

·数字中医药·

本文引用: 李会影, 刘实琪, 李东慧, 张 烁, 姚雨轩, 苏 维, 罗 洁, 王 炜, 杨玉佩. 基于网络药理学研究瑶药黑老虎三萜类成分对类风湿关节炎的作用机制及试验验证[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(10): 1834-1844.

基于网络药理学研究瑶药黑老虎三萜类成分对 类风湿关节炎的作用机制及试验验证

李会影, 刘实琪, 李东慧, 张 烁, 姚雨轩, 苏 维, 罗 洁, 王 炜*, 杨玉佩*
湖南中医药大学中医药民族医药国际联合实验室, 湖南 长沙 410208

[摘要] **目的** 基于网络药理学和实验研究探讨瑶药黑老虎 *Kadsura coccinea* (Lem.) A.C. Smith 治疗类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的作用机制。**方法** 采用硅胶、C₁₈ 反相柱色谱及半制备高效液相分离技术对黑老虎的有效成分进行分离纯化; 采用波谱技术对分离得到的化合物进行结构鉴定; 通过 Swiss Target Prediction 数据库筛选黑老虎成分靶点, 在 GeneCards 数据库和 MalaCards 数据库挖掘 RA 相关靶点, 进而筛选黑老虎作用于 RA 的靶点; 制作蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络取其交集, 并通过 GO 分析和 KEGG 富集分析; 采用 MTT 试剂盒检测化合物对肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α 和白细胞介素 (interleukin, IL)-6 的释放情况, 以及蛋白免疫印迹实验对预测结果进行验证。**结果** 从黑老虎中提取分离出 6 个三萜类化合物, 分别鉴定为 heilaohuacid A (1), heilaohuacid G (2), seco-coccinic acid F (3), seco-coccinic acid G (4), schisandronic acid (5) 和 schisanlactone B (6)。MTT 实验结果是化合物 2, 3, 4, 6 能抑制 RA-FLS 细胞增殖, 其 IC₅₀ 值为 7.52~8.85 μmol 。6 个化合物在浓度为 10 μmol 和 20 μmol 时均能抑制炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的释放 ($P<0.05$, $P<0.01$)。网络药理学预测得到 109 个共同作用靶标, 通过与 691 个 RA 疾病相关靶标进行交集映射, 获得其干预 RA 靶标 38 个, 主要为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶、TNF、丝裂原活化蛋白激酶 1、前列腺素内过氧化物合酶 2、丝裂原活化蛋白激酶 14 等。GO 分析和 KEGG 富集分析得关键通路为白细胞介素 (interleukin, IL)-17 信号通路和 TNF 信号通路等。化合物 3 在浓度为 20 μmol 能上调核因子 κB 抑制因子 α (recombinant inhibitory subunit of NF kappa B- α , I κB - α) 的表达水平 ($P<0.05$)。**结论** 本研究从网络药理学角度预测瑶药黑老虎三萜成分治疗 RA 的作用机制, 初步证实其可上调 I κB - α 蛋白的表达, 为瑶药黑老虎治疗 RA 提供了科学依据。

[关键词] 瑶药; 黑老虎; 三萜; 类风湿关节炎; 网络药理学

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.10.017

Mechanism of action and experimental verification of triterpenoids from the Yao ethnomedicine *Kadsura coccinea* on the rheumatoid arthritis based on network pharmacology

LI Huiying, LIU Shiqi, LI Donghui, ZHANG Shuo, YAO Yuxuan, SU Wei, LUO Jie,
WANG Wei*, YANG Yupei*

TCM and Ethnomedicine Innovation & Development International Laboratory, School of Pharmacy, Hunan
University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism of action of the Yao ethnomedicine *Kadsura coccinea* (Lem.) A.C. Smith in

[收稿日期] 2024-06-18

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82174078); 湖南省自然科学基金青年项目 (2024JJ6344, 2024JJ6347); 2023 年度湖南省大学生创新创业训练计划一般项目 (S202310541070); 2023 年度大学本科科研创新基金项目 (2023BKS105)。

[通信作者] * 杨玉佩, 女, 博士, 讲师, E-mail: yangyupei24@163.com; 王 炜, 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, E-mail: wangwei402@hotmail.com。

treating rheumatoid arthritis (RA) based on network pharmacology and experimental research. **Methods** The active compounds of *Kadsura coccinea* were separated and purified by silica gel, C_{18} reversed-phase column chromatography, and semi-preparative high-performance liquid chromatography. The structures of the compounds obtained from the separation were identified using spectroscopic techniques. The targets of *Kadsura coccinea* components were screened through the Swiss Target Prediction database, and RA-related targets were excavated from the GeneCards and MalaCards databases to further identify the targets of *Kadsura coccinea* acting on RA. A protein-protein interaction (PPI) network was constructed to find the intersections, followed by GO analysis and KEGG enrichment analysis. The MTT (thiazolyl blue) assay kit was used to detect the release of tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-6 by the compounds, and the prediction results were verified through Western blot. **Results** Six triterpenoids were extracted and separated from *Kadsura coccinea* and identified as heilaohuacid A (1), heilaohuacid G (2), seco-coccinic acid F (3), seco-coccinic acid G (4), schisandronic acid (5), and schisanlactone B (6). The MTT assay results demonstrated that compounds 2, 3, 4, and 6 could inhibit the proliferation of RA-FLS cells, with IC_{50} values of 7.52~8.85 μmol . Six compounds suppressed the release of inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 at concentrations of 10 and 20 μmol ($P<0.05$, $P<0.01$). A total of 109 co-acting targets were predicted by network pharmacology, which were mapped against 691 RA-related targets to obtain 38 intervention targets for RA. These targets primarily included serine/threonine protein kinases, TNF, mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (COX-2), and mitogen-activated protein kinase 14 (MAPK14). The key pathways identified through GO analysis and KEGG enrichment analysis were interleukin (IL)-17 signaling pathway and the TNF signaling pathway. Compound 3 upregulated the expression level of recombinant inhibitory subunit of NF kappa B- α ($\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$) at a concentration of 20 μmol ($P<0.05$). **Conclusion** This study predicts the mechanism of action of the triterpenoid components of the Yao ethnomedicine *Kadsura coccinea* in treating RA from a network pharmacology perspective and initially confirms that it can upregulate the expression of $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ protein, offering a scientific basis for the use of *Kadsura coccinea* in RA treatment.

[**Keywords**] Yao ethnomedicine; *Kadsura coccinea*; triterpenoid; rheumatoid arthritis; network pharmacology

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种常见的慢性、高致残性自身免疫紊乱疾病,长期以来被认为是“不死的癌症”,其主要病理特点为关节滑膜炎、微血管的新生、血管翳的形成及软骨和骨组织的破坏等^[1]。RA常见的临床表现为关节僵直、肿胀、疼痛,随着疾病进展最终导致关节畸形及活动能力障碍,其病理特征表现为成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS)的异常增生,以及持续炎症反应,最终导致骨、关节破坏甚至功能障碍^[2-4]。研究表明,RA-FLS细胞具有过度增殖、抑制凋亡、过度炎症介质等肿瘤细胞特征^[5]。活化的RA-FLS细胞可诱导炎症细胞因子、趋化因子和基质降解分子的过度生产,包括肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素(interleukin, IL)-6、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP),促进免疫细胞浸润和软骨降解^[6-7]。此外,炎症细胞因子的过度表达也是RA发病的重要过程,如TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8在RA中大量存在^[8]。此外,在这些细胞因子中,IL-6和TNF- α 是维持炎症反应的重要介质^[9],进而诱导RA-FLS在RA发展过程中的侵袭性增殖。目前,常用的治疗药物有抗风湿药物、生

