

LC-MS 结合网络药理学探讨“片姜黄-当归”挥发油防治膝骨关节炎的作用机制

冯明庆^{1,2}, 廖太阳^{1,2}, 杨楠^{1,2}, 方媛^{1,2}, 王培民^{1,2*}, 刘子修^{1,2*} (1.南京中医药大学附属医院, 南京 210029; 2.江苏省中医院, 南京 210029)

摘要: 目的 提取“片姜黄-当归”药对挥发油,使用液相色谱-质谱联用仪(LC-MS)对提取的挥发油进行化学成分定性分析,并运用网络药理学探讨药对挥发油防治膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)的作用机制。方法 采用水蒸气蒸馏法提取“片姜黄-当归”药对挥发油,并使用 LC-MS 对挥发油成分进行分析。借助 Pubchem、Swiss Target Prediction、GeneCards、DAVID 等数据库预测有效成分防治 KOA 的作用靶点及通路,对核心基因进行基因本体(Gene ontology, GO)分析与京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析,并使用 Cytoscape 软件构建“活性成分-疾病靶点”可视化网络图。运用 AutoDock 及 Pymol 对度值靠前的靶点与活性成分进行分子对接验证。结果 “片姜黄-当归”药对挥发油中共鉴定出 59 种化合物,主要成分为莪术酮、异姜黄醇、藁本内酯等;通过网络药理学筛选出挥发油作用于 KOA 的 28 个潜在靶点,包括 CTSK、PTGS1、PTGS2 和 ESR1 等关键靶点;KEGG 富集分析预测“片姜黄-当归”药对挥发油主要通过肿瘤坏死因子信号通路、破骨细胞分化、白介素 17 信号通路、松弛素信号通路、丝裂原活化蛋白激酶信号通路来发挥治疗 KOA 的作用。分子对接结果显示筛选的活性成分与其对应靶蛋白均具有较好的结合活性。结论 使用 LC-MS 结合网络药理学的方法初步探明了“片姜黄-当归”药对挥发油中的主要有效成分及其干预 KOA 的潜在靶点与作用机制,为“片姜黄-当归”后续的深入研究提供思路。

关键词: 挥发油;片姜黄;当归;化学成分;膝骨关节炎;液相色谱-质谱法;网络药理学

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2023)17-2403-11

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20223672

引用本文: 冯明庆, 廖太阳, 杨楠, 等. LC-MS 结合网络药理学探讨“片姜黄-当归”挥发油防治膝骨关节炎的作用机制[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(17): 2403-2413.

LC-MS Combined with Network Pharmacology to Explore the Mechanism of “Wenyujin Rhizoma Concisum-Angelicae Sinensis Radix” Essential Oil in the Treatment of Knee Osteoarthritis

FENG Mingqing^{1,2}, LIAO Taiyang^{1,2}, YANG Nan^{1,2}, FANG Yuan^{1,2}, WANG Peimin^{1,2*}, LIU Zixiu^{1,2*} (1.The Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2.Jiangsu Provincial Hospital of TCM, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To extract the essential oil of “Wenyujin Rhizoma Concisum-Angelica Sinensis Radix”, and to qualitatively analyze the chemical composition of the extracted essential oil by LC-MS. Network pharmacology was used to explore the mechanism of the essential oil acting on knee osteoarthritis(KOA). **METHODS** The essential oil of “Wenyujin Rhizoma Concisum-Angelicae Sinensis Radix” was extracted by steam distillation, the components of the essential oil were analyzed by LC-MS. PubChem, Swiss Target Prediction, GeneCards, DAVID and other databases were used to predict disease targets and pathways of active component in prevention and treatment of KOA. The key genes were analyzed by Gene ontology(GO) analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG) pathway enrichment analysis. Cytoscape was used to construct a visual network map of “active component-disease targets”. AutoDock and Pymol were used to verify the molecular docking between the target with the highest degree target and the active components. **RESULTS** A total of 59 compounds were identified in the “Wenyujin Rhizoma Concisum-Angelicae Sinensis Radix” essential oil, and the main components were curzerenone, isocurcumenol, ligustilide, etc. Through network pharmacology, 28 potential targets of essential oil acting on KOA were screened, including CTSK, PTGS1, PTGS2 and ESR1, etc. KEGG enrichment analysis predicted that “Wenyujin Rhizoma Concisum-Angelicae Sinensis Radix” essential oil mainly targeted TNF signaling pathway, osteoclast differentiation, IL-17 signaling pathway, relaxin signaling pathway, MAPK signaling pathway to treat KOA. The results of

基金项目: 国家自然科学基金项目(82074460); 中国博士后科学基金面上项目(2022M711695); 江苏省研究生培养实践工程资助项目(SJXC22_0757); 江苏省中医院高峰学术人才项目(Y2021rc02); 江苏省医学重点学科/实验室建设单位(JS2252)

作者简介: 冯明庆, 男, 硕士 E-mail: 1184518489@qq.com *通信作者: 王培民, 男, 博士, 教授, 主任中医师 E-mail: drwpm@163.com
刘子修, 男, 博士, 副主任医师 E-mail: liuzixiu3221@126.com

molecular docking showed that the screened active components and their corresponding target proteins had positive binding activity. **CONCLUSION** LC-MS combined with network pharmacology is used to preliminaries explore the main active components and the potential targets and mechanism of action of “Wenyujin Rhizoma Concisum-Angelicae Sinensis Radix” essential oil in the intervention of KOA, providing ideas for the further study of “Wenyujin Rhizoma Concisum-Angelicae Sinensis Radix” essential oil.

KEYWORDS: essential oil; Wenyujin Rhizoma Concisum; Angelicae Sinensis Radix; chemical composition; knee osteoarthritis; liquid chromatograph mass spectrometer; network pharmacology

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种关节炎的常见表现形式, 主要涉及软骨、软骨下骨、韧带、关节囊、滑膜及周围肌肉等结构改变。KOA 的患病率随年龄、肥胖比例与运动损伤情况的增加而在世界范围内呈逐年上升趋势^[1], 医疗、社会服务等机构每年都要在防治 KOA 上花费大量的金钱, 造成人力物力的极大压力。目前最常用治疗 KOA 的手段是口服非甾体抗炎药(NSAIDs)及在关节内注射药物^[2]。然而, 这些治疗方法常常伴随着不良反应大以及操作困难, 且易诱发感染等缺点^[3]。经皮给药可以使肝肾毒性降到最低, 与常用手段相比, 经皮给药的胃肠道不良反应和心血管疾病患病风险也更低^[4]。

经皮给药通常使用涂敷等形式给药, 通过透皮吸收将药物递送至病灶, 在这个过程中大量药物的作用成分可能由于透皮能力较差而无法发挥作用。外用药常用增加药效的方法是增大给药剂量使透皮后的药物活性成分也相应增加。而研究表明不需要增大给药剂量, 只需通过增加透皮效率即可提高药物的利用率, 达到提高治疗的效果。促透常用方法包括微针法、超声波促透法, 添加经皮促渗剂或制成脂质体、微乳等药剂形式^[5]。中药挥发油是一种性质优良的经皮渗透促渗剂^[6], 主要成分多为萜类、苯丙素类、芳香族类和脂肪族类等化合物, 大部分具有抗菌、抗病毒、抗炎、镇痛、镇静等作用^[7], 使其不仅仅作为药物在经皮给药的过程中参与治疗 KOA, 也能作为一种促渗剂增强原组方的治疗效果。

片姜黄是来源于温郁金 *Curcuma wenyujin* Y.H.Chenet C.Ling 的干燥根茎, 具有破气行血、通经止痛的功效, 常用于治疗风湿痹痛、肩臂疼痛、跌扑损伤等, 早在古方五痹汤中即用“片子姜黄”治疗风寒湿气手臂痛^[8]。当归是来源于当归 *Angelica sinensis*(Oliv.)Diels 的干燥根, 具有补血活血、调经止痛的功效, 始载于《神农本草经》, 常用于治疗经闭痛经、风湿痹痛、跌扑损伤等^[9]。目前大量文献表明这 2 种药材能起到相辅相成的

