DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.09.045

基于分子对接与SPR实验研究祛风通络药对天麻－附子中黄酮酚化合物与CNR结合的亲和力

杨杰[1],马磊[2],刘青妹[2],陈虹雨[1],叶茂[1],丁维俊[3],易伟[2]
(1.毕节医学高等专科学校,贵州 毕节 551700;2.广州医科大学,广东 广州 511436;
3.成都中医药大学,四川 成都 610075)

摘要:目的 以大麻素受体(cannabinoid receptor,CNR)为靶标,通过虚拟筛选和表面等离子共振实验(surface plasmon resonance,SPR),从祛风通路药对天麻－附子中筛选治疗类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis,RA)的小分子黄酮酚化合物(配体),比较小分子化合物与CNR1和CNR2结合的差异性。方法 通过UPLC－MS非靶向代谢组学技术获取天麻－附子中3种黄酮酚化合物,即大豆苷、大豆苷元和姜黄素,确定为小分子化合物(配体)。运用分子对接研究3种黄酮酚化合物与CNR的结合模式,并进一步预测其药动学性质、类药性和毒性。采用分子动力学模拟评估3种小分子化合物与CNR1或CNR2结合稳定性的差异性。最后,采用SPR实验验证3种黄酮酚小分子化合物与CNR1或CNR2结合的稳定性。结果 分子对接与分子动力学模拟结果显示,大豆苷－CNR2、大豆苷元－CNR2和姜黄素－CNR2复合物的稳定性分别高于大豆苷－CNR1、大豆苷元－CNR1和姜黄素－CNR1复合物。SPR实验结果证实,大豆苷－CNR2复合物的值10.19 μmol低于大豆苷－CNR1复合物的值19.67 μmol,提示大豆苷－CNR2复合物的结合稳定性高于大豆苷－CNR1复合物。结论 经高通量生物信息技术与SPR实验证实,与CNR2结合稳定性较高的天麻－附子活性成分为大豆苷。研究为天麻－附子活性成分治疗类风湿性关节炎提供了新借鉴。

关键词:分子对接;分子动力学模拟;表面等离子共振;大麻素受体;天麻－附子;活性成分
中图分类号:R285.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)09-0242-09

Research of Affinity Between CNR and Flavonoids and Phenolic Acids from Tianma (Gastrodiae Rhizoma) and Fuzi (Aconiti Radix Lateralis Praeparata) via Molecular Docking and SPR Experimental Verification

YANG Jie[1],MA Lei[2],LIU Qingmei[2],CHEN Hongyu[1],YE Mao[1],DING Weijun[3],YI Wei[2]
(1. Bijie Medical College,Bijie 551700,Guizhou,China;
2. Guangzhou Medical University,Guangzhou 511436,Guangdong,China;
3. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine,Chengdu 610075,Sichuan,China)

Abstract:*Objective* This study centered on cannabinoid receptors(CNRs) and aimed to screen small molecular compounds associated with flavonoids and phenolic acids derived from Tianma(Gastrodiae Rhizoma) and Fuzi(Aconiti Radix Lateralis Praeparata) for the treatment of rheumatoid arthritis(RA) through molecular docking and surface plasmon resonance(SPR) techniques. Based on the obtained results,the differences in the binding affinities of these compounds to CNR1 or CNR2 were compared. *Methods* Three flavonoids and phenolic acids,namely daidzin,daidzein and curcumin,were identified from Tianma(Gastrodiae Rhizoma) and Fuzi(Aconiti Radix Lateralis Praeparata) using a nontargeted UPLCMS metabolomics approach,which were confirmed as small molecular ligands. Subsequently,the molecular docking was employed to predict the binding modes between these compounds and CNRs. Their pharmacokinetic properties,toxicity profiles and drug－likeness were further predicted using relevant bioinformatics methods. The differences in the binding stabilities of these compounds to CNR1 or CNR2 were evaluated through molecular dynamics simulations. Finally,the stabilities of the complexes formed between the three flavonoids and phenolic acids and CNR1(or CNR2) were verified by SPR. *Results* The findings from molecular docking and molecular dynamics simulations demonstrated that the stabilities of the daidzin－CNR2,daidzein－CNR2 and curcumin－CNR2 complexes were higher than those of the daidzin－CNR1,daidzein－CNR1 and curcumin－CNR1 complexes,respectively. Further SPR results indicated that the dissociation constant value of the daidzin－CNR2 complex(10.19 μmol) was lower than that of the daidzin－CNR1 com-

基金项目:贵州省基础研究计划项目(黔科合基础〔2019〕1003,黔科合基础－ZK－〔2023〕一般003)
作者简介:杨杰(1976－),男,四川广汉人,教授,硕士,研究方向:分子生物学在中医药中的应用。
通讯作者:易伟(1983－),男,湖南邵阳人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:药物化学。E-mail:yiwei@gzhmu.edu.cn。

plex(19.67 μmol), suggesting a higher affinity of the daidzin – CNR2 complex compared to the daidzin – CNR1 complex. *Conclusion The compound daidzin from Tianma(Gastrodiae Rhizoma) and Fuzi(Aconiti Radix Lateralis Praeparata), which was stably bound to CNR2*, was reconfirmed via high – throughput biological informatic approach and SPR experiment. These results offer new perspectives for the application of Tianma(Gastrodiae Rhizoma) and Fuzi(Aconiti Radix Lateralis Praeparata) in the treatment of RA.

Keywords: molecular docking; molecular dynamics simulation; surface plasmon resonance; cannabinoid receptor; Tianma (Gastrodiae Rhizoma) and Fuzi(Aconiti Radix Lateralis Praeparata); active ingredients

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种常见的自身免疫性疾病,其病理变化主要表现为滑膜炎症增生以及骨、软骨组织破坏,经久不愈易导致关节残疾,影响患者生活质量。RA全球发病率约0.5% ~1%[1-2]。靶向药物分子治疗是RA治疗的一个新方向之一。因此,寻找有价值的靶点非常重要,为RA临床治疗提供新依据。