物制剂、糖皮质激素及非甾体抗炎药等,长期应用会引起胃肠道不适、肝损伤等严重不良反应^[10]。因此,从中药民族药物中寻找高效低毒的RA治疗药物,有很大的社会价值和现实意义。

RA属于瑶医“风敌病”范畴,是由于风、寒、湿邪侵袭人体筋脉,导致脉络不通,盈亏失调;或由风邪侵袭机体,湿热毒邪郁积体内而化热所致^[11]。临床表现为肌肉筋骨关节等处疼痛、肿胀、关节变形、活动屈伸不利等症^[12]。瑶医在辨别人体盈亏状态的基础上选择药物,遵循“风亏打盈”的原则,即“盈则消之,亏则补之”,通过药物调整人体“盈亏平衡”,使天、地、人三元和谐,达到治愈疾病的目的^[13]。瑶医依据药物的“风打”属性选择治疗“风敌病”的药物,如104味老班药中的“十八钻”属于“风打相兼药”,“钻”类药物性能强劲、通达经络,多为行气止痛、散瘀消肿之药,用于治疗风湿痹痛、筋骨痛、腰腿痛、跌打损伤等疾病临床疗效显著^[14]。

黑老虎,瑶药俗称“大钻”,为“风打相兼药”中的“十八钻”之一,来源于五味子科南五味子属植物冷饭团 *Kadsura coccinea* (Lem.) A.C. Smith的根,主要分布于我国的广西、湖南、四川、贵州、云南、海南

等省。其味辛、微苦,性温,归肝、脾经,具有行气活血、祛风活络、散瘀止痛之效^[15-16]。黑老虎在瑶族医药中具有显著的抗 RA 效果^[17],如舒筋风湿酒(黑老虎酒)其组方中主要含有黑老虎。目前,关于瑶药黑老虎治疗 RA 的药效物质基础及作用机制研究较少。

本研究拟基于化学成分研究和网络药理学从多靶点、多角度、多途径揭示瑶药黑老虎对治疗 RA 的潜在分子机制,并结合细胞实验验证瑶药黑老虎活性成分抗 RA 的作用,以期瑶药黑老虎临床治疗 RA 的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

核磁共振波谱仪(德国布鲁克集团公司,型号: Bruker AV-600);四级杆飞行时间质谱仪(美国沃特世公司,型号: Xevo G2-S QTof); Agilent 1260 液相色谱、酶标仪(美国安捷伦公司,型号: 1260 Infinity II、800TS-SN);分析天平(梅特勒-托利多国际股份有限公司,型号: MS204TS);高速低温离心机(德国艾本德股份公司,型号: 5418R);超纯水系统(英国埃尔格纯净水技术有限公司,型号: FLB00003057);生物安全柜美国、细胞培养箱(赛默飞世尔科学技术有限公司,型号: 1300、8000);制冰机(日本三洋电机有限公司,型号: AF-200);生物光学显微镜[尼康仪器(上海)有限公司,型号: ECLIPSE Ni-U];凝胶成像系统(上海天能科技有限公司,型号: Tanon 5200);柱色谱填料(青岛海洋化工有限公司,型号: 柱层析硅胶 H);葡聚糖凝胶(香港 GE 医疗公司,型号: Sephadex LH-20)。

氘代试剂(剑桥同位素实验室有限公司,批号: PR-29017/082117AC1);二氯甲烷、乙酸乙酯、乙醇、甲醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司,批号: P2219111、P2382556、20221130、20221223);甲醇、乙腈(色谱纯,上海西格玛奥德里奇贸易有限公司,批号: 57-56-1、75-05-8);核因子 κ B 抑制因子 α (recombinant inhibitory subunit of NF kappa B- α , I κ B- α) 抗体、 β -actin 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号: 10268-1-AP、20536-1-AP);山羊抗兔二抗、小鼠 TNF- α 检测试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号: E-AB-1003、FU104FFZ5209);Super ECL 化学发光检测试剂盒(美国 Advansta 公司,批

号: 240227-60);Easy PAGE 彩色快速凝胶配制试剂盒[赛文(创新)北京生物,批号: 24AD0200];BCA 蛋白定量试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号: 240006016);小鼠 IL-6 检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号: 132171181220)。

1.2 药材

黑老虎根于 2015 年 7 月被收集于湖南省怀化市(N26°16',E109°79'),经湖南中医药大学药学院王炜教授鉴定为五味子科 Schisandraceae 南五味子属 *Kadsura* 植物冷饭团 *Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith 的干燥根。药材目前保存于湖南中医药大学中医药民族医药国际联合实验室,药材标本编号为 2015071501。

1.3 提取和分离

瑶药黑老虎干燥根 200 kg,先用乙醇浸泡 1 h,再依次用 5 倍量、4 倍量的 80%乙醇回流提取 2 h,过滤收集提取液,在 60 °C 条件下减压浓缩蒸干,得到乙醇浸膏 5.3 kg;将 3 kg 乙醇浸膏用 5 L 蒸馏水分散后,依次用 5 L 石油醚、5 L 氯仿、5 L 乙酸乙酯和 5 L 正丁醇分别进行 3 次萃取,得到石油醚萃取部位浸膏 181.3 g、二氯甲烷萃取部位浸膏 1 225.5 g、乙酸乙酯萃取部位浸膏 562.9 g、正丁醇萃取部位浸膏 655.8 g。将二氯甲烷萃取部位浸膏(945 g)经硅胶柱色谱环己烷-乙酸乙酯(体积比为 80:1、20:1、10:1、5:1、1:1、0:1)梯度洗脱后,经 TLC 分析合并相同流分,得 12 个主要流分(Fr.1-Fr.12)。Fr.3 经反复硅胶柱层析、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱以及制备液相分离纯化得到化合物 **2**(5.2 mg)、**5**(15.0 mg)、**3**(2.0 g);Fr.4 经过重结晶得到化合物 **4**(12.0 g);Fr.9 经反复硅胶柱层析和葡聚糖凝胶柱色谱以及制备液相分离、纯化得到化合物 **1**(5 mg)和 **6**(8 mg)。

2 网络药理学分析

2.1 黑老虎中活性三萜类化合物靶点预测

根据体外抗 RA-FLS 细胞增殖和抗炎活性筛选结果,选择化合物 **1-6** 进行靶点预测分析。各化合物结构优化后以 sdf 格式上传至 Swiss Target Prediction(<https://www.swisstargetprediction.ch/>)在线平台进行筛选,筛选条件限定为“Homo sapiens”,消除重复内容,最终得到全部活性化合物的靶点基因。

2.2 RA 疾病相关靶点基因收集

在 GeneCards 数据库 (<http://www.genecards.org/>) 和 MalaCards 数据库 (<https://www.malacards.org/>) 中搜索 RA 的潜在治疗靶点。搜索词为“rheumatoid arthritis”, 使用条件为“gene”和“Homo sapiens”进一步过滤。将两个数据库的全部疾病基因进行合并, 确定为最终的 RA 疾病相关靶点基因。

2.3 RA 疾病与活性化合物靶点韦恩图

使用微生信网页 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 制作黑老虎三萜类活性化合物靶点基因与 RA 相关靶点基因的韦恩图, 得到重叠的靶点, 即黑老虎三萜类活性化合物治疗 RA 的潜在关键作用靶点基因。

