

· 论 著 ·

基于网络药理学探讨骨碎补治疗骨质疏松症的作用机制

马江涛¹ 万雷² 黄宏兴^{2*}

1. 广州中医药大学, 广东 广州 510405

2. 广州中医药大学第三附属医院, 广东 广州 510375

中图分类号: R589.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 04-0490-07

摘要: **目的** 运用网络药理学筛选骨碎补有效成分治疗骨质疏松症的作用靶标及信号通路。**方法** 首先借助 TCSP 分析平台、GeneCards 数据库和 OMIM 数据库, 分别筛选中药活性成分、疾病及相应的靶标, 将中药靶标与疾病靶标取交集, 得到中药-疾病共同靶标并构建中药-疾病-靶标调控网络。然后通过构建中药-疾病共同靶标的蛋白互作网络, 筛选核心靶点基因。最后将中药-疾病共同靶标进行 GO 功能富集分析和 KEGG 功能富集分析, 得出中药-疾病共同靶标相关的信号通路。**结果** 筛选得到骨碎补治疗骨质疏松症的 18 个有效成分和 98 个中药-疾病共同靶标, 并推断其作用机制可能与糖尿病并发症的 AGE-RAGE 信号通路、TNF 信号通路、IL-17 信号通路、HIF-1 信号通路、Th17 细胞分化信号通路等有关, 且白介素-6 基因、JUN 基因、丝裂原活化蛋白激酶-1 基因和表皮细胞生长因子基因可能起着关键性作用。**结论** 基于网络药理学探讨了骨碎补治疗骨质疏松症的作用靶标及信号通路, 为中药现代化研究提供了思路。

关键词: 网络药理学; 骨碎补; 骨质疏松症; 信号通路

Research on the mechanism of Rhizoma Drynariae in the treatment of osteoporosis based on network pharmacologyMA Jiangtao¹, WAN Lei², HUANG Hongxing^{2*}

1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China

2. The Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510375, China

* Corresponding author: HUANG Hongxing, Email: gzhhx@126.com

Abstract: **Objective** To screen the target and signaling pathway of the effective ingredients of Rhizoma Drynariae in the treatment of osteoporosis by network pharmacology. **Methods** Firstly, TCSP analysis platform, GeneCards database and OMIM database were used to screen the active ingredients and corresponding targets of Traditional Chinese Medicine (TCM), and the common target of TCM-Disease was obtained by intersecting the target of TCM with the target of disease, and the regulatory network of TCM-Disease-Target was constructed. Then, the core target genes were screened by constructing the protein protein interaction (PPI) network of common target of TCM-Disease. Finally, GO function enrichment analysis and KEGG function enrichment analysis were carried out on the common target of TCM-Disease, and the signal pathways related to the common target of TCM-Disease were obtained. **Results** 18 effective ingredients and 98 common targets of TCM-Disease were screened for the treatment of osteoporosis. The mechanism of action may be related to AGE-RAGE signaling pathway, TNF signaling pathway, IL-17 signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, Th17 cell differentiation signaling pathway, and interleukin-6 gene, JUN gene, mitogen-activated protein kinase-1 (MAPK-1) gene and epidermal growth factor (EGF) gene may play a key role. **Conclusion** Based on network pharmacology, the target and signal pathway of Rhizoma Drynariae in the treatment of osteoporosis were explored, which provides ideas for the modernization of TCM.