作用,《重订严氏济生方》中记载“蠲痹汤”用到酒浸当归与片姜黄治疗手足冷痹、腰痛等症状^[10];《妇人大全良方》中记载“舒经汤”用到当归与片姜黄治疗臂痛难忍^[11]。将片姜黄与当归配伍后, 活血止痛功效增强, 治疗效果相得益彰, 在理论与实际的临床应用中都发挥了重要作用, 但是对于药对的挥发油联用防治 KOA 的作用机制研究较少。所以本研究拟对“片姜黄-当归”药对挥发油进行提取与 LC-MS 成分分析, 运用网络药理学方法, 通过基因数据库对“片姜黄-当归”药对挥发油治疗 KOA 的作用机制进行探讨, 并使用分子对接进行验证, 为后续的药理与分子生物学研究夯实基础。

1 仪器与材料

Orbitrap Exploris 120 型高分辨质谱、Vanquish 型超高效液相色谱仪、Heraeus Fresco 17 型离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); BSA124S-CW 型天平(德国 Sartorius 公司); JXFSTPRP-24 型研磨仪(上海净信科技有限公司); 明澈 D24 UV 型纯水仪(德国 Merck Millipore 公司); YM-080S 型超声仪(深圳市方奥微电子有限公司); SZCL-2 型数显智能控温磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司)。

片姜黄饮片(安徽协和成药业饮片有限公司, 批号: 21120804)、当归饮片(四川新荷花中药饮片股份有限公司, 批号: D2201121), 经南京中医药大学第一临床医学院王培民教授鉴定分别为姜科植物温郁金 *Curcuma wenyujin* Y.H.Chenet C.Ling 的干燥根茎和伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根; 甲醇(批号: CAEQ-4-003302-4000)、乙腈(批号: CAEQ-4-003306-4000)(LC-MS 级, 德国 CNW Technologies 公司); 甲酸(LC-MS 级, 德国 Sigma 公司, 批号: 5438040250); L-2-氯苯丙氨酸(上海恒柏生物科技有限公司, 批号: C2001; 纯度≥98%)。

2 方法

2.1 挥发油提取

将片姜黄、当归各称取 150 g, 混合后置于 10 L 圆底烧瓶中, 加入 1.5 L 纯水, 具体参照中国药典

2020年版(一部)附录挥发油测定法采用水蒸气蒸馏法进行提取。及时收集挥发油提取器中的挥发油,平行提取3次,得到“片姜黄-当归”药对挥发油。

2.2 LC-MS分析“片姜黄-当归”挥发油成分

2.2.1 测定条件 液相色谱条件: Waters UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 进样量为5 μL, 流速为500 μL·min⁻¹, 流动相为0.1%甲酸水溶液(A)和0.1%甲酸乙腈溶液(B)。采用多步线性洗脱(0~11 min, 85%→25%A; 11~12 min, 25%→2%A; 12~14 min, 2%A; 14~14.1 min, 2%→85%A; 14.1~16 min; 85%A)。

质谱检测条件: 采用Orbitrap Exploris 120质谱仪和Xcalibur软件, 基于IDA采集模式获取MS和MS/MS数据。在每个采集周期中, 质量扫描范围100~1 500 *m/z*, 并筛选每个采集周期的前四位, 进一步获取相应的MS/MS数据。鞘气体积流量: 35 arb; 辅助气体流量: 15 arb; 离子传输管温度: 350 °C; 蒸发室温度: 350 °C; 全MS分辨率: 60 000; MS/MS分辨率: 15 000; 碰撞能量: 16/32/48; 喷雾电压: 4 kV(+)或-3.8 kV(-)。

2.2.2 供试品溶液制备 称取100 mg的挥发油样本, 加入500 μL提取液(甲醇: 水=4: 1, 内标浓度为10 μg·mL⁻¹)。涡旋30 s后使用45 Hz匀浆4 min, 并冰水浴超声1 h。-40 °C环境下静置1 h后将样本于4 °C, 13 800×*g*离心15 min。吸取上清液使用0.22 μm微孔滤膜过滤。取30 μL作为质控(quality control, QC)样本, -80 °C储存, 待测。

2.2.3 数据分析 使用XCMS软件将质谱原始数据导入。进行保留时间矫正、峰识别、峰提取、峰积分、峰对齐等工作, 利用二级质谱数据库及相应裂解规律匹配法对含有MS/MS数据的峰进行物质鉴定。

2.3 网络药理学探讨“片姜黄-当归”挥发油防治KOA的作用机制

2.3.1 挥发油主要成分靶点预测 将LC-MS分析得到的主要成分输入Pubchem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)数据库获取SMILES 2D结构或者3D结构式, 并导入Swiss Target Prediction(<http://www.swisstargetprediction.ch>)数据库进行成分的靶点预测, 删去其中Probability一项为0的靶点。再将筛选得到的靶点通过UniProt(<https://www.uniprot.org>)数据库进行名称规范。

2.3.2 KOA靶点基因筛选 在人类基因数据库(GeneCards, <https://www.genecards.org>)及人类孟德

尔遗传数据库(Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM, <https://www.omim.org>)中以“knee osteoarthritis”为关键词搜索KOA相关靶点, 选择下载Score>10分的靶点, 合并后删去其中的重复靶点。

2.3.3 “成分-靶点”可视化网络构建 将筛选得到的疾病靶点和主要成分靶点导入Draw Venn Diagram(<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn>)在线绘制韦恩图, 取韦恩图中成分和疾病的交集作为“片姜黄-当归”挥发油防治KOA的潜在靶点, 并绘制韦恩图。通过得到的潜在靶点回推所属于的主要成分, 并导入Cytoscape 3.8.2软件, 进行可视化分析, 构建“片姜黄-当归”挥发油治疗KOA的“成分-靶点”网络。

2.3.4 蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络构建及关键靶点筛选 在STRING数据库(<https://www.string-db.org>)中导入片姜黄-当归防治KOA的28个潜在靶点, 将物种设置为人(Homo sapiens), 将置信度得分阈值设置为high confidence=0.400, 隐藏游离节点, 得到潜在靶点蛋白相互作用关系。

2.3.5 KEGG通路分析与GO富集分析 运用David数据库(<https://david.ncifcrf.gov>), 在“Enter Gene List”项输入“2.3.3”项中得到的成分与疾病交集靶点, “Select identifier”项选择“OFFICIAL_GENE_SYMBOL”, “Select species”项选择“Homo sapiens”, 提交基因分析, 在“Functional Annotation Tool”栏目中找到“Gene Ontology”项得到生物学过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)、分子功能(molecular function, MF)结果表, 在“Pathways”项中得到KEGG结果表。选取 $P<0.05$ 的数据进行分析, 在“微生信”(<http://www.bioinformatics.com.cn>)网站在线绘制GO与KEGG通路富集图。

2.3.6 分子对接 选择PPI网络中排名前五的靶点作为受体, 以“成分-靶点”可视化网络中的关键化学成分为配体。通过UniProt(<https://www.uniprot.org>)数据库获取靶点全称, Popular organisms设置为Homo sapiens。使用PDB(<https://www.rcsb.org>)数据库下载核心靶点的PDB结构文件, 设置条件: 物种来源(scientific name of the source organism)为Homo sapiens; 聚合物类型(polymer entity type)为protein; 分辨率(refinement resolution)选择最低值。在Pubchem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)数据