2.4 构建黑老虎治疗 RA 的蛋白质-蛋白质相互作用网络

将黑老虎三萜类成分治疗 RA 的关键作用靶点上传到 STRING 数据库 (<https://string-db.org/cgi/input.pl>), 获得蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction networks, PPI) 网络, 再使用 Cytoscape V3.6.0 软件对 PPI 网络进行分析及可视化处理。

2.5 GO 及 KEGG 富集分析及可视化

将从 PPI 网络下载得到的 GO 功能和 KEGG 信号通路富集数据使用微生信网页 (<https://string-db.org/cgi/input.pl>) 进行分析及可视化, 限定物种为“Homo sapiens”, 分别选择生物学过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 及 KEGG 进行富集分析。设置条件为 $P < 0.05$ 。

2.6 构建药物-活性成分-靶标-通路网络关系图

将药物黑老虎、三萜类活性化合物、治疗 RA 的潜在关键作用靶点基因以及 KEGG 富集的得到的前 20 条通路信息导入 Cytoscape 3.6.0 软件中, 从而构建“药物-活性成分-靶标-通路”网络关系图。并根据 Degree 值进行筛选, 得出黑老虎三萜类成分治疗 RA 中最关键的活性成分、关键作用靶点以及关键信号通路。

3 细胞实验验证

3.1 巨噬细胞 RAW 264.7 的培养

小鼠巨噬细胞样细胞系 RAW 264.7 购买于湖南富衡生物科技有限公司。RAW 264.7 细胞使用含有

10% FBS 和 1% 双抗 (100 U/mL 的青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 的链霉素) 的 DMEM 高糖培养基, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、湿度条件合适的培养箱中培养, 培养基 1~2 d 换液, 2~3 d 传代一次, 准备进一步实验。LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞检测上清液中的炎症因子。将 RAW 264.7 细胞用细胞刮刀从培养瓶中消化下来, 然后以 4 $^{\circ}\text{C}$ 、800 r/min 离心 5 min (离心半径 10 cm), 去除上清液, 用 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基稀释细胞液, 以每孔密度为 8 000 个/孔细胞数量的细胞悬液 100 μL 均匀种植在 96 孔板孔, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、湿度条件合适的培养箱中培养。

3.2 检测炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的表达水平

实验设置分组为正常组、模型组、化合物 1 (10、20 μmol)、化合物 2 (10、20 μmol)、化合物 3 (10、20 μmol)、化合物 4 (10、20 μmol)、化合物 5 (10、20 μmol)、化合物 6 (10、20 μmol)。待 24 孔板中的巨噬细胞 RAW 264.7 长满到 85% 时, 各组加入含药或空白培养基培养 24 h 后, 除正常组外, 其余组继续用 100 ng/mL 的 LPS 孵育细胞 4 h, 收集上清液, 以 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min 离心 10 min (离心半径 10 cm), 吸取上清液, 根据 TNF- α 和 IL-6 的 ELISA 试剂盒说明书进行检测, 在酶标仪的 570 nm 处检测 OD 值, 计算炎症因子的含量。

3.3 检测抑制 RA-FLS 细胞的增殖活性

化合物 1~6 对 RA-FLS 细胞的增殖抑制作用采用标准 MTT 测定方法。平行实验 3 次, 以吲哚美辛为阳性对照。实验设置分组为正常组、吲哚美辛组 (2.5、5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$)、化合物 1 (2.5、5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$)、化合物 2 (2.5、5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$)、化合物 3 (2.5、5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$)、化合物 4 (2.5、5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$)、化合物 5 (2.5、5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$)、化合物 6 (2.5、5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$) 用药物孵育 48 h 后的 RA-FLS 细胞, 弃去培养液, 用 1 \times PBS 清洗 2 次, 随后用含 10% MTT 的无血清 DMEM/F-12 培养基继续培养 4 h 后, 弃去培养液, 每孔加入 100 μL 的 DMSO, 放置摇床上充分溶解结晶紫。在酶标仪上, 以 492 nm 的波长检测 OD 值。根据以下公式计算不同化合物的细胞存活率, 细胞存活率 (%) = (药物组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (正常组 OD 值 - 空白组 OD 值) \times 100%。

3.4 分析蛋白免疫印迹实验

根据抑制 RA-FLS 细胞增殖实验结果,选择化合物 **3** 考察对 TNF 信号通路上的 I κ B- α 蛋白的表达情况。实验设置分组为正常组、化合物 **3** (5、10、20 μ mol/L)。从 RA-FLS 细胞中提取的总蛋白经 10%SDS-PAGE 电泳分离后转移到 PVDF 膜上。将膜在 5%脱脂乳中室温封闭 1.5 h, 然后与一抗 I κ B- α (1:2 000) 和 β -actin (1:5 000) 在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。然后用二抗在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 h, 然后分别使用 ECL 和 Image J 软件对蛋白质条带进行可视化和定量分析。

3.5 统计学方法

用 GraphPad Prism 9.0 和 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,若满足正态性和方差齐性,则采用单因素方差分析;多重比较采用 LSD 法;若不符合正态分布或方差齐性,则采用非参数检验;以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

4 结果

4.1 结构鉴定

化合物 **1**: 白色非晶形粉末, HR-ESI-MS 测定其准分子离子峰 m/z : 491.314 3 [M+Na] $^{+}$ (计算值为 491.313 7, C₃₀H₄₄O₄Na $^{+}$); 1 H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 6.92 (1H, m, H-24), 6.21 (1H, d, H-7), 5.39 (1H, dd, H-6), 4.95 (1H, brs, H-28), 4.75 (1H, brs, H-28), 2.61 (1H, d, H-5), 2.41 (1H, m, H-9), 2.37 (1H, m, H-15), 2.29 (1H, m, H-2), 2.27 (1H, m, H-15), 2.26 (1H, m, H-23), 1.85 (1H, s, H-27), 1.78 (1H, s, H-29), 1.75 (1H, m, H-22), 1.69 (1H, m, H-12), 1.69 (1H, m, H-11), 1.67 (1H, m, H-20), 1.66 (1H, m, H-16), 1.63 (1H, m, H-12), 1.60 (1H, m, H-1), 1.56 (1H, m, H-11), 1.49 (1H, m, H-16), 1.24 (1H, m, H-22), 1.00 (1H, s, H-18), 0.86 (1H, s, H-19), 0.84 (1H, d, H-21), 0.65 (1H, s, H-30); 13 C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 181.5 (C-3), 173.9 (C-26), 147.2 (C-14), 145.9 (C-24), 145.4 (C-4), 127.4 (C-25), 126.5 (C-6), 125.4 (C-7), 124.9 (C-8), 115.5 (C-28), 50.6 (C-5), 49.4 (C-17), 47.5 (C-13), 39.5 (C-9), 37.1 (C-10), 36.5 (C-16), 36.4 (C-20), 32.3 (C-12), 30.3 (C-22), 29.9 (C-2), 28.4 (C-1), 26.1 (C-23), 24.8 (C-29),

23.9 (C-15), 21.8 (C-19), 21.6 (C-18), 19.7 (C-11), 15.7 (C-30), 14.7 (C-21), 12.1 (C-27)。以上数据与文献[18]一致,故鉴定为 heilaohuacid A。

