

升麻素衍生物抑制LPS诱导的RAW264.7细胞炎症反应及改善大鼠佐剂性关节炎

马嘉欣 赵岩 韩梅 洪傲天 韩佳宏 蔡恩博* 杨利民*

(吉林农业大学, 中药材学院, 长春 130118)

摘要 该文旨在设计并合成一系列升麻素衍生物, 并筛选出活性较好的衍生物, 并进一步对其抗类风湿性关节炎的作用机制进行初步研究。采用药物拼合原理合成升麻素有机酸酯衍生物和升麻素三氮唑衍生物, 对其结构进行鉴定; 筛选升麻素衍生物对脂多糖(LPS)诱导的RAW 264.7细胞的抗炎作用; 并构建完全弗氏佐剂(CFA)诱导的大鼠佐剂性关节炎模型, 测定大鼠体质量、踝关节肿胀度、关节炎指数、脏器指数、炎症因子和相关蛋白的表达水平, 采用苏木素-伊红(HE)染色观察踝关节滑膜组织病理变化, 最后将化合物与核心靶点进行分子对接验证。结果显示, 共得到21个升麻素衍生物, 经鉴定均为新化合物, 在6.25 $\mu\text{mol/L}$ ~50 $\mu\text{mol/L}$ 药物浓度下, 这些化合物对RAW 264.7细胞存活率均在 $\geq 85\%$ 以上, 有5个化合物NO抑制率的 IC_{50} 值优于升麻素和地塞米松(地塞米松 IC_{50} 为13.10 $\mu\text{mol/L}$)。与空白组相比, 模型组大鼠体质量极显著降低($P < 0.001$)、足趾肿胀度显著提高($P < 0.01$)、血清炎症因子水平显著提高($P < 0.05$)、脏器指数显著提高($P < 0.05$)。与模型组相比, 化合物15高剂量组的大鼠体质量显著提高($P < 0.01$)、足趾肿胀度显著降低($P < 0.01$)、血清炎症因子水平显著降低($P < 0.05$)、脏器指数显著降低($P < 0.01$), 其中化合物15高剂量组疗效较好, 且优于甲氨蝶呤。与模型组相比, 化合物15高剂量组关节滑膜病损、炎性细胞浸润经给药后得到明显改善, 此外该组大鼠踝关节滑膜组织中p-p38/p38表达水平显著降低($P < 0.01$)、p-ERK/ERK表达水平极显著降低($P < 0.001$)和Cleaved Caspase-3表达水平显著降低($P < 0.01$), 化合物15与关键靶点具有较好的亲和力。该研究得出, 化合物15可治疗由完全弗氏佐剂(CFA)诱导的大鼠佐剂性关节炎, 其作用机制可能与调控MAPK信号通路有关。

关键词 升麻素; 衍生物; 类风湿性关节炎; 结构修饰; MAPK

Inhibition of LPS-Induced Inflammatory Response in RAW264.7 Cells and Amelioration of Adjuvant Arthritis in Rats by Cimifugin Derivatives

MA Jiabin, ZHAO Yan, HAN Mei, HONG Aotian, HAN Jiahong, CAI Enbo*, YANG Limin*

(College of Traditional Chinese Medicines, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract The purpose of this paper was to explore the design and synthesis of a series of cimifugin derivatives, and to screen out the derivatives with better activity, so as to further study the mechanism of action of their anti-rheumatoid arthritis. The anti-inflammatory effects of cimifugin derivatives on LPS (lipopolysaccharide)-induced RAW 264.7 cells were screened, and CFA (complete Frances adjuvant)-induced rat adjuvant arthritis model

收稿日期: 2024-4-27 接受日期: 2024-5-20

国家中药材产业技术体系岗位科学家项目(批准号: CARS-21)和吉林省科技发展规划(批准号: 20210101217JC)资助的课题

*通信作者。Tel: 13944816620, E-mail: caienbo126621@126.com; Tel: 19917267388, E-mail: sqcg126621@126.com

Received: April 27, 2024

Accepted: May 20, 2024

This work was supported by the National Chinese Medicinal Material Industry Technology System Post Scientist Project (Grant No.CARS-21) and the Science and Technology Development Plan of Jilin Province (Grant No.20210101217JC)

*Corresponding authors. Tel: +86-13944816620, E-mail: caienbo126621@126.com; Tel: +86-19917267388, E-mail: sqcg126621@126.com

was constructed, and the body weight, ankle swelling, arthritis index, organ index and related inflammatory factors were measured, and the compounds were molecularly docked with the core targets. The pathological changes of ankle synovium were observed by HE (hematoxylin-eosin) staining. The results showed that a total of 21 cimifugin derivatives were obtained, all of which were identified as new compounds, and at the concentration of 6.25 $\mu\text{mol/L}$ ~50 $\mu\text{mol/L}$, these compounds more than 85% on the viability of RAW 264.7 cells, and the IC_{50} value of NO inhibition rate of 5 compounds was better than that of cimifugin and dexamethasone (Dex IC_{50} was 13.10 $\mu\text{mol/L}$). Compared with the blank group, the rats in the model group showed highly significant decrease in body weight ($P<0.001$), significant increase in toe swelling ($P<0.01$), significant increase in serum inflammatory factor levels ($P<0.05$) and significant increase in organ indices ($P<0.05$). Compared with the model group, the body weight of rats in the high dose group of compound 15 was significantly increased ($P<0.01$); toe swelling was significantly decreased ($P<0.01$); serum inflammatory factor level was significantly decreased ($P<0.05$); and organ index was significantly decreased ($P<0.01$) among which the high-dose compound 15 group had better efficacy and was better than methotrexate. Compared with the model group, compound 15 high dose group joint synovial disease and inflammatory cell infiltration significantly improved. In addition, the expression levels of p-p38/p38 were significantly reduced ($P<0.01$), p-ERK/ERK were highly significantly reduced ($P<0.001$) and Cleaved Caspase-3 were significantly reduced ($P<0.01$) in the synovial tissues of the ankle joints of the rats in this group. Compound 15 has good affinity with key targets. The study concluded that compound 15 can treat adjuvant arthritis induced by CFA (complete Frances adjuvant) in rats. The mechanism may be related to the regulation of MAPK signaling pathways.

Keywords cimifugin; derivatives; rheumatoid arthritis; structural modification; MAPK

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性自身免疫性疾病,可导致软骨和骨损伤,甚至残疾^[1-2]。巨噬细胞作为先天免疫细胞,在巨噬细胞保护身体免受外来入侵者的侵袭吞噬时引发炎症和免疫应答^[3-4]。活化的巨噬细胞通过与炎症微环境相互作用在炎症发展中发挥重要作用,当受到脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激时,巨噬细胞被激活并产生如IL-1 β 、IL-6和TNF- α 等细胞因子,NO是一种游离气体信号分子,参与神经、心血管和免疫系统的调节;反过来,这些细胞因子和NO通过招募免疫细胞、活化成纤维细胞来促进炎症反应^[5-6]。现代医学目前对类风湿性关节炎的治疗总体目标是减轻疼痛、缓解患者不适症状,并减少畸形和防止并发症的发生。非甾体抗炎药物和糖皮质激素药物被认为是快速作用的药物,此类药物常见副作用是恶心、腹痛、溃疡、胃肠道出血、骨质疏松和溃疡形成等^[7-9]。

