

基于UPLC-LTQ-Orbitrap-MS和网络药理学探讨补肾通督方 抗炎药效物质基础及作用机制

荣妍¹, 井露露¹, 侯红平¹, 王慧君¹, 陈丽华¹, 陈韵心^{1,2}, 李亮¹, 林黎^{1,2}, 罗小芹¹,
赵海誉^{1*}, 魏晓露^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室, 北京 100700;
2. 北京工商大学 轻工科学与工程学院, 北京 100048)

[摘要] 目的:探讨补肾通督方发挥抗炎作用的药效物质基础及作用机制。方法:采用超高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-LTQ-Orbitrap-MS)技术系统鉴定补肾通督方的化学成分及其体内入血成分。运用网络药理学筛选该方入血活性成分与潜在靶点,构建核心靶点PPI网络,交集靶点富集分析,利用分子对接验证关键成分-靶点的结合能力。使用Tg(mpx:GFP)转基因斑马鱼建立炎症模型进行体内验证,将受精后3 d(3 dpf)斑马鱼幼鱼随机分为空白组、模型组、阳性药乙酸地塞米松组(75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),以及补肾通督方低、中、高质量浓度组(500、1 000、2 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),荧光显微镜下观察卵黄囊部位中性粒细胞分布和数量。采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测Toll样受体4(TLR4)/髓样分化因子88(MyD88)/核转录因子- κB (NF- κB)信号通路关键基因及炎症因子白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的mRNA表达水平。**结果:**补肾通督方中鉴定得到120个化学成分,通过血清药物化学方法确认出26个原型成分。网络药理学筛选出类风湿关节炎(RA)与入血成分共有227个交集靶点,推测其作用机制是伪马钱子碱、番木鳖次碱、芥子碱、地黄苦苷、肉桂醇苷和甲基麻黄碱作用于蛋白激酶B1(Akt1)、信号转导及转录激活因子3(STAT3)、肿瘤坏死因子(TNF)、TLR4、丝裂原活化蛋白激酶14(MAPK14)和磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸3-激酶催化亚单位 α (PIK3CA)核心靶点,调节TLR4和NF- κB 等多条信号通路,发挥抗炎作用。斑马鱼体内验证表明,补肾通督方的最大耐受质量浓度为2 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。与空白组比较,模型组斑马鱼卵黄囊区中性粒细胞浸润数量显著升高($P<0.01$),TLR4、MyD88、NF- κB 、TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA表达量明显增加($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,补肾通督方中、高质量浓度组及乙酸地塞米松组明显降低中性粒细胞数量($P<0.05$, $P<0.01$),低剂量组差异无统计学意义,TLR4、MyD88、NF- κB 和TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA表达量明显下调($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论:**初步鉴定了补肾通督方的药效物质基础,明确该方通过TLR4/MyD88/NF- κB 信号通路发挥抗炎作用,为后续临床应用提供了科学实验依据。

[关键词] 补肾通督方; 斑马鱼炎症模型; Toll样受体4(TLR4); 髓样分化因子88(MyD88); 核转录因子- κB (NF- κB)

[中图分类号] R277;R285;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)10-0152-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20252344

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20251208.1650.001>

[网络出版日期] 2025-12-09 09:05:00 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>



Material Basis of Anti-Inflammatory Efficacy and Mechanism of Action of Bushen Tongdu Prescription Based on UPLC-LTQ-Orbitrap-MS and Network Pharmacology

RONG Yan¹, JING Lulu¹, HOU Hongping¹, WANG Huijun¹, CHEN Lihua¹, CHEN Yunxin^{1,2}, LI Liang¹,
LIN Li^{1,2}, LUO Xiaoqin¹, ZHAO Haiyu^{1*}, WEI Xiaolu^{1*}

(1. State Key Laboratory for Quality Ensurance and Sustainable Use of Dao-di Herbs, Institute of Chinese

[收稿日期] 2025-09-08

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2019ZX09201005-006);中国中医科学院科技创新工程项目(CI2026A04505, CI2024E003KC-05, CI2023E001TS09)

[第一作者] 荣妍,在读硕士,从事中药药理研究, E-mail: 381727873@qq.com

[通信作者] * 赵海誉,研究员,从事中药新药研发及功效生物学表征研究, E-mail: hyzhao@icmm. ac. cn;

* 魏晓露,副研究员,从事中药抗炎免疫药理及药效物质基础研究, E-mail: xlwei@icmm. ac. cn

Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. School of Light Industry Science and Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

[Abstract] **Objective:** This paper aims to investigate the material basis of the anti-inflammatory efficacy and mechanism of action of Bushen Tongdu prescription (BSTDP). **Methods:** The chemical components of BSTDP and its blood-absorbed components *in vivo* were systematically identified by using ultra-performance liquid chromatography-linear ion trap-electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry (UPLC-LIT-Orbitrap-MS). Network pharmacology was employed to screen blood-absorbed bioactive components and potential targets of this formula. A protein-protein interaction (PPI) network of core targets was constructed to conduct enrichment analysis. Molecular docking was further utilized to verify the binding affinity between key components and targets. The inflammatory model was established and verified *in vivo* by using a transgenic zebrafish Tg (mpx: GFP). At three days post-fertilization (3 dpf), larvae of zebrafish were randomly assigned to blank group, model group, positive drug dexamethasone acetate group ($75 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), and BSTDP groups with low, medium, and high doses (500, 1 000, and 2 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). The distribution and quantity of neutrophils in the yolk sac region were observed under a fluorescence microscope. The mRNA expression levels of key genes in the toll-like receptor 4 (TLR4)/myeloid differentiation factor 88 (MyD88)/nuclear factor kappa-B (NF- κ B) signaling pathway and inflammatory factors including interleukin (IL)-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Results:** A total of 120 chemical components were identified in BSTDP, among which 26 original components were confirmed by using serum pharmacochemical methods. A total of 227 common targets linking rheumatoid arthritis (RA) and the blood-absorbed components were screened by network pharmacology. It is suggested that pseudobrucine, vomicine, sinapine, rehmannioside, cinnamyl alcohol glycoside, and methylephedrine exert anti-inflammatory effects by acting on core targets including protein kinase B1 (Akt1), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), tumor necrosis factor (TNF), TLR4, mitogen-activated protein kinase 14 (MAPK14), and phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit α (PIK3CA), thereby modulating multiple signaling pathways such as TLR4 and NF- κ B. *In vivo* verification in zebrafish demonstrates that the maximum tolerable concentration of Bushen Tongdu Formula is 2 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Compared to those in the blank group, zebrafish in the model group showed a significantly higher number of neutrophils in the yolk sac region ($P<0.01$) and rising mRNA levels of TLR4, MyD88, NF- κ B, TNF- α , IL-6, and IL-1 β ($P<0.01$). Compared to that in the model group, the number of neutrophils was significantly reduced in BSTDP groups with medium and high doses, as well as the dexamethasone acetate group ($P<0.05$, $P<0.01$). There was no statistically significant difference in the low dose group. The mRNA expression levels of TLR4, MyD88, NF- κ B, TNF- α , IL-6, and IL-1 β were significantly down-regulated ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** This paper identifies the material basis of the efficacy of BSTDP, demonstrating that the formula can exert an anti-inflammatory effect through the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway. The results provide scientific experimental evidence for its further clinical application.

