

基于系统药理学探讨乌头生物碱治疗类风湿性关节炎的分子机制

刘婷婷, 肖志彬, 陈琪, 苏敏, 王蕾, 张莎莎, 杨帆, 常福厚*

(内蒙古医科大学药学院, 内蒙古医科大学新药安全评价研究中心, 内蒙古自治区
新药筛选工程研究中心, 呼和浩特 010110)

[摘要] 目的:基于系统药理学探讨乌头生物碱中化学成分对脂多糖(LPS)诱导的RAW264.7巨噬细胞炎症反应的影响及其机制。方法:TCMSP数据库结合口服生物利用度(OB)≥30%,类药性(DL)≥0.18搜集草乌化学成分,通过Pubchem数据库以及Swiss Target Prediction数据库预测各化学成分的潜在作用靶点;从GeneCards数据库搜集类风湿性关节炎(RA)靶点,两者取交集,DAVID数据库进行基因本体(GO)分类富集分析和Pathway富集分析。Cytoscape构建“化学成分-潜在作用靶点-信号通路-疾病”网络拓扑图;结合STRING数据库和Cytoscape软件构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络。体外实验通过LPS刺激RAW264.7巨噬细胞,建立体外巨噬细胞炎症模型,采用蛋白免疫印迹法检测乌头生物碱中化学成分对LPS诱导的RAW264.7细胞肿瘤坏死因子- α (TNF- α),环氧合酶(COX-2)蛋白表达的影响以及对JAK激酶(Janus kinase),核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路主要蛋白表达的影响。结果:通过TCMSP数据库检索以及查阅文献共得到27个化学成分,经筛选后(OB≥30%,DL≥0.18)得到12个化学成分,通过数据库预测并筛选后得到177个潜在作用靶点,与4329个RA靶点取交集后得到97个靶点作为治疗RA的潜在作用靶点。通过DAVID数据库富集到生物过程(BP)经筛选后共32条($P<0.01$,FDR<0.01);所处细胞中的位置(CC)经筛选后共有5个位置($P<0.01$,FDR<0.01);分子功能(MF)经筛选后得到12种分子功能($P<0.01$,FDR<0.01)。通过构建网络拓扑图说明乌头生物碱在治疗RA时不同的化学成分可作用于相同靶点,同一化学成分也作用于不同的靶点;乌头生物碱既可通过不同靶点与同一通路相连接,也可通过同一靶点与不同通路相连接,说明不同的靶点具有协同作用,充分体现了乌头生物碱多成分、多靶点、多通路的复杂机制。加入不同浓度的LPS刺激(质量浓度为0~200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)能够显著上调RAW264.7巨噬细胞COX-2蛋白表达水平($P<0.05$),说明炎症模型成功。与正常组比较,RAW264.7细胞炎症模型中TNF- α ,COX-2蛋白表达显著增加($P<0.05$);与模型组比较,BLA, songorine, yunaconitine, karacoline 各组TNF- α ,COX-2蛋白表达水平不同程度降低($P<0.05$)。与正常组比较,RAW264.7细胞炎症模型中白细胞介素-1受体相关激酶4(IRAK-4),NF- κ B, JAK1,信号转导与转录激活因子3(STAT3)水平显著增加($P<0.05$);与模型组比较,BLA, songorine, yunaconitine, karacoline 各组IRAK4,NF- κ B, JAK1,STAT3水平显著降低($P<0.05$)。结论:基于系统药理学和体外实验对相关靶点和信号通路进行分析,为了了解RA的发病机制,揭示乌头生物碱治疗RA的分子机制提供新见解,也为蒙药在现代医学中的应用提供新思路。

[关键词] 乌头生物碱; 脂多糖; 类风湿性关节炎; 炎症因子; 系统药理学; 分子机制

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)05-0171-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210101

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210105.1431.004.html>

[网络出版日期] 2021-1-6 9:08

Systematic Study on Molecular Mechanism of Aconitum Alkaloid in Treatment of Rheumatoid Arthritis

LIU Ting-ting, XIAO Zhi-bin, CHEN Qi, SU Min, WANG Lei, ZHANG Sha-sha,
YANG Fan, CHANG Fu-hou*

(School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, New Drug Safety Evaluation Research Center,

[收稿日期] 20201013(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81760676);内蒙古自治区自然科学基金项目(2019LH08017)

[第一作者] 刘婷婷,在读硕士,从事生化与分子药理学工作,E-mail:1213011419@qq.com

[通信作者] *常福厚,博士,教授,从事生化与分子药理学工作,E-mail:changfh@163.com

Inner Mongolia Autonomous Region New Drug Screening Engineering Research Center,
Hohhot 010110, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of chemical compound of aconitum alkaloid on the lipopolysaccharide (LPS) -induced inflammatory response of RAW264.7 macrophages and investigate its mechanism. **Method:** The chemical compounds of Aconitum Kusnezoffii Reichb were collected from TCMSP database with consideration of oral bioavailability (OB) $\geq 30\%$ and drug-likeness (DL) ≥ 0.18 . The potential targets of each chemical component were predicted with use of Pubchem database and Swiss Target Prediction database. Rheumatoid arthritis (RA) targets were collected from GeneCards database and selected by intersection screening. Gene ontology (GO) classification enrichment and Pathway enrichment analysis were carried out with use of DAVID database. Cytoscape was used to construct "Chemical Compound-Potential Targets-Pathway-Disease" network. Protein-protein interaction (PPI) network was constructed by using STRING database and Cytoscape software. RAW264.7 macrophages were stimulated by LPS to establish macrophage inflammation model *in vitro*. Western blot was used to detect the effects of chemical compounds on the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in RAW264.7 cells induced by LPS, as well as on the expression of JAK kinase and nuclear transcription factor- kappa B (NF- κ B) signal pathway. **Result:** A total of 27 chemical compounds were obtained by searching TCMSP database and consulting literature (OB $\geq 30\%$, DL ≥ 0.18). 12 chemical compounds were obtained after screening. 177 potential targets were obtained after database prediction and screening, and 97 targets were obtained as potential targets for the treatment of RA after intersection between 177 potential targets and 4 329 RA targets. A total of 32 biological processes (BP), 5 cellular components (CC), and 12 molecular functions (MF) were enriched by DAVID database. The construction of network topology map showed that different chemical compounds can act on the same target and the same chemical compound can also act on different targets in the treatment of RA. Aconitum alkaloid can be connected with the same pathway through different targets or with different pathways through the same target, indicating that different targets may have synergistic effect, which fully reflected the complex multi-compound, multi-targets and multi-pathways mechanism. Different concentrations of LPS in stimulation (0-200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) can significantly up-regulate the expression of COX-2 protein in RAW264.7 macrophages ($P < 0.05$), indicating that the inflammatory model was successful. Compared with the normal group, the expression of TNF- α and COX-2 protein in the inflammatory model of RAW264.7 cells increased significantly ($P < 0.05$), while the expression of TNF- α and COX-2 protein in bulleyaconitine A (BLA), songorine, yunaconitine and karacoline groups decreased in varying degrees compared with the model group ($P < 0.05$). Compared with the normal group, the expression of IRAK4, NF- κ B, JAK1 and STAT3 in the inflammatory model of RAW264.7 cells were significantly increased ($P < 0.05$), while such levels in BulleyaconitineA, songorine, yunaconitine and Karacoline groups were significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Based on systematic pharmacology and *in vitro* experiments, the related targets and signal pathways were analyzed to provide new insights into the pathogenesis of RA, reveal the molecular mechanism of aconitum alkaloid in the treatment of RA, and provide new ideas for the application of Mongolian medicine in modern medicine.

