

基于网络药理学结合药动学及靶点验证探究黄芩清热除痹胶囊治疗 类风湿关节炎质量标志物

董心同¹, 柯江涛¹, 甘珮荣¹, 陈芳园¹, 徐 凤², 陈 建³, 刘 健^{4*}, 吴 虹^{1*}

- (1. 安徽中医药大学药学院, 新安医学教育部重点实验室, 中药研究与开发安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012;
2. 安徽医科大学第二附属医院, 安徽 合肥 230601; 3. 安徽中医药大学中西医结合学院, 安徽 合肥 230012;
4. 安徽中医药大学第一附属医院, 安徽 合肥 230031)

摘要: 黄芩清热除痹胶囊 (Huangqin Qingre Chubi capsule, HQC) 作为临床治疗类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的有效方剂, 质量控制尚属空白。本研究拟通过网络药理学、药动学结合实验验证探究 HQC 治疗 RA 的质量标志物 (quality markers, Q-marker)。通过构建“药效成分-靶点-通路”可视化网络, 初步预测 HQC 治疗 RA 潜在的质量标志物。建立风湿热痹证胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 大鼠模型, 阐明 HQC 药效成分在大鼠疾病状态下的动态量化规律。建立肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 诱导的 RA 成纤维样滑膜细胞 (MH7A) 体外炎症模型, 检测活性成分对鞘氨醇激酶 1 (sphingosin kinase-1, Sphk1)、p-SphK1 蛋白表达影响。网络药理学结果显示, 黄芩苷、栀子苷、木犀草素、薏苡素和苦杏仁苷为 HQC 治疗 RA 的重要活性成分。定量分析结果进一步验证这 5 种成分的可测性。蛋白免疫印迹证实栀子苷和黄芩苷显著抑制 Sphk1 和 p-SphK1 蛋白表达。以上研究确定上述 5 种成分可作为 HQC 治疗 RA 的质量标志物。本实验经安徽中医药大学实验动物伦理委员会审核通过 (批准号: AHUCM-rats-2021049), 所有程序均严格按照动物使用和护理的原则进行。

关键词: 类风湿关节炎; 质量标志物; 黄芩清热除痹胶囊; 热痹; 网络药理学; 药动学

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)06-1422-08

To explore the quality markers of Huangqin Qingre Chubi capsule in the treatment of rheumatoid arthritis based on network pharmacology combined with pharmacokinetics and target verification

DONG Xin-tong¹, KE Jiang-tao¹, GAN Pei-rong¹, CHEN Fang-yuan¹, XU Feng²,
CHEN Jian³, LIU Jian^{4*}, WU Hong^{1*}

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Key Lab of Xin'an Medicine, Ministry of Education, Anhui Province Key Laboratory of Research and Development of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, China; 3. School of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 4. The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

Abstract: As an effective prescription for the treatment of rheumatoid arthritis (RA), Huangqin Qingre Chubi capsule (HQC) is still blank in quality control. This study aims to explore quality markers (Q-markers) for HQC in the treatment of RA by integrating network pharmacology and pharmacokinetics. By constructing the visualization

收稿日期: 2022-12-31; 修回日期: 2023-04-23.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81874360); 安徽省高校自然科学基金重大项目 (KJ2021ZD0060); 省级研究生学术创新项目 (2022xscx101).

*通讯作者 Tel: 13955109537, E-mail: liujianahzy@126.com;

Tel: 13485606565, E-mail: hongw@aliyun.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1447

network of "pharmacodynamic ingredient-target-pathway", the potential Q-Marker of HQC treatment for RA was preliminarily predicted. A rat model of rheumatic heat obstruction syndrome collagen-induced arthritis (CIA) was established to elucidate the dynamic quantification law of pharmacodynamic components of HQC in the disease state of rats. To establish the inflammatory model of RA synovial fibroblasts (MH7A) induced by tumor necrosis factor- α (TNF- α) *in vitro*. The effects of active ingredients on protein expression of sphingosin kinase-1 (Sphk1) and p-SphK1 were detected. The network pharmacological results showed that baicalin, geniposide, luteolin, coixol and amygdalin were the important active components of HQC treatment for RA. Quantitative analysis results further verified the measurability of these five components. The expression of Sphk1 and p-SphK1 was significantly inhibited by geniposide and baicalin by Western blotting. The above studies determined that the above 5 components could be used as Q-markers in the treatment of RA by HQC. This experiment was approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Anhui University of Chinese Medicine (approval number: AHUCM-rats-2021049). All procedures were conducted in strict accordance with the principles of animal use and care.

Key words: rheumatoid arthritis; quality marker; Huangqin Qingre Chubi capsule; heat arthralgia; network pharmacology; pharmacokinetics

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 作为自身免疫性疾病, 属中医学“痹证”范畴^[1]。黄芩清热除痹胶囊 (Huangqin Qingre Chubi capsule, HQC) 包括黄芩、栀子、威灵仙、薏苡仁、桃仁, 全方发挥清热, 化湿之功效^[2], 常用于治疗 RA 风湿热证, 但其药效物质基础尚不明确。质量标志物 (quality marker, Q-marker) 的提出为本研究探究 HQC 药效成分提供明确的方向^[3]。因此本研究整合网络药理学、药动学及实验验证挖掘活性成分, 确定 HQC 的质量标志物。

材料与方法

数据库及软件 中药系统药理学数据库 TCMSP (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php/>), GeneCards 基因组注释数据库平台 (<http://www.genecards.org/>), Metascape 基因富集分析数据库 (<http://metascape.org/>), 网络可视化分析软件 Cytoscape (Version 3.8.2)。