大麻素受体(cannabinoid receptor, CNR)为七次跨膜G蛋白耦联受体,主要分为大麻素受体1(CNR1)和大麻素受体2(CNR2)。其中,CNR1主要分布于中枢神经系统和外周神经元,CNR2主要分布于外周免疫细胞、滑膜细胞和破骨细胞等[3-5]。然而,靶向CNR1会导致神经精神类不良反应,因此具有抗炎镇痛活性的选择性CNR2激动剂成为了研究关注的焦点。比如,HU308与CNR2结合的亲和力较CNR1强5000倍,L-759656与CNR2结合的亲和力较CNR1强406倍,成为了一种具有显著抗炎抗风湿作用的选择性CNR2激动剂[6]。研究表明,选择性CNR2激动剂JWH133、4Q3C等作用于胶原诱导关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)雄性DBA/1小鼠后,可下调炎症因子肿瘤坏死因子-α(Tumour necrosis factor-α, TNF-α)、白介素-1β(Interleukin-1β, IL-1β)、白介素-6(Interleukin-6, IL-6)和环氧化酶(cyclooxygenase-2, COX-2)的水平,抑制破骨细胞活性[7-9];同样,HU308(1-10 μM)通过选择性激动CNR2,能显著抑制脂多糖刺激的小鼠腹膜巨噬细胞炎症反应,减少炎症细胞因子TNF-α、IL-6的水平[10]。此外,内源性大麻素系统是由内源性大麻素衍生物、大麻素受体及相关酶基因群所组成的信号传导系统,可协调、整合机体对某些触发的反应[11-13]。内源性大麻素衍生物是一组类花生酸衍生物,以自分泌或旁分泌的方式按需合成或分泌,与类风湿性关节炎的病理变化密切相关[14-15]。

从天然植物中发现靶向CNR2的黄酮酚化合物是抗炎抗纤维化的研究策略之一。比如,脐橙中含量丰富的黄酮成分橙皮苷及脐橙酚酸化合物可促进肝细胞CNR2表达,下调p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)表达,进而减少COX-2和转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)表达,导致抗炎和抗纤维化效应[16]。酚酸化合物姜黄素通过靶向CNR而延缓四氯化碳诱导的肝纤维化[17]。课题组通过前期研究发现,祛风通络药对天麻-附子在RA痹证中高频应用[18-20],天麻-附子药对1∶1、3∶2、2∶3各剂量比水煎液样本之间的差异性分布化合物显著富集于异黄酮生物合成,包括大豆苷、大豆苷元等化合物;同时,天麻-附子药对各剂量比水煎液能明显抑制COX-2所介导的花生四烯酸代谢通路而具有抗炎抗风湿作用[21]。研究表明,大豆苷元可通过体内代谢为S-雌马酚[22];S-雌马酚是大豆异黄酮衍生的化合物,通过减少氧化应激和降低基质降解酶活性而延缓绝经期关节炎大鼠病程,防止关节软骨降解和破坏[22]。但是,从祛风通络药对天麻-附子中发现的大豆苷、大豆苷元和姜黄素与CNR的结合模式尚未明确。因此,本研究以大麻素受体为靶标,大豆苷、大豆苷元和姜黄素为配体,采用分子对接与SPR实验筛选能治疗RA并能与CNR2结合的天麻-附子黄酮酚活性成分。

1 材料

1.1 主要药物 大豆苷元(RP210817)、大豆苷(RP220910)和姜黄素(RP220331)购自成都麦德生科技有限公司。

1.2 主要试剂 DMSO(472301, Sigma-Aldrich), PBS(SNB-001,广州尚恩科技股份有限公司),CNR1-VLP蛋白(HY-P700408, MCE),CNR2-VLP蛋白(HY-P700636, MCE)。

1.3 主要仪器 生物分子相互作用仪(Biacore S200, Cytiva),S系列L1传感芯片(29104993, cytiva)。

2 方法

2.1 结构准备 首先,天麻-附子药对水煎液制备方法及非靶向UPLC-MS分析方法详见课题组发表文献[21]。经非靶向UPLC-MS代谢组学技术获取天麻-附子药对水煎液中3种黄酮酚小分子化合物,即大豆苷、大豆苷元和姜黄素,并经Pubchem数据库(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)获取此化合物的2D结构(".sdf"格式),确定为配体。此外,从PDB数据库(https://www.rcsb.org/)中获取CNR1(PDB code:6kpg)、CNR2(PDB code:6kpf)的3D结构(".pdb"格式),并删除其原始配体,确定为受体。

2.2 基于虚拟筛选的分子对接 3种黄酮酚小分子化合物与上述蛋白活性位点经WeMol工作平台(https://wemol.wecomput.com/)的AutoDock-GPU模块进行虚拟筛选的刚性分子对接。CNR1活性口袋(Box Center x=104.227、y=144.955、z=134.263, Box Size x=40、y=40、z=40)与3种黄酮酚小分子化合物提交至平台进行分子对接;同理,CNR2活性口袋(Box Center x=109.651、y=109.02、z=126.81, Box Size x=40、y=40、z=40)与3种黄酮酚小分子化合物提交至平台进行分子对接。一般来说,对接结合能≤-7 kcal/mol,配体与受体结合力高[23]。最后,采用Pymol软件绘制可视化的最佳匹配结果图。

2.3 药动学、类药性及毒性预测 上述3种黄酮酚小分子化合物,根据WeMol工作平台的药动学及毒性预测(Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity prediction, ADMET Prediction)模块对其中的化合物进行药动学性质预测,获取脑-血流比值以及与核受体、应激相关靶点的毒性。然后,根据类药性规则,采用平台的类药性模块预测化合物的类药性。

2.4 分子动力学模拟 GROMACS是用于化学模拟的Groningen Machine的缩写[24-25]。GROMACS最初是由荷兰格罗宁根大学开发,目前主要由瑞典乌萨拉大学、斯德哥尔摩大学和德国的马普学会高分子研究所维护和管理。它开创了分子动力学模拟的先河,成为迄今为止应用很广泛的动力学模拟软件之一[24-25]。