化合物 **2**: 白色无定形粉末, HR-ESI-MS 测定其准分子离子峰 m/z : 437.341 7 [M-H] $^{-}$ (计算值为 437.342 0, C₃₀H₄₅O₂ $^{-}$); 1 H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 6.16 (1H, dd, H-23), 5.75 (1H, dd, H-24), 5.42 (1H, dd, H-22), 5.31 (1H, d, H-7), 4.88 (1H, brs, H-28), 4.82 (1H, brs, H-28), 2.58 (1H, m, H-9), 2.31 (1H, m, H-1), 2.26 (1H, m, H-6), 2.11 (1H, m, H-20), 2.08 (1H, d, H-5), 1.98 (1H, m, H-6), 1.85 (1H, m, H-12), 1.80 (1H, m, H-16), 1.80 (1H, s, H-29), 1.75 (1H, s, H-26), 1.74 (1H, s, H-27), 1.72 (1H, m, H-2), 1.66 (1H, m, H-12), 1.64 (1H, m, H-11), 1.60 (1H, m, H-2), 1.55 (1H, m, H-11), 1.54 (1H, m, H-17), 1.44 (1H, m, H-15), 1.20 (1H, m, H-16), 1.03 (1H, s, H-30), 1.00 (1H, d, H-21), 0.86 (1H, s, H-19), 0.78 (1H, s, H-18); 13 C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 179.2 (C-3), 149.9 (C-4), 146.7 (C-8), 138.7 (C-22), 132.9 (C-25), 125.4 (C-24), 124.4 (C-23), 118.0 (C-7), 112.1 (C-28), 53.0 (C-17), 51.8 (C-14), 45.5 (C-5), 43.8 (C-13), 40.6 (C-20), 38.8 (C-9), 36.5 (C-10), 34.2 (C-15), 33.9 (C-12), 29.8 (C-6), 29.0 (C-1), 28.9 (C-2), 28.7 (C-16), 27.6 (C-30), 26.1 (C-29), 26.1 (C-26), 24.2 (C-19), 22.0 (C-18), 20.4 (C-21), 18.7 (C-11), 18.4 (C-27)。以上数据与文献[19]一致,故鉴定为 heilaohuacid G。

化合物 **3**: 不定型无色粉末, HR-ESI-MS 测定其准分子离子峰 m/z : 463.353 8 [M+Na] $^{+}$ (计算值为 463.354 7, C₃₀H₄₈O₂Na $^{+}$); 1 H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 5.31 (1H, d, H-7), 5.23 (1H, m, H-24), 4.99 (1H, brs, H-28), 2.66 (1H, m, H-9), 2.55 (1H, m, H-1), 2.55 (1H, m, H-6), 2.38 (1H, m, H-6), 2.24 (1H, d, H-5), 2.12 (1H, m, H-23), 2.01 (1H, m, H-2), 1.96 (1H, m, H-23), 1.95 (1H, m, H-16), 1.91 (1H, m, H-2), 1.85 (1H, s, H-29), 1.81 (1H, m, H-12), 1.70 (1H, m, H-11), 1.70 (1H, s, H-26), 1.63 (1H, s, H-27), 1.54 (1H, m, H-11), 1.53 (1H, m, H-22), 1.52 (1H, m, H-15), 1.48 (1H, m, H-17), 1.47 (1H, m, H-12), 1.41

(1H, m, H-20), 1.29 (1H, m, H-16), 1.10 (1H, m, H-22), 1.06 (1H, s, H-30), 0.94 (1H, d, H-21), 0.93 (1H, s, H-19), 0.80 (1H, s, H-18); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 176.6 (C-3), 150.1 (C-4), 146.8 (C-8), 130.6 (C-25), 125.5 (C-24), 118.0 (C-7), 111.9 (C-28), 53.1 (C-17), 51.6 (C-14), 45.4 (C-5), 43.7 (C-13), 39.0 (C-9), 36.4 (C-10), 36.2 (C-22), 36.0 (C-20), 34.2 (C-15), 33.9 (C-12), 29.8 (C-6), 29.7 (C-1), 29.4 (C-2), 28.3 (C-16), 27.3 (C-30), 25.9 (C-29), 25.6 (C-26), 25.1 (C-23), 24.1 (C-19), 21.6 (C-18), 18.7 (C-11), 18.3 (C-21), 17.5 (C-27)。以上数据与文献[20]一致,故鉴定为 *seco-coccinic acid F*。

化合物 4: 不定型无色粉末, HR-ESI-MS 测定其准分子离子峰 m/z : 463.353 8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (计算值为 463.354 5, $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_2\text{Na}^+$); ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 5.10 (1H, t, H-24), 4.91 (1H, brs, H-28), 4.69 (1H, brs, H-28), 2.42 (1H, m, H-2), 2.13 (1H, m, H-5), 2.13 (1H, m, H-11), 2.08 (1H, m, H-23), 2.03 (1H, m, H-7), 2.02 (1H, m, H-1), 1.93 (1H, m, H-16), 1.93 (1H, m, H-11), 1.84 (1H, m, H-1), 1.77 (1H, s, H-29), 1.76 (1H, m, H-12), 1.69 (1H, s, H-26), 1.61 (1H, s, H-27), 1.60 (1H, m, H-15), 1.55 (1H, m, H-6), 1.50 (1H, m, H-17), 1.50 (1H, m, H-22), 1.42 (1H, m, H-20), 1.31 (1H, m, H-16), 1.20 (1H, m, H-15), 1.04 (1H, m, H-22), 0.97 (1H, s, H-30), 0.96 (1H, s, H-19), 0.92 (1H, d, H-21), 0.73 (1H, s, H-18); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 179.1 (C-3), 147.4 (C-4), 139.4 (C-8), 131.0 (C-9), 129.2 (C-25), 125.2 (C-24), 113.9 (C-28), 50.8 (C-14), 50.4 (C-17), 46.9 (C-5), 44.4 (C-13), 40.4 (C-10), 36.3 (C-20), 36.3 (C-22), 32.3 (C-1), 31.1 (C-12), 31.0 (C-15), 29.2 (C-2), 28.1 (C-16), 25.9 (C-7), 25.8 (C-26), 25.2 (C-23), 25.2 (C-30), 24.0 (C-6), 22.9 (C-29), 22.3 (C-19), 21.7 (C-11), 18.7 (C-21), 17.7 (C-27), 16.0 (C-18)。以上数据与文献[21]一致,故鉴定为 *seco-coccinic acid G*。

化合物 5: 不定型无色粉末, HR-ESI-MS 测定其准分子离子峰 m/z : 453.337 5 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (计算值为 453.336 9, $\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{O}_3^-$); ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3)

δ_{H} : 6.90 (1H, m, H-24), 2.29 (1H, m, H-2), 2.27 (1H, m, H-2), 2.27 (1H, m, H-11), 2.14 (1H, m, H-23), 2.05 (1H, m, H-16), 1.90 (1H, m, H-7), 1.87 (1H, m, H-15), 1.85 (1H, s, H-27), 1.72 (1H, m, H-5), 1.67 (1H, m, H-22), 1.60 (1H, m, H-17), 1.58 (1H, m, H-8), 1.57 (1H, m, H-20), 1.56 (1H, m, H-15), 1.56 (1H, m, H-6), 1.43 (1H, m, H-12), 1.38 (1H, m, H-23), 1.31 (1H, m, H-1), 1.29 (1H, m, H-7), 1.19 (1H, m, H-20), 1.10 (1H, s, H-30), 1.02 (1H, s, H-29), 1.00 (1H, s, H-18), 0.96 (1H, m, H-6), 0.92 (1H, d, H-21), 0.91 (1H, s, H-28), 0.78 (1H, m, H-19), 0.57 (1H, m, H-19); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 216.7 (C-3), 172.6 (C-26), 145.8 (C-24), 26.5 (C-25), 52.2 (C-17), 50.3 (C-4), 48.7 (C-14), 48.4 (C-5), 47.9 (C-8), 45.4 (C-13), 37.5 (C-2), 36.0 (C-12), 35.5 (C-1), 34.8 (C-20), 33.4 (C-15), 32.8 (C-22), 29.6 (C-19), 28.2 (C-7), 26.7 (C-16), 26.0 (C-10), 26.0 (C-11), 25.9 (C-23), 22.2 (C-29), 21.5 (C-6), 21.1 (C-9), 20.8 (C-30), 19.3 (C-28), 18.1 (C-18), 18.1 (C-21), 12.0 (C-27)。以上数据与文献[22]一致,故鉴定为 *schisandronic acid*。