[Keywords] Bushen Tongdu prescription; inflammatory model of zebrafish; toll-like receptor 4 (TLR4); myeloid differentiation factor 88 (MyD88); nuclear factor kappa-B (NF- κ B)

类风湿关节炎(RA)是一种以持续性滑膜炎为核心病理特征的慢性系统性自身免疫病,其病因尚未阐明^[1]。作为一种高致残性疾病,RA可导致关节畸形和功能丧失,严重影响患者生活质量,并带来显著的社会经济负担。流行病学数据显示,2020年全球RA患病率为0.24%~1%^[2],我国人群患病率为0.32%~0.36%^[3]。目前,甲氨蝶呤(MTX)、糖皮质激素(GCs)及传统合成改善病情抗风湿药(csDMARDs)是治疗RA的主要药物^[4]。虽可有效缓解关节炎症并减轻骨质破坏,但无法阻止疾病进展,且长期应用伴随感染风险升高、胃肠道黏膜损伤等不良反应^[5]。因此,寻找更安全有效的治疗药物仍是当前RA研究的重要方向。

研究表明,巨噬细胞、中性粒细胞等免疫细胞在RA关节滑膜中的浸润是驱动病理进程的核心环节^[6]。这些细胞产生大量促炎细胞因子如肿瘤坏死

因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-1 β 和IL-6等,不仅形成并维持了关节内的慢性炎症微环境,更直接介导了滑膜异常增生、骨侵蚀等结构性损伤^[7-8]。临床主要表现为血管翳形成、滑膜衬里细胞增殖、间质炎性细胞浸润及软骨和骨组织破坏^[9]。中医将上述症状归属于“痹证”的范畴,病机为外感风寒湿热之邪,痹阻经络,致气血运行不畅,痰浊瘀血内生,流注关节而发为痹^[10]。补肾通督方系由经典方剂阳和汤化裁而成,组方含熟地黄、鹿角胶、肉桂、麻黄、白芥子及制马钱子^[11]。全方温阳不燥,滋阴不滞,补通相济,兼具温肾助阳、散寒通督之效。前期研究表明,补肾通督方治疗RA疗效确切,能够显著改善患者关节肿痛、疼痛、活动功能障碍及晨僵等临床症状,并有效延缓RA疾病进展^[12]。

超高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-LTQ-Orbitrap-MS)技术凭借其高

效液相色谱分离与高分辨串联质谱对精确相对分子质量的测定能力,被广泛应用于中药及复方化学成分的全面、快速与准确鉴定^[13]。血清药物化学通过分析体内成分明确中药直接作用物质,网络药理学揭示成分-疾病网络的关联规律^[14]。斑马鱼因其体型小、繁殖快、成本低、胚胎透明及与人类免疫系统高度保守等特点,已成为抗炎药物筛选及机制研究的理想模式生物^[15]。综上,本研究旨在通过UPLC-LTQ-Orbitrap-MS技术鉴定补肾通督方主要化学成分和入血成分,结合网络药理学分析与斑马鱼炎症模型验证,系统阐释该方调控炎症的药效物质基础和作用机制。

1 材料

1.1 动物 野生型AB品系与Tg(mpx;GFP)转基因斑马鱼由杭州环特生物科技股份有限公司提供,动物合格证号SYXK(浙)2022-0004,本实验获得机构动物护理和使用委员会批准,伦理编号IACUC-2025-12102-01。所有斑马鱼均饲养于28℃的循环水系统中,并维持14 h光照/10 h黑暗光照周期。水质参数维持如下:电导率450~550 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$,硬度50~100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 CaCO_3 计),pH 6.5~8.5。

SPF级雄性SD大鼠12只,6~8周龄,体质量220~260 g,购于北京维通利华实验技术有限公司,动物合格证号SCXK(京)2021-0006。动物饲养于温度范围为22~25℃,相对湿度45%~60%,12 h照明/12 h黑暗明暗交替的环境中,实验前适应性饲养1周。本实验获得中国中医科学院中药研究所动物伦理委员会批准,伦理编号2024B194。

1.2 药物与试剂 熟地黄(批号24060203)、肉桂(批号23122801)、白芥子(批号24081002)购买于北京同仁堂药店,鹿角(批号240401)、麻黄(批号241202)、制马钱子(批号230701)购买于河北安国振宇药业有限公司,经中国中医科学院中药研究所赵海誉研究员鉴定,均符合2020年版《中华人民共和国药典》相关要求。质谱级乙腈、甲醇、甲酸,购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;脂多糖(LPS,默克生命科学技术有限公司,批号0000389758);甲基纤维素、二甲基亚砜(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号分别为C2004046、I2229063);RNA提取试剂盒(广州飞扬生物工程有限公司,批号R6934010000C11X068);逆转录反应试剂盒[东洋纺(上海)生物科技有限公司,批号441000];TransStart Top Green qPCR SuperMix试剂盒(北京金全式生物技术股份有限公司,批号R2250305)。

1.3 仪器 ML104型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);Ultimate 3000型超高液相色谱仪、LTQ Orbitrap Velos Pro型质谱仪(美国Thermo Scientific公司);SZX7型解剖显微镜(日本Olympus公司);VertA1型CCD相机(上海士森视觉科技有限公司);IM300型显微注射仪、PC-10型拉针仪(日本Narishige公司);AZ100型电动聚焦连续变倍荧光显微镜(日本Nikon公司);LGR18-W型高速冷冻离心机(北京京立离心机有限公司);DS-11型微量分光光度计(美国Denovix公司);TAdvanced型基因扩增仪(德国Biometra GmbH公司),LightCycler 480 II型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(瑞士Roche公司)。

2 方法

2.1 补肾通督方化学成分及入血成分分析

2.1.1 补肾通督方干膏粉制备 参照太原市类风湿病医院院内制剂“补肾通督胶囊”(批准文号:晋药制字AZ20070141)的处方组成及用量,制备水煎干膏。该方由熟地黄、鹿角胶、肉桂、白芥子、麻黄、制马钱子组成。精密称取上述合格饮片,置于提取容器中,按药材体积的10倍加入蒸馏水浸泡30 min,先以武火加热至沸腾后转文火煎煮1 h,200目滤布滤过药液备用,向滤渣中加入8倍体积蒸馏水煎煮30 min,滤布过滤合并2次滤液。经60℃减压浓缩和真空干燥后,干膏粉收率为19.33%。

2.1.2 供试品溶液制备 称取(1.000 0±0.000 5) g补肾通督方干膏粉置于50 mL离心管中,加入纯水25 mL溶解,室温超声30 min,冷却后称质量,补足减失质量,重复提取2次,合并滤液。12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径9.8 cm,下同),取上清液,过0.22 μm 滤膜,转移至液相小瓶,待液相色谱-质谱联用(LC-MS)检测。