上述3种黄酮酚小分子化合物分别与CNR1或CNR2的复合物,进行基于Gromacs的全自动分子动力学模拟流程(https://wemol.wecomput.com/)。流程包括pdb结构处理,蛋白质质子化处理,蛋白参数化,小分子参数化,溶剂化,分子动力学模拟,轨迹生成,波动分析以及结合自由能计算。每一配体-受体复合物总的运行模拟时间为150 ns。所有模拟轨迹用于分析均方根偏差(Root Mean Square Deviation,RMSD)和标准差波动性(Root Mean Square Fluctuation,RMSF)。最后,使用分子力学泊松玻尔兹曼表面积(Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area,MMPBSA)模块计算配体-受体复合物的结合自由能,计算公式如下:

$$G_{bind} = G_{complex} - (G_{receptor} + G_{ligand})$$

2.5 SPR实验 Biacore S200系统用于测量大豆苷元、大豆苷和姜黄素与CNR1或CNR2结合的亲和力。在测量这些物质亲和力之前,配置5% DMSO浓度校正曲线,通过Biacore S200启动试剂验证。SPR实验步骤包含3步,比如固定、结合分析和再生成。对于固定,CNR1或CNR2(1 mg/mL)蛋白通过胺偶联结合到S系列L1传感芯片上。注射时间设置为7 min。对于结合分析,10 mmol小分子液体(大豆苷元或大豆苷或姜黄素)被1.05×PBS-P稀释至500 μmol浓度的含有小分子的5% DMSO溶液。然后,使用含有5% DMSO的运行缓冲液将此溶液进一步稀释至100 μmol高注射浓度。随后,进一步分别稀释至50、25、12.5、6.25、3.125 μmol浓度的溶液。最后,测试小分子以流速30 μL/min、时间2 min流入S系列L1传感芯片,与芯片上提前负载的CNR1-VLP或CNR2-VLP蛋白结合。对于再生成,在测试反应之后,S系列L1传感芯片用50 μL/mL运行缓冲液再生成10 min。

2.6 统计学方法 采用PRIM 6.0统计软件,计量数据以$\bar{x} \pm s$表示,组间进行单因素方差分析,方差齐则采用LSD进行比较,方差不齐则采用秩和检验,$P < 0.05$为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 祛风通络药对天麻-附子水煎液中3种黄酮酚小分子化合物药动学性质及类药性预测 表1显示了3种黄酮酚小分子化合物的脑-血流比值以及与核受体、应激相关靶点的毒性。根据类药性规则,大豆苷、大豆苷元与姜黄素均符合类药4原则[26],即分子量小于500 g/mol、脂/水分配系数小于5、氢键结合受体数量小于10、氢键结合供体数量小于5等,提示此化合物水溶性好,易通过细胞膜产生药效作用。其中,大豆苷元存在核受体与应激相关毒性。插页XXXⅦ图1显示,大豆苷、大豆苷元和姜黄素在天麻-附子药对1∶1、2∶3、3∶2各剂量比水煎液样本中的相对含量存在差异性,提示3种黄酮酚化合物源于祛风通络药对天麻-附子。此3种黄酮酚小分子化合物与CNR1、CNR2结合的情况见表2。

3.2 基于虚拟筛选的分子对接 分子对接主要用于测量小分子化合物与大麻素受体结合的亲和力和作用类型。表2结果显示,大豆苷、大豆苷元和姜黄素等3个黄酮酚小分子化合物与大麻素受体2的结合能均低于-7.0 kcal/mol,并分别低于与大麻素受体1的结合能,提示了3种黄酮酚小分子化合物与CNR2结合的稳定性高于CNR1。

然而,大豆苷与大豆苷元的化学结构仅一个糖基的差异,从而导致与CNR2结合氨基酸的差异。从表1结果可知,大豆苷不具有核受体和应激反应相关毒性,大豆苷元则具有核受体和应激反应相关毒性。因此,大豆苷具有高效低毒的效应。除了结合能之外,精确的相互作用有助于评价配体-受体复合物的稳定性。周围的氨基酸残基可通过非共价相互作用结合配体,比如氢键、pi-pi相互作用等。

从插页XXXⅧ图2a、b、c中可知,大豆苷与CNR2结合形成了3个pi-pi相互作用(涉及氨基酸残基为Phe183,Phe91和Tyr25),同时也与CNR2关键氨基酸残基Ser285、Tyr25形成了2个氢键结合(大豆苷-OH·Ser285-O、大豆苷-OH·Tyr25-O);姜黄素与CNR2结合则形成了3个氢键结合(姜黄素-O·His95-NH、姜黄素-OH·Lys109-O和姜黄素-O·Cys288-SH)和2个pi-pi相互作用(涉及的氨基酸残基为Phe281和Ser90)。此外,大豆苷元与CNR2对接,形成2个氢键结合(大豆苷元-OH·Leu182-O和大豆苷元-OH·Lys109-O)。据发现,大豆苷-CNR2和姜黄素-CNR2的结合模式更接近CNR2激动剂AM12033和选择性CNR2激动剂HU-308与CNR的结合模式[6]。

从插页XXXⅨ图3a、b、c中可知,大豆苷与CNR1氨基酸残基Ile267和Thr297形成3个氢键结合;大豆苷与CNR1氨基酸残基Lys376形成一个氢键结合;姜黄素则与CNR1氨基酸残基Cys386和Ser173形成2个氢键结合。此后,进一步应用分子动力学模拟测试这些配体受体复合物的稳定性。

3.3 RMSD稳定性分析 RMSD值用于评价配体-受体复合物的结合稳定性[27-28]。通过计算分子动力学模拟运行时间150 ns内配体-受体复合物的RMSD均值,以比较配体与CNR1或CNR2结合稳定性的差异。插页XL图4结果显示,大豆苷-CNR2复合物RMSD曲线于100 ns基本达到平衡,大豆苷元-CNR2复合物RMSD曲线于100 ns基本达到平衡,姜黄素-CNR2复合物RMSD曲线于40 ns基本达到平衡,提示了大豆苷、大豆苷元和姜黄素-CNR2复合物的稳定性分别高

表1 药动学性质及类药性预测

化合物ID	化合物名称	分子式	保留时间/(min)	核受体相关毒性	应激相关毒性	脑/血流比值	分子量/(g/mol)	脂/水分配系数	氢键受体数目	氢键供体数目
107971	大豆苷 Daidzin	$C_{21}H_{20}O_9$	11.060 0	-	-	≥5∶1	416.40	0.34	9	5
5281708	大豆苷元 Daidzein	$C_{15}H_{10}O_4$	12.251 0	+	+	≥5∶1	254.24	2.87	4	2
969516	姜黄素 Curcumin	$C_{21}H_{20}O_6$	10.061 0	-	-	≥5∶1	368.40	3.37	6	2