化合物 6: 不定型无色粉末, HR-ESI-MS 测定其准分子离子峰 m/z : 465.300 9 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (计算值为 465.301 0, $\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{O}_4^-$); ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 6.61 (1H, d, H-24), 6.13 (1H, d, H-1), 5.96 (1H, d, H-2), 4.47 (1H, d, H-22), 2.42 (1H, m, H-5), 2.39 (1H, m, H-23), 2.10 (1H, m, H-23), 2.09 (1H, m, H-7), 2.05 (1H, m, H-20), 1.93 (1H, s, H-27), 1.86 (1H, m, H-19), 1.82 (1H, m, H-8), 1.78 (1H, m, H-11), 1.71 (1H, m, H-12), 1.64 (1H, m, H-7), 1.61 (1H, m, H-17), 1.49 (1H, m, H-6), 1.41 (1H, m, H-11), 1.39 (1H, s, H-29), 1.37 (1H, s, H-28), 1.36 (1H, m, H-16), 1.24 (1H, m, H-15), 1.21 (1H, m, H-6), 1.06 (1H, m, H-15), 1.00 (1H, s, H-18), 0.98 (1H, d, H-21), 0.91 (1H, s, H-30), 0.821 (1H, m, H-19); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 167.6 (C-3), 166.7 (C-26), 150.8 (C-1), 139.5 (C-24), 128.5 (C-25), 120.4 (C-2), 84.7 (C-4), 80.6 (C-22), 48.8 (C-14), 48.1 (C-17), 46.4 (C-5), 45.6 (C-13), 45.1 (C-8), 39.3 (C-20), 35.1 (C-16), 33.5

(C-9), 32.5 (C-12), 32.3 (C-15), 29.3 (C-29), 29.0 (C-7), 28.8 (C-10), 27.0 (C-11), 24.5 (C-6), 24.1 (C-19), 23.6 (C-23), 22.2 (C-28), 19.1 (C-30), 17.3 (C-18), 17.1 (C-27), 13.3 (C-21)。以上数据与文献[23]一致,故鉴定为 schisanlactone B。

4.2 网络药理学分析结果

4.2.1 黑老虎三萜类成分-RA 共有靶点的预测 将分离得到的 6 个黑老虎三萜类成分导入 Swiss Target Prediction 数据库中,靶标识别结果显示,6 个黑老虎三萜类成分作用靶点去重复后共有 109 个。通过检索在线疾病数据库 GeneCards 和 MalaCards,将两个数据库的全部疾病基因进行合并整理,设置分数 >5 ,确定最终的 RA 疾病相关靶点基因有 691 个。将 691 个疾病靶点与 109 个三萜类成分作用靶点进行交集,结果显示,交集靶基因共有 38 个。并构建韦恩图预测黑老虎三萜类成分-RA 共有靶点。详见图 1。

4.2.2 黑老虎三萜类成分-RA 共有靶点网络构建 利用 STRING 数据库对可能的 RA 治疗靶基因进行分析,获取其相互作用关系,借助 Cytoscape 3.6.0 构建 PPI 网络,该网络包含 38 个节点和 179 个边。对排序前 15 位的基因依次命名为蛋白激酶 B1(RAC-alpha serine/threonine-protein kinase B1, AKT1)(30)、TNF(25)、丝裂原激活蛋白激酶 1(mitogen-activated protein kinase, MAPK)1(23)、前列腺素内过氧化物合酶 2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)(22)、MAPK14(19)、热休克蛋白 90 α 家族 A 类成员 1(heat shock protein 90 alpha family class A member 1, HSP90AA1)(16)、雌激素受体 1(estrogen receptor1, ESR1)(16)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)(14)、蛋白酪氨酸磷酸酶受体 C 型(protein tyrosine phosphatase receptor type C, PTPRC)(14)、雄激素受体(androgen receptor, AR)(14)、孕激素受体(progesterone receptor, PGR)(13)、核受体亚家族 3C 组成员 1(nuclear receptor subfamily 3 group C member 1, NR3C1)(12)、基质金属蛋白酶 1(matrix metalloproteinase 1, MMP1)(11)、细胞色素 P450 家族 19 亚家族 A 成员 1(cytochrome P450 family 19 sub-

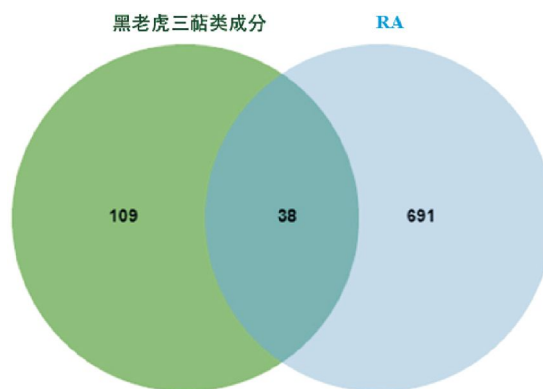


图 1 黑老虎三萜类成分-RA 共有靶点韦恩图

Fig.1 Venn diagram of shared targets between triterpenoids of *Kadsura coccinea* and RA

family A member 1, CYP19A1)(10)和诱导型一氧化氮合酶(nitric oxide synthase 2, NOS2)(10)。上述靶点在 PPI 网络中发挥重要作用,可能是黑老虎与 RA 关联的核心靶点。详见图 2。

4.2.3 黑老虎三萜类成分-RA 共有靶点的 GO 功能和 KEGG 富集分析 对 38 个可能的 RA 治疗靶点进行 GO 富集分析,以确定黑老虎治疗 RA 的相关生物学功能。GO 功能富集分析主要包括 BP、MF 和 CC 3 个方面;经过筛选,展示出富集到的 15 个 BP、3 个 CC 以及 10 个 MF,详见图 3。通过 KEGG 通路分析,确定黑老虎抗 RA 作用的相关信号通路,共筛选出 20 条排名最高的路径,主要包括 TNF 信号通路,IL-17 信号通路和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)信号通路等。详见图 3—4。

4.2.4 构建“药物-活性成分-靶标-通路”网络关系图 图中共有 75 个节点,构成 352 条相互作用关系,这体现了黑老虎多成分、多靶点、多通路的作用机制。药物-活性成分-靶标-通路网络通路结果显示,显著富集的 8 个关键靶点分别是 MAPK1、AKT1、MAPK14、TNF、PTGS2、NOS2、HSP90AA1 和 PRKCD。详见图 5。

4.3 炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的表达水平

与正常组对比,经过 LPS 诱导后 RAW 264.7 细胞上清液中炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的表达水平显著升高($P<0.01$)。与模型组相比,浓度为 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 20.0 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物 1~6 能抑制炎症因子 TNF- α 的表达($P<0.05$, $P<0.01$),化合物 1, 2, 5, 6 能显著抑制炎症因子 IL-6 的表达($P<0.01$)。详见图 6。