在中国,中药草本在治疗RA上有着悠久的历史且一直发挥着重要的作用。中药单方如防风、雷公藤、白芍等是中国传统用于治疗风湿性疾病的良药。它们往往具有多种有效成分,能够同时作用于多个靶点治疗RA,且毒副作用较小,近年来

逐渐受到人们的关注^[10-11]。升麻素(cimifugin, CIM)具有解热镇痛、抗炎等药理作用^[12]。CHEN等^[13]经结构修饰合成了21个升麻素氨基酸酯衍生物,其中筛选出的衍生物3对RAW 264.7细胞上清中IL-1 β 、TNF- α 和IL-6的抑制作用最强。LEE等^[14]研究了鞘内注射升麻素可显著减少福尔马林试验两个阶段的退缩反应,升麻素在低浓度下具有抗炎作用,在较高浓度下具有非炎性镇痛作用。WANG等^[15]建立特异性皮炎(atopic dermatitis, AD)模型,升麻素对TSLP和IL-33(人表皮细胞中关键细胞因子)的抑制作用显著,此外升麻素减少了上皮细胞之间的分离间隙,增加了皮肤屏障(tight junctions, TJs, 由紧密连接的脱膜小体组成)的表达量,得出了升麻素在初始阶段通过抑制TSLP/IL-33和TJs的表达来治疗过敏性炎症。王晓钰^[16]研究升麻素在小鼠ACD(allergic contact dermatitis)致敏初期就对ACD小鼠耳肿胀及耳重有显著抑制作用,并且升麻素可调整机体发生变化而发挥长期效应,而不是仅仅短期内控制炎症。

尽管有大量研究表明升麻素与炎症密切相关,但目前针对于佐剂性关节炎研究较少,而且升麻素在体内代谢较快,其前药升麻素苷在大鼠体内的绝对生物利用度不到1%^[17-19],这是制约升麻素开发利

用的重要因素。因此,本研究以升麻素为先导化合物,合成一系列升麻素衍生物,并进行体外细胞活性筛选,对优选的衍生物进行大鼠体内佐剂性关节炎的作用机制,及对MAPK信号通路调控的研究,为用于治疗佐剂性关节炎的候选药物研发提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

升麻素为实验室自制, HPLC $\geq 98\%$, 见文献[13]; 1,3-二溴丙烷和山梨酸等均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 弗式完全佐剂和甲氨蝶呤购自上海麦克林生化科技股份有限公司; NO试剂盒购自上海碧云天生物科技有限公司; DMSO、IL-6(批号: MM-0163M1)、IL-1 β (批号: MM-0040M1)、TNF- α (批号: MM-0132M1) ELISA试剂盒购自江苏酶免实业有限公司。

1.2 实验细胞与实验动物

小鼠单核白血病巨噬细胞(RAW 264.7)购自中国科学院上海细胞库; SPF级 Wistar雌性大鼠购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 许可批号: SCXK(辽)2020-0001, 体质量 200 ± 10 g, 于实验前均适应性喂养3天。本研究动物实验均遵循《中华人民共和国实验动物管理条例》的相关规定进行, 并已通过吉林农业大学实验动物福利与伦理委员会审查批准(批号: 20211015001)。

1.3 升麻素衍生物的制备

升麻素有机酸酯衍生物的合成路线见图1, 将0.2 mmol CIM、0.4 mmol有机酸、0.4 mmol EDCI、0.4 mmol DMAP置于反应瓶中并溶于10 mL二氯

甲烷, 常温超声(20~40 Hz)至完全溶解, 薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)每30 min监测一次, 室温反应8~16 h, 回收溶剂, 得黏稠物。分离(三氯甲烷: 甲醇=20:1~30:1), 共得到6个升麻素有机酸酯衍生物(化合物1~6, 记作CIM-1~CIM-6)。

升麻素三氮唑衍生物的合成路线见图2, 将0.2 mmol CIM、0.6 mmol碳酸钾、4.0 mmol二溴烷烃置于反应瓶中并溶于20 mL丙酮, 超声(20~40 Hz)至完全溶解, TLC每2 h监测一次, 反应的混合液在60 °C回流下反应20~30 h, 回收溶剂, 用水溶解, 乙酸乙酯萃取, 取有机层, 最后77 °C减压蒸馏, 得黏稠物。分离(二氯甲烷: 甲醇=15:1~20:1), 共得到5个反应中间体(化合物7~11, 记作CIM-7~CIM-11)。取CIM-7到CIM-11各0.2 mmol, 再取0.6 mmol碳酸钾、1.0 mmol 1-(H)1, 2, 3三氮唑置于反应瓶中并溶于20 mL丙酮, 超声至完全溶解, TLC每2 h监测一次, 常温超声反应14~18 h, 用水溶解, 乙酸乙酯萃取, 最后77 °C减压蒸馏, 得黏稠物。分离(二氯甲烷: 甲醇=15:1~20:1), 共得到10个升麻素三氮唑衍生物(化合物12~21, 记作CIM-12~CIM-21)。

1.4 RAW264.7细胞NO和炎症因子含量测定

以每孔 1.5×10^4 个细胞铺板, 并进行分组: 空白组、LPS模型组(1 $\mu\text{g/mL}$)、给药组、阳性药Dex组, 细胞加药培养48 h, 细胞经1 000 r/min离心3 min后收集上清液后, 置于冰盒中待用, 按照试剂盒测定NO的含量。3种炎症因子步骤类似, 同上收集细胞培养上清液后, 加样: 取定量样品添加适量样品稀释液, 终体积50 μL , 空白孔不加样; 温育: 酶标包被板封板恒温37 °C温育30 min; 洗涤: 去除封膜并甩干, 各