注:"+"表示存在,"-"表示不存在,保留时间为非靶向UPLC-MS代谢组学技术所检测的3种黄酮酚化合物的特征值。

表2 基于分子对接虚拟筛选结果

化合物ID	化合物名称	与CNR1对接			与CNR2对接		
		结合能/(Kcal/mol)	相互作用的关键氨基酸残基	作用类型	结合能/(Kcal/mol)	相互作用的关键氨基酸残基	作用类型
107971	大豆苷 Daidzin	-7.9	Phe170, Phe268, Ile267, Thr197	Pi-Pi T-shaped Conventional hydrogen bond	-8.05	Ser285, Phe183, Phe91, Tyr25	Conventional hydrogen bond, Pi-Pi T-shaped
5281708	大豆苷元 Daidzein	-6.57	Phe177, Phe379, Lys376	Pi-Pi T-shaped, Pi-Pi Stacked Conventional hydrogen bond	-7.08	Lys109, Leu182	Conventional hydrogen bond
969516	姜黄素 Curcumin	-7.22	Phe268, Phe174, Ser173, Cys386	Pi-Pi T-shaped, Pi-Pi Stacked Conventional hydrogen bond	-8.07	Phe281, His95, Ser90, Cys288, Lys109	Conventional hydrogen bond, Pi-Pi T-shaped

于CNR1。

3.4 RMSF波动性分析 RMSF值用于分析配体-受体复合物在模拟过程中的波动性,根据插页XXXⅧ图2和插页XXXⅨ图3所示的氨基酸残基,大豆苷不仅与CNR1氨基酸残基Thr197氢键结合,而且与CNR2氨基酸残基Ser285氢键结合均出现了较低的波动性(RMSF<0.2 nm)。同样,姜黄素与CNR1氨基酸残基Ser173氢键结合,而且与CNR2氨基酸残基Cys288氢键结合也出现了较低的波动性(RMSF<0.2 nm),提示了此2种化合物与CNR结合后使关键氨基酸残基更加稳定,有利于配体与受体的相互作用[29]。然而,大豆苷元与CNR形成氢键结合和pi-pi相互作用的氨基酸残基的RMSF值均大于0.2 nm,因此,大豆苷、姜黄素与CNR的结合较大豆苷元更加稳定。

表3 配体-受体复合物RMSD均值比较

化合物ID	化合物名称	配体-CNR1复合物的RMSD值 RMSD/(nm)	配体-CNR2复合物的RMSD值 RMSD/(nm)
107971	大豆苷	0.558 2±0.003 9	0.380 8±0.002 6
5281708	大豆苷元	0.502 2±0.004 1	0.458 5±0.003 9
969516	姜黄素	0.394 9±0.002 8	0.454 4±0.003 2

3.5 MM-PBSA结合自由能分析 如3.3所述,大豆苷-CNR2、大豆苷元-CNR2以及姜黄素-CNR2结合较稳定,且结合自由能均为负值。一般来说,结合自由能数值越小,表示结合所需的能量越低,更有利于配体与受体的结合。此结合自由能进一步验证了分子对接和分子动力学模拟的结果。

3.6 SPR实验结果分析 SPR实验是验证配体-受体复合物稳定性的主要方法之一。SPR实验结果表明,大豆苷分别与CNR1、CNR2结合的值为19.67 μmol和10.19 μmol,提示了大豆苷与CNR2结合的稳定性高于大豆苷与CNR1的结合。大豆苷与CNR1或CNR2结合的传感曲线见插页XL图5。此外,本研究也通过SPR实验发现,大豆苷元、姜黄素与CNR1和CNR2均无结合。因此,课题组推测大豆苷是天麻-附子通过结合CNR2治疗类风湿性关节炎的主要活性成分。

4 讨论

大麻素受体2主要表达于RA患者滑膜组织和成纤维样滑膜细胞[30]。通过激动大麻素受体2,具有免疫调节和抗炎效应,可减少炎症因子的释放[30]。因此,大麻素受体2成为抗炎抗风湿药物的潜在靶点。长期以来,天麻-附子作为中药复方的配伍应用于类风湿性关节炎痹证的治疗。前期研究发现,天麻-附子水煎液可抑制COX-2介导的炎症介质前列腺素的释放[31],但是对激动大麻素受体2所致的COX-2 mRNA表达作用不明。因此,本研究对照能与CNR2形成pi-pi相互作用和氢键结合的氨基酸残基,比如Phe183、Phe281、Phe94、Phe91、His95、Ser285、Phe117等[6],经UPLC-MS非靶向代谢组与分子对接虚拟筛选出3种黄酮酚小分子化合物能与CNR结合。分子动力学模拟结果进一步表明,大豆苷-CNR2、大豆苷元-CNR2和姜黄素-CNR2复合物结合较稳定。

WE GE-JIN等研究表明,大豆苷可通过抑制NF-κB配体受体激活(Receptor activator of nuclear factor κ-B ligand, RANKL)所诱导的破骨细胞分化,防止骨吸收和骨量丢失,是RA等溶骨性疾病的一种具有研究前景的天然药物活性成分[32]。首先,大豆苷、大豆苷元是从豆科植物中发现的天然异黄酮活性成分,具有抗癌、抗菌、抗炎、防治心血管疾病和骨质疏松症等药理作用[31-33]。其次,大豆苷元的抗炎效应可通过抑制诱导型一氧化氮合成酶(Inducible nitric oxide synthase, iNOS)和COX-2所介导,从而减少炎症细胞因子的释放[34-35],这与前期代谢组学和网络药理学研究的结论相一致[21]。经SPR实验验证,大豆苷与CNR2结合的稳定性高于大豆苷与CNR1的结合,可成为激动CNR2而具有抗炎抗风湿作用的一种有前景的天然活性成分。但是,通过SPR实验验证,大豆苷元、姜黄素与CNR无结合作用。