实验动物及细胞 雄性 SPF 级 SD 大鼠, 体重 200~250 g, 购自济南朋悦实验动物繁育有限公司, 合格证号: SCXK (鲁) 20190003, 实验方案经安徽中医药大学实验动物伦理委员会审核通过 (批准号: AHUCM-rats-2021049)。动物于自然光照、自由进食饮水、恒温、恒湿、整洁环境。RA 滑膜成纤维细胞 (MH7A 细胞) 株购自广州吉妮欧生物科技有限公司。

试剂及仪器 HQC (批号: 20210601) 购自安徽中医药大学第一附属医院; 黄芩苷 (批号: Z28S11X125952)、栀子苷 (批号: C07N7Y24406)、薏苡素 (批号: J26GB152842)、芍药苷 (批号: X12A8C33672) 均购自

上海源叶生物科技有限公司; 苦杏仁苷 (批号: 29883-15-6); 木犀草素 (批号: CHB180113) 购自成都克洛玛生物科技有限公司; 鸡 II 型胶原 (chick type II collagen, C II) (批号: 220184)、弗氏完全佐剂 (freund's complete adjuvant, FCA) (批号: F5881) 购自美国 Sigma 公司; 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (货号: A0216, H+L)、蛋白酶抑制剂混合物 (货号: P1005)、磷酸酶抑制剂混合物 A (货号: P1081, 50X)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (货号: P0012) 均购自碧云天生物技术有限公司; 鼠单克隆 β -actin 一抗 (货号: TA-09)、辣根酶标记兔抗山羊 IgG (货号: ZB-2306, H+L) 购自北京中山金桥生物技术有限公司; PageRuler™ 预染蛋白分子量标准 (货号: 26616) 购自赛默飞世尔科技有限公司; PVDF 膜 (货号: BS-PVDF-45) 购自白鲨 Biosharp 生物; 兔多克隆鞘氨醇激酶 1 (sphingosin kinase-1, Sphk1) 一抗 (货号: BA2865) 购自博士德生物; 兔多克隆 p-SphK1 一抗 (货号: 19561-1-AP, Ser 25) 购自美国 Proteintech; AB SCIEX QTRAP 5500 三重四极杆质谱联用仪 (型号: EB20711805, 美国 AB SCIEX 公司); 人工气候造模箱 (型号: RXZ-160A, 宁波江南仪器厂); 红外热像仪 (型号: T620, 美国 Flir Systems 公司)。

活性成分及靶点预测 通过 TCMSP 检索 HQC 成分, 以口服生物利用度 $\geq 30\%$ 及药物类药性 ≥ 0.18 作为筛选条件, 同时纳入文献各单味药中发挥药效的成分。通过 PharmMpapper 平台预测成分靶点。利用 DrugBank 等数据库构建 RA 靶点数据库。通过 Veeny 在线平台获取成分与疾病交集靶点。通过 Cytoscape 软件分析中药、成分、靶点三者间相互关系, 获取重要活性成分及靶点。

交集靶点的通路富集分析 利用 Metascape 数据

库对交集靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 生物过程和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。根据 *P* 值显著性以气泡图形式展示前 20 条通路。

成分-靶点-通路网络构建 基于 KEGG 结果构建 HQC“成分-靶点-通路”图, 明确 HQC 治疗 RA 的潜在质量标志物。

色谱及质谱条件 采用 Waters Xbridge C18 色谱柱 (150 mm × 2.1 mm, 2.5 μm); 流动相: 含 0.01 mol·L⁻¹ 甲酸铵的 0.1% 甲酸水溶液 (A)-0.1% 甲酸的乙腈 (B) 为流动相, 洗脱梯度: 0~0.5 min, 95% A; 0.5~1.5 min, 95%~60% A; 1.5~3.0 min, 60% A; 3.0~4.5 min, 60%~0% A; 4.5~6.5 min, 0% A; 6.5~8.5 min, 0%~95% A; 8.5~10 min, 95% A。采用多反应监测扫描方式, 电喷雾负离子源模式。喷雾气为 55 psi, 气帘气压力为 25 psi, 碰撞气压力为中等, 辅助气为 65 psi, 喷雾电压为 -4 500 V, 离子源温度为 450 °C。重要质谱参数见表 1。

大鼠分组及造模 24 只大鼠适应性喂养一周, 随机分为正常对照组、胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 组、风湿热环境 (rheumatic heat environment, FSR) 组、HQC 组, 每组 6 只。CIA 组模型制备: 在第 0 天, 将 FCA 乳化后的 CII 于大鼠左后足趾及尾巴根部皮内注射 0.2 mL, 第 7 天在背部多处注射 0.1 mL 乳剂加强刺激; FSR 组及 HQC 组模型制备: 与 CIA 组同法注射乳剂, 并且在首次造模后接受持续 28 天, 一天 4 h 的环境刺激 (干预条件: 湿度 95 °C; 风速 5 m·s⁻¹; 温度 37 °C); 正常对照组: 注射生理盐水造模, 常温饲养。