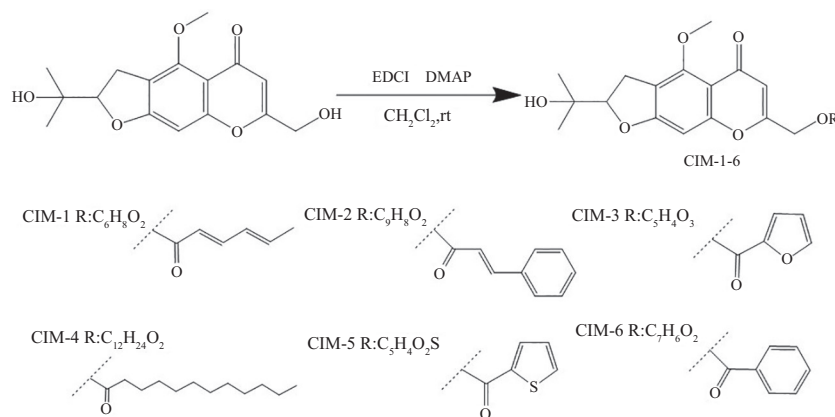


图1 升麻素有机酸酯衍生物的合成路线图

Fig.1 Synthesis roadmap of cimifugin organic acid ester derivatives

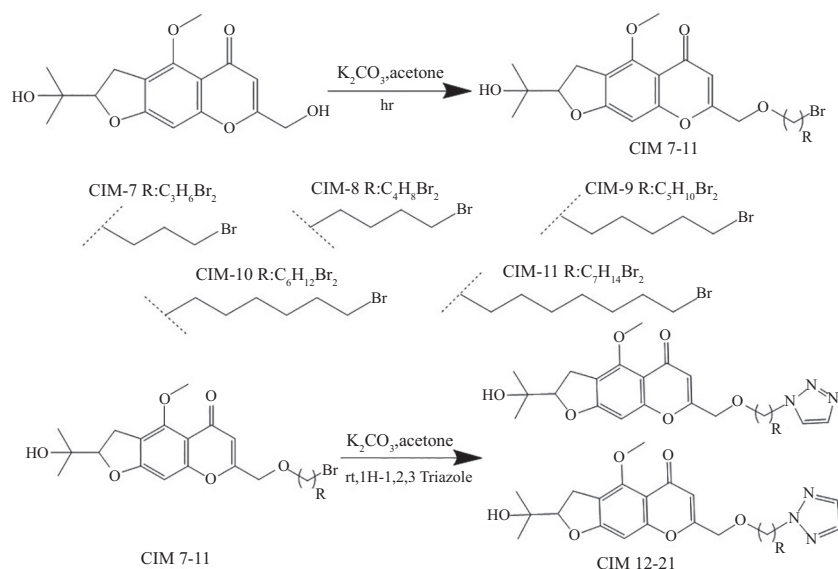


图2 升麻素三氮唑衍生物的合成路线图

Fig.2 Synthesis roadmap of cimifugin triazole derivatives

个孔中置入稀释后的洗涤液30 s后再将其去除,反复5次后拍干;加酶:除空白孔,每孔加入50 μ L酶标试剂;再次温育与洗涤,步骤同上;显色:每孔中置入50 μ L A显色剂摇匀,再置入等量B显色剂摇匀,避光条件下37 $^{\circ}$ C摇床轻轻振荡15 min;终止:按照50 μ L标准在各个孔中置入终止液;测定:于波长为450 nm处测定D值。

1.5 大鼠AA模型的建立^[20-21]、分组与给药

将大鼠适应性喂养后,在每只大鼠右后足足跖处注射0.1 mL含有10 mg/mL的完全弗氏佐剂,空白对照组用生理盐水同量同法注射造膜(第0天)。分为5组,分别为MTX组(甲氨蝶呤,1.5 mg/kg,给药一周2次),给药组参考本课题组前期研究及江小燕等^[22]和杨天宁等^[23]研究,CIM-15-H组(20 mg/kg,给药一天1次),CIM-15-L组(10 mg/kg,给药一天1次),AA模型组(生理盐水,给药一天1次),CON组(生理盐水,给药一天1次),给药体积按1 mL/100 g,给药方式均采用腹腔注射。

1.6 大鼠相关评价指标测定

造模开始,每天测量大鼠体质量,最后一次给药24 h后,对大鼠后足进行拍摄记录,之后处死取血和免疫器官,血清经37 $^{\circ}$ C、3 000 r/min离心10 min后用于后续ELISA实验,步骤同1.4;免疫器官指数=免疫器官质量(mg)/大鼠体质量(mg),记录数据。在大鼠建模前(第0天)和建模成功后每3天使用游标卡尺测量大鼠右后爪厚度,测量3次取平均值。大鼠建模

成功后仔细观察大鼠关节炎严重情况,(每只爪关节最高分数为4分,评分主要评估两后足爪关节,两后肢关节评分之和为最后得分,大于4分即造模成功,6~8分即为关节严重受损),评分标准见文献^[24-25]。

1.7 HE染色观察踝关节病理

取各组大鼠踝关节并剔除周围肌肉及软组织,室温固定在4%多聚甲醛后,对组织进行修剪暴露病理位置,并对标本进行脱钙、脱水(依次梯度脱水:蒸馏水20 min,75%乙醇依次过渡到无水乙醇,各30 min,之后二甲苯I和II各30 min,无水乙醇30 min,蒸馏水30 min,石蜡30 min)、石蜡包埋(在骨组织上缓缓滴入石蜡液,不要产生气泡,使石蜡快速凝固,室温保存)、切片(切至1 mm的厚度,控干水分,烘干后室温保存),苏木素、伊红染色(将石蜡切片放入二甲苯和梯度乙醇中复水,随后染色),脱水封片(中性树脂封片);置于光学显微镜下观察,并应用数字病理扫描系统进行拍照分析。

1.8 网络药理学与分子对接^[26-27]

根据升麻素(CIM)-炎症(inflammation)检索相关数据库信息,利用Venny 2.1绘制二者靶点交集图;将得到的交集靶点上传至STRING12.0(Search Tool for the Retrieval of Interaction Genes/Proteins)数据库中,采用Cytoscape 3.7.2软件获取核心靶点,并构建PPI网络图。整理作用靶点数据,导入到Metascape(<https://www.metascape.org/gp/index.html>)数据库,以 $P < 0.01$ 进行筛选,对潜在作用靶点进行

GO功能富集和KEGG通路分析。

将CIM-15与CASP3、P38与ERK靶点进行分子对接,以模拟蛋白质与化合物分子之间的相互作用模式。从PDB数据库(<https://www.rcsb.org/>)获取核心靶点的三维结构,导入Pymol软件,去除水分子和有机物,使用AutoDock Tools软件进行加氢,Grid Box工具确定对接范围,通过AutoDock Vina软件进行分子对接,使用Pymol软件完成可视化。

1.9 Western blot检测大鼠滑膜组织中相关蛋白表达情况

提取组织总蛋白并在冰上裂解,样品在4℃、10 000 r/min条件下离心5 min,根据说明书测定蛋白浓度。随后沸水浴变性,-20℃冰箱保存备用。随后进行电泳、转膜,再用脱脂牛奶于室温将其封闭2 h,再将膜与一抗ERK(稀释比例为1:1 000)、p-ERK(稀释比例为1:1 000)、p38(稀释比例为1:1 000)、p-p38(稀释比例为1:1 000)、Cleaved Caspase-3(稀释比例为1:1 000)和 β -actin(稀释比例为1:1 000)于TBST中孵育过夜(4℃)。次日于室温下与相应二抗(稀释比例为1:2 000)孵育1 h。加入ECL化学发光剂显影,凝胶成像仪成像,最后用ImageJ软件分析灰度值。

1.10 统计学分析

所有实验结果均用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,每组数据重复3次,显著性分析用独立 t 检验, $P<0.05$ 认为存在统计学差异。

2 结果

2.1 升麻素及衍生物对细胞培养上清液中NO抑制率 IC_{50} 值的影响

如图3所示,当LPS刺激RAW 264.7细胞后,大量的NO从细胞释放到培养基并以亚硝酸盐的形式

存在,再采用Griess试剂测定其亚硝酸盐含量^[28]。根据NO抑制率 IC_{50} 值可知,小于升麻素的化合物共计6个,分别是CIM-2、CIM-5、CIM-14、CIM-15、CIM-18和CIM-19。综合考虑化合物的细胞毒性和NO抑制率 IC_{50} 值,在升麻素三氮唑衍生物中选取CIM-14、CIM-15、CIM-18和CIM-19,作进一步的炎症因子研究。

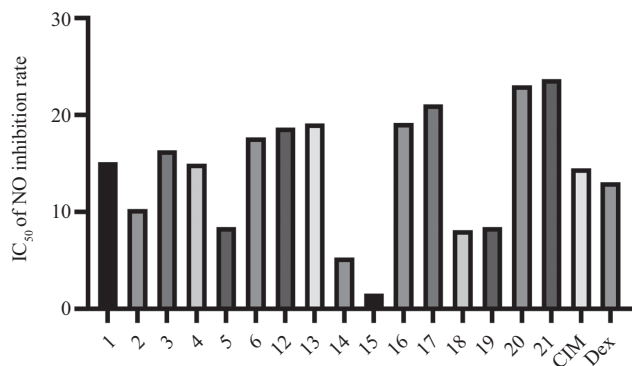
2.2 升麻素及优选衍生物对LPS诱导的RAW 264.7细胞培养上清液中炎症因子的影响