[Key words] aconitum alkaloid; lipopolysaccharide; rheumatoid arthritis; inflammatory factors; systematic pharmacology; molecular mechanism

类风湿性关节炎(RA)是一种以关节滑膜炎为主要表现,伴随滑膜增生,炎症细胞浸润,关节积液,在炎症反复刺激下,新生血管增生导致血管翳形成^[1],随病程进展开始出现关节表面软骨和骨质

进行性破坏的慢性自身免疫性疾病。临床表现以出现多关节晨僵、肿痛、变形、活动受限为特征^[2-3]。RA全球患病率为0.2%~1%,我国患病率为0.28%~0.41%,总患病人群近500万,男女患病比率为

1:4^[4]。RA的药物治​​疗主要包括非甾体类抗炎药(NSAIDs)^[5],糖皮质激素(GC)^[6],对乙酰氨基酚(paracetamol)^[7],传统改善病情抗风湿药(DMARDs)^[8]。NSAIDs药物及GC虽有抗炎止痛作用,但无延缓病情进展作用,且有引起心血管及消化道病变、糖脂代谢紊乱、骨质疏松、感染等不良反应,不适于RA患者长期应用。传统DMARDs药物作为RA的重要治疗药物,虽可延缓病情进展,但常需一种甚至多种药物联合长病程服用,引起骨髓抑制、肝肾损伤、消化道病变等的风险较大,患者耐受性及依从性较差^[9-10]。西医治疗RA的药物种类较多,治疗方案灵活多变,疗效虽然显著提高,但治疗上存在局限性和不足,无论哪种药物,均有严格的适应症,禁忌症和不良反应,而RA病情进展的控制,常需要多种药物联合应用,因此在提高疗效的同时也带来更多的不良反应。

乌头属在我国古代已供药用,中医处方中乌头常用于治疗风湿性及RA,坐骨神经炎及胃、腹冷痛等疾患。其中草乌为毛茛科乌头属多年生草本植物,又叫北乌头碱(aconitum kusnezoffii reichb)^[11],以干燥块茎及干燥叶入药。2020年版《中华人民共和国药典》(第一部)^[12]记载具有祛风湿、温经止痛之功效,用于风寒湿痹、关节疼痛、心腹冷痛、寒疝作痛及麻醉止痛。《内蒙古中草药》^[13]记载乌头生物碱味辛、性温、平、效轻、消化后变凉性;有大毒。乌头生物碱作为蒙药已广泛用于治疗各种疾病,一些复方已成功用于RA的治疗,例如痹苦乃停片^[14],那如-3^[15]等。滇西喇叭碱甲(bulleyaconitine A, BLA)是从乌头碱植物滇西喇叭(aconitumbulleyanum diels)中提取的具有生物活性的二萜类生物碱,具有抗炎、镇痛等功效^[16],主治癌症晚期疼痛、风湿及RA、肩周炎、骨关节炎、坐骨神经痛等,已广泛用于临床。针对BLA治疗RA药理机制有待进一步阐明。研究表明,乌头生物碱通过影响免疫反应以及抑制肿瘤坏死因子- α (TNF- α),环氧化酶-2(COX-2)促炎细胞因子的表达来治疗RA,尽管草乌疗效显著,但其分子机制还有待研究,已有化学分析^[17]、生物活性测定^[18]等传统方法对乌头生物碱进行研究,但其药理机制尚未完全阐明。

系统药理学是基于系统生物学的理论,对生物系统的网络分析,选取特定信号节点(nodes)进行多靶点药物分子设计的新学科,通过构建药物与潜在靶点、信号通路、疾病之间的相互作用网络,对所得的网络图分析探讨药物的药效物质基础及作用机

制,整体上提高药物疗效,从而降低毒副作用^[19]。随着临床大数据挖掘技术的开展和应用,传统的药物作用机制研究已不适合蒙药的研究需求。本文基于系统药理学,对乌头生物碱有效成分进行整体研究、药物协同治疗作用及药理学机制进行预测,将现代医学的“疾病”和中医学中的“证型”有机结合起来。本次研究选取乌头生物碱中具有代表性的草乌以及BLA,以脂多糖(LPS)刺激小鼠巨噬细胞RAW264.7为炎症模型,旨在从细胞水平上进一步阐明乌头生物碱的抗炎机制,从细胞生物学、分子机制和信号通路层面为乌头生物碱治疗RA提供依据。

1 材料

1.1 细胞 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞RAW264.7(北京协和基础医学研究所)。

1.2 药材 BLA,宋果灵(songorine),滇乌头碱(yunaconitine),多根乌头碱(karacolone)(成都乐美天医药科技有限公司,货号分别为DC0057, DS0073, DD0058, DST191025-058),药材均购于成都乐美天医药科技有限公司;LPS(上海源叶生物科技有限公司,货号S11060)。

1.3 试剂 青霉素-链霉素,DMEM高糖培养基,灭活胎牛血清(美国Gibco公司,货号分别为15140163, C11995500BT, 12483020, D12345);噻唑蓝(MTT,美国Sigma公司,货号2128);loading buffer蛋白上样缓冲液(中国索莱宝公司,货号P1040); β -肌动蛋白(β -actin)抗体, TNF- α 抗体, COX-2抗体,核转录因子- κ B(NF- κ B)抗体,白细胞介素-1受体相关激酶4(IRAK-4)抗体, JAK激酶(JAK1)抗体,信号转导与转录激活因子3(STAT3)抗体,辣根过氧化物酶(HRP)结合的山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G(英国Abcam公司,货号分别为ab8227, ab183218, ab179800, ab32360, ab32511, ab133666, ab68153, ab6789);BCA蛋白定量试剂盒, RIPA裂解液(中国碧云天公司,货号分别为183056, P0013C)。

1.4 仪器 1645050型电泳仪,165-8001型电泳槽(美国Bio-Rad公司);BDS200型倒置生物显微镜(德国Leica公司);OSE-DB-01型金属浴(中国北京天根生化科技有限责任公司);Heraeus HERAcell 150i型CO₂培养箱, Forma-702型-80℃超低温冰箱, ST16R型台式高性能离心机(美国Thermo Fisher公司);ES-215型立式高压蒸汽灭菌锅(日本Tomy公司);Odyssey CLx型红外荧光扫描成像系

统(美国Licor公司)。

2 方法

2.1 化学成分筛选 利用中药系统药理学技术平台(TCMSP)数据库^[20](<http://tcmssp.com/>)中搜索草乌中含有的化学成分。根据药动学参数口服生物利用度(OB)^[21](OB≥30%)和药物相似性(DL)^[22](DL≥0.18)获取草乌中的化学成分。