5 结论

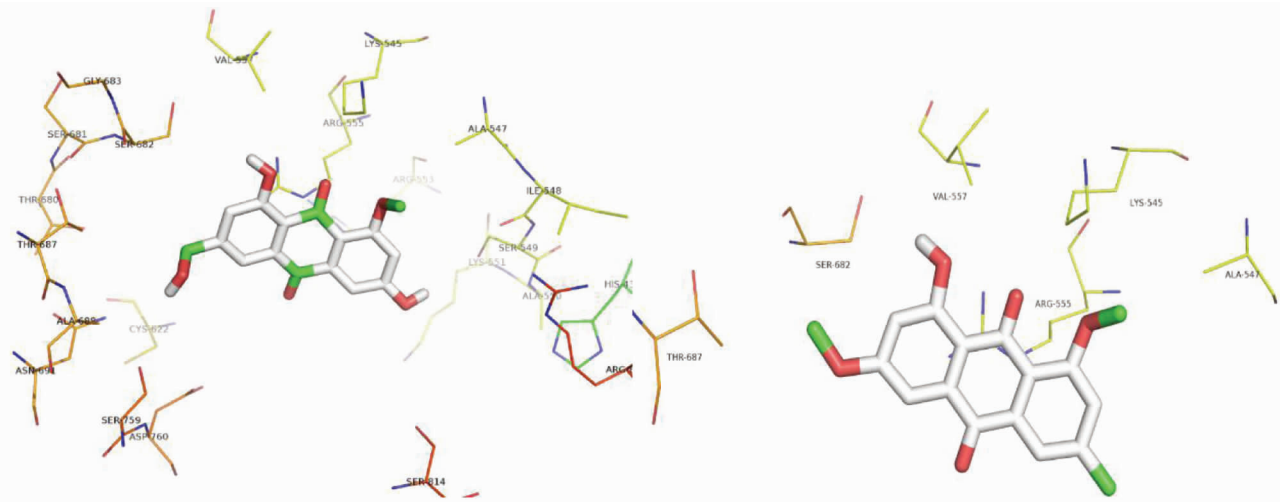
目前通过分子对接、分子动力学模拟及SPR实验筛选到与CNR2结合稳定性较高的天麻-附子活性成分大豆苷,后期还需通过多组学系统生物学技术对天麻-附子活性成分激动CNR2 mRNA和蛋白表达的程度进行验证。

参考文献

[1] ZHENG Y X, WEI K, JIANG P, et al. Macrophage polarization in rheumatoid arthritis: signaling pathways, metabolic reprogramming, and crosstalk with synovial fibroblasts[J]. Front Immunol, 2024, 15: 1394108.

[2] CHAPA-VILLARREAL F A, STEPHENS M, PAVLICIN R, et al.

Therapeutic delivery systems for rheumatoid arthritis based on hydrogel carriers[J]. Adv Drug Deliv Rev,2024,208: 115300.
[3] HUA T,VEMURI K,PU M C,et al. Crystal structure of the human cannabinoid receptor CB1[J]. Cell,2016,167(3): 750 - 762. e14.
[4] SHAO Z H,YIN J,CHAPMAN K,et al. High - resolution crystal structure of the human CB1 cannabinoid receptor[J]. Nature,2016,540(7634): 602 - 606.
[5] LI X T,HUA T,VEMURI K,et al. Crystal structure of the human cannabinoid receptor CB2[J]. Cell,2019,176(3): 459 - 467. e13.
[6] HUA T,LI X T,WU L J,et al. Activation and signaling mechanism revealed by cannabinoid receptor - gi complex structures[J]. Cell,2020,180(4): 655 - 665. e18.
[7] ISMAIL M,KHAWAJA G. Cannabinoid receptor 2 gene polymorphism and the risk of developing rheumatoid arthritis in Lebanese patients[J]. Cannabis Cannabinoid Res,2024,9(6): e1597 - e1603.
[8] TIAN N,YANG C,DU Y,et al. Cannabinoid receptor 2 selective agonist ameliorates adjuvant - induced arthritis by modulating the balance between Treg and Th17 cells[J]. Front Pharmacol,2025,16: 1532518.
[9] AHMAD NAIKOO R,PAINULI R,AKHTER Z,et al. Cannabinoid receptor 2 (CB2) modulators: a patent review (2016 - 2024)[J]. Bioorg Chem,2024,153: 107775.
[10] BRYK M,STAROWICZ K. Cannabinoid - based therapy as a future for joint degeneration. Focus on the role of CB2 receptor in the arthritis progression and pain: an updated review[J]. Pharmacol Rep,2021,73(3): 681 - 699.
[11] CROCQ M A. History of cannabis and the endocannabinoid system[J]. Dialogues Clin Neurosci,2020,22(3): 223 - 228.
[12] KILARU A,CHAPMAN K D. The endocannabinoid system[J]. Essays Biochem,2020,64(3): 485 - 499.
[13] LU H C,MACKIE K. Review of the endocannabinoid system[J]. Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging,2021,6(6): 607 - 615.
[14] KAUR I,BEHL T,BUNGAU S,et al. The endocannabinoid signaling pathway as an emerging target in pharmacotherapy,earmarking mitigation of destructive events in rheumatoid arthritis[J]. Life Sci,2020,257: 118109.
[15] SPIERA R,KUWANA M,KHANNA D,et al. Efficacy and safety of lenabasum,a cannabinoid type 2 receptor agonist,in a phase 3 randomized trial in diffuse cutaneous systemic sclerosis[J]. Arthritis Rheumatol,2023,75(9): 1608 - 1618.
[16] SAPONARA I,ALOISIO CARUSO E,COFANO M,et al. Anti - inflammatory and anti - fibrotic effects of a mixture of polyphenols extracted from "navelina" orange in human hepa - RG and LX - 2 cells mediated by cannabinoid receptor 2[J]. Int J Mol Sci,2025,26(2): 512.
[17] HUANG S S,CHEN D Z,WU H,et al. Cannabinoid receptors are involved in the protective effect of a novel curcumin derivative C66 against CCl4 - induced liver fibrosis[J]. Eur J Pharmacol,2016,779: 22 - 30.
[18] 王宜艳,滕晶. 基于中医传承辅助系统的治疗中风病古方用药规律分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(21): 197 - 201.
[19] 彭代平,汤小虎,周瑞彬. 天麻祛风通络配伍用药规律的探析[J]. 云南中医学院学报,2016,39(4): 35 - 38,43.
[20] 赖张凤,汤小虎,简旖沫. 天麻祛风通络配伍在痹病中的运用[J]. 中国中医基础医学杂志,2016,22(6): 856 - 859.
[21] YANG J,ZHANG Y,LI W H,et al. Assessment of the anti - rheumatoid arthritis activity of Gastrodia elata (Tian - ma) and Radix aconitic lateralis preparata (fu - zi) via network pharmacology and untargeted metabolomics analyses[J]. Int J Rheum Dis,2021,24(3): 380 - 390.
[22] HU Y C,HUANG T C,HUANG L W,et al. S - equol ameliorates menopausal osteoarthritis in rats through reducing oxidative stress and cartilage degradation[J]. Nutrients,2024,16(14): 2364.
[23] CHENG M H,LI M N,ZHANG Y M,et al. Exploring the mechanism of PPCPs on human metabolic diseases based on network toxicology and molecular docking[J]. Environ Int,2025,196: 109324.
[24] PARISE A,CRESCA S,MAGISTRATO A. Molecular dynamics simulations for the structure - based drug design: targeting small - GTPases proteins[J]. Expert Opin Drug Discov,2024,19(10): 1259 - 1279.
[25] PATEL A C,SINHA S,PALERMO G. Graph theory approaches for molecular dynamics simulations[J]. Q Rev Biophys,2024,57: e15.
[26] ALRUWAILI M,ELSAMAN T,MOHAMED M A,et al. Molecular docking,free energy calculations,ADMETox studies,DFT analysis,and dynamic simulations highlighting a chromene glycoside as a potential inhibitor of PknG in Mycobacterium tuberculosis[J]. Front Chem,2025,13: 1531152.
[27] HOZOORBAKHSH F,GHIASIAN M,GHANDEHARI F,et al. An immunoinformatic approach employing molecular docking and molecular dynamics simulation for evaluation of L - asparaginase produced by Bacillus velezensis[J]. J Biomol Struct Dyn,2023,41(18): 9057 - 9071.
[28] SINGH M B,SHARMA R,KUMAR D,et al. An understanding of coronavirus and exploring the molecular dynamics simulations to find promising candidates against the Mpro of nCoV to combat the COVID - 19: a systematic review[J]. J Infect Public Health,2022,15(11): 1326 - 1349.
[29] 刘小赟,潘敬灵,梁玉婷,等. 基于分子对接及分子动力学模拟的中药来源Ⅱ型5α - 还原酶抑制剂筛选[J]. 中草药,2020,51(10): 2819 - 2827.
[30] RANGARI V A,O'BRIEN E S,POWERS A S,et al. A cryptic pocket in CB1 drives peripheral and functional selectivity[J]. Nature,2025,640(8057): 265 - 273.
[31] 郭步伐,杨杰,彭启伦,等. 天麻 - 附子祛风通络药对抗类风湿性关节炎风寒湿痹症大鼠的干预机制[J]. 天然产物研究与开发,2020,32(5): 831 - 836.
[32] WEI G J,LIANG T H,WEI C M,et al. Daidzin inhibits RANKL - induced osteoclastogenesis in vitro and prevents LPS - induced bone loss in vivo[J]. J Cell Biochem,2019,120(4): 5304 - 5314.
[33] ZHU P P,QI M Z,YANG J H,et al. Anti - rheumatoid arthritis mechanism of Sophorae Tonkinesis Radix et Rhizoma based on network pharmacology and experimental verification[J]. China J Chin Mater Med,2022,47(19): 5327 - 5335.
[34] BERNATONIENE J,KAZLAUSKAITE J A,KOPUSTINSKIENE D M. Pleiotropic effects of isoflavones in inflammation and chronic degenerative diseases[J]. Int J Mol Sci,2021,22(11): 5656.
[35] ERDAYANDI G E,YILMAZ O,KERIMOGLU G,et al. Can intra - articular daidzein injection reduce oxidative damage and early osteoarthritis in a rabbit temporomandibular joint model? [J]. BMC Oral Health,2024,24(1): 1193.