库下载活性成分的 SDF 格式文件，并使用 OpenBabel2.3.2 软件转化为 mol2 格式文件。利用 PyMOL 软件去除靶点结构的水分子及小分子配体，并使用软件 AutoDock 进行加氢等处理。对受体和配体进行分子对接，分析其结合活性。使用 PyMOL 软件进行分子对接可视化处理。

3 结果

3.1 挥发油的提取与 LC-MS 检测

水蒸气蒸馏法提取得到 10.5 mL “片姜黄-当归”挥发油，对提取得到的挥发油进行 LC-MS 分离与鉴定，得到挥发油的总离子流图，见图 1。对离子流图中的各峰经质谱扫描后得质谱图，经计算机 NIST27、NIST147 谱库检索和人工解析、查

阅相关文献并以峰面积归一法计算出各色谱峰的相对百分含量，共鉴定出化合物 59 种，见表 1，占挥发油总量的 22.97%。

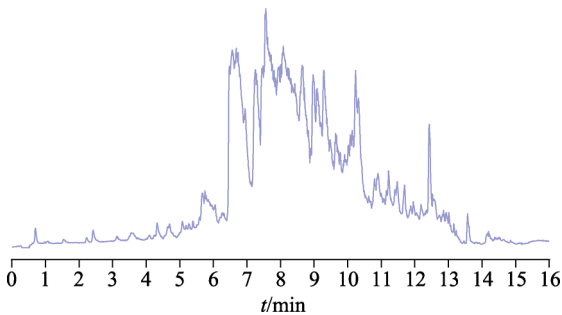


图 1 挥发油总离子流图
Fig. 1 Total ion flow diagram of essential oil

表 1 “片姜黄-当归”挥发油的化学成分信息

Tab. 1 Information on chemical composition of “Wenyujin Rhizoma Concisum-Angelicae Sinensis Radix” essential oil

序号	英文名	中文名	分子式	保留时间/s	理论分子量	检测分子量	误差/ $\times 10^{-6}$	MS/MS	相对百分含量/%
1	Curzerenone	莪术酮	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	466	231.138 0	231.137 7	1.30	231.137; 109.065; 175.074; 213.128; 189.126	6.81
2	Isocurcumenol	异姜黄醇	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	389	235.169 3	235.168 8	2.13	219.164; 191.17; 237.176; 67.054; 189.164	4.40
3	Ligustilide	藁本内酯	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	413	191.106 7	191.106 3	2.09	137.06; 147.117; 193.123; 93.07; 91.055	4.12
4	Ar-tumerone	芳姜黄酮	C ₁₅ H ₂₀ O	460	217.158 7	217.158 7	0.199	217.159; 175.111; 161.097; 81.07; 147.117	1.46
5	Illicic acid	冬青叶豚草酸	C ₁₅ H ₂₄ O ₃	537	253.179 8	253.178 7	4.34	189.164; 217.159; 135.116; 235.167; 121.101	1.20
6	Camphor	樟脑	C ₁₀ H ₁₆ O	355	153.127 4	153.127 2	1.31	153.127; 43.018; 97.065; 135.116; 109.1	0.796
7	2-Hydroxycinnamaldehyde	2-羟基肉桂醛	C ₉ H ₈ O ₂	459	149.059 7	149.059 5	1.34	149.06; 79.055; 103.054; 93.07; 81.07	0.544
8	Germaacene B	吉马烯 B	C ₁₅ H ₂₄	606	205.195 1	205.195 1	0.126	205.194; 149.132; 95.085; 121.101; 123.117	0.400
9	3- <i>n</i> -Butylphthalide	正丁基苯酞	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	553	191.106 7	191.106 6	0.52	147.117; 193.124; 175.113; 105.07; 119.085	0.298
10	(-)-3-Thujene	(-)-3-侧柏烯	C ₁₀ H ₁₆	355	137.132 5	137.132 2	2.19	81.071; 137.132; 95.085; 57.07; 69.069	0.245
11	Reynosin	诺木烯内酯	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	539	249.148 5	249.147 9	2.41	231.137; 83.085; 213.128; 203.142; 175.074	0.230
12	β -Cyclocostunolide	环木香烯内酯	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	475	233.153 6	233.153 2	1.72	233.154; 215.141; 145.1; 93.07; 187.15	0.213
13	Curdione	莪术二酮	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	451	237.184 9	237.184 5	1.69	135.116; 237.185; 219.175; 107.086; 95.085	0.187
14	<i>m</i> -Cresol	间甲酚	C ₇ H ₈ O	261	109.064 8	109.064 6	1.83	109.065; 81.071; 94.041; 91.055; 107.049	0.174
15	Carvone	香芹酮	C ₁₀ H ₁₄ O	312	151.111 7	151.111 6	0.66	151.111; 69.069; 81.071; 109.065; 123.117	0.172
16	4-Hydroxycinnamic Acid	4-羟基肉桂酸	C ₉ H ₈ O ₃	146	165.054 6	165.054 3	1.82	165.054; 91.054; 105.034; 137.06; 95.049	0.127
17	2,4(15)-Copadiene	2,4(15)-连二烯	C ₁₅ H ₂₂	654	203.179 4	203.179 1	1.48	149.132; 205.194; 121.101; 81.07; 93.07	0.094 3
18	Pyrocurzerenone	焦莪术酮	C ₁₅ H ₁₆ O	93.5	213.127 4	213.127 2	0.938	213.128; 198.103; 214.129; 197.095; 183.079	0.088 5
19	Valerophenone	1-苯基-1-戊酮	C ₁₁ H ₁₄ O	459	163.111 7	163.111 7	0.297	163.11; 93.07; 145.102; 121.064; 91.054	0.087 1
20	3-Phenylpropyl acetate	醋酸苯丙酯	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	284	179.106 7	179.106 3	2.23	163.076; 181.085; 135.116; 43.018; 121.101	0.085 2
21	Humulene	α -石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	630	205.195 1	205.195 1	0.126	149.132; 205.194; 121.101; 81.071; 93.07	0.080 8
22	Zederone	蓬莪术环氧酮	C ₁₅ H ₁₈ O ₃	420	247.132 9	247.132 4	2.02	141.044; 140.042; 231.131; 249.14; 139.039	0.074 2
23	3-Butylidenephthalide	丁烯基苯酞	C ₁₂ H ₁₂ O ₂	449	189.091 0	189.091 1	0.529	189.092; 171.081; 153.07; 143.086; 128.062	0.066 8
24	4-Hydroxyphthalide	4-羟基苯酞	C ₈ H ₆ O ₃	134	151.039 0	151.038 7	1.99	79.054; 153.045; 80.056; 81.061; 95.049	0.064 9
25	Thymol	百里酚	C ₁₀ H ₁₄ O	261	151.111 7	151.111 5	1.32	110.067; 152.115; 109.065; 124.084; 43.054	0.061 7
26	Curzerene	莪术烯	C ₁₅ H ₂₀ O	700	217.158 7	217.158 7	0.119	217.159; 149.097; 69.069; 121.101; 131.085	0.057 9
27	<i>m</i> -Xylene	间二甲苯	C ₈ H ₁₀	352	107.085 5	107.085 5	0.385	107.086; 91.055; 105.07; 119.06; 79.055	0.052 8
28	Spathulenol	匙叶桉油烯醇	C ₁₅ H ₂₄ O	660	221.190 0	221.189 8	0.904	221.192; 203.18; 123.117; 95.086; 81.07	0.050 5
29	<i>p</i> -Mentha-1,3,5,8-tetraene	对-薄荷-1,3,5,8-四烯	C ₁₀ H ₁₂	285	133.101 2	133.100 9	2.25	133.1; 105.07; 93.069; 134.104; 106.073	0.044 6
30	Lucidenic acid M	赤芝酸 M	C ₂₇ H ₄₂ O ₆	653	463.305 4	463.303 4	4.32	463.305; 51.479; 464.301; 111.041; 377.193	0.041 8
31	Asteriscunolide A	星状喹啉 A	C ₁₅ H ₁₈ O ₃	303	247.132 9	247.132 6	1.21	247.132; 229.121; 201.127; 123.043; 139.039	0.038 3
32	Ethyl 4-methoxycinnamate	对甲氧基肉桂酸乙酯	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	275	207.101 6	207.101 6	0.114	151.075; 209.201; 167.06; 123.081; 163.112	0.037 3
33	Isocyperol	异香附醇	C ₁₅ H ₂₄ O	629	221.190 0	221.189 8	0.904	221.188; 203.18; 81.07; 147.117; 95.085	0.035 9
34	α -Cyperone	α -香附酮	C ₁₅ H ₂₂ O	449	219.174 3	219.173 7	0.456	121.101; 221.184; 85.028; 71.05; 81.07	0.035 4
35	3,7-dimethylindan-5-carboxylic acid	3,7-二甲基茚满-5-羧酸	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	251	191.106 7	191.106 8	0.523	121.065; 193.085; 95.049; 175.112; 147.117	0.032 2