2.2 化学成分潜在作用靶点的获取 在Pubchem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)^[23]数据库检索化学结构信息,并以Smiles格式进行保存。将筛选得到的化学成分Smiles结构导入Swiss Target Prediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)^[24]数据库,获得与药物成分相关的潜在作用靶点。

2.3 疾病靶点的获取 通过在GeneCards(<https://www.genecards.org/>)^[25]数据库输入关键词“rheumatoid arthritis”,检索出与RA相关的靶点。将预测出的乌头生物碱中化学成分的潜在作用靶点与RA相关靶点进行匹配,选取重合的靶点作为乌头生物碱治疗RA的潜在作用靶点。

2.4 DAVID富集分析 将获得的乌头生物碱化学成分潜在作用靶点导入DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/>)^[26]数据库,选择基因本体(GO)下的生物过程(BP),所处细胞中的位置(CC),分子功能(MF)进行GO富集分析,选择Pathway分析中京都基因与基因组百科全书(KEGG) Pathway,设定显著性 $P < 0.01$,辅助筛选条件 $FDR < 0.01$ 。按照涉及的靶点数目多少进行排序并绘制热图。

2.5 “化学成分-潜在作用靶点-信号通路-疾病”网络构建 将2.4项中富集的Pathway整合,采用Cytoscape软件^[27]构建“化学成分-潜在作用靶点-信号通路-疾病”关系网络拓扑图。

2.6 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建 将2.3项得到的潜在作用靶点导入STRING(<https://string-db.org/>)^[28]数据库,获得蛋白互作关系,将关键信息导入Cytoscape软件绘制PPI网络,使用Generate style from statistics工具将节点大小与颜色用于反映度值(Degree)大小,边的粗细设置用于反映综合得分(Combined score)大小,最终获得蛋白质相互作用网络(PPI)。

2.7 信号通路构建 不同的网络区域可能是不同的生物途径、过程或细胞定位的基础。药物不仅调节其相关靶点,还影响各种代谢酶和下游蛋白,以及与特定疾病相关的通路。为了了解RA的治疗机制,将预测的靶点映射到KEGG数据库([\[www.kegg.jp/\]\(http://www.kegg.jp/\)\)^{\[29\]}生成信号通路\(T-P\)图。](https://</p></div><div data-bbox=)

2.8 实验验证方法

2.8.1 细胞培养 小鼠巨噬细胞RAW264.7在含有10%胎牛血清(FBS)和1%抗生素(100 U·mL⁻¹青霉素和80 U·mL⁻¹链霉素)的DMEM培养液,于37℃ 5% CO₂的细胞培养箱中培养。

2.8.2 建立细胞炎症模型及指标测定 取对数生长期增殖活跃的细胞,将细胞接种于6孔板中,培养24 h后,设置空白组,LPS不同浓度组^[30],继续培养24 h。提取全细胞蛋白,通过蛋白免疫印迹法(Western bolt)检测炎症介质COX-2的蛋白表达水平,除去培养液,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次,加入蛋白裂解液,提取全蛋白,此过程需在冰上进行。用牛血清白蛋白作为对照,采用BCA蛋白定量试剂盒测得其蛋白浓度。采用10% SDS-PAGE(150 V, 2 h)分离蛋白,湿转法将蛋白条带转移至PVDF膜上,用5%脱脂牛奶封闭2 h,切膜,加COX-2(1:2 500), β -actin(1:5 000)孵育过夜,冲洗掉一抗,再用二抗(1:5 000)孵育1 h,采用增强化学发光法检测蛋白质,采用Image J软件统计相对灰度值。

2.8.3 化学成分对RAW264.7细胞的细胞存活率的影响 将预先培养好的细胞采用血细胞计数板进行细胞计数,按一定的倍数稀释细胞悬液,调整细胞密度 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ 个/mL加入96孔板,分为5个药物浓度梯度,每个药物浓度设置5个复孔,并设置对照孔和调零孔。放入37℃细胞培养箱中24 h后,加入药物。加入药物刺激20 h后,每孔加入MTT溶液20 μ L,37℃孵育4 h后,每孔加入DMSO 150 μ L,震荡10 min,使紫色结晶物甲臞充分溶解,计算每组复孔细胞增殖率的平均值,绘制生长曲线。

2.8.4 化学成分对LPS诱导RAW264.7细胞炎性介质水平的影响 取对数生长期增殖活跃的细胞,接种于6孔板,设置正常组、模型组(LPS质量浓度为100 μ g·L⁻¹),BLA组(12.5 μ mol·L⁻¹),songorine组(25 μ mol·L⁻¹),yunaconitine组(12.5 μ mol·L⁻¹),karakoline组(12.5 μ mol·L⁻¹),刺激24 h后,用离心管收集细胞培养液,低温高速离心机中以4℃,12 000 r·min⁻¹离心10 min,用移液器小心抽取上清液,裂解细胞,提取全细胞蛋白,通过Western bolt检测炎症介质TNF- α (稀释倍数1:1 000),COX-2(稀释倍数1:2 500)蛋白表达水平,实验步骤同2.8.2项。

2.8.5 化学成分对NF- κ B信号通路的影响 实验步骤同2.8.4项,通过Western bolt检测NF- κ B,IRAK-4

(稀释倍数均为 1:5 000)蛋白表达水平。

2.8.6 化学成分对 JAK1 信号通路的影响 实验步骤同 2.8.4 项,通过 Western bolt 检测 JAK1(稀释倍数 1:5 000),STAT3(稀释倍数 1:2 000)蛋白表达水平。

2.8.7 统计学处理 实验数据采用 SPSS 25.0 软件分析,符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 化学成分的筛选 通过数据库检索以及查阅文献,收集到草乌中化学成分共 27 个。通过 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 进一步筛选得到草乌化学成分共 8 个。药代动力学研究表明,部分乌头碱类药物吸收不良,导致 OB 较低。例如, OB 为 7.95% 的 aconitine^[31], 8.70% 的 mesaconitine^[31], 24.46% 的 songorine^[32] 具有镇痛、消炎等作用,并且 songorine 具有祛风散寒、止痛消肿、通经活络的功效,用于治疗风湿及 RA 等慢性炎症性疾病,因此被保留供后续分析。共得到 12 种化学成分。见表 1。

3.2 化学成分潜在作用靶点的获取 通过数据库预测草乌化学成分以及 BLA 的潜在作用靶点,共得到 259 个靶点,筛去重复项共得到 177 个靶点。

3.3 疾病靶点的获取 通过在 GeneCards 数据库检索出与 RA 相关靶点共 4 329 个,将潜在作用靶点与 RA 相关靶点进行重叠,取重合的 97 个靶点进行分析。