MH7A 细胞培养及分组 MH7A 在含 5% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素溶液的 DMEM 培养基中培养, 浓度为 5% CO₂, 温度为 37 °C。组别为空白对照组、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) 组: TNF-α (10 ng·mL⁻¹)、栀子苷组: TNF-α (10 ng·mL⁻¹) + 栀子苷 (5 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹)、黄芩苷组: TNF-α (10 ng·mL⁻¹) + 黄芩苷 (1 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹)、木犀草素组: TNF-α (10 ng·mL⁻¹) + 木犀草素 (2 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹)、薏苡素组: TNF-α (10 ng·mL⁻¹) + 薏苡素 (1 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹)、苦杏仁苷组: TNF-α (10 ng·mL⁻¹) + 苦杏仁苷 (1 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹)。各单体给药浓度参照文献^[4-8]。

储备液制备 精密称取栀子苷、薏苡素、黄芩苷、木犀草素、苦杏仁苷对照品适量, 加入甲醇溶解稀释成浓度分别为 0.263、0.550、0.280、0.260、0.206 mg·mL⁻¹ 的对照品储备液, 4 °C 保存备用。另精密称取芍药苷内标 (internal standard, IS) 适量, 加甲醇稀释成 3.230 μg·mL⁻¹。

血浆样品处理 精密吸取 100 μL 血浆样品, 移至 2 mL 离心管, 加入 100 μL IS 溶液, 涡旋混匀, 500 μL 甲醇蛋白沉淀, 涡旋, 离心 (12 000 ×g, 4 °C, 10 min), 取上清 500 μL, 真空浓缩仪挥干。残渣用 100 μL 甲醇复溶, 涡旋 10 min, 离心 2 次 (12 000 ×g, 4 °C, 10 min), 取上清, 进样分析。

TNF-α 刺激 MH7A 浓度优化 选取 1.25、2.5、5、10、20 ng·mL⁻¹ 的 TNF-α 溶液刺激 MH7A 24 h, 观察细胞增殖情况。

大鼠整体指标评价 炎症出现后, 每隔 3 天对各组大鼠进行全身表现评分、关节炎指数评分及足趾容积测量, 此外检测滑膜病理形态学。

热属性判断 通过红外热像仪每 3 天测量大鼠后肢关节表面温度。免疫第 35 天, 检测大鼠红细胞压积、血浆黏度、全血黏度。

专属性考察 分析空白血浆、空白血浆加 5 种混合对照品和 IS 溶液及口服 HQC 的血浆加 IS 溶液的色谱图, 评价专属性。

线性范围及定量下限考察 精密吸取对照品储备液, 混合, 甲醇逐级稀释配制成混合对照品溶液。取 100 μL 空白血浆, 加入各梯度混合对照品 100 μL, 按照血浆样品方法处理, 评价线性关系。

精密度和准确度考察 3 种浓度质控样品 (*n* = 6), 通过同一天和连续三天检测, 考察日内、日间精密度和方法的准确度。

基质效应和提取回收率考察 比较处理前后空白血浆添加质控样品的峰面积, 考察提取回收率。纯溶剂与血浆中混合对照品的峰面积比, 考察基质效应。

稳定性考察 评估在不同储存条件下, 质控样品在血浆中化学性质变化。室温下储存 24 h 的短期稳定性, 经过 3 次冻融循环的冻融稳定性及 -80 °C 下放置 30 天的长期稳定性。

药动学研究 造模第 33 天单次灌胃 HQC

Table 1 Mass spectrometric parameters of 6 compounds

| Analyte | Molecular weight | Precursor ion (<i>m/z</i>) | Product ion (<i>m/z</i>) | Declustering potential/V | Collision energy /eV |
|--------------|------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------|
| Baicalin | 446.36 | 445.2 | 269.0 | -60 | -31 |
| Geniposide | 388.37 | 387.2 | 225.1 | -80 | -12 |
| Luteolin | 286.24 | 285.4 | 133.0 | -120 | -44 |
| Coixol | 165.15 | 164.0 | 149.0 | -60 | -20 |
| Amygdalin | 457.43 | 456.4 | 323.1 | -60 | -17 |
| Paeoniflorin | 480.47 | 479.00 | 120.6 | -80 | -30 |

324 mg·kg⁻¹, 取给药后 0、0.083、0.17、0.25、0.5、1、1.5、2、4、6、8、10、12、24、36 h 采集的含药血浆, 液质联用分析, 绘制平均血浆药物浓度-时间曲线, DAS 2.0 软件计算药动力学参数。

蛋白免疫印迹法检测蛋白含量 分组给药干预, 加 500 μL 含 1% PMSF 蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解。BCA 法蛋白定量试剂盒定量样品中总蛋白。用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等效蛋白样品。转移至 200 mA PVDF 膜上, 转膜后置于 5% 的脱脂奶粉中室温孵育封闭 2 h 时, 与一抗 (1:1 000) 在 4 °C 下孵育过夜, 再次洗膜, 蛋白条带转移至二抗, 室温孵育 1 h, 曝光。

结果

1 活性成分及靶点预测

网络药理学结果显示获得 HQC 成分 90 种, RA 靶点 1 457 个, 成分与 RA 交集靶点 140 个。此外纳入网络药理学中生物利用度较低但具有药效活性的成分黄芩苷、槲子苷、木犀草素、薏苡素、苦杏仁苷作为研究对象。分析中药、成分、靶点关系获得木犀草素、槲子苷、苦杏仁苷、薏苡素、黄芩苷等成分主要通过 Sphk1、1-磷酸鞘氨醇 (sphingosine 1-phosphate, S1P) 等靶点治疗 RA。