续表 1

序号	英文名	中文名	分子式	保留时间/s	理论分子量	检测分子量	误差/ 10 ⁻⁶	MS/MS	相对百分含量/%
36	Germacrone	吉马酮	C ₁₅ H ₂₂ O	359	219.174 3	219.174 4	0.456	163.111; 221.152; 81.07; 203.18; 119.085	0.031 9
37	1-Phenyl-1-propanone	1-苯基-1-丙酮	C ₉ H ₁₀ O	485	135.080 4	135.080 4	0.126	135.08; 107.086; 79.055; 91.055; 117.07	0.030 3
38	Curcumenol	莪术烯醇	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	396	235.169 3	235.169 0	1.10	257.153; 258.155; 65.004; 275.915; 269.025	0.029 7
39	Curcumanolide A	莪术螺内酯 A	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	497	235.169 3	235.168 8	2.24	135.116; 219.173; 237.181; 107.086; 95.085	0.026 8
40	α -Fenchene	甲位葑烯	C ₁₀ H ₁₆	431	137.132 5	137.132 3	1.34	95.085; 137.132; 81.071; 57.07; 109.1	0.023 6
41	Cuelure	乙酸覆盆子酮酯	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	298	207.101 6	207.101 7	0.378	207.102; 189.092; 119.085; 161.096; 165.09	0.022 9
42	Zedoarol	地多罗	C ₁₅ H ₁₈ O ₃	341	247.132 9	247.132 4	2.18	247.132; 229.12; 139.039; 248.128; 201.127	0.022 8
43	Biphenyl	联苯	C ₁₂ H ₁₀	412	155.085 5	155.085 6	0.401	155.086; 156.09; 153.07; 154.078; 129.07	0.021 9
44	Chavicol	4-烯丙基苯酚	C ₉ H ₁₀ O	528	135.080 4	135.080 4	0.127	135.08; 107.086; 93.07; 79.055; 91.054	0.019 9
45	β -Terpinene	β -松油烯	C ₁₀ H ₁₆	447	137.132 5	137.132 4	0.882	137.095; 81.071; 95.085; 109.1; 67.055	0.019 7
46	Decyl acetate	乙酸癸酯	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	421	201.184 9	201.184 8	0.310	201.126; 159.08; 131.084; 173.132; 145.1	0.019 1
47	LYSINE	赖氨酸	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	608	147.112 8	147.112 7	0.361	147.117; 105.07; 119.085; 148.12; 91.055	0.017 8
48	Epishyobunone	表水菖蒲酮	C ₁₅ H ₂₄ O	693	221.190 0	221.189 8	1.05	221.192; 203.18; 81.071; 95.085; 109.1	0.017 6
49	2,4-Dimethylbenzaldehyde	2,4-二甲苯苯甲醛	C ₉ H ₁₀ O	502	135.080 4	135.080 5	0.456	135.08; 107.086; 93.07; 91.055; 79.055	0.017 5
50	Procurcumenol	原莪术烯醇	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	510	235.169 3	235.168 9	1.79	135.116; 237.184; 219.172; 107.086; 95.085	0.015 7
51	<i>p</i> -Mentha-1,3,8-triene	<i>p</i> -薄荷-1,3,8-三烯	C ₁₀ H ₁₄	609	135.116 8	135.116 6	1.24	81.07; 137.095; 95.085; 67.055; 109.102	0.015 6
52	Tetramethylpyrazine	川芎嗪	C ₈ H ₁₂ N ₂	59.4	137.107 3	137.107 0	1.84	137.107; 138.111; 96.08; 42.034; 55.054	0.014 9
53	Glyceryl linolenate	亚麻酸甘油酯	C ₂₁ H ₃₆ O ₄	639	353.268 6	353.268 4	0.555	375.248; 376.254; 249.112; 185.134; 215.145	0.012 7
54	Methylisoeugenol	异丁香酚甲醚	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	537	179.106 7	179.106 4	1.81	133.101; 179.106; 161.097; 180.092; 165.07	0.012 3
55	Phenylpropanolamine	苯丙醇胺	C ₉ H ₁₃ NO	317	152.107 0	152.106 8	1.64	152.115; 153.127; 81.07; 43.018; 135.116	0.011 9
56	Methylvanillin	藜芦醛	C ₉ H ₁₀ O ₃	280	167.070 3	167.070 0	1.90	167.071; 43.018; 149.06; 121.065; 125.06	0.011 4
57	Batatasin IV	山药素 IV	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	370	245.117 2	245.116 8	1.83	245.115; 227.106; 212.082; 199.111; 181.1	0.011 3
58	Cuminy alcohol	4-异丙基苯甲醇	C ₁₀ H ₁₄ O	452	151.111 7	151.111 2	3.39	133.1; 105.07; 91.055; 134.104; 131.086	0.011 0
59	Lactarorufin A	乳糖素 A	C ₁₅ H ₂₂ O ₄	248	267.159 1	267.158 0	3.95	249.145; 121.101; 231.137; 203.142; 119.085	0.010 8

3.2 “片姜黄-当归”挥发油活性成分与疾病靶点

上述 59 个有效成分通过 Swiss Target Prediction 共预测得到 591 个靶点; Genecards 与 OMIM 合并后共得到 KOA 的疾病靶点 707 个。运用韦恩图得到 28 个挥发油活性成分防治 KOA 的共同潜在作用靶点, 见图 2。推导出 44 个有效成分对应此 28 个潜在靶点, 见表 2, 表明此 44 个有效成分可能是“片姜黄-当归”挥发油防治 KOA 的潜在活性成分。

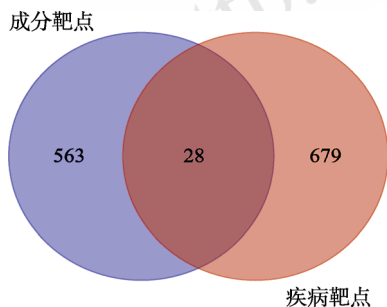


图 2 “片姜黄-当归”挥发油防治膝骨关节炎的靶点韦恩图
Fig. 2 Venn diagram of targets of “Wenyujin Rhizoma Concisum-Angelicae Sinensis Radix” essential oil in preventing knee osteoarthritis