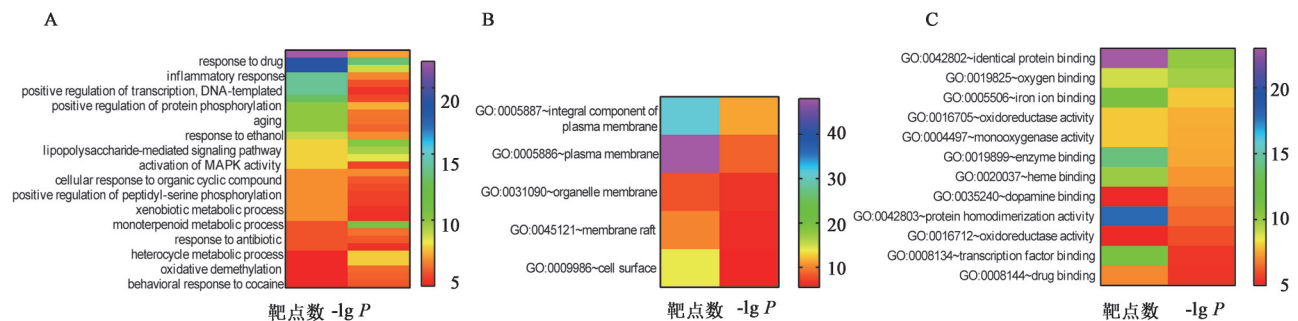
3.4 DAVID 富集分析 将 RA 与乌头生物碱共同潜在作用靶点导入 DAVID 数据库进行富集分析。97 个靶点共富集到生物过程(BP)389 条,经筛选后

表 1 乌头碱化学成分 OB,DL 值

Table 1 Chemical component in aconitum alkaloid and their OB and DL values

M_ID	成分	OB/%	DL
MOL002397	karakoline	51.73	0.73
MOL004748	3-deoxyaconitine	30.96	0.24
MOL004749	3-acetylaconitine	37.05	0.20
MOL004756	crassicauline A	34.13	0.21
MOL004757	yunaconitine	33.56	0.20
MOL004759	napelline	34.48	0.72
MOL004763	Izoteolin	39.53	0.51
MOL000538	hypoconitine	31.39	0.26
MOL002088	aconitine	7.95	0.23
MOL002089	mesaconitine	8.70	0.25
MOL002431	songorine	24.46	0.72
-	BLA	-	0.55

($P < 0.01$, $FDR < 0.01$)得到 32 条。所处细胞中的位置(CC)共富集到 53 种,经筛选后共有 5 个位置。分子功能(MF)共富集到 85 种,经筛选后得到 12 种分子功能。这些靶点主要富集的生物过程有对 RNA 聚合酶的调节、免疫应答、细胞凋亡、炎症反应等。在细胞中主要集中在质膜、细胞器膜、膜筏、细胞表面等位置。各靶点主要执行的分子功能有促进相同蛋白的结合、同源二聚体的活性、酶活性、离子的结合、转录因子的结合等。主要涉及细胞、组织、器官、代谢、免疫、对应激的应答、对酶活性的调节等过程,反映了 RA 作为一种复杂的疾病涉及多种生物过程,乌头生物碱可以通过调节这些生物过程来发挥治疗 RA 的作用。具体生物过程、细胞所处位置、分子功能见图 1。



A. BP; B. CC; C. MF

图 1 BP,CC, MF 富集分析

Fig. 1 BP, CC, MF enrichment analysis

3.5 构建“化学成分-潜在作用靶点-信号通路-疾病”网络构建 通过 DAVID 数据库共富集到 107 条信号通路,筛选后 ($P < 0.01$, $FDR < 0.01$)得到 28 条信

号通路。Cytoscape 绘制网络拓扑图,共涉及 219 个节点,687 条边,见图 2。其中与潜在作用靶点相连的化学成分 Degree 值分别为 BLA(76); songorine

(74); (+)-Isoboldine(28); napelline(17); karakoline(12); yunaconitine, deoxyaconitine(10); hyaconitine, acetylaconitine, mesaconitine(9); crassicauline A, aconitine(8)。RA与乌头生物碱共同的潜在作用靶点中对RA治疗效果明显的靶点Degree值分别为羟基类固醇(11 β)脱氢酶2(HSD11B2), 7-脱氢胆固醇还原酶(DHCR7), 类固醇5 α 还原酶, α 肽1(SRD5A1), 核受体亚家族3C组成员1(NR3C1), 滤泡刺激激素受体(FSHR)均为10; 蛋白激酶1(Akt1)(3); TNF, JAK1, STAT3, NF- κ B, 白细胞介素-6(IL-6), IL-1, C-RAF原癌基因丝

苏氨酸蛋白激酶(RAF1)均为2。Degree值较高的信号通路有hsa04080:神经活动配体受体相互作用(neuroactive ligand-receptor interaction)(20); hsa05161:乙型肝炎(hepatitis B)(18); hsa05152:肺结核(tuberculosis)(17); hsa05145:弓形虫病(toxoplasmosis)(15); hsa05164:甲型流感(influenza A)(14); hsa04210:细胞凋亡(apoptosis)(13)。表明乌头生物碱既可通过不同靶点与同一通路相连接,也可通过同一靶点与不同通路相连接,说明不同的靶点具有协同作用,充分体现了乌头生物碱多靶点、多通路的复杂机制。

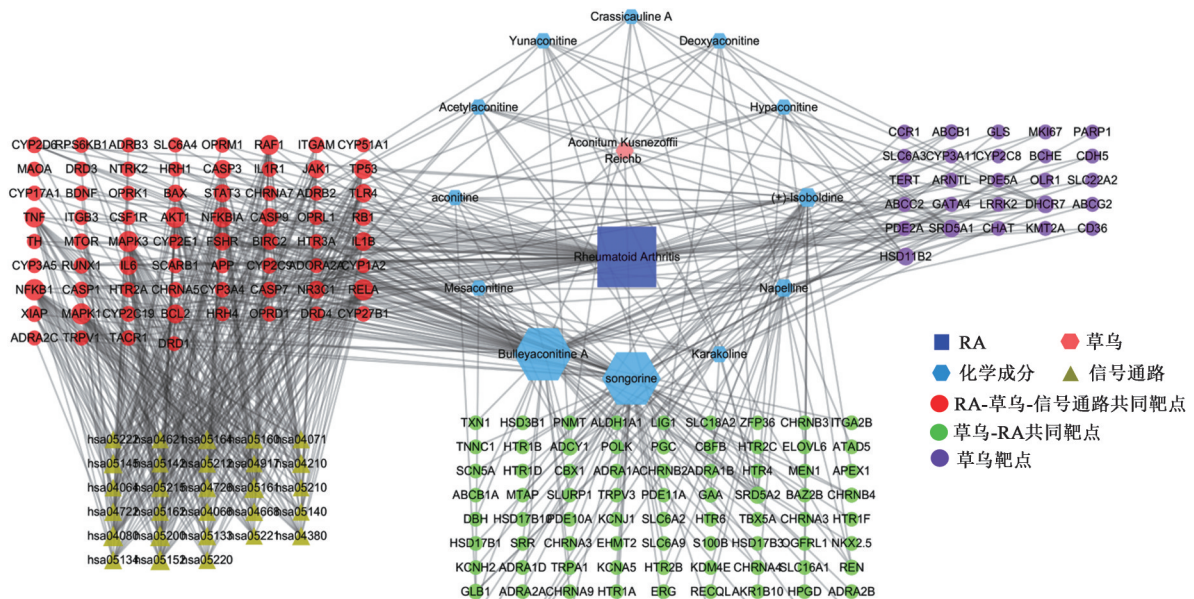


图2 “化学成分-潜在作用靶点-信号通路-疾病”网络拓扑
Fig. 2 "Chemical compound-potential target-pathway-disease" network