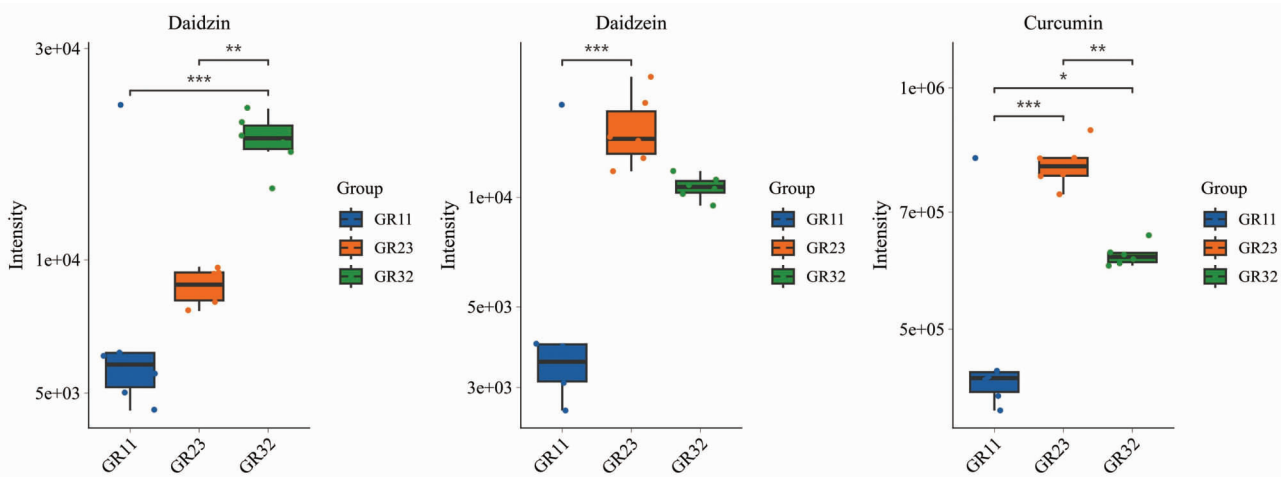


G. 化合物7与靶酶位点处氨基酸的相互作用　　H. 化合物8与靶酶位点处氨基酸的相互作用

图 2　化合物 1 – 8 与 RdRp 的 NTPs 通道处氨基酸的相互作用

基于分子对接与 SPR 实验研究祛风通络药对天麻 – 附子中黄酮酚化合物与 CNR 结合的亲和力

（正文见 242 – 246 页）



注：GR11 为天麻 – 附子药对 1∶1 剂量比水煎液样本；GR23 为天麻 – 附子药对 2∶3 剂量比水煎液样本；GR32 为天麻 – 附子药对 3∶2 剂量比水煎液样本。* 表示两组样本化合物相对含量比较差异有统计学意义，* * 表示 $P<0.01$，* * * 表示 $P<0.001$。