3.3 “活性成分-疾病靶点”网络的构建与分析

Cytoscape 3.8.2 软件绘制出了“活性成分-疾病靶点”网络图, 见图 3。图中共 75 个节点, 211

条边。左侧圆形代表“片姜黄-当归”中 44 个具有防治 KOA 的活性成分, 右侧八边形代表这些成分防治 KOA 的靶点基因。靶点颜色随度值(Degree)增加变深, 表示此靶点连接数量越多。“片姜黄-当归”挥发油的 44 个成分中, 筛选度值靠前的 Ethyl 4-methoxycinnamate、Batatasin IV、Reynosin、Lucidenic acid M、Ligustilide、Decyl acetate、Glyceryl linolenate、Curcumanolide A、3-Butylidenephthalide 为关键活性成分。Ethyl 4-methoxycinnamate 有 13 条边, 对应了 12 个靶基因, 为最关键成分; Batatasin IV 对应 9 个靶基因; Reynoldsin 和 Lucidenic acid M 对应 6 个靶基因; Ligustilide、Decyl acetate、Glyceryl linolenate、Curcumanolide A、3-Butylidenephthalide 各分别对应 5 个靶基因。28 个疾病靶点中, CTSK 基因对应 15 个活性成分, ESRI、PTGS2 和 PTGS1 基因基因对应 13 个活性成分, DRD4 基因对应了 8 个活性成分, 见表 3, 表明这 5 个基因可能为“片姜黄-当归”挥发油防治 KOA 的关键作用靶点。

3.4 潜在核心靶点 PPI 网络图

将 STRING 数据库中获得的 PPI 信息表导入 Cytoscape 3.8.2 软件, 构建 PPI 网络图, 见图 4。使用 Analyse Network 功能进行处理分析, 每一节

表2 “片姜黄-当归”挥发油防治膝骨关节炎活性成分与对应潜在靶点

Tab. 2 Active ingredients and corresponding potential targets of “Wenyujin Rhizoma Concisum-Angelicae Sinensis Radix” essential oil in preventing knee osteoarthritis

序号	潜在有效成分英文名	潜在有效成分中文名	对应靶点
1	Curzerenone	莪术酮	PTGS2、PTGS1、CTSK
2	Isocurcumenol	异姜黄醇	SIGMAR1、FADS1
3	Ar-tumerone	芳姜黄酮	CTSK、TGFB1、DRD4、PIK3CA、SLC18A3
4	Ligustilide	藁本内酯	PTGS2、TGFB1、PTGS1、CTSK、F2
5	Illicic acid	冬青叶豚草酸	PTGS2、VDR
6	Reynosin	诺木烯内酯	PTGS2、MMP3、MMP1、MMP9、CYP2C9、DRD4
7	3-Butylidenephthalide	丁烯基苯酞	PTGS2、TGFB1、PTGS1、CTSK、F2
8	Asteriscunolide A	星状噻啉 A	PTGS2、CTSK、SIGMAR1、DRD4
9	Curcumanolide A	莪术螺内酯 A	PTGS2、PTGS1、ESR1、CTSK、F2
10	Cuelure	乙酸覆盆子酮酯	PTGS2、TGFB1、TGFB2、PDGFRB
11	Zedoarol	地多罗	PTGS2、PIK3CA
12	Glyceryl linolenate	亚麻酸甘油酯	PTGS2、TGFB1、PIK3CA、FGFR2、DRD4
13	Methylisoeugenol	异丁香酚甲醚	PTGS2、PTGS1、ESR1、PIK3CA
14	Batatasin IV	山药素 IV	PTGS2、MMP1、MMP9、MMP2、ESR1、ALPL、PIK3CA、PDGFRB、FADS1
15	Lactarorufin A	乳糖素 A	PTGS2、TRPV4、PTGS1
16	Lucidenic acid M	赤芝酸 M	TNF、MMP3、MMP1、ESR1、PIK3CA、SIGMAR1
17	4-Hydroxycinnamic Acid	4-羟基肉桂酸	MMP1、MMP9、MMP2、ESR1
18	Ethyl 4-methoxycinnamate	对甲氧基肉桂酸乙酯	MMP1、MMP9、TGFB1、MMP2、VDR、TNFRSF1A、PTGS1、ESR1、CTSK、PDGFRB、ASAH1、C1R
19	2-Hydroxycinnamaldehyde	2-羟基肉桂醛	MMP9、MMP2、ALPL
20	Camphor	樟脑	CTSK、VDR
21	Decyl acetate	乙酸癸酯	VDR、SCN9A、HPGD、PDGFRB、ASAH1
22	Curdione	莪术二酮	PTGS1、CTSK、SIGMAR1、F2
23	Thymol	百里酚	PTGS1
24	Spathulenol	匙叶桉油烯醇	PTGS1
25	Isocyperol	异香附醇	PTGS1、ESR1
26	α -Cyperone	α -香附酮	PTGS1、CTSK、SIGMAR1、DRD4
27	(-)-3-Thujene	(-)-3-侧柏烯	ESR1
28	m-Cresol	间甲酚	ESR1
29	2,4(15)-Copadiene	2,4(15)-连二烯	ESR1
30	Valerophenone	1-苯基-1-戊酮	ESR1、PIK3CA、HPGD
31	3,7-dimethylindan-5-carboxylic acid	3,7-二甲基茛满-5-羧酸	ESR1
32	Biphenyl	联苯	ESR1
33	Chavicol	4-烯丙基苯酚	ALPL、DRD4
34	3-n-Butylphthalide	正丁基苯酞	CTSK
35	3-Phenylpropyl acetate	醋酸苯丙酯	CTSK、PDGFRB
36	Germacrone	吉马酮	CTSK
37	Epishyobunone	表水菖蒲酮	CTSK
38	Methylvanillin	藜芦醛	CTSK
39	1-Phenyl-1-propanone	1-苯基-1-丙酮	HPGD
40	Carvone	香芹酮	SIGMAR1、DRD4
41	Curcumenol	莪术烯醇	SIGMAR1、FADS1
42	Zederone	蓬莪术环氧酮	PTGS1、FADS1
43	Curzerene	莪术烯	DRD4
44	β -Cyclocostunolide	环木香烯内酯	SIGMAR1

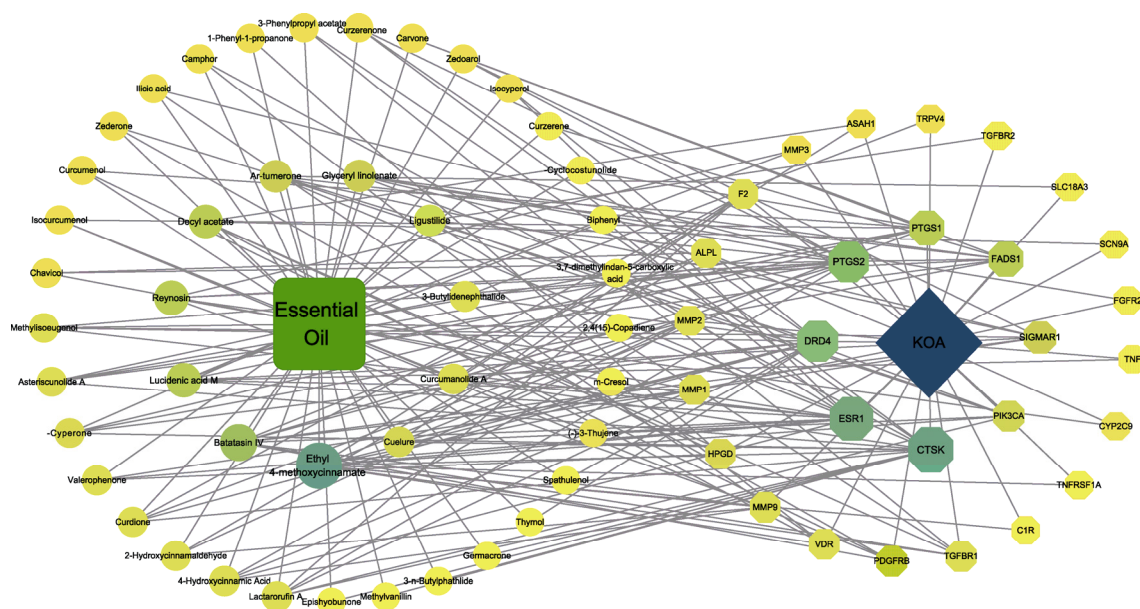


图3 “片姜黄-当归”挥发油防治膝关节炎的“成分-靶点-疾病”可视化网络图

Fig. 3 Visual network diagram of “component-target-disease” of “Wenyujin Rhizoma Concisum-Angelicae Sinensis Radix” essential oil in preventing knee osteoarthritis