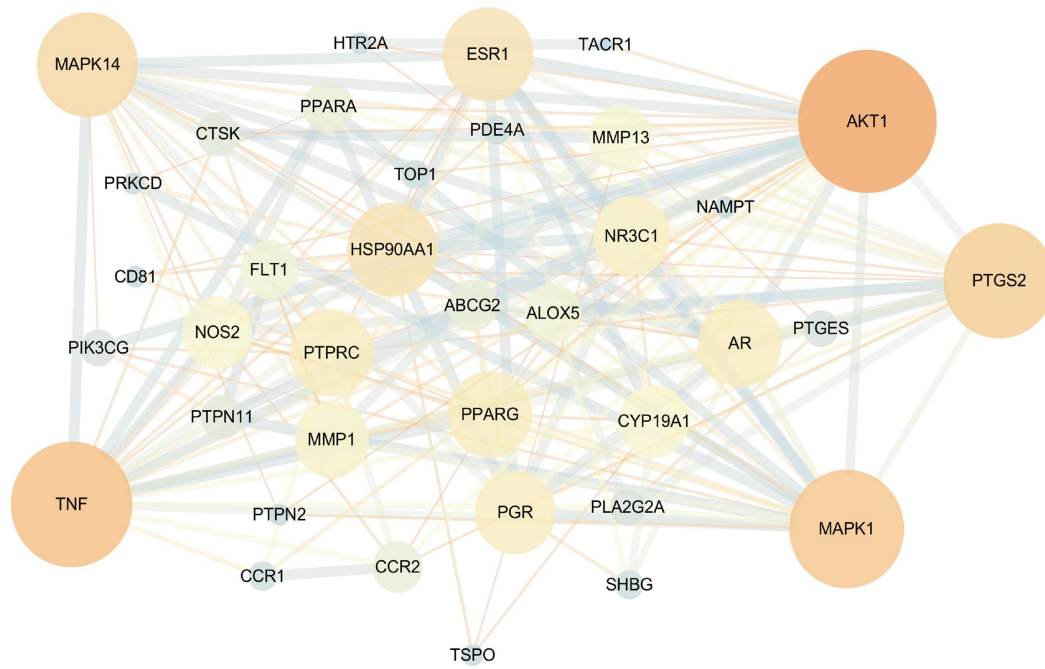


图 2 黑老虎三萜类成分-RA 共有靶点相互作用网络

Fig.2 Interaction network of shared targets between triterpenoid components of *Kadsura coccinea* and RA

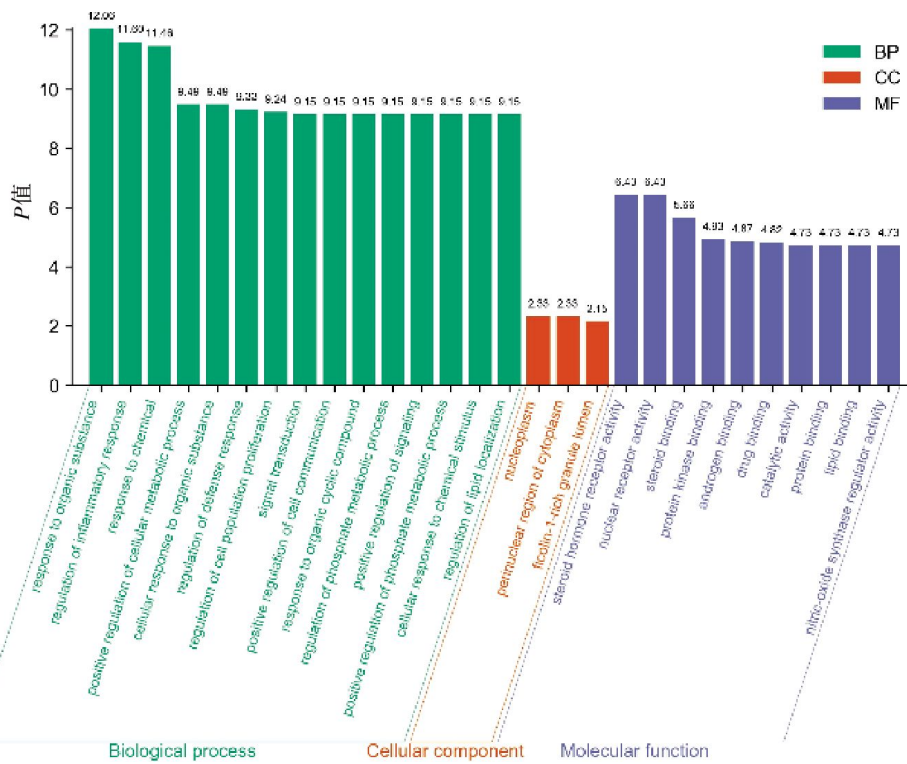


图 3 黑老虎三萜类成分-RA GO 功能富集分析

Fig.3 GO functional enrichment analysis of triterpenoid components of *Kadsura coccinea* and RA

4.4 抑制 RA 滑膜细胞的增殖活性

采用 MTT 法筛选分离得到 6 个化合物的抑制 RA-FLS 细胞增殖的活性,阳性对照药为吲哚美辛,结果显示化合物 2,3,4,6 展示出明显的抑制活性。详见表 1。

4.5 Western blot 实验结果

根据网络药理学研究结果,选择 IκB-α 蛋白进行作用机制的研究。在化合物 3 的作用下,与正常组相比,IκB-α 蛋白的表达水平升高($P<0.05, P<0.01$)。说明化合物 3 可能通过激活 IκB-α 蛋白的表达水

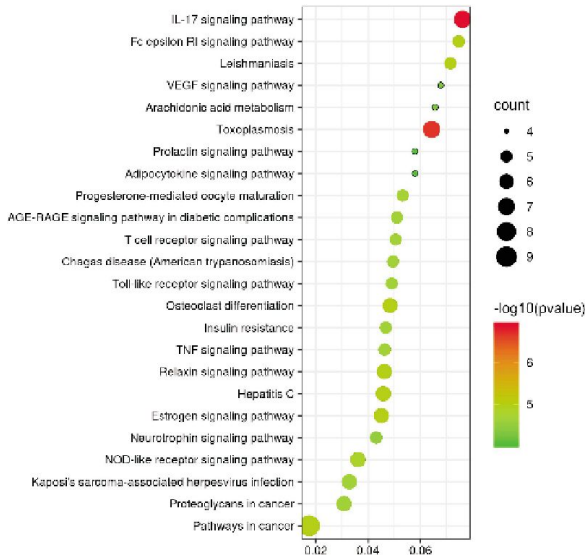


图 4 黑老虎三萜类成分-RA 共有靶点的 KEGG 通路富集分析

Fig.4 KEGG pathway enrichment analysis of triterpenoid components of *Kadsura coccinea* and RA

平来抑制 TNF 信号通路,从而发挥抗 RA 的作用。详见图 7。

5 讨论

RA 已成为医学领域中亟待解决的难题^[24],从中药中寻找安全、有效的抗 RA 药物来解决这一难题,具有重要的科学价值和社会意义。研究发现,黑老虎中的三萜类化合物具有很好的抗 RA 作用^[19]。ELISA 法检测化合物 1~6 对 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞产生炎症因子的表达水平的影响实验说明,黑老虎中的三萜类化合物能缓解 RA 中的炎症反应。结合 GO 功能和 KEGG 富集分析实验结果,提示黑老虎的靶点可能参与类固醇激素受体活性、核受体活性、类固醇结合等。本课题组认为,黑老虎是通过 TNF、IL-17 信号通路等多成分、多靶点、多信号通路的相互作用发挥抗炎作用,从而治疗 RA。