3.6 PPI网络构建 图3为蛋白质-蛋白质相互作用网络图,图中共有93个节点,823条边。节点的大小表示Degree值大小,节点越大, Degree值越大;边的粗细表示Combine score,边越粗, Combine score值越大。其中Degree值较高的靶点有Akt1(60); IL-6(51); 促分裂原活化蛋白激酶3(MAPK3)(48); 对半胱天冬氨酸蛋白酶(CASP3)(43); TNF(42); STAT3(38); 促分裂原活化蛋白激酶1(MAPK1)(36); IL-1 β (30); 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)(27); NF- κ B(25); JAK1(14); RAF1(17)。表明这些蛋白质在整个网络中占据重要的地位,乌头生物碱可能综合调控复杂的蛋白网络从而起到治疗RA。

3.7 信号通路构建 考虑到乌头生物碱治疗RA的复杂机制,将通过T-P网络获得的关键通路整合起来,构建了完整的RA通路分析。RA由6条信号通

路组成的通路,如 hsa04668: TNF signaling pathway, hsa04064: NF- κ B signaling pathway, hsa04010: MAPK signaling pathway, hsa04150: mTOR signaling pathway, hsa04151: PI3K/Akt signaling pathway 和 hsa04630: JAK/STAT signaling pathway。见图4, RA通路可代表炎症相关模块。炎症微环境在类风湿关节炎发展的各个阶段都起着非常重要的作用。许多重要的细胞因子和化学因子参与了这一过程。例如BLA激活转录因子NF- κ B, MAPK, mTOR等,降低下游蛋白COX-2和TNF- α 的表达。NF- κ B家族参与了炎症、分化、肿瘤发生、胚胎发育和凋亡等多种基因的激活,因此, COX-2在大多数正常组织中低水平表达,而是受到LPS和多种细胞因子的强烈诱导,在各种炎症反应的发展中起着至关重要的作用。结果表明, BLA可通过调节NF- κ B, COX-2等抗炎活性来治疗RA,

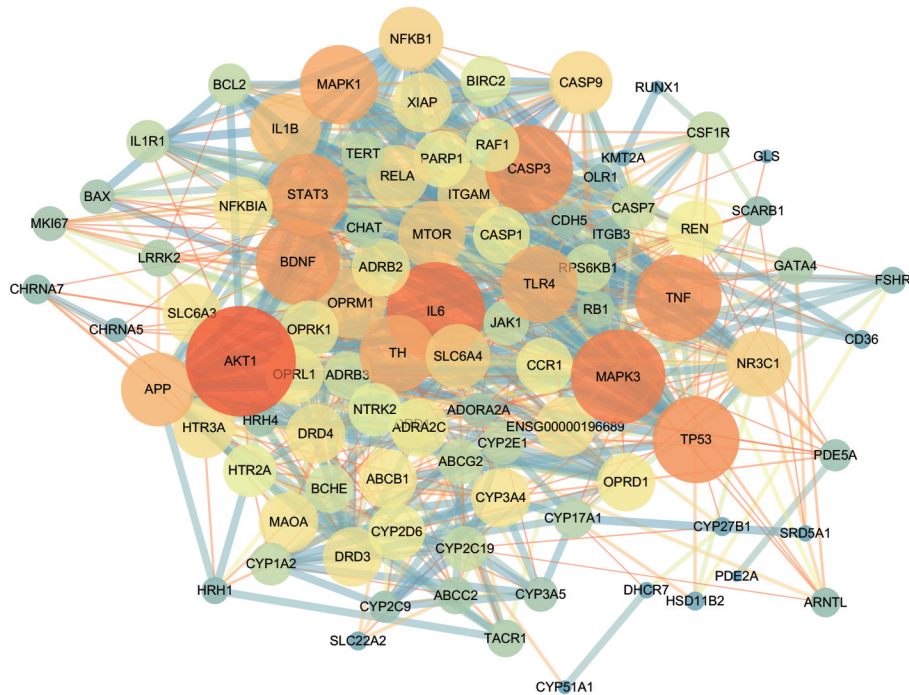


图3 PPI相互作用网络

Fig. 3 Protein-protein interaction network

songorine可激活JAK的转录,降低下游蛋白JAK1和STAT3的表达。JAK/STAT信号通路由酪氨酸激酶JAK和转录因子STAT组成,在细胞增殖、生长、

凋亡、免疫等重要生理过程中起调节作用。因此,乌头生物碱可能通过调节细胞周期、凋亡和抗血管生成来治疗RA。

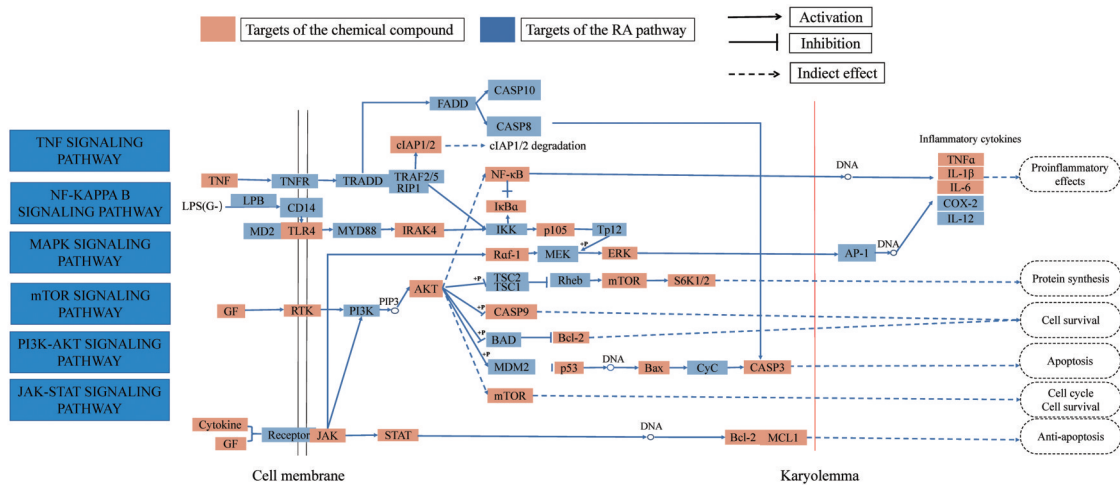


图4 RA信号通路

Fig. 4 RA-pathway

3.8 实验验证结果

3.8.1 LPS对RAW264.7细胞COX-2蛋白表达的影响 与正常组比较,LPS各剂量组COX-2蛋白表达均明显升高,当LPS质量浓度为 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时较明显($P<0.05$)。因此, $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS可诱导RAW264.7细胞产生炎症反应。见表2,图5。