2 交集靶点的通路富集分析

GO 富集结果显示药效成分通过调控激酶活性等作用参与 RA 多种生物学过程。KEGG 富集结果显示药效成分主要参与鞘脂等信号通路的调控。前 20 条

KEGG 通路图见图 1A。

3 成分-靶点-通路网络分析

通过分析获得槲子苷、黄芩苷、苦杏仁苷、木犀草素、薏苡素的度值较高, 为 HQC 治疗 RA 的潜在质量标志物, “成分-靶点-通路”图如图 1B。

4 TNF-α 浓度优化

通过检测 MH7A 细胞增殖, 最终选择 10 ng·mL⁻¹ 的 TNF-α 作为后续造模浓度。不同浓度 TNF-α 对 MH7A 增殖能力的影响如图 2A。

5 大鼠整体指标评价

大鼠足爪肿胀图如图 3A。随造模时间延长, 大鼠背部溃烂、行动迟缓、体重减轻。病理结果 (图 3B) 显示, 与正常组相比, CIA 组滑膜细胞多层增厚, 大量炎性细胞充盈滑膜并伴有内膜下血管生成。正常组滑膜细胞整齐排列。FSR 组大鼠较 CIA 组表现出更加明显的增殖及浸润, 且可观察多处新生血管。与正常组大鼠相比, CIA 组及 FSR 组全身表现评分 (图 3C)、关节炎指数 (图 3D) 及足爪肿胀度 (图 3E) 逐渐增加, 有显著差异, FSR 组较 CIA 组大鼠症状明显。

6 热属性判断

免疫 35 天的血液流变学结果显示, 与正常组相比, CIA 组及 FSR 组大鼠血浆黏度、红细胞压积及低剪切率下全血黏度显著升高。与 CIA 组相比, FSR 组低剪切率下全血黏度、红细胞压积、血浆黏度有降低的趋势, 关节表面温度升高 (图 4)。免疫接种期间, CIA 组及 FSR 组大鼠关节表面温度较正常组高, FSR 组最高。

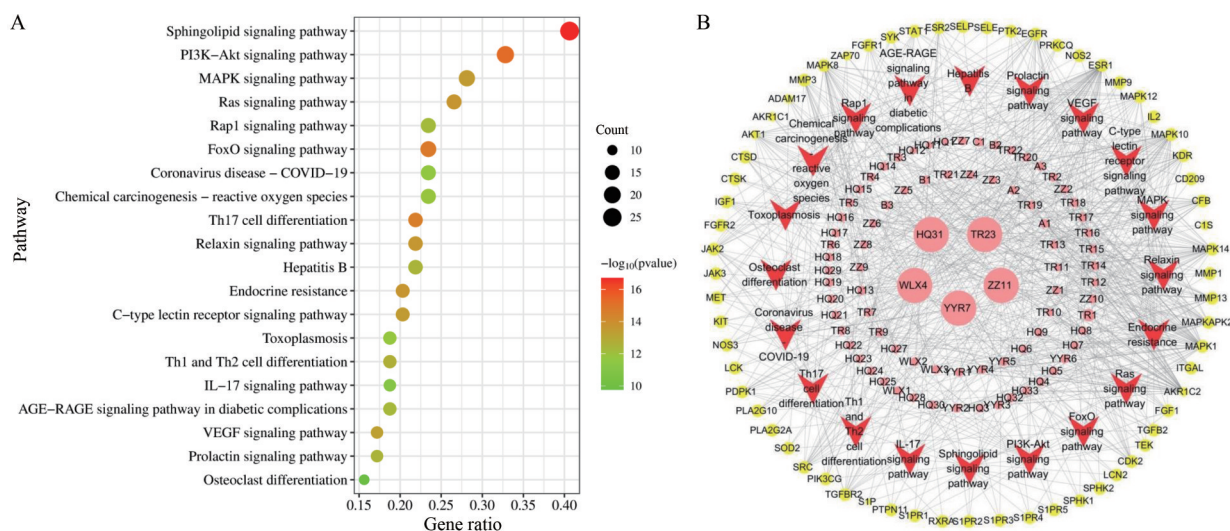


Figure 1 Network pharmacological analysis. KEGG pathway enrichment of the anti-rheumatoid arthritis (RA) effect of Huangqin Qingre Chubi capsule (HQC) (A); network diagram of "components-targets-pathways" (B). PI3K: Phosphoinositide 3-kinase; AKT: Protein kinase B; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; Ras: Rat sarcoma; Rap1: Ras-associated protein 1; FoxO: Forkhead box protein O; Th17: T helper cell 17; IL-17: Interleukin-17; AGE: Advanced glycation end-products; RAGE: Receptor for advanced glycation end-products; VEGF: Vascular endothelial growth factor; HQ 31: Baicalin; TR 23: Amygdalin; ZZ 11: Geniposide; YZR 7: Coixol; WLX 4: Luteolin