点都代表一个靶点,整个网络图中共有 20 个节点、65 条边。图中基因的颜色、形状随度值(Degree)增大而变深、增大。网络图显示 *TNF*、*ESR1* 2 个基因处于核心位置, *PTGS2*、*CTSK*、*MMP9*、*MMP2* 4 个基因次之。说明这些靶点基因可能也在蛋白相互作用网络中发挥着关键的调控作用。

3.5 GO 注释分析与 KEGG 通路富集

BP 富集主要涉及平滑肌细胞增殖的正向调控(positive regulation of smooth muscle cell proliferation)、正向调节细胞凋亡过程(positive regulation of apoptotic process)、血管生成(angiogenesis)、蛋白水解(proteolysis)、炎症反应(inflammatory response)等; CC 富集包括了质膜(plasma membrane)、胞外区(extracellular region)、膜的组成部分(integral component of membrane)、细胞外间隙(extracellular space)、细胞膜(membrane); MF 富集主要存在相同的蛋白结合(identical protein binding)、丝氨酸型内肽酶活性(serine-type endopeptidase activity)、锌离子结合(zinc ion binding)、内肽酶活性(endopeptidase activity)、金属内肽酶活性(metalloendopeptidase activity)等功能。DAVID 数据库中, BP 共富集到 157 条,以 $P<0.05$ 为筛选条件共有 115 条; CC 共富集到 22 条,筛选后有 16 条; MF 共富集到 27 条,筛选后有 16 条。对处理后的 BP、CC、MF 功能条目进行绘图分析,见图 5。

KEGG 中共富集到了 64 条通路,以 $P<0.05$ 为筛选条件,共筛选到 49 条。按富集的显著程度选取排名靠前的通路进行 KEGG 通路富集图绘图分析,见图 6。图中,颜色越深的点代表其富集程度越显著。肿瘤坏死因子信号通路(TNF signaling pathway)、破骨细胞分化(Osteoclast differentiation)、白介素 17 信号通路(IL-17 signaling pathway)、松弛素信号通路(Relaxin signaling pathway)、丝裂原活化蛋白激酶信号通路(MAPK signaling pathway)是其中最重要的五条通路,此外还涉及细胞因子-细胞因子受体相互作用(Cytokine-cytokine receptor interaction)、类风湿性关节炎(Rheumatoid arthritis)等的产生。

3.6 分子对接验证结果

选取“活性成分-靶点-通路”网络中排名靠前的化合物作为配体,包括 Ethyl 4-methoxycinnamate、Batatasin IV、Reynosin、Lucidenic acid M、Ligustilide、Curcumanolide A、3-Butylidenephthalide,以 CTSK、DRD4、ESR1、PTGS1、PTGS2 为受体预测结合能力,关键化合物与核心靶点分子对接结合能见表 4,通常结合能 <0 说明分子之间具有结合活性, $<-20.93 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 说明分子之间具有较强的结合活性,且能量越低代表结合能力越强。结果显示,度值最大的靶点 CTSK 与主要成分所需结合能较低,且其余靶点与成分均具有较好的结合能力,与网络药理学的预测结果相符。部分蛋白与成分对接的结合模式见图 7。

表3 “片姜黄-当归”挥发油防治膝骨关节炎的关键靶点
Tab. 3 Key targets of “Wenyujin Rhizoma Concisum-Angelicae Sinensis Radix” essential oil in preventing knee osteoarthritis

基因	度值	介度中心性	接近中心性
CTSK	15	0.057	0.459
PTGS2	13	0.040	0.448
PTGS1	13	0.042	0.448
ESR1	13	0.052	0.448
DRD4	8	0.023	0.422

4 讨论

片姜黄与姜黄作用功效相似，在古代常常互称互代，但是其主要成分有着很大的差异^[12]。流传下来的组方直接以片姜黄命名的很少，在一定程度上限制了片姜黄的临床应用。有关“片姜黄-当归”挥发油治疗 KOA 的研究较少，且对于其防治 KOA 的活性成分与作用机制尚不明晰，因此本研究首先使用 LC-MS 对“片姜黄-当归”挥发油定性分析得到其主要成分，再用得到的 59 种成分搜

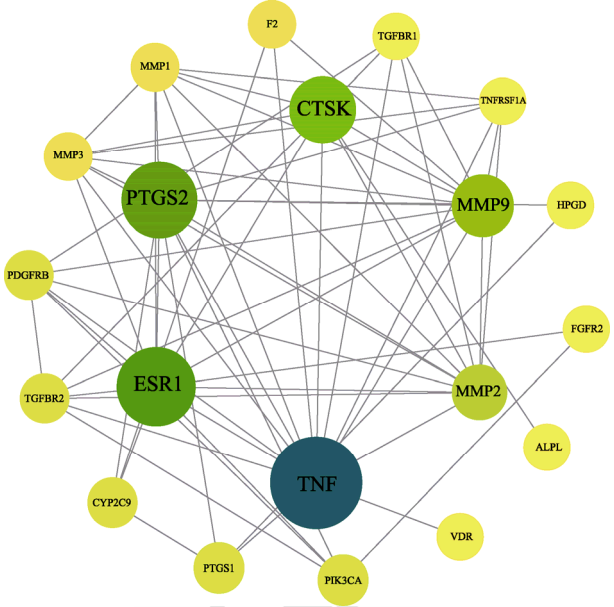


图4 挥发油活性成分防治膝骨关节炎的核心靶点蛋白互作关系
Fig. 4 Key targets protein-protein interaction of active ingredients in essential oil in preventing knee osteoarthritis

