要集中在花生四烯酸代谢网络中。进一步的网络研究分析表明PI3K-AKT信号通路、雌激素信号通路、VEGF信号通路可能是YYFZ治疗RA的关键通路。结合文献信息,在VEGF信号通路中,VEGF与细胞膜表面受体结合后引起大量Ca<sup>2+</sup>内流,活化cPLA2,使大量花生四烯酸游离,引起代谢紊乱。以上研究结果为YYFZ临床应用提供了借鉴。

**作者贡献:** 张芳芳和李晓凯负责实验部分和文章撰写;李雪、王玉玉负责代谢组学实验;武君珂负责数据分析;王玉明和李遇伯指导并修改论文。

**利益冲突:** 本作者声明无利益冲突。

## References

- [1] Caplazi P, Baca M, Barck K, et al. Mouse models of rheumatoid arthritis [J]. *Vet Pathol*, 2015, 52: 819-826.
- [2] Zheng YT, Cao G, Wu X. Anti-rheumatoid arthritis efficacy and mechanism of Corni Fructus-Paeoniae Radix Alba herbal pair with wine before and after processing based on OPG/RANKL/RANK pathway [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2022, 53: 3084-3092.
- [3] Theis KA, Steinweg A, Helmick CG, et al. Which one? What kind? How many? Types, causes, and prevalence of disability among U.S. adults [J]. *Disabil Health J*, 2019, 12: 411-421.
- [4] Xiang YJ, Dai SM. Prevalence of rheumatic diseases and disability in China [J]. *Rheumatol Int*, 2009, 29: 481-490.
- [5] Zhang C, Zhang W, Shi R, et al. *Coix lachryma-jobi* extract ameliorates inflammation and oxidative stress in a complete Freund's adjuvant-induced rheumatoid arthritis model [J]. *Pharm Biol*, 2019, 57: 792-798.
- [6] Li XK, Gu K, Liang MW, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of Coicis Semen [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2020, 51: 5645-5657.
- [7] Feng W, Liu J, Zhang D, et al. Revealing the efficacy-toxicity relationship of Fuzi in treating rheumatoid arthritis by systems pharmacology [J]. *Sci Rep*, 2021, 11: 23083.
- [8] Guo C, He L, Hu N, et al. Aconiti Lateralis Radix Praeparata lipid-soluble alkaloids alleviates IL-1 $\beta$ -induced inflammation of human fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis by inhibiting NF- $\kappa$ B and MAPKs signaling pathways and inducing apoptosis [J]. *Cytokine*, 2022, 151: 155809.
- [9] Li CC, Zhang YQ, Li WJ, et al. Exploring the effect and mechanism of Baihu-Guizhi Decoction on rheumatoid arthritis with hot syndrome from the angiogenesis regulatory network mediated by VEGF/VEGFR2/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 1044-1053.
- [10] Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2010, 376: 1094-1098.
- [11] Zhou J, Wang Q, Xiang Z, et al. Network pharmacology analysis of traditional chinese medicine formula Xiao Ke Yin Shui treating type 2 diabetes mellitus [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 4202563.
- [12] Yang T, Zhong XX, He QY. A preliminary study of associate professor He Qingyong's thought of applying Yiyi Fuzi powder in the treatment of chest Bi and heartache [J]. *J Emerg Tradit Chin Med (中国中医急症)*, 2016, 25: 821-822, 825.
- [13] Wu CW, Lu L, Liang SW, et al. Application of drug-target prediction technology in network pharmacology of traditional Chinese medicine [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2016, 41: 377-382.
- [14] Lin Z, Sun X, Xin H, et al. Plasma metabolomics coupled with MetaboAnalystan Ingenuity Pathway Analysis characterizes linoleic acid metabolism disorder in patients with Spleen-Yang-Deficiency syndrome [J]. *Eur J Integr Med*, 2018, 19: 72-79.
- [15] Uniprot Consortium. Activities at the universal protein resource (UniProt) [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 191-198.
- [16] Wang Y, Zhang S, Li F, et al. Therapeutic target database 2020: enriched resource for facilitating research and early development of targeted therapeutics [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48: 1031-1041.
- [17] Hamosh A, Scott AF, Amberger JS, et al. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 514-517.
- [18] Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: 607-613.
- [19] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13: 2498-2504.
- [20] Oosenbrug T, van de Graaff MJ, Haks MC, et al. An alternative model for type I interferon induction downstream of human TLR2 [J]. *J Biol Chem*, 2020, 295: 14325-14342.
- [21] Scherer HU, Häupl T, Burmester GR. The etiology of rheumatoid arthritis [J]. *J Autoimmun*, 2020, 110: 102400.
- [22] Murphy K, Haudek SB, Thompson M, et al. Molecular biology of septic shock [J]. *New Horiz*, 1998, 6: 181-193.
- [23] Ridker PM, Silvertown JD. Inflammation, C-reactive protein, and atherothrombosis [J]. *J Periodontol*, 2008, 79: 1544-1551.
- [24] Yagami T. Cerebral arachidonate cascade in dementia: Alzheimer's disease and vascular dementia [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2006, 4: 87-100.