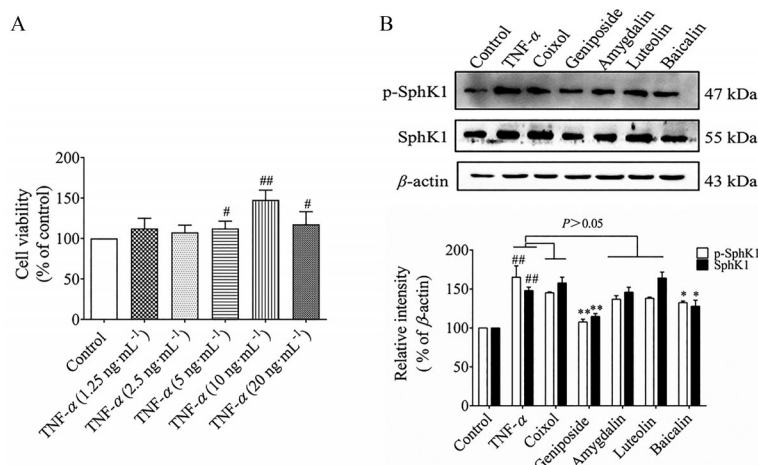


Figure 2 Expression of p-SphK1 and SphK1 protein in MH7A induced by TNF- α and intervention of five active components of HQC. CCK-8 was used to detect the proliferation of MH7A treated by different concentrations of TNF- α (A). $n = 6, \bar{x} \pm s$. Effects of coxioid, geniposide, amygdalin, luteolin, and baicalin on the expression of SphK1 and p-SphK1 protein in MH7A induced by TNF- α , respectively (B). $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs TNF- α group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ vs control group. TNF- α : Tumor necrosis factor- α ; SphK1: Sphingosin kinase-1

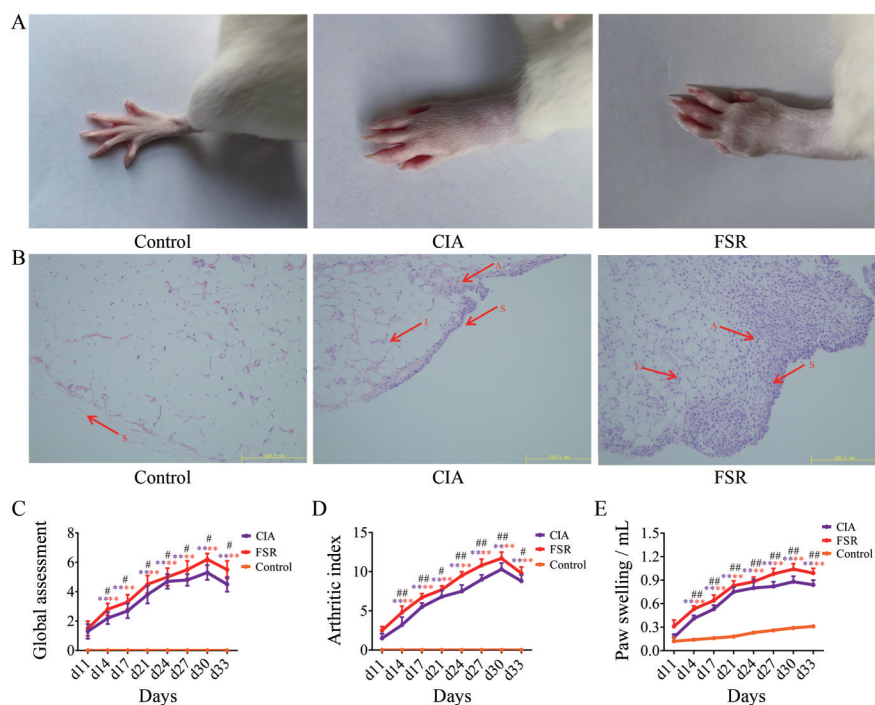


Figure 3 Results of global index evaluation in RA rats. The paw observation of CIA and FSR rats showed swelling (A); pathomorphology of synovium in CIA and FSR rats (B); global assessment of CIA and FSR rats (C); arthritis index of CIA and FSR rats (D); paw swelling of CIA and FSR rats (E). $n = 6, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ vs CIA group. CIA: Collagen-induced arthritis; FSR: Rheumatic heat environment; S: Synoviocytes; A: Angiogenesis; I: Inflammatory cells

7 专属性

5个化合物及IS的色谱图如图5。内源性物质不干扰待测物及IS的测定。

8 线性关系及定量下限

血浆中5种化合物标准曲线方程、相关系数、线性

范围及定量下限见表2。

9 精密度及准确度

5种成分低、中、高3种浓度的质控样品日内精密度是2.0%~12.6%、日间精密度是3.3%~11.1%，准确度分别是87.2%~112.2%，93.9%~109.2%，符合生物

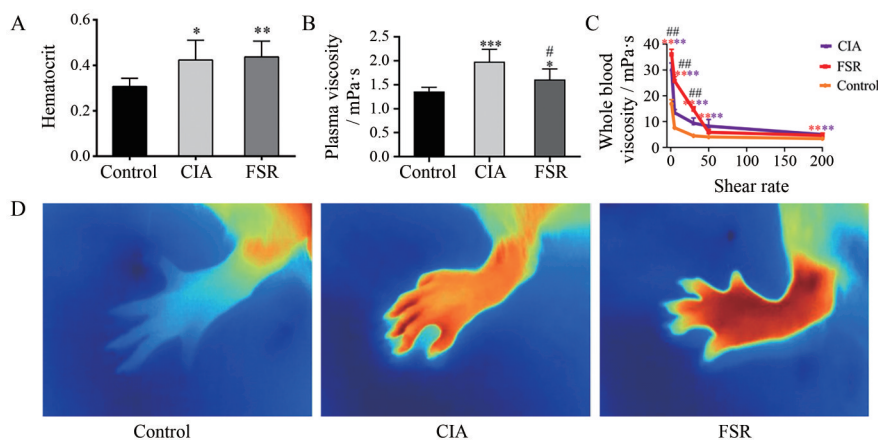


Figure 4 Results of heat attribute evaluation in RA rats. Hematocrit of CIA and FSR rats (A); plasma viscosity of CIA and FSR rats (B); whole blood viscosity of CIA and FSR rats (C); joint surface temperature in CIA and FSR rats (D). $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs CIA group