3.8.2 化学成分对LPS诱导RAW264.7细胞存活率

的影响 RAW264.7细胞用BLA, songorine, yunaconitine, karakoline不同浓度刺激后,对细胞的增殖率影响各不相同,取最适浓度用于后续实验研究,BLA为 $12.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, songorine为 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, yunaconitine为 $12.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, karakoline为 $12.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。见表3。

3.8.3 化学成分对RAW264.7细胞TNF- α 蛋白表达

表 2 LPS 对 RAW264.7 细胞 COX-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of LPS on COX-2 protein expression in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	COX-2/ β -actin
正常		0.534 \pm 0.113
LPS	25	0.698 \pm 0.117
	50	0.745 \pm 0.120
	100	0.895 \pm 0.156 ¹⁾
	150	0.989 \pm 0.114 ^{1,2)}
	200	0.809 \pm 0.201 ^{1,2)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与 LPS 组最低剂量比较²⁾ $P < 0.05$ 。

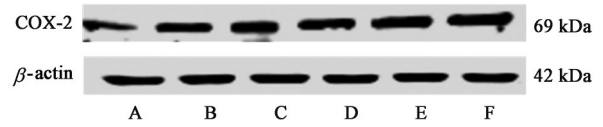
表 3 化学成分对 RAW264.7 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=20$)

Table 3 Effect of chemical components on survival rate of RAW264.7 cell ($\bar{x} \pm s, n=20$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	BLA
正常		0.124 \pm 0.051
DMSO		0.119 \pm 0.050
BLA	12.5	0.121 \pm 0.029
	25	0.144 \pm 0.051 ¹⁾
	50	0.098 \pm 0.053
	100	0.094 \pm 0.053
	200	0.090 \pm 0.050
songorine	12.5	0.130 \pm 0.052
	25	0.134 \pm 0.050
	50	0.118 \pm 0.020 ¹⁾
	100	0.099 \pm 0.025 ¹⁾
	200	0.092 \pm 0.058 ^{1,2)}
yunaconitine	12.5	0.165 \pm 0.051
	25	0.149 \pm 0.054 ^{1,3)}
	50	0.132 \pm 0.056 ^{1,3)}
	100	0.140 \pm 0.053 ^{1,3)}
	200	0.094 \pm 0.055 ^{1,2,3)}
karakoline	12.5	0.130 \pm 0.058 ¹⁾
	25	0.115 \pm 0.056
	50	0.110 \pm 0.003
	100	0.115 \pm 0.052
	200	0.107 \pm 0.054 ¹⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与 DMSO 组比较²⁾ $P < 0.05$;与给药组最低剂量比较³⁾ $P < 0.05$ 。

的影响 与正常组比较,RAW264.7 细胞炎症模型中 TNF- α 蛋白的表达明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较,BLA, songorine, yunaconitine, karakoline 组 TNF- α 蛋白表达水平均有不同程度的降低 ($P <$



A. 正常组; B. LPS 25 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; C. LPS 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. LPS 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; E. LPS 150 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; F. LPS 200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

图 5 各组 RAW264.7 细胞 COX-2 蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of COX-2 protein expression in RAW264.7 cells of each group

0.05)。见表 4, 图 6。

3.8.4 化学成分对 RAW264.7 细胞 COX-2 蛋白表达的影响 与正常组比较,RAW264.7 细胞炎症模型中 COX-2 蛋白的表达明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较,BLA, yunaconitine, karakoline 组 COX-2 蛋白表达水平均有不同程度的降低 ($P < 0.05$)。见表 4, 图 6。

3.8.5 化学成分对 RAW264.7 细胞 NF- κ B 通路的影响 与正常组比较,RAW264.7 细胞炎症模型中 IRAK4 和 NF- κ B 蛋白的表达明显增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较,BLA, yunaconitine, karakoline 组 IRAK4 蛋白表达水平均有不同程度的降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,songorine, yunaconitine 组 NF- κ B 蛋白表达水平均有不同程度的降低 ($P < 0.05$)。见表 4, 图 6。

3.8.6 对 JAK 通路的影响 与正常组比较,RAW264.7 细胞炎症模型中 JAK1 和 STAT3 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较,BLA, songorine, yunaconitine, karakoline 组 JAK1 蛋白表达水平均有不同程度的降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,songorine, yunaconitine, karakoline 组 STAT3 蛋白表达水平均有不同程度的降低 ($P < 0.05$)。见表 4, 图 6。

4 讨论

炎症反应通常是许多疾病的早期症状之一,在许多疾病的发生和发展中起着关键作用,而巨噬细胞是调节炎症相关疾病的靶基因。当 LPS 刺激巨噬细胞时,巨噬细胞在 LPS 刺激下被激活,激活相关信号通路 NF- κ B^[33], MAPK^[34], JAK1^[35-36], 并分泌大量炎症介质如 COX-2。分泌大量促炎因子,如 IL-1, IL-6, TNF- α 等^[37-38]。RAW264.7 小鼠巨噬细胞系,一般用于建立炎症模型和研究炎症反应。本研究以 RAW264.7 细胞为研究对象,经 LPS 刺激建立巨噬细胞炎症模型,研究化合物对炎症的影响及其分子机制。

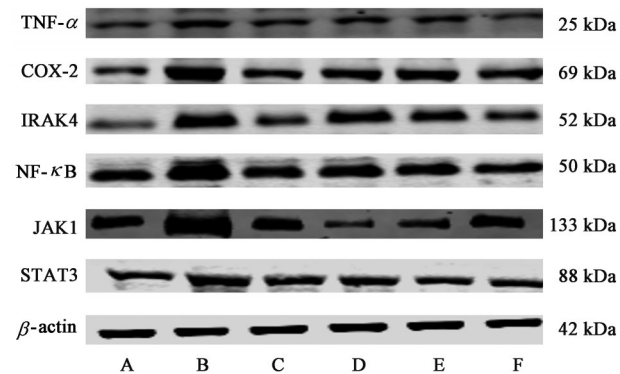
TNF- α 是活化的单核-巨噬细胞产生的一种重

表 4 化学成分对 LPS 诱导巨噬细胞 RAW264.7 中 TNF- α , COX-2, IRAK4, NF- κ B, JAK1, STAT3 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=18$)