2.1.3 动物分组、给药及样本处理 将12只大鼠随机分为空白组和补肾通督方给药组,每组6只。给药组剂量参照“人体与动物体表面积等效剂量比率表”进行换算(成人标准体质量按60 kg计)^[16]。补肾通督方等效剂量为243 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,以10倍临床等效剂量2.43 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃给药^[17],空白组给予等体积生理盐水。分别在给药后0.5、1、2、3、4 h眼眶采血1 mL,肝素钠抗凝,4℃、3 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液。将5个时间点血浆各取100 μL 合并,加入3倍体积乙腈,涡旋3 min,4℃、12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液浓缩,加入乙腈复溶后,按上述方法进行涡旋、离心,取上清待测。空白组血浆处理

方法同给药组。

2.1.4 色谱条件 ACQUITY UHPLC[®] HSS T3 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 流动相: A(0.1%甲酸-水溶液)和B(乙腈), 流速0.3 mL·min⁻¹, 进样量5 μL, 柱温35 °C。洗脱程序: 0~1 min, 5%B; 1~13 min, 5%~95%B; 13~16 min, 95%B; 16~16.5 min, 95%~5%B; 16.5~20 min, 5%B。

2.1.5 质谱条件 电喷雾电离(ESI)源参数设定如下: 正、负离子扫描模式。毛细管温度350 °C, 毛细管电压35 V, 喷雾电压3.5 kV, 鞘气(N₂)流速40 mL·min⁻¹, 辅助气(N₂)流速10 mL·min⁻¹。样品一级质谱在FT模式下进行全扫描(分辨率R为60 000, 扫描范围*m/z* 100~1 500), 二级质谱采用数据依赖性扫描。

2.2 补肾通督方入血成分的网络药理学分析

2.2.1 原型入血成分潜在靶点预测及RA靶点获取 在PubChem数据库获取26个人血成分的SMILES, 导入Swiss Target Prediction数据库预测潜在靶点(筛选阈值probability>0.1)。以“Rheumatoid Arthritis”为关键词检索GeneCards (Score≥中位数1.43)、药物靶标数据库(TTD)、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)和DrugBank数据库, 整合去重后获得RA相关靶点。利用微信平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)获取入血成分靶点与RA靶点的交集靶点。

2.2.2 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)及成分-交集靶点网络构建 利用PPI网络分析数据库(String, <https://cn.string-db.org/>), 物种设为“homo sapiens”, 置信度设为0.4, 将数据导入Cytoscape 3.9.1, 通过CentiScape 2.2插件, 筛选中介中心性、接近中心性和度中心性高于中位数的核心靶点并构建其PPI网络。将交集靶点及其对应入血成分导入Cytoscape 3.9.1构建“入血成分-交集靶点”网络图。

2.2.3 基因本体(GO)、京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 利用注释、可视化和集成发现数据库(DAVID, <https://davidbioinformatics.nih.gov/>)对交集靶点进行GO与KEGG富集分析。根据 $-\lg P$ 值进行排序, GO分析选取生物学过程(BP)、细胞组分(CC)与分子功能(MF)排序前10的条目, KEGG富集筛选排序前20的显著通路。

2.2.4 分子对接 从蛋白质结构数据库(PDB, <https://www.rcsb.org/>)检索并下载补肾通督方核心靶点蛋白的结构, 通过PubChem数据库([\[pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/\]\(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/\)\)下载该活性成分的3D结构作为配体。使用CB-Dock2在线工具\(<https://cadd.labshare.cn/cb-dock2/php/index.php>\)进行靶点蛋白与活性成分的分子对接, 并记录结合能^{\[18\]}。将CB-Dock2生成的对接结果导入PyMOL完成蛋白-配体相互作用的可视化。](https://</p></div><div data-bbox=)

2.3 基于斑马鱼模型的体内抗炎药效评价

2.3.1 最大耐受浓度(MTC)测定 随机选取受精后3 d(3 dpf)野生型AB品系斑马鱼, 使用三卡因(0.16 g·L⁻¹)溶液将斑马鱼幼鱼麻醉, 向斑马鱼卵黄囊注射10 g·L⁻¹ LPS 10 nL建立炎症模型^[19]。在28 °C的培养水中复苏后随机分配到6孔板中, 每孔30尾幼鱼。除空白组和模型组外, 设置125、250、500、1 000和2 000 mg·L⁻¹质量浓度的补肾通督方浸泡培养(药物使用胚胎水稀释), 每孔容量为3 mL。28 °C处理5 h后, 观察斑马鱼的畸形表型并统计其死亡数量, 以计算死亡率。

2.3.2 显微注射LPS构建斑马鱼炎症模型 随机选取状态良好的3 dpf的Tg(mpx:GFP)品系斑马鱼, LPS显微注射构建炎症模型。在28 °C的培养水中复苏后随机分配到6孔板中, 每孔30尾幼鱼。除空白组、模型组外, 其余各组分别给予乙酸地塞米松^[20](75 μmol·L⁻¹)和补肾通督方低、中、高质量浓度组(500、1 000、2 000 mg·L⁻¹)药液, 每孔3 mL。本研究给药剂量设置参考文献[21]及MTC测定结果。28 °C处理5 h后, 每个实验组随机选取10尾斑马鱼置于荧光显微镜下拍照, 使用NIS-Elements D 3.20高级图像处理软件采集数据, 观察斑马鱼卵黄囊部位中性粒细胞的分布和数量, 拍照并进行统计分析。

2.3.3 Real-time PCR检测炎症因子mRNA表达水平 按2.3.2项下方法造模、分组给药, 收集幼鱼。按照RNA提取试剂盒说明书提取总RNA, 用超微量核酸分光光度计测量RNA浓度和纯度, 采用逆转录反应体系50 μL合成cDNA。各目的基因引物通过NCBI Primer-BLAST在线设计并验证特异性, 由北京生工生物工程股份有限公司合成, 引物序列见表1。Real-time PCR反应: 94 °C预变性30 s; 94 °C退火5 s, 60 °C延伸30 s, 45个循环; 溶解曲线94 °C, 15 s, 60 °C, 1 min。以β-肌动蛋白(β-actin)为内参, 采用2^{-ΔΔC_t}法进行数据分析。

2.4 统计学分析 使用GraphPad Prism 9.0软件对数据进行统计分析并作图, 数据结果均以 $\bar{x}±s$ 表示。组间差异显著性分析用独立样本*t*检验和单因素方

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
IL-6	上游 CAGAGACGAGCAGTTGAGAG	114
	下游 TTTTATGACAGGCAGCGGTC	
TNF- α	上游 TTTATCAGACAACCGTGGCA	142
	下游 TCTTCGTTTGGCTTCATCACA	
IL-1 β	上游 TCATCGCCCTGAACAGAATG	108
	下游 TCACTTCACGCTCTTGGATG	
Toll样受体4 (TLR4)	上游 CGGTTTGCACAGGATATG	176
	下游 TTGGCGAACAAAGGAATGCG	
髓样分化因子88 (MyD88)	上游 AACAGTTGGAACACACCGAA	123
	下游 CCACCATCCTCTTACACCTTTT	
核转录因子- κ B (NF- κ B)	上游 GCGAACATTCAGAGGAGGAAG	236
	下游 CTCATTACTGGTCAAGCCGATT	
β -actin	上游 CCCCATTGAGCACGGTATTG	193
	下游 ATACATGGCAGGGGTGTGA	