如图4所示,在三种药物浓度下,CIM、CIM-15与CIM-18均显著抑制了IL-1 β 的表达($P<0.001$),其中6.25~25 μ mol/L下CIM-15与CIM-18优于阳性对照Dex组(25 μ mol/L)。CIM及4种衍生物均极显著抑制了IL-6和TNF- α 的表达($P<0.001$),CIM及4种衍生物IL-6和TNF- α 表达水平均高于阳性对照Dex组(25 μ mol/L)。综上所述,选取化合物15(CIM-15)作进一步的大鼠体内研究。

2.3 大鼠足趾外观、体质量和关节肿胀度的测定

如图5所示,与CON组相比,AA组发红和肿胀极其明显,经给药后,MTX组、CIM-15-H组和CIM-15-L组均有不同程度的改善。在第15天我们准备开始给药时,CON组体质量明显高于AA组,具有极显著差异($P<0.001$),证明AA组造模成功。在第14天,肉眼可观察到除CON组外各组大鼠后足踝关节有明显的肿胀,大鼠行动不便,甚至踝关节肿胀至它们不能行走。随着各组开始给药,除AA组外,各给药组体重均有所增长。

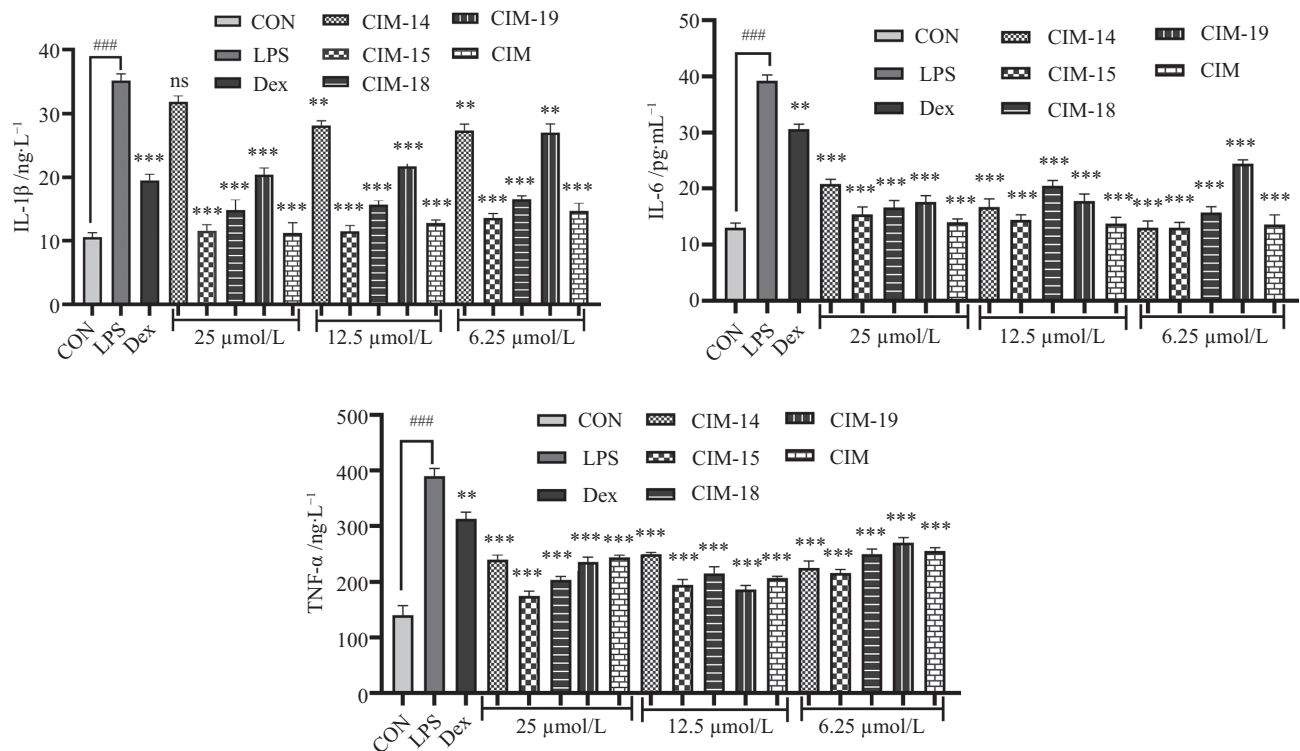
如图6所示,与AA组相比,CON组、MTX组和CIM-15-H组大鼠体质量具有极显著差异($P<0.01$),CIM-15-L组具有显著差异($P<0.05$)。与CON组相比,AA组具有显著差异($P<0.01$),证明AA模型造模成功。与AA组相比,CIM-15-H组具有极显著差异



$n=3$.

图3 升麻素及衍生物对RAW 264.7细胞培养上清液中NO抑制率 IC_{50} 值的影响

Fig.3 Effect of cimifujin and derivatives on IC_{50} value of NO inhibition rate in the supernatant of RAW 264.7 cell culture



$P<0.001$; ns $P>0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与LPS组比较。n=3。

$P<0.001$; ns $P>0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with LPS group. n=3.

图4 CIM及优选衍生物对LPS诱导的RAW 264.7细胞的IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量的影响

Fig.4 Effects of CIM and its preferred derivatives on the IL-1 β , IL-6 and TNF- α contents in RAW 264.7 cells induced by LPS

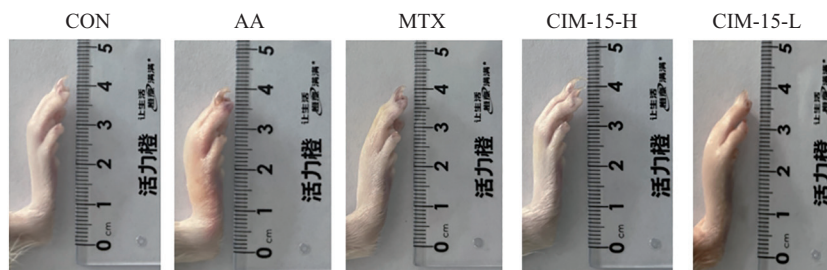


图5 大鼠右后足趾外观成像

Fig.5 Appearance imaging of the right posterior toe of the rat

($P<0.01$), CIM-15-L组具有显著差异($P<0.05$), 表明CIM-15的确能够缓解AA大鼠的炎症。

2.4 大鼠关节炎评分、免疫器官指数和炎症因子的含量

如图7A所示, AA组一直维持在6分水平, MTX组、CIM-15-H组由6分降到最终的2分, CIM-15-L组降到3分, CIM-15可以改善其关节肿胀度等症状。