Table 4 Effect of chemical components on expression of TNF- α , COX-2, IRAK4, NF- κ B, JAK1 and STAT3 protein in RAW264.7 macrophages induced by LPS ($\bar{x}\pm s, n=18$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	TNF- α / β -actin	COX-2/ β -actin	IRAK4/ β -actin	NF- κ B/ β -actin	JAK1/ β -actin	STAT3/ β -actin
正常		0.423 \pm 0.077	0.938 \pm 0.165	0.409 \pm 0.070	0.495 \pm 0.072	1.121 \pm 0.276	1.070 \pm 0.306
模型		0.812 \pm 0.168 ¹⁾	2.126 \pm 0.334 ¹⁾	1.082 \pm 0.108 ¹⁾	1.252 \pm 0.079 ¹⁾	2.083 \pm 0.109 ¹⁾	1.526 \pm 0.305 ¹⁾
BLA	12.5	0.525 \pm 0.107 ²⁾	1.348 \pm 0.116 ^{1,2)}	0.662 \pm 0.063 ^{1,2)}	0.794 \pm 0.140 ¹⁾	1.153 \pm 0.445 ²⁾	1.194 \pm 0.284
songorine	25	0.491 \pm 0.180 ²⁾	1.562 \pm 0.090 ¹⁾	0.762 \pm 0.107 ^{1,3)}	0.959 \pm 0.084 ^{1,2)}	0.848 \pm 0.391 ²⁾	1.127 \pm 0.212 ²⁾
yunaconitine	12.5	0.581 \pm 0.125 ²⁾	1.767 \pm 0.199 ^{1,2,4)}	0.698 \pm 0.038 ^{1,3)}	0.970 \pm 0.097 ^{1,2,3,4)}	0.634 \pm 0.102 ²⁾	0.838 \pm 0.125 ²⁾
karakoline	12.5	0.522 \pm 0.066 ²⁾	1.587 \pm 0.420 ^{1,2,4)}	0.507 \pm 0.076 ^{2,3)}	0.774 \pm 0.064 ^{1,3,4,5)}	1.074 \pm 0.313 ²⁾	0.988 \pm 0.218 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$;与 BLA 组比较³⁾ $P<0.05$;与 songorine 组比较⁴⁾ $P<0.05$;与 yunaconitine 组比较⁵⁾ $P<0.05$ 。



A. 正常组; B. 模型组; C. BLA 组; D. songorine 组; E. yunaconitine 组; F. karakoline 组

图 6 巨噬细胞 RAW264.7 中 TNF- α , COX-2, IRAK4, NF- κ B, JAK1, STAT3 蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of TNF- α , COX-2, IRAK4, NF- κ B, JAK1 and STAT3 protein expression in RAW264.7 macrophages

要的炎症因子,通过促进髓系细胞向巨噬细胞的分化,抑制和杀伤肿瘤细胞,引起发热,参与自身免疫性疾病的病理损害^[39]。TNF- α 在类风湿关节炎的发生发展中起着重要作用,主要由滑膜巨噬细胞产生,是炎症反应的上游因子,能刺激巨噬细胞产生 IL-6, IL-8 和氧自由基,参与局部炎症,而滑膜细胞能产生 TNF- α 由滑膜巨噬细胞诱导。TNF- α 和 IL-1 通常共同合成和分泌。滑膜组织中 TNF- α 水平与滑膜内层巨噬细胞数量有关^[40]。他们之间的相互作用加剧了 RA 的病情。环氧合酶有 3 种同工酶,包括 COX-1, COX-2, COX-3^[41]。其中 COX-2 是一种可诱导的同工酶,包括促炎因子和生长因子^[42]。当受到外界刺激时,COX-2 可诱导花生四烯酸产生前列腺素 H₂,在多种下游酶的催化下转化为前列腺素 E₂(PGE₂),这在 PGE₂的炎症反应中非常重要^[43]。正常情况下 COX-2 不表达或低表达,但在炎症细胞和肿瘤细胞中表达较多。是一种能反映疾病严重程度的标记酶炎症结果表明。NF- κ B 是一种广泛存在

的核转录因子,其生理功能主要是调节免疫细胞生长分化及机体防御能力,该因子的活化可以促使炎症反应发生,清除病原体。NF- κ B 也是控制细胞因子、急性反应蛋白等基因开关的关键因子,若过度活化,细胞因子、急性反应蛋白等基因将过度表达,导致多种疾病发生,如关节炎、哮喘、艾滋病等。NF- κ B 在类风湿关节炎病变滑膜组织中大量表达,静息时,与抑制蛋白(I- κ B)结合^[44],当被激活后,与 I- κ B 解离,升高特定基因转录水平 NF- κ B 通路被认为是参与类风湿关节炎病理进程的重要途径。NF- κ B 可提高多种炎症基因的转录水平,如 TNF- α , IL-6 等。NF- κ B 还可导致滑膜肥厚增生,加重关节破坏,促进类风湿关节炎的发展^[45]。JAK 激酶家族是一类非受体酪氨酸激酶,在 RA 发病过程中的细胞因子信号转导中起重要作用,与组织细胞炎症反应过程及免疫应答关系密切^[46]。激活的 JAK 募集 STAT3,这些蛋白转位到细胞核并激活他们的靶基因。已有 40 多种不同的细胞因子和生长因子被证明可以激活 JAK 和 STAT 的特定组合。STAT3 可能在 RA 的发病机制中很重要,特别是在滑膜炎中。

本实验通过系统药理学和体外实验探讨乌头生物碱化学成分对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症反应的影响及其机制。通过 DAVID 数据库富集 GOBP, CC, MF, Cytoscape 构建“化学成分-潜在作用靶点-信号通路-疾病”网络拓扑图以及 PPI 网络图,得到与炎症相关的信号通路有 NF- κ B, JAK1, MAPK, mTOR 等。体外实验采用 Western blot 检测化学成分对炎性介质水平和相关信号通路的影响,结果显示,4 种化学成分均能不同程度的降低 TNF- α , COX-2 蛋白表达以及对 NF- κ B, JAK1 信号通路的产生影响。揭示乌头生物碱是通过多成分、多靶点、多通路治疗 RA,也为蒙药草乌以及 BLA 在

现代医学应用提供新思路。

[参考文献]