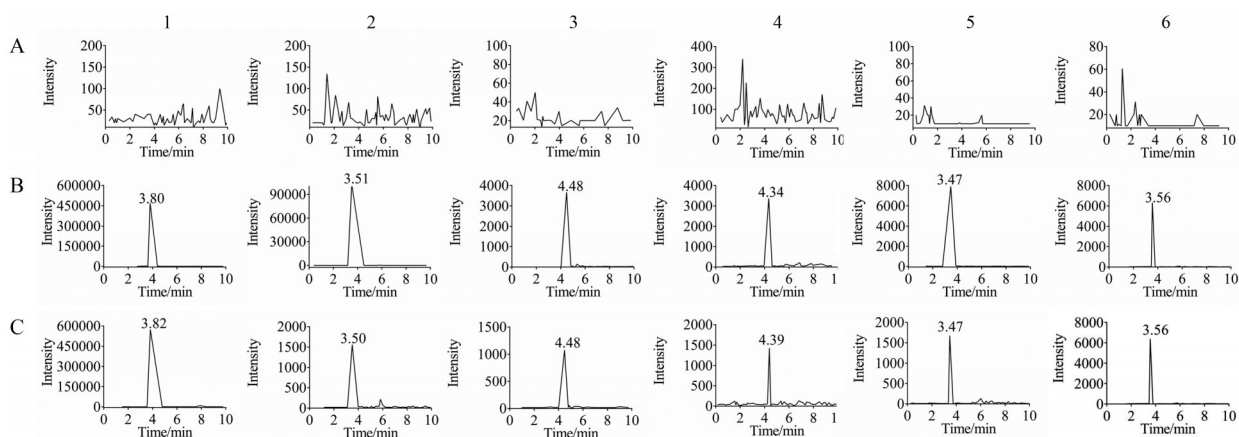


Figure 5 UHPLC-MS/MS chromatograms of 5 compounds and IS (paeoniflorin). blank plasma (A); blank plasma spiked with the 5 analytes and IS (B); plasma sample after oral administration of Huangqin Qingre Chubi capsule at a dosage of $324 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (C). 1: Baicalin; 2: Geniposide; 3: Luteolin; 4: Coixol; 5: Amygdalin; 6: Paeoniflorin

Table 2 Regressive equation, correlation coefficients, linearity range, and limit of quantitation of 5 constituents. LOQ: Limit of quantitation

| Compound | Regressive equation | Correlation coefficient (R^2) | Linear range/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ | LOQ/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ |
|------------|--------------------------|-----------------------------------|--|---------------------------------------|
| Baicalin | $y = 0.0289x - 0.0493$ | 0.9992 | 21.88–2800 | 10.94 |
| Geniposide | $y = 0.00358x - 0.0607$ | 0.9987 | 20.55–2630 | 10.28 |
| Luteolin | $y = 0.0138x + 0.000614$ | 0.9994 | 0.8125–26.00 | 0.8125 |
| Coixol | $y = 0.0128x + 0.0363$ | 0.9979 | 0.4297–55.00 | 0.4297 |
| Amygdalin | $y = 0.00401x + 0.0136$ | 0.9993 | 0.8047–206.0 | 0.8047 |

样品分析要求。

10 基质效应及提取回收率

5种成分的质控样品在大鼠血浆中的基质效应结果为85.7%~109.0%，提取回收率为85.3%~99.6%，结果符合体内样品定量方法要求。

11 稳定性

5种成分质控样品相对标准偏差在85.2%~111.3%之间，生物样本基本稳定，不影响定量测定结果。

12 药动学研究

平均血浆药物浓度-时间曲线图如图6，药动学参数见表3。

13 HQC中5种活性成分对MH7A中SphK1、p-SphK1蛋白表达影响

蛋白免疫印迹结果见图2B。结果显示，与对照组相比，TNF- α 组SphK1和p-SphK1蛋白显著升高($P < 0.01$)。与TNF- α 组相比，栀子苷和黄芩苷显著抑制p-SphK1和SphK1蛋白表达，而木犀草素、薏苡素和苦杏仁

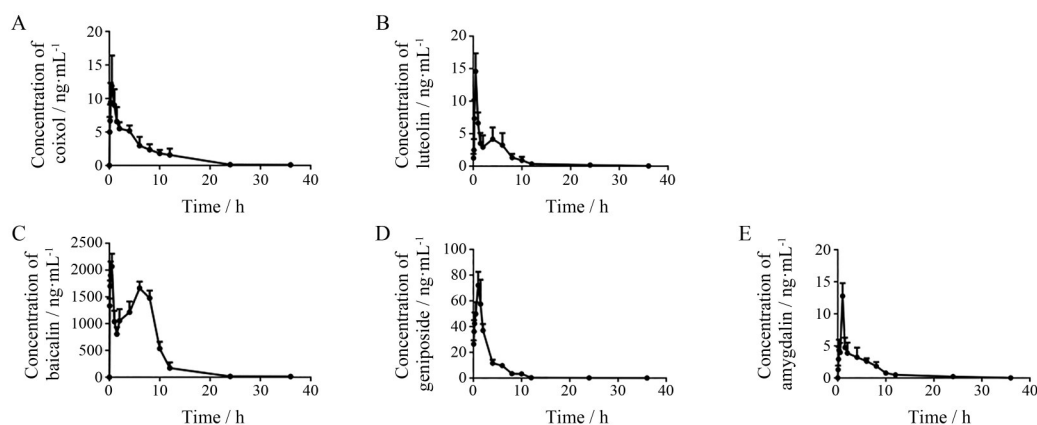


Figure 6 Mean plasma concentration-time curves of 5 compounds. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. A: Coxiol; B: Luteolin; C: Baicalin; D: Geniposide; E: Amygdalin