目前,研究表明,Th17 细胞在自身免疫中的作用,包括 RA,提示 Th17 细胞在 RA 的发病机制中可能扮演着重要的角色^[24]。其中,Th17 细胞免疫反应活跃,IL-6 驱动 Th17 细胞分化^[25],从而在自身免疫

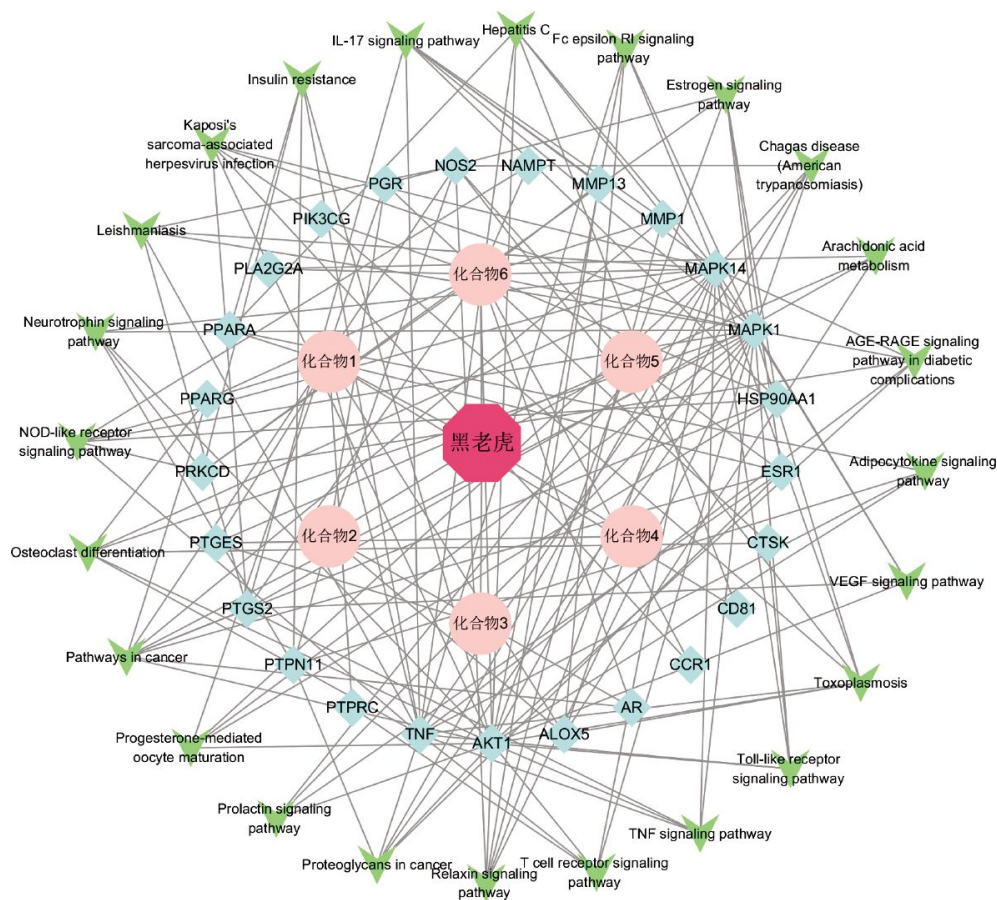


图 5 “药物-活性成分-靶标-通路”网络关系图

Fig.5 The "medicine-active compound-target-pathway" network relationship diagram
注:玫红色节点代表黑老虎,粉色节点代表活性三萜化合物,蓝色节点代表靶点,绿色节点代表通路。

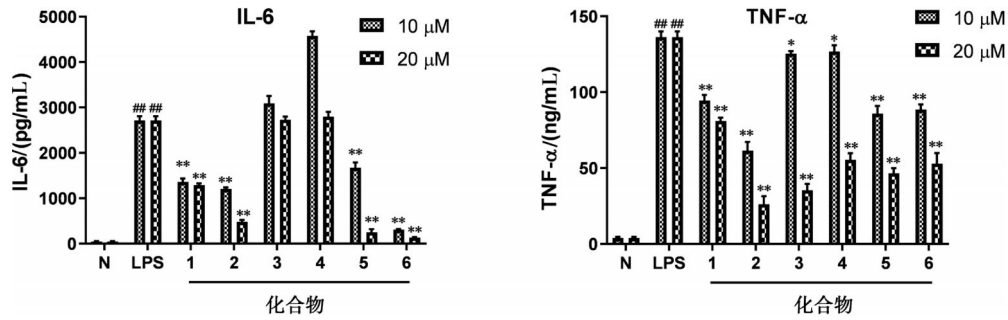


图 6 化合物 1~6 对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞中 IL-6 和 TNF- α 含量的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig.6 Effects of compounds 1~6 on IL-6 and TNF- α content in RAW 264.7 cells induced by LPS ($\bar{x}\pm s, n=3$)

注: N.正常组; LPS.模型组; 与正常组相比, # $P<0.01$; 与模型组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

表 1 抗 RA-FLS 细胞增殖活性化合物 IC₅₀ 值

Table 1 IC₅₀ value of active compounds with anti-proliferative activity against RA-FLS cells

化合物	IC ₅₀ / μ mol
1	8.16
3	7.52
4	8.85
6	7.97
吲哚美辛	4.10

疾病中发挥重要作用。IL-6 和 TNF- α 是 RA 骨病变中关键的促炎细胞因子^[27]。TNF- α 通过促进 NF- κ B 亚基 p65、p50 和 c-Rel 的核易位直接激活 NF- κ B 的经典途径^[27-29], 其中蛋白 I κ B- α 可以活化 I κ B 激酶复合体, 最终激活 NF- κ B, 诱导炎症细胞因子、趋化因子和基质金属蛋白酶的表达, 继而促进 RA 滑膜细胞增殖和活化, 软骨损伤, 最终导致关节破坏^[28]。结果表明, 黑老虎中三萜类化合物可能通过上调 I κ B- α 蛋白来抑制 NF- κ B 通路激活发挥抗 RA-FLS 细胞增殖和抗炎作用来改善 RA。

综上所述, 本研究基于瑶药黑老虎行气活血、祛风活络、散瘀止痛的功效, 采用网络药理学的方法研究黑老虎治疗 RA 的药效物质基础。在本研究中, 本课题组探讨了瑶药黑老虎三萜类成分对 RA 的作用机制, 并进行相关实验验证, 通过构建“药物-活性成分-靶标-通路”网络关系图并进一步结合蛋白免疫印迹实验, 明确了黑老虎活性三萜类成分通过抑制炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的释放, 上调 I κ B- α 蛋白的表达, 改善 RA, 其作用机制可能与 TNF 通路有关。然而, 研究结果仍存在一些限制性因素, 例如本课题组未能充分考虑其他可能影响药物作用的因素, 如个体的遗传差异、环境因素以及不同药物之间的相互作用。此外, 实验模型的选择也可能限制了结果的普遍适用性。本研究团队后续将进一步在佐剂诱导的关节炎或胶原诱导型关节炎大鼠动物模型中, 验证黑老虎三萜类成分的体内抗 RA 效果, 以及继续研究其他信号通路, 从而阐明瑶药黑老虎抗 RA 的作用机制, 并在临床上为黑老虎治疗 RA 的应用提供科学依据。