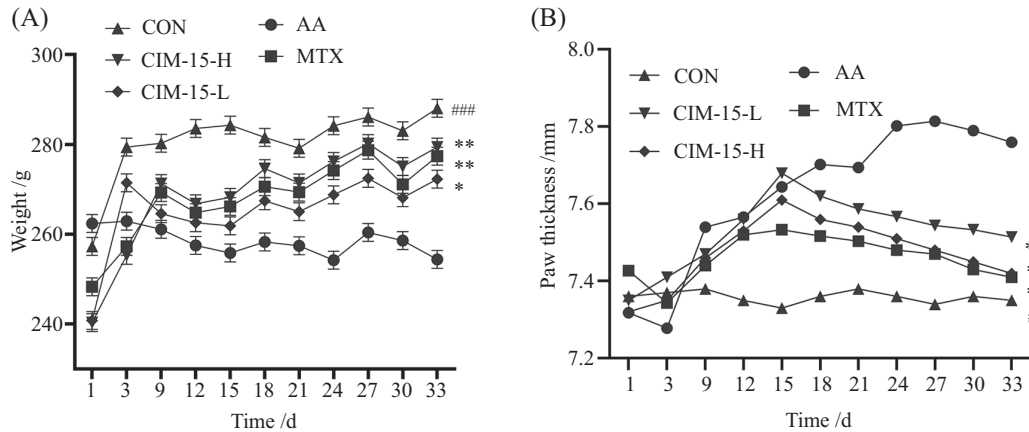
如图7B和图7C所示, 与CON组相比, AA组大鼠胸腺指数极显著升高($P<0.01$), 脾脏指数显著升高($P<0.05$), 证明AA模型造膜成功。与AA组相比, CIM-15-H组、MTX组胸腺指数极显著降低($P<0.01$),

与AA组相比, CIM-15-H组和MTX组脾脏指数显著降低($P<0.05$)。

如图8所示, 与CON组相比, AA组TNF- α 和IL-1 β 表达水平显著降低($P<0.01$), IL-6表达水平显著降低($P<0.05$), 证明AA模型造膜成功; 与AA组相比, CIM-15-H组和MTX组TNF- α 、IL-6和IL-1 β 表达水平极显著降低($P<0.01$), CIM-15-L组TNF- α 、IL-6和IL-1 β 表达水平显著降低($P<0.05$)。

2.5 不同组大鼠踝关节病理的变化

如图9所示, CON组大鼠踝关节结构完整, 未见有炎性细胞浸润, 细胞排布较均匀, 且关节软骨平

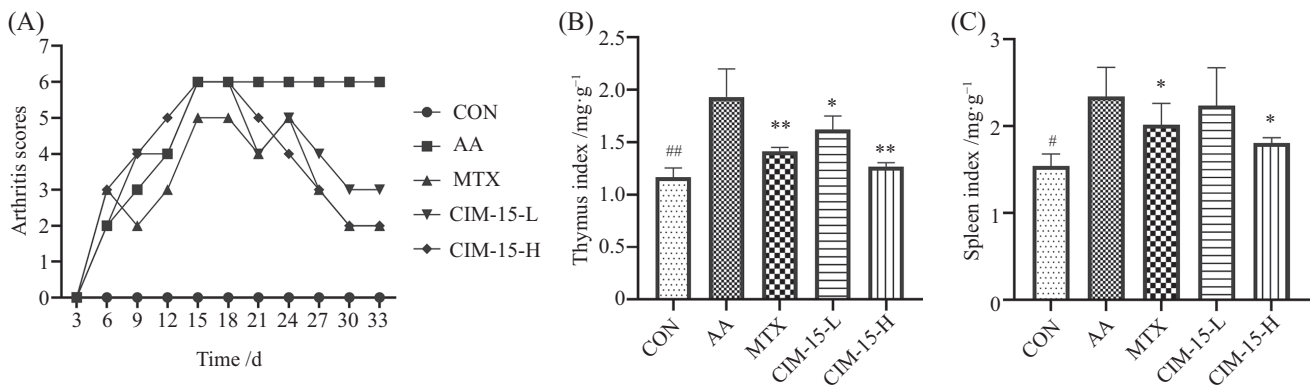


A: 不同给药组大鼠体重; B: 不同给药组大鼠足趾肿胀度, $^{###}P<0.01$, $^{####}P<0.001$, 与CON组比较; $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, 与AA组相比。 $n=5$ 。

A: body mass of rats in different dosing groups; B: swelling degree of toes of rats in different dosing groups. $^{###}P<0.01$, $^{####}P<0.001$ compared with the CON group; $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ compared with the AA group. $n=5$.

图6 大鼠体重和右后足足趾肿胀度

Fig.6 The body mass and swelling degree of right posterior full toe in rats

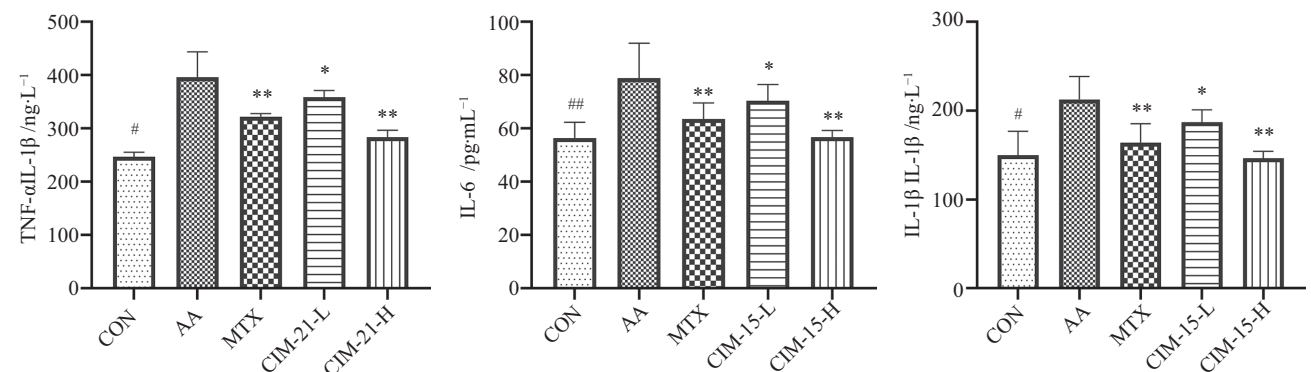


A: 不同给药组大鼠关节炎评分; B: 不同给药组大鼠胸腺指数; C: 不同给药组大鼠脾脏指数。 $^{#}P<0.05$, $^{###}P<0.01$, 与CON组比较; $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, 与AA组相比。 $n=5$ 。

A: arthritis score of rats in different administration groups; B: thymus index of rats in different administration groups; C: spleen index of rats in different administration groups. $^{#}P<0.05$, $^{###}P<0.01$ compared with the CON group; $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ compared with the AA group. $n=5$.

图7 大鼠关节炎评分和脏器指数

Fig.7 Arthritis scores and organ index of rats



$^{#}P<0.05$, 与CON组比较; $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, 与AA组相比。 $n=5$ 。

$^{#}P<0.05$ compared with the CON group; $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ compared with the AA group. $n=5$.