差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 补肾通督方化学成分及入血成分分析 通过分析准分子离子峰与碎片离子信息,并结合文献报道,从补肾通督方中鉴定出120个化合物,包括生物碱类33个、氨基酸及其衍生物15个、有机酸类14个、黄酮类14个、萜类12个、醛酮类12个、苯丙素及香豆素类6个、糖类3个及其他成分11个。进一步在含药血清中鉴定出26种入血原型成分,其中来源于马钱子11种、麻黄4种、熟地黄7种、白芥子1种和肉桂3种。补肾通督方、含药血清及空白血清的UPLC-LTQ-Orbitrap-MS基峰色谱图(BPC)见增强出版附加材料,入血成分详细鉴定结果见表2,补肾通督方成分的鉴定结果见增强出版的附加材料。

3.2 基于入血活性成分治疗RA网络药理学分析

3.2.1 PPI及“入血成分-靶点”网络图构建 补肾通督方入血成分预测得到354个靶点,与RA疾病靶点(6 934)取交集得到227个共同靶点。将上述靶点导入STRING数据库,使用Cytoscape 3.9.1软件对PPI网络进行拓扑属性分析,筛选得到46个核心靶点,并构建其PPI网络图,节点尺寸与颜色深度均与Degree值正相关。其中Degree值排名前三的核心

靶点为TNF、信号转导与转录激活因子3(STAT3)、蛋白激酶B1(Akt1)。构建“入血成分-交集靶点”互作网络,其中V形符号代表入血活性成分,菱形符号代表作用靶点,系统揭示了补肾通督方“多成分-多靶点”协同干预RA作用模式。见增强出版附加材料。

3.2.2 GO功能和KEGG通路富集分析 采用DAVID数据库对交集靶点进行GO与KEGG富集分析。GO结果表明,BP、MF、CC分别获得1 111、353、149个条目。以 $-\lg P$ 值排名取前10条绘制气泡图,生物过程包括蛋白磷酸化、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联的正向调控、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)的正向调控、表皮生长因子受体信号通路等;细胞组分包括质膜、受体复合物、膜筏等;分子功能包括组蛋白H3酪氨酸41激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性、酶结合等。KEGG富集到195条通路,选取差异显著的20条信号通路进行绘图,包括MAPK信号通路、PI3K/Akt信号通路、炎症介质调控TRP通道、Toll样受体(TLR)信号通路及核转录因子(NF- κ B)信号通路等。见增强出版附加材料。

3.2.3 分子对接 为探究补肾通督方关键成分与靶点蛋白的相关性,选取方中排名靠前的6种活性成分伪马钱子碱、番木鳖次碱、芥子碱、地黄苦苷、肉桂醇苷、甲基麻黄碱分别与6个核心靶点Akt1、STAT3、TNF、TLR4、丝裂原活化蛋白激酶14(MAPK14)和磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸3-激酶催化亚单位 α (PIK3CA)进行了分子对接,并绘制结合能热图。结果表明,所有成分与靶点的结合能均 $\leq -5.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,其中5种成分与TNF、TLR4的结合能 $\leq -7.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,显示出较强结合能力,见增强出版附加材料。对结合能较高的成分与蛋白进一步解析发现,番木鳖次碱与Akt1的THR-21形成氢键(2.8 Å),地黄苦苷与STAT3的GLN-326、GLU-324形成氢键(3.0 Å、2.6 Å)且与GLY-253、ALA-250存在疏水作用,肉桂醇苷与TNF的ASN-137形成氢键(2.2 Å),甲基麻黄碱与TLR4的GLN-115形成氢键(3.0 Å),伪马钱子碱与MAPK14的LEU-86、LYS-165存在疏水作用(3.3 Å、2.7 Å),芥子碱与PIK3CA的ARG-234等残基形成多个氢键(1.7 Å),见增强出版附加材料。这些结合位点多位于靶点功能活性区域,提示这些成分可能是补肾通督方发挥抗炎作用的关键药效物质基础。

3.3 补肾通督方基于斑马鱼的抗炎药效评价

3.3.1 补肾通督方最大耐受浓度测定 3 dpf斑马鱼注射LPS构建炎症模型后观察其一般状态。空

表2 补肾通督方入血原型成分鉴定结果

Table 2 Identification results of blood-entering prototype components in BSTDP

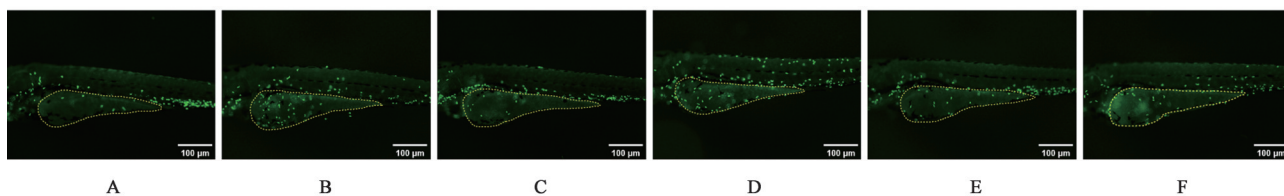
No.	化合物	<i>m/z</i> 实测值	分子式	离子模式	<i>t_R</i> /min	δ	碎片离子(MS/MS)
1	地黄素C	199.060 6	C ₉ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	1.74	0.25	155.070 8, 137.060 4, 109.066 1
2	去甲基麻黄碱	152.107 3	C ₉ H ₁₃ NO	[M+H] ⁺	3.31	0.20	134.060 3, 119.018 0, 105.069 7
3	焦地黄呋喃	183.065 9	C ₉ H ₁₂ O ₄	[M-H] ⁻	6.82	0.39	137.061 3, 121.065 4, 93.070 8
4	脱咖啡酰基毛蕊糖苷	461.164 5	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	[M-H] ⁻	3.75	-0.18	161.045 0, 135.044 9
5	麻黄噁唑酮	192.102 3	C ₁₁ H ₁₃ NO ₂	[M+H] ⁺	3.48	0.20	183.041 3, 119.049 5
6	阿魏酸	195.065 6	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M+H] ⁺	3.82	0.21	177.091 8, 163.039 6
7	地黄新萜B	299.148 5	C ₁₅ H ₂₄ O ₆	[M-H] ⁻	4.26	-0.14	183.138 7, 139.001 1
8	甲基麻黄碱	180.138 6	C ₁₁ H ₁₇ NO	[M+H] ⁺	6.34	0.17	162.128 3, 147.373 7, 117.070 0
9	8-表番木鳖酸	375.128 6	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	[M-H] ⁻	5.15	0.01	213.076 6, 169.086 5
10	儿茶酸	289.070 4	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	[M-H] ⁻	5.36	-0.09	245.081 7, 205.050 2, 203.070 9, 123.044 9, 109.029 3
11	草木樨苷	327.107 3	C ₁₅ H ₂₀ O ₈	[M-H] ⁻	4.69	-0.04	256.997 1, 177.039 0, 165.055 7, 147.045 0
12	地黄苦苷	345.153 9	C ₁₆ H ₂₆ O ₈	[M-H] ⁻	4.88	-0.14	183.102 6, 179.055 9, 165.091 9
13	肉桂醇苷	427.159 1	C ₂₀ H ₂₈ O ₁₀	[M-H] ⁻	5.69	-0.18	293.085 9, 233.067 1, 149.045 2
14	芥子碱	311.173 4	C ₁₆ H ₂₄ NO ₅	[M+H] ⁺	4.52	0.22	251.092 4, 207.065 9, 175.065 0, 143.428 6, 124.560 6
15	土的宁	335.176 0	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	10.85	0.18	307.145 2, 264.103 0, 234.092 3, 222.092 3, 184.076 3
16	土的宁氮氧化物	351.171 1	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	5.07	0.22	334.168 6, 306.113 8, 277.181 0, 220.076 3
17	8- <i>O</i> -马钱子碱	409.174 9	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₅	[M-H] ⁻	11.40	-0.22	391.201 4
18	马钱子碱氮氧化物	411.192 0	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₅	[M+H] ⁺	12.28	0.13	394.194 2, 379.100 9, 366.133 1, 351.177 2
19	伪马钱子碱	411.192 0	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₅	[M+H] ⁺	11.61	0.13	393.188 0
20	奴弗新	425.207 7	C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O ₅	[M+H] ⁺	11.79	0.14	368.151 4, 350.140 6, 324.124 7, 308.129 7, 296.093 3
21	马钱子碱	395.197 4	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₄	[M+H] ⁺	11.84	0.22	334.146 5, 307.120 6, 220.097 9
22	依卡精	365.186 4	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	10.63	0.12	308.129 8, 290.119 4, 264.103 0, 248.108 3, 236.107 5
23	2-羟基土的宁	351.171 1	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	12.54	0.22	323.140 4, 280.097 9, 238.087 2
24	4-羟基番木鳖碱	351.171 1	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	9.60	0.22	333.160 3, 238.087 2
25	$\alpha(\beta)$ -可鲁勃林	365.186 6	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	12.83	0.17	337.156 4, 294.113 8, 264.103 1, 252.103 1, 214.087 4
26	番木鳖次碱	381.181 7	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₄	[M+H] ⁺	12.85	0.22	324.124 9, 306.114 4, 280.098 4, 264.103 5, 250.087 7