图 1　大豆苷（Daidzin）、大豆苷元（Daidzein）、姜黄素（Curcumin）在天麻 – 附子药对各剂量比水煎液样本中的相对含量

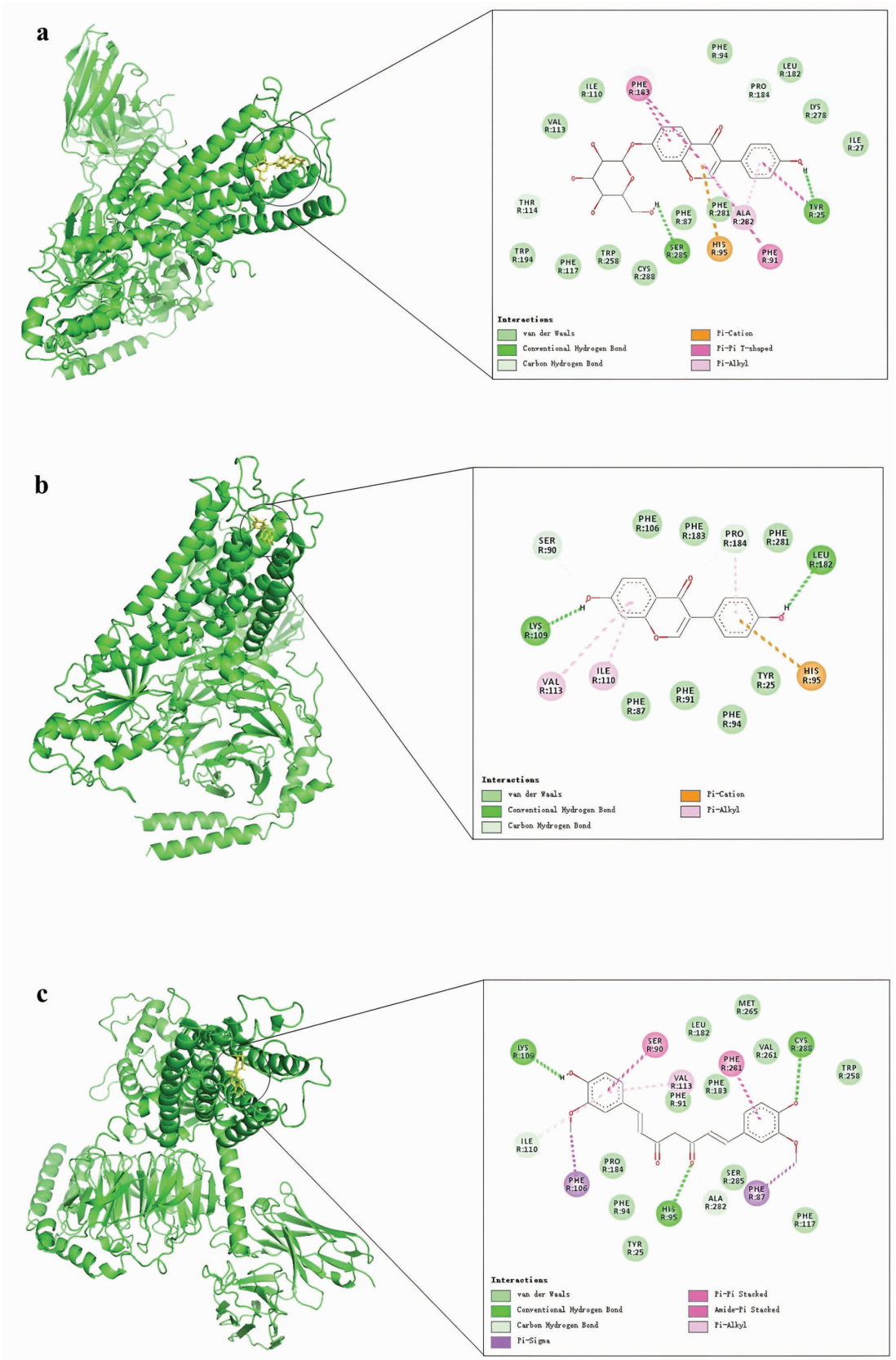


图 2 大豆苷(a)、大豆苷元(b)和姜黄素(c)与 CNR2 结合的 2D 和 3D 结构

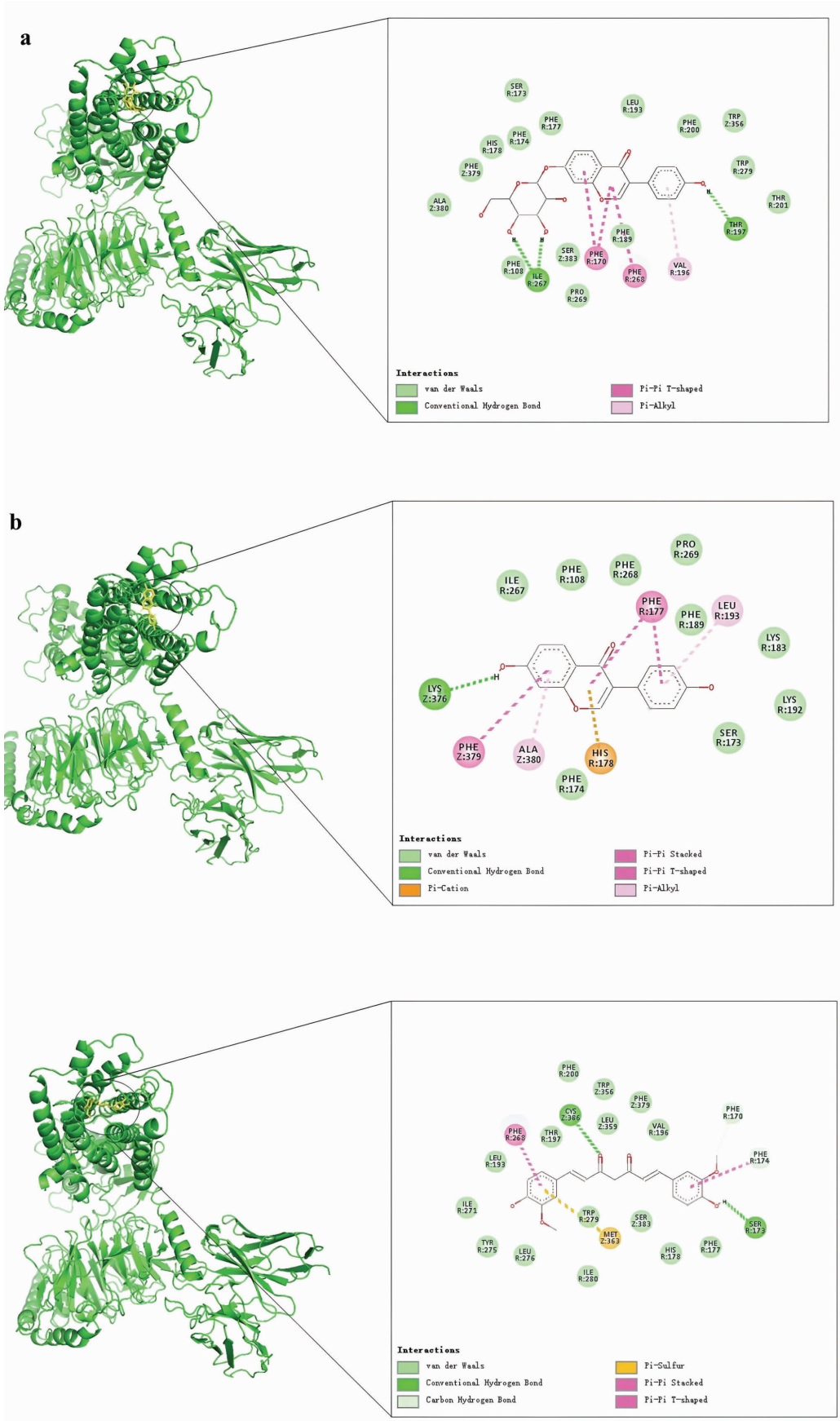


图 3 大豆苷(a)、大豆苷元(b)和姜黄素(c)与 CNR1 结合的 2D 和 3D 结构