图8 大鼠血清中TNF- α 、IL-6和IL-1 β 表达水平

Fig.8 The level of TNF- α , IL-6 and IL-1 β expression in serum of mice

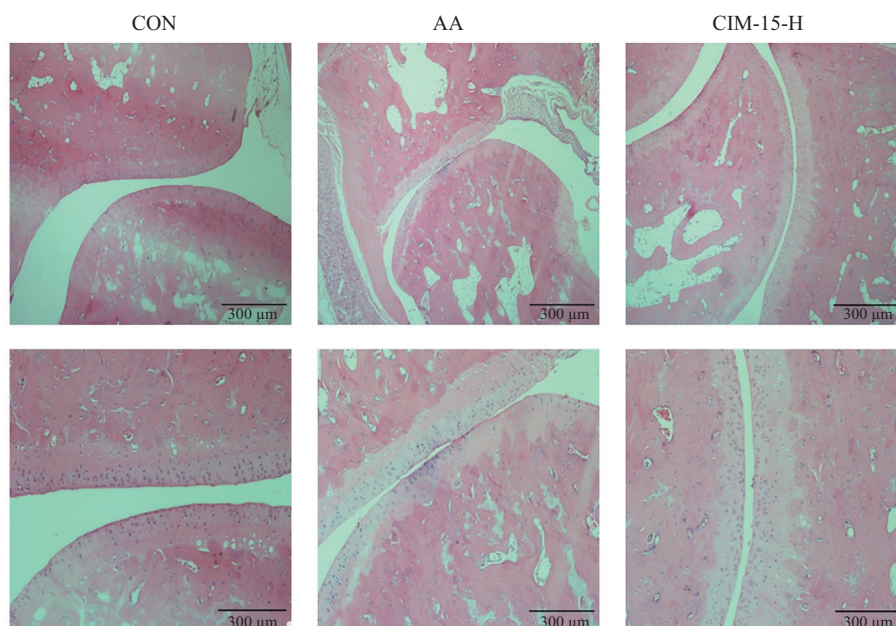


图9 不同组大鼠踝关节组织HE染色病理切片

Fig.9 HE stained pathological sections of ankle joint tissues of rats in different groups

滑;与CON组相比,AA组大鼠踝关节大量炎性细胞浸润,细胞体积变大,滑膜组织明显增厚且排列不规则;CIM-15-H组经过给药处理后,大鼠关节处炎症得到明显缓解,关节表面相对完整,少量炎性浸润。

2.6 网络药理学分析

核心靶点互作图表明,相关度较高的靶点从高到低有CASP3、JUN、MTOR、MAPK3、CD4、MAPK1、PIK3CA等。GO分析结果表明,生物过程(biological process, BP)主要涉及细胞激活、白细胞活化等方面;细胞组分(cellular component, CC)主要涉及膜筏、膜微结构域等方面;与分子功能(molecular function, MF)主要涉及磷酸转移酶活性等方面。KEGG富集分析主要包括MAPK信号通路、Rap1通路、PI3K-Akt信号通路等。

2.7 Western blot检测大鼠滑膜组织中相关蛋白表达情况

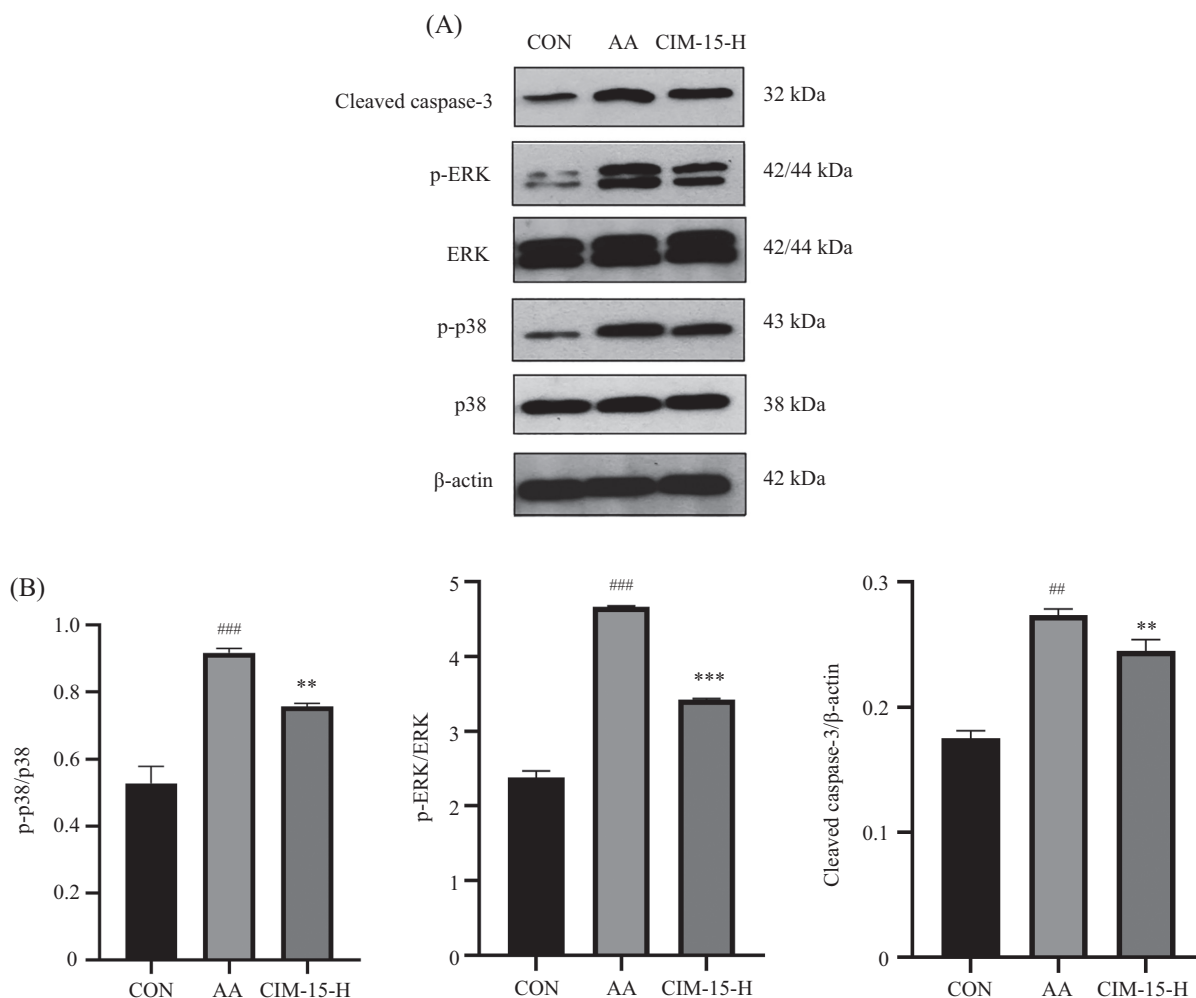
如图10所示,与CON组相比,AA组Cleaved Caspase-3蛋白表达水平明显升高($P<0.01$);与AA组相比,CIM-15-H组Cleaved Caspase-3蛋白表达水平明显降低($P<0.01$)。与CON组比较,AA组大鼠踝关节滑膜组织中p-p38/p38、p-ERK/ERK表达水平极显著升高($P<0.001$),证明AA模型复制成功;与AA组比较,CIM15-H组大鼠踝关节滑膜组织中p-p38/p38表达水平极显著降低($P<0.001$),p-ERK/ERK表达水平显著降低($P<0.01$)。

2.8 化合物15与关键靶点的分子对接

结果见表1与图11,将CIM-15与CASP3蛋白以及MAPK信号通路上的关键蛋白进行分子对接;由相互作用知:CIM-15与CASP3结合时,与蛋白的TRP-206、TRP-214、PHE-256形成氢键作用,与蛋白的TYR-204、ARG-207、ASN-208、SER-209、SER-251形成疏水作用,与蛋白的TRP-206形成 π -Stacking作用。CIM-15与p38结合时,与蛋白的PRO-198形成氢键作用,与蛋白的LYS-184、ILE-197、VAL-156形成疏水作用。CIM-15与ERK结合时,与蛋白的MET-125、LYS-71、TYR-53、TYR-81、THR-85形成氢键作用,与蛋白的LEU-173、ILE-48、VAL-56、ILE-73形成疏水作用。CIM-15与CASP3蛋白自由能最低,形成结构更稳定,说明药物有效成分与类风湿关节炎关键靶点具有较好的亲和力。