白组与模型组斑马鱼幼鱼在形态学上未见明显异常。补肾通督方 125、250、500、1 000、2 000 mg·L⁻¹ 质量浓度组连续浸泡斑马鱼 5 h, 显示各质量浓度组幼鱼均无死亡, 表型未见明显异常。因此, 本实验确定 2 000 mg·L⁻¹ 为补肾通督方对斑马鱼的最大耐受浓度。据此, 本研究选定 500、1 000、2 000 mg·L⁻¹ 作为药效学实验给药质量浓度评估药效。

3.3.2 补肾通督方对中性粒细胞数目的影响 与空白组比较, 模型组斑马鱼卵黄囊区中性粒细胞数量显著升高 ($P < 0.01$), 提示急性细菌性炎症模型建立成功; 与模型组比较, 乙酸地塞米松组可显著逆转该变化 ($P < 0.01$), 补肾通督方呈质量浓度依赖性抑制中性粒细胞募集, 2 000、1 000 mg·L⁻¹ 质量浓度组明显降低中性粒细胞数量 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而 500 mg·L⁻¹ 质量浓度组差异无统计学意义。结果表

明, 补肾通督方在高、中质量浓度下可显著抑制斑马鱼炎症部位中性粒细胞浸润。见图 1、表 3。

3.3.3 补肾通督方调控 LPS 诱导斑马鱼 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路 mRNA 表达 与空白组比较, 模型组斑马鱼 TLR4、MyD88 及 NF- κ B 的 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的 mRNA 表达显著上调 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 乙酸地塞米松组和补肾通督方高、中质量浓度 TLR4、MyD88、NF- κ B、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 补肾通督方低质量浓度组仅 TNF- α 的 mRNA 表达明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 对其余基因有降低趋势但差异无统计学意义。结果表明补肾通督方可通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路, 降



注: A.空白组; B.模型组; C.乙酸地塞米松组; D-F.补肾通督方低、中、高质量浓度组

图1 补肾通督方对斑马鱼炎症模型中性粒细胞数目的影响(荧光显微镜, ×100)

Fig. 1 Effect of BSTDP on neutrophil counts in zebrafish inflammation model (fluorescence microscope, ×100)

表3 补肾通督方对斑马鱼炎症模型中性粒细胞数目的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 3 Effect of BSTDP on neutrophil counts in zebrafish inflammation model ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	浓度	卵黄囊部位中性粒细胞数/个
空白组		5.60±0.70
模型组		19.90±2.01 ¹⁾
乙酸地塞米松组	75 μmol·L ⁻¹	6.90±0.75 ³⁾
补肾通督方低质量浓度组	500 mg·L ⁻¹	14.50±2.08
补肾通督方中质量浓度组	1 000 mg·L ⁻¹	13.80±1.62 ²⁾
补肾通督方高质量浓度组	2 000 mg·L ⁻¹	10.30±0.86 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$

低炎症因子转录水平,从而缓解LPS诱导的急性炎症反应。见表4。

4 讨论

补肾通督方以熟地黄滋阴补肾、填精益髓,鹿角胶温壮元阳、强筋壮骨,二者共为君药,肉桂补命门之火、温通血脉、散寒止痛,为臣药;麻黄宣腠理、通阳气,助肉桂开痹散邪。白芥子温中通络,制马钱子通络祛痹,二者助君臣通痹止痛^[22-23]。全方温阳而不助火,滋阴而不碍脾,补泻兼施,体现了“温通督脉、滋补肝肾”标本同治之旨。临床研究表明,补肾通督方可显著下调炎症因子 γ 干扰素(IFN- γ)、TNF- α 与IL-1 β 的表达水平,进而减轻细胞因子介导的免疫损伤^[24]。然而,该复方发挥抗炎作用的药

效物质基础及其作用机制尚未阐明。

本研究采用UPLC-LTQ-Orbitrap-MS技术对补肾通督方进行系统鉴定得到120个成分,为进一步明确其体内直接作用的药效物质,使用血清药物化学方法鉴定出26个入血原型成分。运用网络药理学构建“入血成分-靶点”网络,通过拓扑学参数筛选出核心成分伪马钱子碱、番木鳖次碱、地黄苦苷、肉桂醇苷、芥子碱和甲基麻黄碱,提示是补肾通督方发挥抗炎作用的重要药效成分。现代药理学研究表明,在胶原诱导性关节炎(CIA)小鼠成纤维滑膜细胞模型中,番木鳖次碱显著抑制TNF- α 、IL-6、环氧酶-2(COX-2)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达并减少滑膜细胞增殖^[25]。马钱子水提物通过抑制TLR4/TNF- α /基质金属蛋白酶-9(MMP-9)信号通路的过度活化,改善CIA大鼠关节组织中炎症因子的产生和炎症反应的发生,从而发挥抗炎镇痛作用^[26]。地黄苦苷在CIA大鼠模型中,显著下调血清TNF- α 、IL-17水平,减轻滑膜增生和骨侵蚀^[27]。肉桂及其主要活性成分肉桂醛、肉桂醇等具有显著抗炎效应,可阻断单核-巨噬细胞分化阶段的炎症级联,抑制还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶2/活性氧(NOX2/ROS)及蛋白激酶C δ /细胞外信号调节激酶/激活蛋白-1/NF- κ B(PKC δ /JNK/AP-1/NF- κ B)信号轴,下调相关炎症介质的表达^[28]。白芥子碱具有显著的抗炎、抗氧化等