Table 3 Pharmacokinetic parameters of 5 compounds in rat models of FSR. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

| Parameter | Baicalin | Geniposide | Luteolin | Coxiol | Amygdalin |
|---|------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| t_{max}/h | 0.42 ± 0.13 | 1.08 ± 0.20 | 0.46 ± 0.10 | 0.58 ± 0.20 | 1.00 ± 0.00 |
| $C_{max}/ng \cdot mL^{-1}$ | 2 179.7 ± 196.9 | 77.7 ± 11.2 | 14.9 ± 2.3 | 12.0 ± 4.5 | 12.8 ± 2.0 |
| $t_{1/2}/h$ | 6.0 ± 1.0 | 5.5 ± 0.5 | 5.6 ± 1.1 | 4.6 ± 1.1 | 4.5 ± 1.7 |
| $AUC_{0-4}/\mu g \cdot h \cdot L^{-1}$ | 15 564.1 ± 891.1 | 203.9 ± 23.6 | 39.6 ± 11.0 | 59.3 ± 19.8 | 36.6 ± 8.2 |
| $AUC_{0-\infty}/\mu g \cdot h \cdot L^{-1}$ | 15 764.5 ± 867.1 | 204.8 ± 23.6 | 39.9 ± 11.0 | 59.6 ± 20.1 | 38.4 ± 7.4 |
| MRT_{0-4}/h | 7.0 ± 0.5 | 3.09 ± 0.16 | 5.4 ± 0.5 | 5.9 ± 1.0 | 4.8 ± 0.8 |
| $MRT_{0-\infty}/h$ | 7.6 ± 0.5 | 3.29 ± 0.2 | 5.7 ± 0.6 | 6.3 ± 1.5 | 5.9 ± 1.1 |

仁昔对 SphK1 和 p-SphK1 的表达均无影响 ($P > 0.05$)。

讨论

中药复方质量可控是临床疗效的重要保证, 因此寻求有效且适合的中药质控手段迫在眉睫。本研究基于网络药理学结合药动学及实验验证, 探究 HQC 抗 RA 的质量标志物。本研究通过“成分-靶点-通路”可视化网络分析, 发现 HQC 中 5 种活性成分可能通过影响 Sphk1、S1P 等靶点治疗 RA。

滑膜炎症作为 RA 典型的病理特征, 研究表明, 多种炎症因子可作为推动炎症不断发展的始作俑者^[9]。S1P 作为一类新型鞘脂分子, 通过 SphKs 磷酸化激活催化产生, 结合胞内或胞膜上 S1P 受体参与成纤维样滑膜细胞中炎症因子白细胞介素 (interleukin, IL)-6 释放, 介导 RA 炎症反应^[10]。本实验证实黄芩昔及栀子昔能够显著抑制细胞中 p-SphK1 和 SphK1 蛋白表达, 缓解炎症反应。细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal regulated kinase 1/2, ERK1/2) 通常参与 RA 中丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 介导的炎症、增殖和关节破坏^[11,12]。在炎症环境中, TNF- α 参与激活 ERK1/2 通路并诱导下游 IL-6、基质金属蛋白酶-3 释放, 加重滑膜炎症, 加速胞外基质降解^[13]。激活后的 p38 MAPK 同样释放 IL-1 β 、TNF- α

和 IL-6 等多种促炎细胞因子^[14,15]。研究显示黄芩昔可有效降低 p-p38, 阻断炎症通路, 缓解滑膜炎症^[16]。薏苡素通过抑制 MAPK 通路, 抑制 NOD 结构域样受体 3 炎性小体的激活, 发挥抗炎活性^[17]。3-磷酸肌醇激酶/蛋白激酶 B (phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT) 通路可协助 IL-17 及 IL-21 炎性因子推动炎症发展^[9]。Hou 等^[18]研究发现木犀草素通过下调 p-AKT、p-ERK 蛋白, 缓解 CIA 大鼠滑膜细胞增殖。此外黄芩昔可调控腺苷酸活化蛋白激酶/ERK/Akt 通路减轻溃疡性结肠炎大鼠症状^[19]。

研究显示 SphK1 参与 RA 血管新生, 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 触发 SphK1 磷酸化位点激活, 介导 VEGF-SphK1-S1P 通路激活参与 RA 血管新生^[20]。ERK1/2 可借助 VEGF 促进 p-ERK1/2 与 SphK1 的结合, 调控血管新生^[21,22]。Deng 等^[23]研究表明, 栀子昔通过抑制 SphK1 和 p-ERK1/2 结合, 减少 S1P 的释放, 抑制血管生成。鉴于药效作用与入血成分密切相关^[24], 本研究构建符合病证特点的 FSR 大鼠模型, 成功测定网络药理学预测的 5 种活性成分。