3 讨论

本研究在合成升麻素有机酸酯衍生物过程中,优选出二氯甲烷作溶剂,其特点是对升麻素和有机酸溶解性较好、沸点适中、且容易回收,为防止逆反应发生,加入物质的量比为2的EDCI,并加入适量分子筛来吸收酯化反应生成的水。此外,在合成升麻素三氮唑衍生物过程中,通过两步反应得到产物,在第一步反应中,优选出丙酮作溶剂,其特点是对升麻素溶解性较好、沸点适中、能维持较高反应温度



A: 大鼠滑膜组织蛋白条带图; B: 蛋白柱形图。^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$, 与CON组比较; ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$, 与AA组比较。 $n=5$ 。

A: rat synovial tissue protein bar graph; B: protein bar graph; ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$ compared with CON group; ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$ compared with AA group. $n=5$ 。

图10 大鼠滑膜组织中相关蛋白表达($n=5$)

Fig.10 Expression of related proteins in rat synovial tissue ($n=5$)

表1 CIM-15与受体蛋白的分子对接结果

Table 1 Molecular docking results of CIM-15 with receptor protein

蛋白 Proteins	蛋白受体 Protein receptors	CIM-15对接评分/ $\text{KJ} \cdot \text{mol}$ CIM-15 docking score / $\text{KJ} \cdot \text{mol}$
CASP3	1QX3	-6.6
p38	RPP38	-7.3
ERK	ERK1	-10.5

又容易回收; 优选出碳酸钠作除酸剂, 其碱性适中, 又能溶于丙酮。第二步反应, 仍以丙酮作溶剂, 中间体需要大大过量, 一方面促使反应向产物方向进行, 另一方面可结合生成的溴化氢, 不需另加除酸剂。

此外, 本研究还探讨了升麻素衍生物的构效关系: 首先从有机酸的类别看, 芳香族有机酸抗炎效果相对较好, 且含有氮原子的有机酸相对较好, 脂肪族

有机酸效果较为相似; 从合成衍生物的不同类别看, 含氮杂环小分子集团的引入较有机酸的效果好; 且短链较长链效果好。

本研究基于网络药理学及分子对接的研究方法^[29]对升麻素单体成分、作用靶点、生物过程及相关通路进行分析, 得出MAPK通路是升麻素干预佐剂性关节炎最有可能的通路, MAPK通路的主要

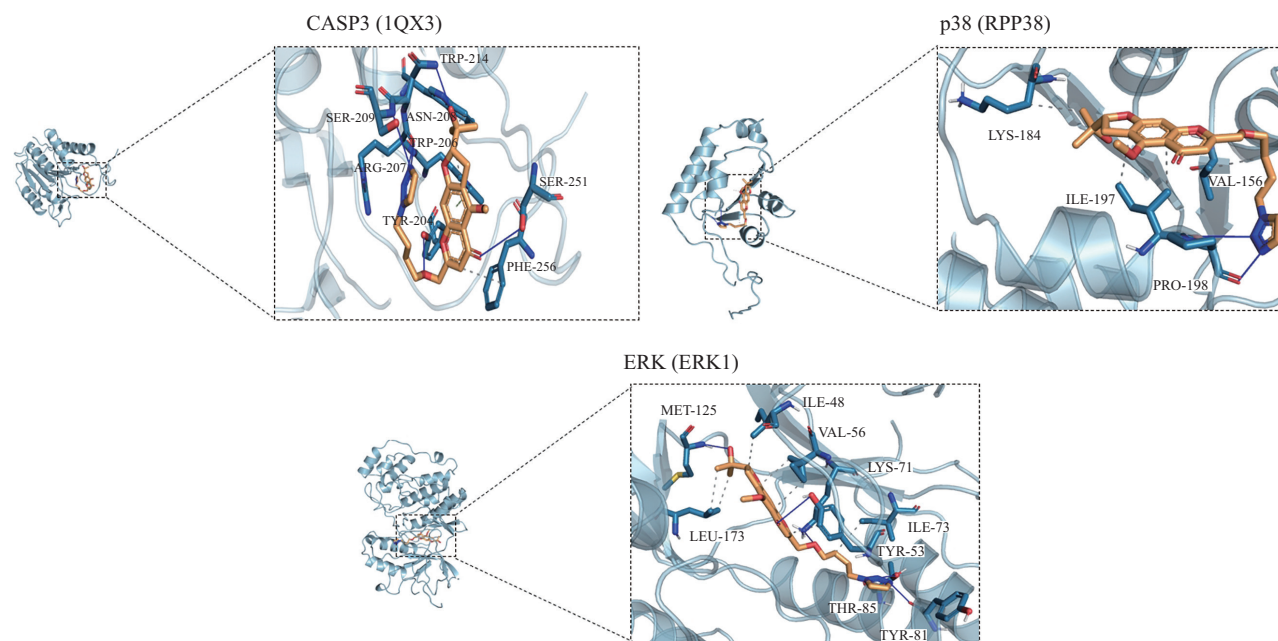


图11 CIM-15分别与CASP3、p38、ERK蛋白对接
Fig.11 Docking of CIM-15 with CASP3, p38 and ERK protein

作用是将细胞外刺激信号转导到细胞核中,如细胞增殖、分化、基因表达和细胞凋亡等;此外发现基因靶点中发挥作用较大的为CASP3、JUN和mTOR, CASP3是细胞凋亡途径中最为关键的一种蛋白酶,涉及抗原呈递、免疫反应炎症功能等方面^[30]; JUN是二聚体转录因子,由c-JUN、c-Fos和ATF家族的蛋白质组成,可促进类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的形成^[31]; mTOR作为自噬相关的调节因子,与自噬的启动呈负相关,该因子可促进关节软骨细胞的自噬,减轻骨性关节炎大鼠炎症反应^[32],因此在分子对接中,化合物15可以与MAPK通路上的靶点和CASP3靶点稳定结合。

综上所述,炎症细胞因子如TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等是参与RA病理活动的重要成员。这些因子可以刺激靶细胞继续表达炎症因子,形成持续性的炎症循环,继而持续侵蚀骨关节^[33]。本研究在前人研究的基础上,通过建立AA大鼠佐剂性关节炎模型,证实了化合物15可能通过抑制IL-1 β 、IL-6和TNF- α 表达而减少炎症因子产生,HE染色得出,化合物15高剂量组经给药后关节间隙稍见狭窄,关节破坏较少,滑膜增生不明显,且该组抑制踝关节滑膜组织中p-ERK及p-p38 MAPK蛋白的表达,抑制转录因子AP-1进入细胞核并与靶启动子结合,从而开启炎症基因的转录,缓解类风湿关节炎患者脏器功能损

伤^[34]。从而缓解关节损伤,其作用机制可能与调控MAPK信号通路有关,本研究对防风药材与升麻素的开发与应用具有一定的参考意义。

参考文献 (References)