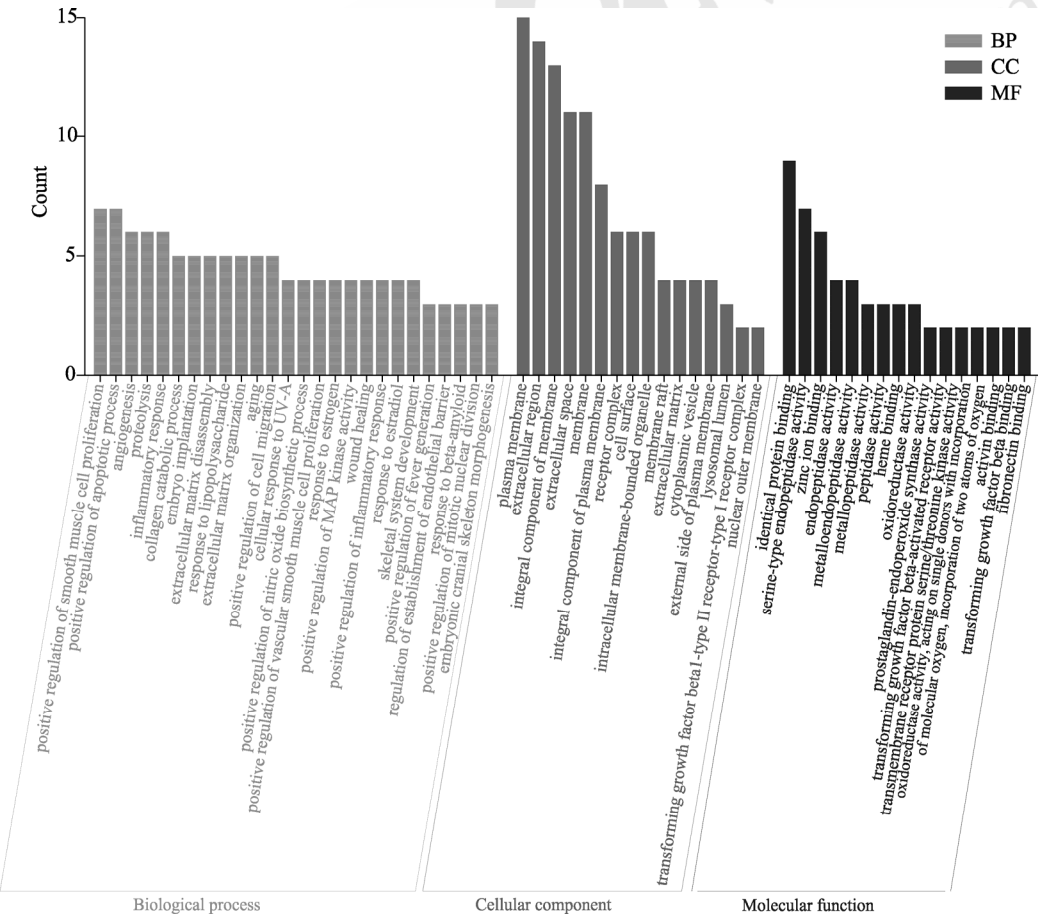


图5 “片姜黄-当归”挥发油防治膝骨关节炎潜在靶点的 GO 富集分析
Fig. 5 GO enrichment analysis of potential targets of “Wenyujin Rhizoma Concisum-Angelicae Sinensis Radix” essential oil in preventing knee osteoarthritis

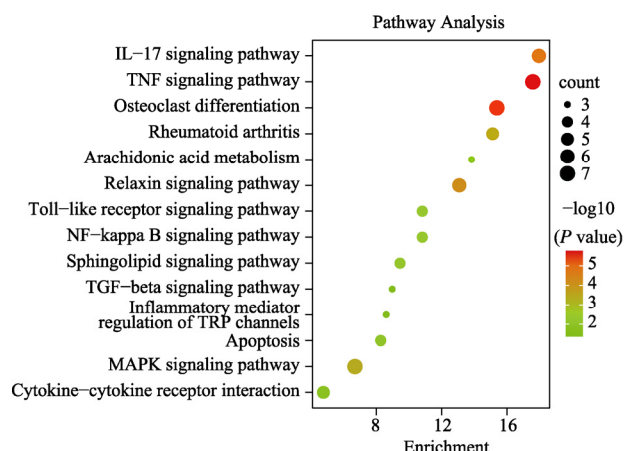


图 6 “片姜黄-当归”挥发油防治膝骨关节炎潜在靶点 KEGG 通路富集分析

Fig. 6 KEGG enrichment analysis of pathways of potential targets of essential oil in “Wenyujin Rhizoma Concisum-Angelicac Sinensis Radix” in preventing knee osteoarthritis

表 4 关键化合物与核心靶点的分子对接结合能

Tab. 4 Binding energy of the molecular docking between key compounds and core targets $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$

主要成分	CTSK	DRD4	ESR1	PTGS1	PTGS2
对甲氧基肉桂酸乙酯	-16.62	-4.98	-17.37	-16.28	-10.72
山药素IV	-12.31	-7.16	-13.94	-7.49	-8.37
诺木烯内酯	-24.32	-15.53	-23.52	-19.80	-21.01
赤芝酸 M	-25.24	-21.83	-25.03	-21.64	-13.02
藁本内酯	-16.41	-14.61	-14.80	-17.50	-13.02
莪术螺内酯 A	-23.27	-16.07	-20.85	-16.74	-16.37
丁烯基苯酚	-23.32	-21.10	-20.68	-17.79	-16.28

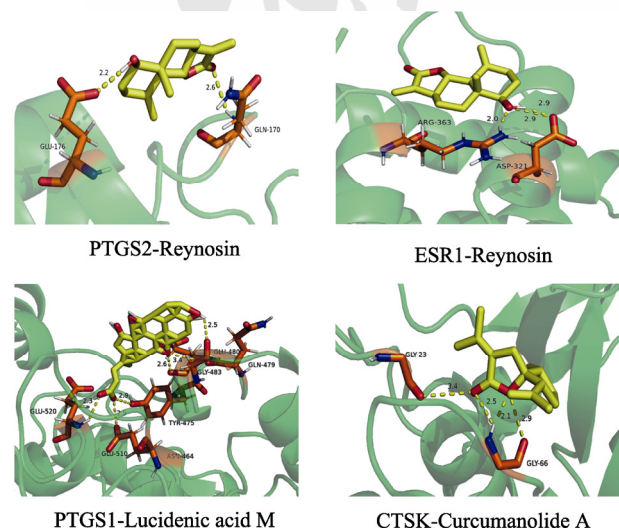


图 7 活性成分与核心靶点的分子对接模式图

Fig. 7 Molecular docking pattern of active components to core targets

索相关疾病靶点，并对其进行数据挖掘发现与防治 KOA 相关的有效成分共 44 种，共同潜在作用靶点 28 个，最后进行 GO 与 KEGG 通路富集分析，

来探索“片姜黄-当归”挥发油防治 KOA 的活性成分与潜在作用机制。

“活性成分-疾病靶点”可视化网络图的 44 个有效成分中，Ethyl 4-methoxycinnamate、Batatasin IV、Reynosin、Lucidenic acid M、Ligustilide、Decyl acetate、Glyceryl linolenate、Curcumanolide A、3-Butylidenephthalide 为关键活性成分。已有研究表明 Ethyl 4-methoxycinnamate 具有抗真菌、抗炎活性，还可起到镇痛乙酸诱导的小鼠扭体作用^[13]；Batatasin IV 可以减轻由脂多糖诱导的炎症反应，还可以对角叉菜胶诱导的小鼠足肿胀起到缓解的作用^[14]；Lucidenic acid M 可以促进 p38-MAPK 基因的表达^[15]，而 p38-MAPK 在炎症痛敏的信号传导中发挥重要作用，从而参与 KOA 的调节^[16]。此外，Curcumanolide A、3-Butylidenephthalide、Ligustilide 等活性成分也具有抗炎、镇痛、抗菌、血管扩张等药理作用^[17-18]。

结合图 3~4，得知 28 个疾病靶点中，CTSK、PTGS2、ESR1、PTGS1、DRD4 和 TNF 是最重要的 6 个关键靶点基因。CTSK 是一种组织蛋白酶，参与骨重塑，主要在破骨细胞中表达，在细胞蛋白周转中起到关键作用^[19]；PTGS2 是一种前列腺素，编码可诱导的同工酶，可促进成纤维样滑膜细胞增殖，参与炎症和有丝分裂的前列腺素生物合成^[20]；ESR1 编码雌激素受体和配体激活的转录因子，在骨质疏松中起关键作用，并可能增加 KOA 的发生率^[21]；PTGS1 编码的酶可催化花生四烯酸盐向前列腺素的转化，编码的蛋白质调节内皮细胞的血管生成，并被非甾体抗炎药如阿司匹林抑制表达^[22]；DRD4 基因可编码多巴胺受体，可抑制腺苷环化酶，减少环磷酸腺苷的合成，从而对 MAPK 信号通路进行调控^[23]；TNF 基因是属于肿瘤坏死因子家族的多功能促炎细胞因子，参与调节广泛的生物过程，包括细胞增殖、分化、细胞凋亡、脂质代谢和凝血等^[24]，并已被相关研究证实与 KOA 的发病机制密切相关^[25-26]。

KEGG 通路分析发现主要涉及肿瘤坏死因子信号通路、破骨细胞分化、IL-17 信号通路、松弛素信号通路、MAPK 信号通路等通路的功能调控。已有研究显示，TNF- α 可激活多种信号诱导其他细胞因子参与炎症反应，加重关节损伤^[27]；破骨细胞分化通路会导致病变关节发生骨降解，导致溶骨性疾病^[28]；IL-17 可通过异常激活 NF- κ B 造成