表4 补肾通督方对斑马鱼炎症模型TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路相关基因mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 4 Impact of BSTDP on mRNA expression of TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway-related genes in zebrafish inflammation model ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度	TLR4	MyD88	NF- κ B	TNF- α	IL-6	IL-1 β
空白组		1.60±0.32	1.04±0.45	10.29±2.03	0.24±0.13	0.23±0.02	0.22±0.09
模型组		4.55±0.68 ²⁾	4.32±0.72 ¹⁾	16.73±3.04 ¹⁾	1.73±0.38 ²⁾	1.24±0.18 ²⁾	0.88±0.20 ²⁾
乙酸地塞米松组	75 μmol·L ⁻¹	1.80±0.39 ⁴⁾	1.50±0.41 ⁴⁾	10.91±1.16 ³⁾	0.27±0.08 ⁴⁾	0.40±0.15 ³⁾	0.33±0.12 ³⁾
补肾通督方低质量浓度组	500 mg·L ⁻¹	3.37±0.59	2.88±0.54	14.20±1.29	0.97±0.36 ³⁾	0.87±0.27	0.71±0.21
补肾通督方中质量浓度组	1 000 mg·L ⁻¹	3.00±0.68 ³⁾	2.23±0.37 ³⁾	10.74±1.97 ³⁾	0.52±0.43 ³⁾	0.68±0.15 ³⁾	0.53±0.10 ³⁾
补肾通督方高质量浓度组	2 000 mg·L ⁻¹	2.43±0.60 ³⁾	2.06±0.20 ³⁾	9.85±1.27 ³⁾	0.39±0.12 ³⁾	0.50±0.17 ³⁾	0.43±0.10 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$

特性,通过调控核心信号通路(如NF- κ B和MAPK)来抑制炎症因子(如TNF- α 、IL-6和IL-1 β)的产生^[29]。麻黄生物碱通过激活环磷酸腺苷/蛋白激酶A/环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(cAMP/PKA/CREB)信号轴,抑制IL-6/STAT3信号通路,下调TNF- α 、IL-1 β 及IL-4等炎症因子表达^[30]。上述结果表明,补肾通督方中具有多种抗炎活性成分,这些成分通过相应机制发挥抗炎作用,共同构成了补肾通督方的抗炎药效基础。

本研究通过构建核心靶点PPI网络分析发现,补肾通督方中发挥抗炎作用的靶点基因众多,其中TNF、STAT3、Akt1、TLR4等是关键靶点。进一步将靶点与活性成分进行分子对接实验,结果表明伪马钱子碱、番木鳖次碱等活性成分均与TNF、TLR4靶点具有较强的结合力。其中TNF- α 是TNF家族中关键的多效性促炎细胞因子,通过调节NF- κ B和MAPK等信号通路直接参与系统性炎症反应,驱动RA的滑膜炎、软骨和骨破坏^[31];还通过上调IL-1、IL-6、IL-17等其他炎症介质的产生,加剧RA的进展^[32]。STAT3是Th17细胞分化的核心转录因子,其核内激活直接促进IL-17等促炎因子产生,驱动RA的病理进展^[33]。Akt1通过激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体1(mTORC1)和NF- κ B信号通路,促进炎症反应和破骨细胞分化,加剧关节破坏^[34]。TLR4是一种模式识别受体,可以被各种类型的病原体相关分子模式(PAMPs)激活,诱发机体的炎症和免疫反应^[35]。其下游关键接头蛋白MyD88通过TIR结构域介导TLR信号转导,在免疫细胞中广泛表达并充当通路枢纽,活化的MyD88进一步激活NF- κ B信号通路,直接调控细胞因子TNF- α 、IL-6和IL-1 β 等表达^[36]。KEGG富集分析显示,MAPK信号通路、PI3K/Akt信号通路、TLR信号通路及NF- κ B信号通路等均与炎症调节过程显著相关。本课题组前期研究揭示了TLR4/NF- κ B信号通路在RA发病机制中的关键作用^[37]。本研究构建斑马鱼炎症模型,验证了该通路在补肾通督方抗炎效应中的核心调控作用,并发现MAPK、PI3K/Akt等信号通路在炎症调控中的潜在重要性。后续将系统探讨这些通路在补肾通督方抗炎机制中的具体作用,以全面揭示其多靶点、多通路的药理机制。

近年来,斑马鱼已成为研究免疫介导炎症疾病的优选模型,其基因与人类同源性高达70%,疾病相关基因的保守性更达82%^[38]。LPS是革兰氏阴性菌细胞壁的内毒素,作为PAMP,可通过TLR激活先

天免疫,触发全身炎症级联反应^[15]。在斑马鱼炎症模型中,LPS通过胚胎浸泡^[39]或卵黄囊显微注射进行给药^[40],操作便捷且结果稳定可控。造模成功后,呈现出TLR4介导的NF- κ B信号通路活化和各种炎症介质如TNF- α 和IL-1 β 的表达,其炎症反应特征与哺乳动物高度保守^[41],已成为中药复方抗炎活性高通量筛选的主要造模方法之一^[42]。

斑马鱼中性粒细胞于受精后18 h(18 hpf)开始发育,在24~48 hpf间成熟,其核分节形态、颗粒特征及髓过氧化物酶表达模式均与人类中性粒细胞高度相似^[43]。这使得利用透明且遗传易感的斑马鱼幼体来研究中性粒细胞生物学成为可能。尽管中性粒细胞传统上被视为急性炎症反应的关键效应细胞,但越来越多的证据表明,其在RA的慢性病理进程中扮演着核心协调者角色^[44]。激活后的中性粒细胞通过分泌促炎因子释放蛋白酶、活性氧簇、中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)等主动参与并驱动滑膜炎、骨侵蚀及血管翳形成。本研究经显微注射LPS后,模型组卵黄囊中性粒细胞显著增加,补肾通督方可剂量依赖性地逆转其募集,表明该复方具有较好抗炎药效。此外,在斑马鱼LPS模型组中,TLR4、MyD88、NF- κ B及炎症因子TNF- α 、IL-6和IL-1 β 的表达均显著上升,经药物干预后,上述信号通路关键蛋白及相关炎症因子的表达被显著抑制。表明补肾通督方可以通过调控TLR4/MyD88/NF- κ B通路发挥抗炎作用。

综上所述,本研究通过UPLC-LTQ-Orbitrap-MS技术,从补肾通督方中鉴定出120种化学成分及26种入血原型成分。进一步通过网络药理学分析,首次揭示了伪马钱子碱、番木鳖次碱、地黄苦苷、肉桂醇苷、芥子碱和甲基麻黄碱等关键成分,可能通过干预TNF、TLR4等核心靶点调控TLR4/NF- κ B信号通路,从而抑制炎症反应、调节免疫机制,为阐释补肾通督方的药效作用机制提供了重要依据。然而,本研究亦存在局限性,所使用的斑马鱼幼体模型因缺乏成熟的关节腔与滑膜组织,难以完全模拟人类类风湿性关节炎的慢性免疫病理过程。因此,当前关于该方剂的抗炎成分及通路调控作用的初步结论,尚需通过CIA小鼠等哺乳动物模型及体外细胞实验进行系统验证与深入解析,这也是后续研究的重要方向。