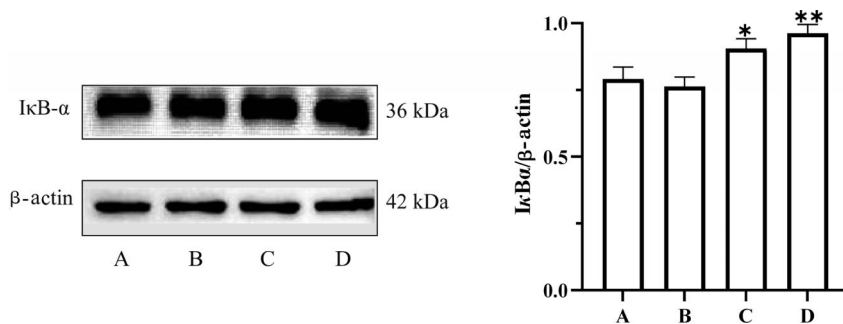


图 7 化合物 3 对 I κ B- α 蛋白的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig.7 Effects of compound 3 on I κ B- α protein ($\bar{x}\pm s, n=3$)

注: A.正常组; B.化合物 3 低浓度组; C.化合物 3 中浓度组; D.化合物 3 高浓度组。与正常组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

参考文献

- [1] 郭梦如, 杜星辰, 李 晖, 等. 类风湿关节炎达标治疗人群临床特点及风险因素评估预测模型建立与验证[J]. 中国中西医结合杂志, 2024, 44(6): 684-691.
- [2] NYGAARD G, FIRESTEIN G S. Restoring synovial homeostasis in rheumatoid arthritis by targeting fibroblast-like synoviocytes[J]. Nature Reviews Rheumatology, 2020, 16: 316-333.
- [3] 吴婧若, 步亚男, 岳进茹, 等. 独活寄生汤对 TNF- α 诱导的类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞增殖、凋亡和炎症的影响[J]. 中国药理学通报, 2024, 40(9): 1665-1673.
- [4] 吴晓东, 罗穆玲, 徐立峰, 等. 清热祛风汤联合常规治疗对热痹证老年类风湿性关节炎患者的临床疗效[J]. 中成药, 2024, 46(3): 1056-1059.
- [5] 肖剑伟, 蔡 旭, 黄新民, 等. 类风湿性关节炎患者滑膜组织 lncRNA HCP5 表达上调并与免疫细胞浸润相关[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2023, 39(5): 445-450.
- [6] 陆 婷, 蒋 总, 兰维娅, 等. GSK-3 介导的信号通路在类风湿性关节炎中的作用的研究进展[J]. 重庆医学, 2024, 53(3): 451-455.
- [7] 李 舒, 万 磊, 刘 健, 等. circCBLB 抑制类风湿性关节炎成纤维细胞样滑膜细胞增殖促进细胞凋亡并增加抗炎细胞因子水平[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2024, 40(2): 106-113.
- [8] 熊 浪, 蒋 总, 唐 芳, 等. 中医药调控肠道菌群从白细胞介素-6 治疗类风湿性关节炎的研究进展[J]. 世界中西医结合杂志, 2024, 19(2): 421-424.
- [9] YOKOTA K, SATO K, MIYAZAKI T, et al. Characterization and function of tumor necrosis factor and interleukin -6 -induced osteoclasts in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis & Rheumatology, 2021, 73(7): 1145-1154.
- [10] ZHAO J N, JIANG P, GUO S C, et al. Apoptosis, autophagy, NETosis, necroptosis, and pyroptosis mediated programmed cell death as targets for innovative therapy in rheumatoid arthritis[J]. Frontiers in Immunology, 2021, 12: 809806.
- [11] 付宇蕾, 秦黄冠, 宋欢欢, 等. 基于关联规则和聚类分析挖掘《广西民族医药验方汇编》治疗风湿病用药规律[J]. 中国中医基础医学杂志, 2023, 29(2): 261-264.
- [12] 燕慧峰. 中西医结合治疗老年风湿病临床效果观察[J]. 山西医药杂志, 2021, 50(19): 2792-2794.
- [13] 臧知明, 张 齐, 张 曼, 等. 瑶医药与中医药理论源流探析[J]. 广西民族大学学报(自然科学版), 2019, 25(4): 32-35.
- [14] 陆 延, 周红海, 蔡 毅, 等. 瑶医具有治疗骨伤科疾病的“老班药”药物特点分析[J]. 中药材, 2021, 44(4): 806-811.
- [15] 刘 健, 陶袁志, 吴沁昱, 等. 黑老虎果实中 1 个新的联苯环辛烯型木脂素[J]. 中草药, 2024, 55(5): 1443-1450.
- [16] 陈巧华, 杨 赞, 邓怡芳, 等. 不同产地、不同部位及不同直径的黑老虎根质量差异研究[J]. 湖北中医药大学学报, 2024, 26(1): 46-50.
- [17] 金智玲, 李超杰, 张祥云, 等. 瑶药大钻的药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(15): 50-54.
- [18] YANG Y P, JIAN Y Q, LIU Y B, et al. Triterpenoids from *Kadsura coccinea* with their anti-inflammatory and inhibited proliferation of rheumatoid arthritis-fibroblastoid synovial cells activities[J]. Frontiers in Chemistry, 2021, 9: 808870.
- [19] YANG Y P, JIAN Y Q, LIU Y B, et al. Heilaohuacid G, a new triterpenoid from *Kadsura coccinea* inhibits proliferation, induces apoptosis, and ameliorates inflammation in RA-FLS and RAW 2647 cells via suppressing NF- κ B pathway[J]. Phytotherapy Research, 2022, 36(10): 3900-3910.
- [20] WANG N, LI Z L, SONG D D, et al. Lanostane-type triterpenoids from the roots of *Kadsura coccinea*[J]. Journal of Natural Products, 2008, 71(6): 990-994.
- [21] WANG N, LI Z L, SONG D D, et al. Five new 3, 4-seco-lanostane-type triterpenoids with antiproliferative activity in human leukemia cells isolated from the roots of *Kadsura coccinea*[J]. Planta Medica, 2012, 78(15): 1661-1666.
- [22] TAKANI M, OHYA K, TAKAHASHI K. Studies on constituents of medicinal plants. XXII. Constituents of *Schizandra nigra* Max[J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1979, 27(6): 1422-1425.
- [23] LIU J S, HUANG M F, AYER W A, et al. Schisanlactone B, a new triterpenoid from *Kadsura coccinea*[J]. Tetrahedron Letters, 1983, 24(23): 2355-2358.
- [24] 叶梅芳, 刘媛媛, 丘 琴, 等. 民族药抗类风湿性关节炎作用机制的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(6): 55-60.
- [25] 陆晓珊. 土家族药物黑老虎治疗大鼠佐剂性关节炎的药效作用研究与作用机制探讨[D]. 广州: 广东药科大学, 2021.
- [26] 何继浩, 邹关美, 吴博文, 等. SAA、IL-6、CRP 及 T 淋巴细胞亚群联合检测在类风湿性关节炎患者中的应用价值[J]. 中国医药科学, 2024, 14(13): 173-176, 198.
- [27] 刘 槃, 席德双, 黄 瑞, 等. 短链脂肪酸通过抑制白细胞介素 17A 和 NF- κ B 信号通路减轻 γ 8T 细胞介导的炎症反应[J]. 实用医学杂志, 2024, 40(8): 1088-1094.
- [28] 张 炜, 王 莉, 杨雨欣, 等. 黄芩苷调节 let-7i-3p/PI3K/Akt/NF-KB 信号轴减轻类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞 NLRP3 炎性小体活化[J]. 中国药理学通报, 2023, 39(12): 2313-2319.
- [29] 时一鸣, 常 岑, 姜 平, 等. 中药单体化合物调控 NF- κ B 信号通路干预类风湿性关节炎的研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2023, 57(10): 89-94.

(本文编辑 田梦妍)