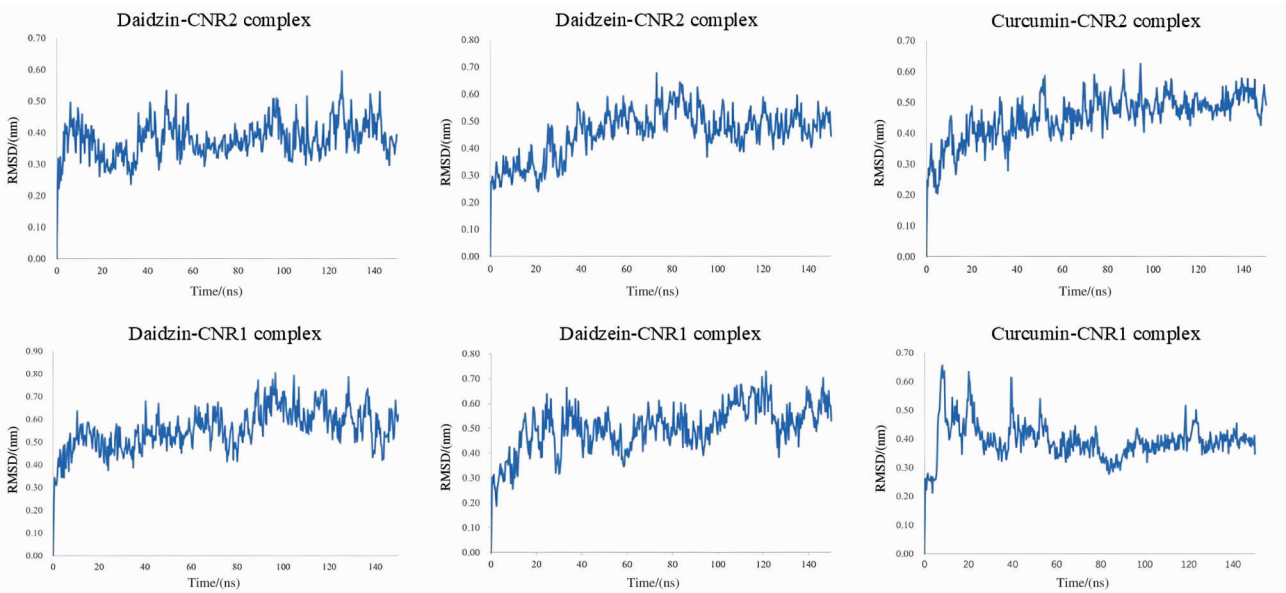
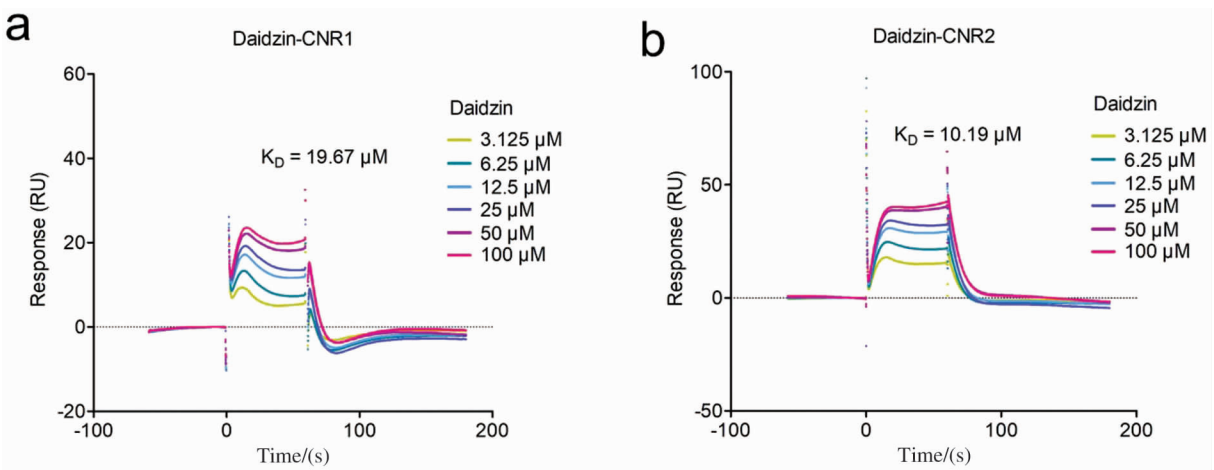


图 4　配体 – CNR1 或 CNR2 复合物氨基酸骨架原子随时间变化的 RMSD 值



注：大豆苷与 CNR1 结合的传感曲线的 χ^2 值为 0.743；大豆苷与 CNR2 结合的传感曲线的 χ^2 值为 2.13。

图 5　表面等离子共振法（SPR）检测大豆苷与 CNR1/2 蛋白结合的值