[利益冲突] 赵海誉为本刊编委,未参与审稿过程的任何环节,本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] DI MATTEO A, FIRESTEIN G S, MCSHANE C, et al. Rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2023, 402 (10416) : 2019-2033.
- [2] ALMOALLIM H, AL SALEH J , BADSHA H, et al. A review of the prevalence and unmet needs in the management of rheumatoid arthritis in Africa and the Middle East [J]. *Rheumatol Ther*, 2021, 8(1) : 1-16.
- [3] 刘小宁,王丽敏. 肝肾不足型类风湿性关节炎的临床研究进展[J]. *中医研究*, 2025, 38(8) : 87-91.
- LIU X N, WANG L M. Clinical research advances in liver-kidney deficiency pattern of rheumatoid arthritis [J]. *Chin Med Res*, 2025, 38(8) : 87-91.
- [4] SPARKS J A. Rheumatoid arthritis [J]. *Ann Intern Med*, 2019, 170(1) : ITC1-ITC16.
- [5] 杨昊若,寇秋爱,任军华,等. 基于 SLC31A1/FDX1 通路探讨槲皮素抑制铜死亡缓解类风湿性关节炎大鼠的作用及机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(1) : 121-130.
- YANG H R, GENG Q A, REN J H, et al. Effect of quercetin on cuproptosis in rheumatoid arthritis rats and its mechanism via SLC31A1/FDX1 pathway [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, 31(1) : 121-130.
- [6] DENG Y, ZHENG H, LI B, et al. Nanomedicines targeting activated immune cells and effector cells for rheumatoid arthritis treatment [J]. *J Control Release*, 2024, 371 : 498-515.
- [7] KONDO N, KURODA T, KOBAYASHI D. Cytokine networks in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(20) : 10922.
- [8] HAN P, LIU X, HE J, et al. Overview of mechanisms and novel therapies on rheumatoid arthritis from a cellular perspective [J]. *Front Immunol*, 2024, 15 : 1461756.
- [9] ZHAO J H, MA S, LI C Y, et al. Clinically approved small-molecule drugs for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 256 : 115434.
- [10] 杨媛媛,王小玉,陈思思,等. 基于玄府理论探讨风药在治疗类风湿关节炎中的应用[J]. *吉林中医药*, 2025, 45(6) : 663-666.
- YANG Y Y, WANG X Y, CHEN S S, et al. Exploring the application of wind-dispelling medicines in the treatment of rheumatoid arthritis based on the Xuanfu theory [J]. *J Tradit Chin Med Jilin*, 2025, 45(6) : 663-666.
- [11] 赵慧,吴建红,侯丽萍,等. 补肾通督胶囊对肾虚寒凝型风湿关节炎患者 DKK1 及钙磷代谢的影响[J]. *湖北中医药大学学报*, 2015, 17(4) : 90-92.
- ZHAO H, WU J H, HOU L P, et al. Effect of Bushen Tongdu capsule on DKK1 and calcium-phosphorus metabolism of patients with rheumatoid arthritis of kidney deficiency and cold coagulation syndrome [J]. *J Hubei Univ Chin Med*, 2015, 17(4) : 90-92.
- [12] 张莉. 补肾通督胶囊治疗类风湿关节炎的临床疗效[J]. *临床合理用药杂志*, 2018, 11(6) : 54-55.
- ZHANG L. Clinical efficacy of Bushen Tongdu capsule in treating rheumatoid arthritis [J]. *J Clin Ration Drug Use*, 2018, 11(6) : 54-55.
- [13] 张驰,张彩娟,邱敏懿,等. 丹参多化学成分的上PLC-LTQ Orbitrap MS 快速表征解析[J]. *中医学报*, 2018, 46(3) : 14-21.
- ZHANG C, ZHANG C J, QIU M Y, et al. Quick feature analyzation of chemical constituents of Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae by UPLC-LTQ Orbitrap MS [J]. *J Tradit Chin Med*, 2018, 46(3) : 14-21.
- [14] 安琼,魏媛,李倩,等. 基于网络药理学、分子对接和实验验证探讨苹果对溶血致高胆红素血症的影响[J]. *食品科学*, 2024, 45(9) : 144-152.
- AN Q, WEI Y, LI Q, et al. Effect of apples on hemolysis-induced hyperbilirubinemia: Evaluation by network pharmacology and molecular docking and experimental validation [J]. *Food Sci*, 2024, 45(9) : 144-152.
- [15] XIE Y, MEIJER A H, SCHAAF M J M. Modeling inflammation in zebrafish for the development of anti-inflammatory drugs [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 8 : 620984.
- [16] LIU W, YU Z, WANG Z, et al. Using an animal model to predict the effective human dose for oral multiple sclerosis drugs [J]. *Clin Transl Sci*, 2023, 16(3) : 467-477.
- [17] 张宏,王旭昀,刘美奇,等. 中药含药血清实验动物灌胃给药剂量探讨[J]. *吉林中医药*, 2015, 35(6) : 623-625.
- ZHANG H, WANG X Y, LIU M Q, et al. Analysis of traditional Chinese medicated serum intragastric dose [J]. *J Tradit Chin Med Jilin*, 2015, 35(6) : 623-625.
- [18] LIU Y, YANG X C, GAN J H, et al. CB-Dock2: Improved protein-ligand blind docking by integrating cavity detection, docking and homologous template fitting [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(W1) : W159-W164.
- [19] ZHANG Y, TAKAGI N, YUAN B, et al. The protection of indolealkylamines from LPS-induced inflammation in zebrafish [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 243 : 112122.
- [20] 吕林艳,刘洋,方彬又,等. 山牡荆不同部位提取物药效学评价研究[J]. *大众科技*, 2023, 25(7) : 56-59.
- LU L Y, LIU Y, FANG B Y, et al. Study on pharmacodynamic evaluation of extracts from different parts of *Vitex quinata* (Lour.) Willd. [J]. *Pop Sci*, 2023, 25(7) : 56-59.
- [21] 王涛,戴明珠,李延川,等. 复方中药提取物增强免疫力作用及初步机制研究[J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(2) : 198-207.
- WANG T, DAI M Z, LI Y C, et al. Study of the immunity-enhancing effect and mechanism of Chinese herbal compound extract [J]. *Chin J Lab Anim Sci*, 2022, 30(2) : 198-207.
- [22] 祁学萍. 补肾通督胶囊治疗早期类风湿性关节炎的疗效及对血清炎性因子的影响[J]. *世界中医药*, 2017, 12(10) : 2375-2378.
- QI X P. Therapeutic effects of Bushen Tongdu capsule on early rheumatoid arthritis and its effects on serum inflammatory factors [J]. *World J Tradit Chin Med*, 2017, 12(10) : 2375-2378.
- [23] 周晓莉,刘秀峰,王英旭,等. 补肾通督胶囊治疗类风湿关节炎 42 例疗效观察[J]. *山西中医*, 2012, 28(2) : 21-23.
- ZHOU X L, LIU X F, WANG Y X, et al. Curative effect observation of capsule of Bushen Tongdu on rheumatoid arthritis (RA), a report of 42 cases [J]. *Shanxi J Tradit Chin Med*, 2012, 28(2) : 21-23.
- [24] 梁永妍. 补肾通督胶囊对类风湿性关节炎患者骨代谢及炎性细胞因子的影响[J]. *西部中医药*, 2017, 30(11) : 4-7.