关节软骨功能失常, 出现炎症反应^[29]; MAPK 信号通路可通过调节产生炎症因子的过程加重炎症反应^[30-33]。分子对接结果显示, 核心靶点和相应化合物之间结合自由能较低, 对接效果良好, 本研究中网络药理学的预测结果具有一定的合理性。

综上所述, “片姜黄-当归”药对挥发油是通过多成分、多靶点、多通路联合作用, 发挥治疗 KOA 的功效。但是目前对于 “片姜黄-当归”药对及其挥发油的研究尚少, 本研究基于 LC-MS 成分分析得到了 “片姜黄-当归”挥发油中的主要成分, 并运用网络药理学与分子对接手段筛选出了挥发油中治疗 KOA 的潜在活性成分与关键作用靶点, 进一步得到挥发油防治 KOA 的通路途径, 为 “片姜黄-当归”挥发油治疗 KOA 的基础研究和临床应用提供参考依据。

REFERENCES

- [1] BERTEAU J P. Knee pain from osteoarthritis: Pathogenesis, risk factors, and recent evidence on physical therapy interventions[J]. J Clin Med, 2022, 11(12): 3252.
- [2] NELSON A E, ALLEN K D, GOLIGHTLY Y M, et al. A systematic review of recommendations and guidelines for the management of osteoarthritis: The chronic osteoarthritis management initiative of the U.S. bone and joint initiative[J]. Semin Arthritis Rheum, 2014, 43(6): 701-712.
- [3] GENG Z J, JI Q B, WANG Y. Research progress of different treatment methods of osteoarthritis[J]. Chin J Bone Jt(中国骨与关节杂志), 2021, 10(8): 636-640.
- [4] MA Z Y, MO H. Research progress of traditional Chinese medicine sticking therapy in the treatment of knee osteoarthritis[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报), 2020, 36(6): 926-930.
- [5] HAN J Q, LIU Z P. Research progress of transdermal drug delivery system[J]. Prog Biomed Eng(生物医学工程学进展), 2022, 43(1): 24-28.
- [6] HERMAN A, HERMAN A P. Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: A review[J]. J Pharm Pharmacol, 2015, 67(4): 473-485.
- [7] ZHANG X, LI Q X, CAO R R, et al. Research progress of volatile oil in traditional Chinese medicine[J]. Sci Technol Innov(科学技术创新), 2019(30): 63-64.
- [8] (宋)太平惠民和剂局. 太平惠民和剂局方[M]. 陈庆平, 陈冰鸥, 校注. 北京: 中国中医药出版社, 1996: 25.
- [9] ZHAO X F, XIANG G X, WANG J F, et al. Herbal textual research on efficacy, indications and contraindications of Danggui(*Angelica*) [J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2020, 35(5): 2479-2482.
- [10] 严用和. 重订严氏济生方[M]. 上海: 上海人民出版社, 2005: 54.
- [11] (宋)陈自明. 妇人大全良方[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2020: 82.
- [12] GAO L H, ZHANG Y M, LIU Y X, et al. Analysis of essential oil components in *Curcuma longa* L. and Wenyujin Rhizoma Concisum by GC-MS method and research on their anti-tumor effects *in vitro* [J]. Pharm Care Res(药学服务与研究), 2014, 14(1): 18-21.
- [13] RIDTITID W, SAE-WONG C, REANMONGKOL W, et al. Antinociceptive activity of the methanolic extract of *Kaempferia galanga* Linn. in experimental animals[J]. J Ethnopharmacol, 2008, 118(2): 225-230.
- [14] SUN Y L. Study on the isolation, purification and mechanism of anti-inflammatory active substances from Chinese yam[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2020: 4-6.
- [15] LI H M. Inhibitory activity of *Ganoderma* acid A on HeLa cells and its mechanism[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2020: 25-27.
- [16] JI R R, SAMAD T A, JIN S X, et al. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia[J]. Neuron, 2002, 36(1): 57-68.
- [17] WANG N, ZHANG Y, LI X, et al. Analysis of volatile oils of *Ligusticum chuansiong* Hort. from different geographical origins by comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry[J]. Chin J Chromatogr, 2010, 28(4): 329-335.
- [18] WU G L, HUO Z P, WANG Y, et al. Study advancement on neuroprotective effect of ligustilide[J]. Tianjin Pharm(天津药), 2022, 34(1): 72-78.
- [19] GARNERO P. New developments in biological markers of bone metabolism in osteoporosis[J]. Bone, 2014(66): 46-55.
- [20] MAHBOUBI RABBANI S M I, ZARGHI A. Selective COX-2 inhibitors as anticancer agents: A patent review (2014-2018)[J]. Expert Opin Ther Pat, 2019, 29(6): 407-427.
- [21] LIU Y, WANG Y, PEI X F. Estrogen receptor α gene(*ESR1*) polymorphisms and bone mineral density in Chinese adult women: A meta-analysis[J]. Mod Prev Med(现代预防医学), 2017, 44(8): 1350-1357, 1370.
- [22] SCHWARZBACH S V, MELO C F, XAVIER P L P, et al. Morphine, but not methadone, inhibits microsomal prostaglandin E synthase-1 and prostaglandin-endoperoxide synthase 2 in lipopolysaccharide-stimulated horse synoviocytes[J]. Biochimie, 2019(160): 28-33.
- [23] YAN Y, ZHANG H Y, PAN J H, et al. Effect of dopamine receptor 4 on proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma cells and its prognostic significance[J]. J Sun Yat Sen Univ Med Sci(中山大学学报: 医学科学版), 2020, 41(5): 669-680.
- [24] TAYLOR P C. Pharmacology of TNF blockade in rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory diseases[J]. Curr Opin Pharmacol, 2010, 10(3): 308-315.
- [25] YANG N, LIU Z X, ZHANG L, et al. Optimization of the matrix formulation of sanse powder gel paste and its

- intervention effect on synovitis in KOA rats[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报), 2022, 38(1): 32-39.
- [26] ZHANG C, WANG H S, WANG L J, et al. Regulation mechanism and significance of TCM Bu-Shen Gu-Jin prescription on IL-1 and TNF- α of knee osteoarthritis[J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol(世界科学技术-中医药现代化), 2015, 17(6): 1198-1202.
- [27] WANG J P, DU J L, LI H. Effect of celecoxib on tumor necrosis factor- α signaling pathway and synovial cells in rats with rheumatoid arthritis[J]. Chin J Anat(解剖学杂志), 2022, 45(1): 17-21.
- [28] ZHANG L K, LI F B, MA J X, et al. Research development of osteoclast differentiation pathway[J]. Biomed Eng Clin Med(生物医学工程与临床), 2017, 21(3): 328-333.
- [29] TERZUOLI E, MEINI S, CUCCHI P, et al. Antagonism of bradykinin B2 receptor prevents inflammatory responses in human endothelial cells by quenching the NF- κ B pathway activation[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e84358.
- [30] RALPH J A, MORAND E F. MAPK phosphatases as novel targets for rheumatoid arthritis[J]. Expert Opin Ther Targets, 2008, 12(7): 795-808.
- [31] BUBICI C, PAPA S. JNK signalling in cancer: In need of new, smarter therapeutic targets[J]. Br J Pharmacol, 2014, 171(1): 24-37.
- [32] LI M T, DENG J, YANG D L, et al. Crosstalk between TGF- β and MAPK signaling pathways during cardiac hypertrophy[J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2022, 41(5): 257-263.
- [33] REN A G S, GAO Y R, XU L L, et al. The signal pathway involved in the treatment of vascular cognitive impairment in rats by butylphthalide[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2023, 32(9): 902-905.
- 收稿日期: 2022-10-27
(本文责编: 李艳芳)