- [1] 王莎莎. 新型Au@CeO₂核壳纳米药物的制备及其在类风湿性关节炎治疗中的研究[D]. 株洲: 湖南工业大学, 2020.
- [2] 张钦. 基于超支化半导体纳米材料的类风湿性关节炎精准靶向治疗[D]. 苏州: 苏州大学, 2021.
- [3] 蒙涛. 基于网络药理学的宽筋藤抗类风湿关节炎作用机制研究[D]. 武汉: 中南民族大学, 2020.
- [4] YU N, YANG F, ZHAO X, et al. Manual acupuncture at ST36 attenuates rheumatoid arthritis by inhibiting M1 macrophage polarization and enhancing Treg cell populations in adjuvant-induced arthritic rats [J]. *Acupunct Med*, 2023, 41(2): 96-109.
- [5] WRIGHT H L, MOOTS R J, EDWARDS S W. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2014, 10(10): 593-601.
- [6] SOLER P B, ESTRADA C L, IZQUIERDO E, et al. Macrophages from the synovium of active rheumatoid arthritis exhibit an activin A-dependent pro-inflammatory profile [J]. *J Pathol*, 2015, 235(3): 515-26.
- [7] 肖素芸. 三乌胶丸提取物的制备及其经皮递送模式下对类风湿性关节炎的治疗效应[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2022.
- [8] 吴懿. 宫血间充质干细胞对类风湿关节炎治疗作用的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2021.
- [9] 赵传怡. 牛白藤中龙胆苦苷治疗类风湿关节炎及其代谢组学研究[D]. 汕头: 汕头大学, 2021.
- [10] 范氏绒. 昆断益母方调控Treg/Th17细胞失衡和抗类风湿关节炎的机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2021.
- [11] 杨晨曦. 复方芪芍颗粒治疗类风湿性关节炎的临床观察及实

- 验研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2021.
- [12] 戴炜辰, 陈璟. 升麻素衍生物的合成及抗炎构效关系研究[J]. 广东化工(DAI W C, CHEN J. Synthesis and anti-inflammatory structure-activity relationship of cimifugin derivatives [J]. Guangdong Chemical Industry), 2023, 50(4): 13-6.
- [13] CHEN H, ZHAO Y, LIU F F, et al. Synthesis and anti-inflammatory, analgesic activities evaluation of cimifugin amino acid ester derivatives [J]. *Phytochem Letters*, 2023, 57(1): 185-94.
- [14] LEE H Y, KI Y J, PARK S Y, et al. Antinociceptive effects of intrathecal cimifugin treatment: a preliminary rat study based on formalin test [J]. *Anesth Pain Med*, 2020, 15(4): 478-85.
- [15] WANG X, JIANG X, YU X, et al. Cimifugin suppresses allergic inflammation by reducing epithelial derived initiative key factors via regulating tight junctions [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(11): 2926-36.
- [16] 王晓钰. 基于microRNAs对上皮连接蛋白的调控探讨升麻素抗过敏性炎症复发的机制[D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.
- [17] 戴锦娜. 防风药效物质基础和相关成分药代动力学研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2009.
- [18] 郑单单, 魏文峰, 霍金海. 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS技术的芪风固表颗粒血清药物化学研究[J]. 中草药(ZHENG S D, WEI W F, HUO J H, et al. Serum pharmacochemical study of QiFeng-FuXiao Granules based on UPLC-Q-TOF-MS technique [J]. *Chinese Herbal Medicine*), 2021, 52(3): 643-52.
- [19] 赵晓莉, 刘玲, 狄留庆, 等. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷对升麻素苷及其苷元大鼠体内药代动力学特征的影响研究[J]. 中国中药杂志(ZHAO X L, LIU L, DI L Q, et al. Studies on effects of calycosin-7-O- β -D-glucoside on prim-O-glucosylcimifugin and cimifugin *in vivo* pharmacokinetics [J]. *Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine*), 2014, 39(23): 4669-74.
- [20] 李晓飞, 高雄, 林晓蓉. 等. 基于RAW264.7细胞模型的不同茶类抗炎功能特性[J]. 食品工业科技(LI X F, GAO X, LIN X R, et al. Anti-inflammatory functional properties of different teas based on RAW264.7 cell model [J]. *Science and Technology of Food Industry*), 2017, 38(19), 67-73.
- [21] 彭渤. 乌苏里瓦韦总黄酮抗类风湿性关节炎作用研究[D]. 佳木斯: 佳木斯大学, 2022.
- [22] 江小燕, 王慧珠, 桂黎黎, 等. 升麻素通过调节2型细胞因子抑制过敏性炎症[J]. 中药药理与临床(JIANG X Y, WANG H Z, GUI L L, et al. Cimifugin inhibits allergic inflammation by regulating type 2 cytokines [J]. *Pharmacology and Clinic of Chinese Medicine*), 2014, 30(2), 28-30.
- [23] 杨天宁, 李浩林, 王海东, 等. 祖师麻乙素对CIA小鼠Th17/Treg细胞失衡的影响[J]. 中国临床药理学杂志(YANG T N, LI H L, WANG H D, et al. Effect of Zushima ethyl on Th17/Treg cell imbalance in CIA mice [J]. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology*, 2019, 39(22), 3316-20.
- [24] 易伟. n-3多不饱和脂肪酸对类风湿性关节炎的防治作用及相关机制的探讨[D]. 宁波: 宁波大学, 2021.
- [25] WANG X, JIANG X, YU X, et al. Cimifugin suppresses allergic inflammation by reducing epithelial derived initiative key factors via regulating tight junctions [J]. *J Cell Mol Med*. 2017, 21(11): 2926-36.
- [26] 郭嘉鑫. 基于网络药理学与分子对接研究青海川贝母有效成分抗炎的作用机制[D]. 青海: 青海师范大学, 2023.
- [27] 梁巧玲. 基于网络药理学和代谢组学技术的南蛇藤提取物抗类风湿关节炎作用机制研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2023.
- [28] 段晓梅. 胡蜂毒提取物Ento-IV对类风湿关节炎的疗效及机制研究[D]. 大理: 大理大学, 2019.
- [29] FOTIS C, ANTORANZ A, HATZIAVRAMIDIS D, et al. Pathway-based technologies for early drug discovery [J]. *Drug Discovery Today*, 2018, 23(3): 626-35.
- [30] ZHOU Z, XU S, JIANG L, et al. A systematic pan-cancer analysis of CASP3 as a potential target for immunotherapy [J]. *Frontiers in molecular biosciences*, 2022, 9: 776808.
- [31] EFERL R, WAGNER E F. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(11): 859-68.
- [32] 李满意, 刘红艳, 陈传榜, 等. 膝痹的证治[J]. 风湿病与关节炎(LI M Y, LIU H Y, CHEN C B, et al. Treatment of knee arthralgia [J]. *Rheumatology and Arthritis*), 2022, 11(9): 40-2.
- [33] ABDELJ G S, AZAB S S, EI-BAKLY W M, et al. Methyl palmitate attenuates adjuvant induced arthritis in rats by decrease of CD68 synovial macrophages [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 42(2): 1-9.
- [34] 王霆钧, 邱扬凌, 蔡嘉莉, 等. 姜黄素衍生物FM0807对佐剂性类风湿性关节炎模型大鼠疗效观察[J]. 中国现代医生(WANG T J, QIU Y L, CAI J L, et al. Effect of curcumin derivative FM0807 on adjuvant rheumatoid arthritis model rats [J]. *Chinese Modern Medical Doctor*), 2016, 54(11): 20-2.