- LIANG Y Y. The influence of Bushen Tongdu capsules on the levels of inflammatory cytokines and bone metabolism of the patients with rheumatoid arthritis[J]. West Chin Med, 2017, 30(11):4-7.
- [25] CHEN J, WANG X, QU Y G, et al. Analgesic and anti-inflammatory activity and pharmacokinetics of alkaloids from seeds of *Strychnos nux-vomica* after transdermal administration: Effect of changes in alkaloid composition[J]. Ethnopharmacol, 2012, 139(1):181-188.
- [26] 黄荷兰, 苏晓慧, 康世奇, 等. 基于TLR4/TNF- α /MMP-9信号通路研究马钱子水提物改善类风湿关节炎大鼠疼痛的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(6):1429-1437.
- HUANG H L, SU X H, KANG S Q, et al. Mechanism of aqueous extract of *Strychni Semen* in improving pain in rats with rheumatoid arthritis based on TLR4/TNF- α /MMP-9 signaling pathway[J]. China J Tradit Chin Med, 2024, 49(6):1429-1437.
- [27] 冯卫生. 地黄化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医学报, 2025, 40(10):2035-2055.
- FENG W S. Research progress on chemical composition and pharmacological effects of Dihuang (*Rehmannia glutinosa* Libosch.)[J]. China J Chin Med, 2025, 40(10):2035-2055.
- [28] 李雪, 马艳春, 赵婧含, 等. 肉桂的化学成分及药理作用研究进展[J]. 药学研究, 2024, 43(10):1015-1020.
- LI X, MA Y C, ZHAO J H, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Cinnamomum cassia*[J]. Pharm Res, 2024, 43(10):1015-1020.
- [29] DU D, YANG Y, CHENG X, et al. Deciphering the therapeutic potential of sinigrin: A promising anti-inflammatory agent for chronic disease management [J]. Phytomedicine, 2025, 144:156875.
- [30] 郑亚娟, 袁培培, 傅阳, 等. 基于cAMP/PKA/CREB信号通路探讨麻黄生物碱组分对过敏性哮喘大鼠的抗炎机制[J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(11):1453-1459.
- ZHENG Y J, YUAN P P, FU Y, et al. Exploring the anti-inflammatory mechanism of Ephedra Herba alkaloid components in allergic asthmatic rats based on cAMP/PKA/CREB signaling pathway[J]. New Chin Med Clin Pharmacol, 2022, 33(11):1453-1459.
- [31] MENG Q, LI Y, YUAN F, et al. E₃ ubiquitin ligase gene BIRC3 modulates TNF-induced cell death pathways and promotes aberrant proliferation in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. Front Immunol, 2024, 15:1433898.
- [32] UNTERBERGER S, DAVIES K A, RAMSBURGER E, et al. Contribution of Toll-like receptors and the NLRP3 inflammasome in rheumatoid arthritis pathophysiology [J]. Immunotargets Ther, 2021, 10:285-298.
- [33] LEE S Y, KWOK S K, SON H J, et al. mtSTAT3 suppresses rheumatoid arthritis by regulating Th17 and synovial fibroblast inflammatory cell death with IL-17-mediated autophagy dysfunction [J]. Exp Mol Med, 2025, 57(1):221-234.
- [34] YANG J, WANG M, ZHAO R, et al. Bioinformatics identification based on causal association inference using multi-omics reveals the underlying mechanism of Gui-Zhi-Shao-Yao-Zhi-Mu decoction in modulating rheumatoid arthritis[J]. Phytomedicine, 2025, 136:156332.
- [35] 周凡琦, 冷静, 运晨霞. Toll样受体与类风湿性关节炎的相关性及靶向防治的研究进展[J]. 广西医学, 2020, 42(11):1430-1434.
- ZHOU F Q, LENG J, YUN C X. Correlation between Toll-like receptor and rheumatoid arthritis and its targeted treatment: A literature review [J]. Guangxi Med J, 2020, 42(11):1430-1434.
- [36] 王瑞杰, 王钢, 张丽. TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路在RA中的作用及中药干预研究进展[J]. 中医药信息, 2023, 40(8):84-89.
- WANG R J, WANG G, ZHANG L. Role of TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway in RA and research progress in Chinese medicinal intervention [J]. J Tradit Chin Med Inf, 2023, 40(8):84-89.
- [37] WEI X L, LIU M G, WANG X Y, et al. Integrated pharmacology reveals the mechanism of action of Bushen Tongdu prescription against collagen-induced arthritis [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 143:112160.
- [38] STRYNATKA K A, GURROLF G, CHAPMAN G, et al. How surrogate and chemical genetics in model organisms can suggest therapies for human genetic diseases [J]. Genetics, 2018, 208(3):833-851.
- [39] 周蔓, 安晓萍, 王园, 等. 基于斑马鱼模型探讨中草药提取物的抗炎抗氧化作用[J]. 饲料研究, 2025, 48(9):155-159.
- ZHOU M, AN X P, WANG Y, et al. Exploring anti-inflammatory and antioxidant effects of Chinese herbal extracts based on zebrafish modeling [J]. Feed Res, 2025, 48(9):155-159.
- [40] YANG L L, WANG G Q, YANG L M, et al. Endotoxin molecule lipopolysaccharide-induced zebrafish inflammation model: A novel screening method for anti-inflammatory drugs [J]. Molecules, 2014, 19(2):2390-2409.
- [41] FORN-CUNÍ G, VARELA M, FERNÁNDEZ RODRIGUEZ C, et al. Conserved gene regulation during acute inflammation between zebrafish and mammals [J]. Sci Rep, 2017, 7:41905.
- [42] 兰晴, 王安娜, 周霏霏, 等. 基于TLR4/MyD88/NF- κ B通路探讨金丝桃苷对LPS诱导的斑马鱼炎症模型的抗炎机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(22):63-72.
- LAN Q, WANG A N, ZHOU F F, et al. Hyperoside Alleviates LPS-induced inflammation in zebrafish model via TLR4/MyD88/NF- κ B pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025, 31(22):63-72.
- [43] SALAFRANCA J, KO J K, MUKHERJEE A K, et al. Neutrophil nucleus: Shaping the past and the future [J]. J Leukoc Biol, 2023, 114(6):585-594.
- [44] XIAO S, WANG Y, LIU L, et al. Qingjin Huatan decoction attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by controlling platelet-associated formation of neutrophil extracellular traps [J]. Sci Tradit Chin Med, 2023, 1(1):59-71.

[责任编辑 孙丛丛]