- [25] Gomberg-maitland M, Olschewski H. Prostacyclin therapies for the treatment of pulmonary arterial hypertension [J]. *Eur Respir J*, 2008, 31: 891-901.
- [26] Wu KK, Liou JY. Cellular and molecular biology of prostacyclin synthase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 338: 45-52.
- [27] Gomez I, Foudi N, Longrois D, et al. The role of prostaglandin E2 in human vascular inflammation [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2013, 89: 55-63.
- [28] Ahn JK, Kim S, Hwang J, et al. GC/TOF-MS-based metabolomic profiling in cultured fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis [J]. *Joint Bone Spine*, 2016, 83: 707-713.
- [29] Minois N, Carmona-Gutierrez D, Madeo F. Polyamines in aging and disease [J]. *Aging*, 2011, 3: 716-732.
- [30] Bjelakovic' G, Stojanovic' I, Jevtic' Stoimenov T, et al. Metabolic correlations of glucocorticoids and polyamines in inflammation and apoptosis [J]. *Amino Acids*, 2010, 39: 29-43.
- [31] Hasko G, Kuhel DG, Marton A, et al. Spermine differentially regulates the production of interleukin-12 p40 and interleukin-10 and suppresses the release of the T helper 1 cytokine interferon-gamma [J]. *Shock*, 2000, 14: 144-149.
- [32] Shi Y, Zhao Y, Qian J, et al. Aconitum diterpenoid alkaloid profiling to distinguish between the Official Traditional Chinese Medicine (TCM) Fuzi and adulterant species using LC-qToF-MS with chemometrics [J]. *J Nat Prod*, 2021, 84: 570-587.
- [33] Tong P, Xu S, Cao G, et al. Chondroprotective activity of a detoxicated traditional Chinese medicine (Fuzi) of *Aconitum carmichaeli* Debx against severe-stage osteoarthritis model induced by mono-iodoacetate [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151: 740-744.
- [34] Zhang YG, Liu XX, Zong JC, et al. Investigation driven by network pharmacology on potential components and mechanism of DGS, a natural vasoprotective combination, for the phytotherapy of coronary artery disease [J]. *Molecules*, 2022, 27: 4075.
- [35] Zhang X, Bao GF, Cui ZM. Research progress of PI3K/AKT signaling pathway in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *J Southeast Univ Med Sci Ed (东南大学学报 医学版)*, 2019, 38: 358-363.
- [36] Li XY, Xu N, Huang NN, et al. An integrative pharmacological-based study on network mechanism of Xinkeshu Tablets intervention in atherosclerosis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2018, 49: 3463-3470.
- [37] Zhao YB, Gao J. Clinical Study of Hormone-dependent Rheumatoid Arthritis [J]. *China Contin Med Edu (中国继续医学教育)*, 2020, 12: 151-153.
- [38] Qian K, Zheng XX, Wang C, et al.  $\beta$ -Sitosterol inhibits rheumatoid synovial angiogenesis through suppressing VEGF signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 12: 816477.