- [1] BODOLAY E, KOCH AE, KIM J, et al. Angiogenesis and chemokines in rheumatoid arthritis and other systemic inflammatory rheumatic diseases [J]. *J Cell Mol Med*, 2002, 6(3): 357-376.
- [2] LI Y, YU B. Invited commentary on- "The efficacy and safety of extracorporeal shockwave therapy in knee osteoarthritis: a systematic review and Meta-analysis"[J]. *Int J Surg*, 2020, 77: 24-34.
- [3] MARGUERITE C, REGIS B, AUDE I S, et al. Bone morphogenetic protein 2 and transforming growth factor β_1 inhibit the expression of the proinflammatory cytokine IL-34 in rheumatoid arthritis synovial FibroBLAsts[J]. *Am J Pathol*, 2017, 187(1): 156-162.
- [4] LI R, SUN J, REN L M, et al. Epidemiology of eight common rheumatic diseases in China: a large-scale cross-sectional survey in Beijing [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2012, 51(4): 721-729.
- [5] 姜泉,王海隆,巩固,等. 类风湿关节炎病证结合诊疗指南[J]. *中医杂志*, 2018, 59(20): 1794-1800.
- [6] VANDEWALLE J, LUYPAERT A, DE BOSSCHER K, et al. Therapeutic mechanisms of glucocorticoids [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2018, 29(1): 42-54.
- [7] MONTERRAT-DE L P S, GARCIA GIMENEZ M D, QUILEZ A M, et al. Ginger rhizome enhances the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of paracetamol in an experimental mouse model of fibromyalgia [J]. *Inflammopharmacology*, 2018, 26(4): 1093-1101.
- [8] NAVARRO M I, CORNELIUS S A, O'BEIRNE R J, et al. Views of primary care physicians and rheumatologists regarding screening and treatment of hyperlipidemia among patients with rheumatoid arthritis[J]. *BMC Rheumatology*, 2020, doi: 10. 1136/annrheumdis-2019-eular. 1827.
- [9] VISSER K, VANDER H D. Optimal dosage and route of administration of methotrexate in rheumatoid arthritis: a systematic review of the literature[J]. *Ann Rheum Dis*, 2009, 68(7): 1094-1099.
- [10] SEMERANO L, DECKER P, CLAVEL G, et al. Developments with investigational Janus kinase inhibitors for rheumatoid arthritis [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2016, 25(12): 1355-1359.
- [11] 张跃华,贾振宇,马维文,等. 乌头生物碱种子产量因子与产量间的关联性分析[J]. *种子*, 2016, 35(11): 87-90.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020: 252.
- [13] 内蒙古自治区革命委员会卫生局. 内蒙古中草药[M]. 呼和浩特:内蒙古自治区人民出版社, 1975.
- [14] 孙宝莹,王波. 痹苦乃停片的工艺及质量标准[J]. *中成药*, 1992(2): 3-4.
- [15] 王桂芝. 蒙药那如-3味丸治疗类风湿性关节炎的临床疗效及安全性分析[J]. *临床医药文献电子杂志*, 2018, 5(67): 166, 168.
- [16] LIU L, WANG S, XING H, et al. Bulleyaconitine A inhibits the lung inflammation and airway remodeling through restoring Th1/Th2 balance in asthmatic model mice [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2020, 84(7): 1409-1417.
- [17] 澈力木格,那生桑. 蒙中药乌头生物碱的测定和提取工艺及化学成分研究[J]. *中国民族医药杂志*, 2020, 26(2): 44-47.
- [18] 苏玉,勘静. 中药川乌与乌头生物碱的鉴别比较及药理活性分析[J]. *当代医药论丛*, 2020, 18(7): 57-58.
- [19] LI S, ZHANG B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application[J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(2): 110-120.
- [20] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, doi: 10. 1186/1758-2946-6-13.
- [21] BEHESHTI S, SHAYANFAR A. Prediction of the oral bioavailability correlation between humans and preclinical animals [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2020, 45(6): 771-783.
- [22] JIA C Y, LI J Y, HAO G F, et al. A drug-likeness toolbox facilitates ADMET study in drug discovery [J]. *Drug Discov Today*, 2020, 25(1): 248-258.
- [23] KIM S. Getting the most out of PubChem for virtual screening[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2016, 11(9): 843-855.
- [24] GFELLER D, GROSDIDIER A, WIRTH M, et al. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 32-38.
- [25] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The genecards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54: 1-33.
- [26] DENNIS G J R, SHERMAN B T, HOSACK D A, et al. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery[J]. *Genome Biol*, 2003, 4(5): P3.
- [27] DONCHEVA N T, MORRIS J H, GORODKIN J, et al.

- Cytoscape stringApp: network analysis and visualization of proteomics data[J]. *J Proteome Res*, 2019, 18(2):623-632.
- [28] SZKLARCZYK D, MORRIS J H, COOK H, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1):D362-D368.
- [29] KANEHISA M, FURUMICHI M, TANABE M, et al. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs[J]. *J. Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1):D353-D361.
- [30] KUMARI A, SINGH D K, DASH D, et al. Intranasal curcumin protects against LPS-induced airway remodeling by modulating toll-like receptor-4 (TLR-4) and matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9) expression via affecting MAP kinases in mouse model [J]. *Inflammopharmacology*, 2019, 27(4):731-748.
- [31] 李丹, 韩瑞兰, 林英华, 等. 不同比例甘草附子配伍对乌头碱及甘草苷溶出率的影响及镇痛抗炎作用探究 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2020, 18(12):115-120.
- [32] 陈佳, 郝小江, 郑国伟. 准噶尔乌头的生物碱成分及其对一氧化氮生成的抑制作用研究 [J]. *中药材*, 2020, 43(4):881-886
- [33] OZAWA T, ARORA S, SZULZEWSKY F, et al. A de novo mouse model of C11orf95-RELA fusion-driven ependymoma identifies driver functions in addition to NF- κ B [J]. *Cell Rep*, 2018, 23:3787-3797.
- [34] VENKATESAN T, CHOI Y W, LEE J, et al. Falcarindiol inhibits LPS-induced inflammation via attenuating MAPK and JAK-STAT signaling pathways in murine macrophage RAW 264. 7 cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 445(1/2):169-178.
- [35] COCHRAN F R, FINCH ARIETTA M B. Interleukin-6 can prime THP-1 macrophages for enhanced production of tumor necrosis factor-alpha in response to LPS [J]. *Immunopharmacology*, 1992, 23(2):97-103.
- [36] 孙颖, 刘玲, 施晓艳, 等. 丹皮酚通过下调 miR-155/JAK1-STAT1 通路抑制巨噬细胞 M1 极化 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(9):2158-2164.
- [37] VAN DEN BOSSCHE J, O'NEILL L A, MENON D. Macrophage immunometabolism: where are we (going)? [J]. *Trends Immunol*, 2017, 38(6):395-406.
- [38] 李木子, 张浩, 崔国情, 等. 苦地丁的抗炎药效物质基础组分及作用机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(11):2586-2594.
- [39] XU J, ZHAO Y, AISA H A. Anti-inflammatory effect of pomegranate flower in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264. 7 macrophages [J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1):2095-2101.
- [40] YI Y, CHENG J C, KLAUSEN C, et al. TGF- β inhibits human trophoBLAst cell invasion by upregulating cyclooxygenase-2 [J]. *Placenta*, 2018, 68:44-51.
- [41] HIGAKI T, OKANO M, FUJIWARA T, et al. COX/PGE (2) axis critically regulates effects of LPS on eosinophilia-associated cytokine production in nasal polyps [J]. *Clin Exp Allergy*, 2012, 42(8):1217-1226.
- [42] SALINAS G, RANGASETTY U C, URETSKY B F, et al. The cyclooxygenase 2 (COX-2) story: it's time to explain, not inflame [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2007, 12(2):98-111.
- [43] ZHANG Q, JIANG X, HE W, et al. MCL plays an anti-inflammatory role in mycobacterium tuberculosis-induced immune response by inhibiting NF- κ B and NLRP3 inflammasome activation [J]. *Med Inflamm*, 2017, doi:10.1155/2017/2432904.
- [44] ZAKARIA N, YUSOFF N M, ZAKARIA Z, et al. Inhibition of NF- κ B signaling reduces the stemness characteristics of lung cancer stem cells [J]. *Front, Oncol*, 2018, 8:166.
- [45] MALEMUD C J. The role of the JAK/STAT signal pathway in rheumatoid arthritis [J]. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2018, 10(5/6):117-127.
- [46] WAKAMATSU K, NANKI T, MIYASAKA N, et al. Effect of a small molecule inhibitor of nuclear factor-kappa synovial cells [J]. *Arthritis Res*, 2005, 7(6):R1348-R1359.

[责任编辑 周冰冰]