综上所述, 本研究通过体内外实验证实黄芩昔、栀子昔、苦杏仁昔、木犀草素、薏苡素是 HQC 抗 RA 的质量标志物, 其中黄芩昔、栀子昔可作为 HQC 主要成分

抑制 p-SphK1 及 S1P 释放, 治疗 RA。

作者贡献: 董心同负责完成相关实验及论文撰写; 柯江涛、甘珮荣、陈芳园、陈建、徐凤负责完成数据采集; 吴虹、刘健负责指导实验与修改论文。

利益冲突: 本文所有作者均声明无利益冲突。

References

- [1] Wang RH, Dai XJ, Wu H, et al. Anti-inflammatory effect of geniposide on regulating the functions of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts *via* inhibiting sphingosine-1-phosphate receptors1/3 coupling *Gai/Gas* conversion [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 584176.
- [2] Wen JT, Liu J, Wang X, et al. Effect of Xinfeng capsules-containing serum on TNF- α -induced apoptosis and inflammation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis [J]. *Rheum Arthritis (风湿病与关节炎)*, 2021, 46: 436-443.
- [3] Zhang TJ, Bai G, Liu CX, et al. The concept core theory and research methods of Chinese medicine quality markers [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 187-196.
- [4] Lee HJ, Ryu J, Park SH, et al. Suppressive effects of coixol, glyceryl trilinoleate and natural products derived from *Coix Lachryma-Jobi* var. *ma-yuen* on gene expression, production and secretion of airway MUC5AC mucin [J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38: 620-627.
- [5] Xiao Z, Ji Q, Fu YD, et al. Amygdalin ameliorates liver fibrosis through inhibiting activation of TGF- β /Smad signaling [J]. *Chin J Integr Med*, 2023, 29: 316-324.
- [6] Wang Y, Wu H, Deng R, et al. Geniposide downregulates the VEGF/SphK1/S1P pathway and alleviates angiogenesis in rheumatoid arthritis *in vivo* and *in vitro* [J]. *Phytother Res*, 2021, 35: 4347-4362.
- [7] Zhu M, Ying J, Lin C, et al. Baicalin induces apoptotic death of human chondrosarcoma cells through mitochondrial dysfunction and downregulation of the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Planta Med*, 2019, 85: 360-369.
- [8] Zuo W, Liu N, Zeng Y, et al. Luteolin ameliorates experimental pulmonary arterial hypertension *via* suppressing hippo-YAP/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 663551.
- [9] Spel L, Martinon F. Inflammasomes contributing to inflammation in arthritis [J]. *Immunol Rev*, 2020, 294: 48-62.
- [10] Baker DA, Obeid LM, Gilkeson GS. Impact of sphingosine kinase on inflammatory pathways in fibroblast-like synoviocytes [J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2011, 10: 464-471.
- [11] Arthur JS, Ley SC. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13: 679-692.
- [12] Wang XL. The Mechanism of IGFBP2 Regulating the Biological Behavior of RA-FLS Cells Through ERK1/2 Signaling Pathway (IGFBP2通过ERK1/2信号通路调控RA-FLS细胞生物学行为机制研究) [D]. Guangzhou: Jinan University, 2017.
- [13] Machado CRL, Dias FF, Resende GG, et al. Morphofunctional analysis of fibroblast-like synoviocytes in human rheumatoid arthritis and mouse collagen-induced arthritis [J]. *Adv Rheumatol*, 2023, 63: 1.
- [14] Beyaert R, Cuenda A, Vanden Berghe W, et al. The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor [J]. *EMBO J*, 1996, 15: 1914-1923.
- [15] Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis [J]. *Nature*, 1994, 372: 739-746.
- [16] Fang F, Xie Z, Quan J, et al. Baicalin suppresses *Propionibacterium acnes*-induced skin inflammation by downregulating the NF- κ B/MAPK signaling pathway and inhibiting activation of NLRP3 inflammasome [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2020, 53: e9949.
- [17] Hu Y, Zhou Q, Liu T, et al. Coixol suppresses NF- κ B, MAPK pathways and NLRP3 inflammasome activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells [J]. *Molecules*, 2020, 25: 894.
- [18] Hou Y, Wu J, Huang Q, et al. Luteolin inhibits proliferation and affects the function of stimulated rat synovial fibroblasts [J]. *Cell Biol Int*, 2009, 33: 135-147.
- [19] Bi WP, Man HB. Baicalin inhibits inflammation and apoptosis of interstitial cells of Cajal by targeting the NF- κ B-mediated AMPK/ERK/Akt pathway in an ulcerative colitis rat model [J]. *Neuro Endocrinol Lett*, 2021, 42: 528-537.
- [20] Sun M, Deng R, Wang Y, et al. Sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate/sphingosine 1-phosphate receptor 1 pathway: a novel target of geniposide to inhibit angiogenesis [J]. *Life Sci*, 2020, 256: 117988.
- [21] Pulkoski-Gross MJ, Obeid LM. Molecular mechanisms of regulation of sphingosine kinase 1 [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2018, 1863: 1413-1422.
- [22] Wang Y, Wu H, Gui BJ, et al. Geniposide alleviates VEGF-induced angiogenesis by inhibiting VEGFR2/PKC/ERK1/2-mediated SphK1 translocation [J]. *Phytomedicine*, 2022, 100: 154068.
- [23] Deng R, Bu Y, Li F, et al. The interplay between fibroblast-like synovial and vascular endothelial cells leads to angiogenesis *via* the sphingosine-1-phosphate-induced RhoA-F-actin and Ras-ERK1/2 pathways and the intervention of geniposide [J]. *Phytother Res*, 2021, 35: 5305-5317.
- [24] Ren JL, Zhang AH, Kong L, et al. Analytical strategies for the discovery and validation of quality markers of traditional Chinese medicine [J]. *Phytomedicine*, 2020, 67: 153165.