Key words: network pharmacology; rhizoma drynariae; osteoporosis; signaling pathway

基金项目: 国家自然科学基金项目(81674004, 81673786); 广东省科技计划项目(2016A020216024); 广州中医药大学学科研究重点项目(XK2019028)。

* 通信作者: 黄宏兴, Email: gzhhx@126.com

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种全身性骨骼疾病,其特点是骨量降低,骨组织微结构破坏,从而导致脆性增加,骨折风险增加。随着人口老龄

化以及糖皮质激素的广泛应用,骨质疏松症在很大程度上已成为“隐形杀手”。预计到 2050 年^[1],全世界 60 岁及以上的老年人数将达到 20 亿。到那时,骨质疏松症的发病率也会迅猛增加,这将成为沉重的社会经济负担。目前,OP 的治疗^[2]主要包括补充骨健康基本补充剂(钙剂、维生素 D),骨吸收抑制剂(双膦酸盐、降钙素、雌激素、选择性雌激素受体调节剂等),骨形成促进剂(甲状旁腺素类似物),活性维生素 D 及其类似物等。但这些西药普遍存在不良反应众多、价格高昂等问题,这严重限制了西药在临床上的广泛应用。因此,迫切需要寻求高效、安全、价廉的抗骨质疏松新药。

近年来,多项研究^[3]表明中药影响骨质疏松症的骨代谢,调节人体骨代谢相关细胞因子及信号通路,促进成骨细胞合成,抑制骨量丢失,明显改善患者骨质疏松症状。其中,补肾助阳、活血化瘀类中药,如淫羊藿、杜仲、续断、补骨脂、骨碎补等,对骨质疏松症的治疗效果显著。骨碎补^[4],为槲蕨的干燥根茎,性温、味苦,归肝、肾经,具有活血止痛,补肾强骨的功效,能通血脉、续筋骨、疗伤痛,为伤科要药。本品含柚皮苷、骨碎补双氢黄酮苷、骨碎补酸等成分,能促进对钙的吸收,提高血钙和血磷水平,有利于骨钙化和骨质的形成。除了抗骨质疏松的作用外,骨碎补具有不良反应少,价格低廉等优点。因此,研究骨碎补中有效成分治疗骨质疏松症的作用机制具有重要的理论价值。

网络药理学是基于系统生物学的理论,对生物系统的网络分析,选取特定的信号节点进行多靶点药物分子设计的新学科。中药网络药理学基于多学科交叉,整合中药、中药有效成分、中药靶标、疾病靶标、信号通路等信息,利用靶标的一致性进行大数据分析,得出中药-疾病靶标并进行相关通路分析,这为科学研究中药复方的作用机制提供了技术支持,也为中医药研究的现代化指明了方向。因此,本研究基于中药网络药理学的相关原理及软件,探索并构建单味中药骨碎补治疗 OP 的作用机制网络,为进一步研究骨碎补的作用机制及新药开发提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 资料

本研究使用的数据库及相关分析平台见表 1。

1.2 方法

1.2.1 骨碎补中有效成分的筛选和靶点预测

本研究通过检索中药系统药理学分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP),对骨碎补的所有有效成分进行初步筛选,其中筛选条件^[5]为口服生物利用度(oral bioavailability, OB)>30%,药物类药性(drug likeness, DL)>0.18,见表 2。采用 TCMSP 靶点预测模型和 Perl 软件对相关有效成分作用靶点进行预测。

1.2.2 骨碎补靶点基因名(gene symbol)的添加

利用 Perl 软件和 UniProt 知识库为筛选出的靶点基因添加基因名,由于某些靶点可能在 UniProt 知识库中找不到对应的基因名,无法找到基因名的靶点删除,故实际得到的靶点基因名要少。

1.2.3 已知 OP 相关疾病靶点基因的获取

利用“osteoporosis”作为关键词,对 GeneCards 数据库、OMIM 数据库进行已知疾病靶点基因的检索及筛选,并删除检索结果中重复的靶点基因,得到疾病靶点基因。

1.2.4 中药靶点基因和疾病靶点基因的交集

利用 R 语言软件将疾病靶点基因与中药靶点基因取交集,得到中药-疾病共同靶点基因的韦恩图(见图 1),从中得到中药-疾病共同靶点基因。

1.2.5 中药-疾病调控网络的构建

将中药靶点基因和中药-疾病共同靶点基因利用 Perl 软件进行一一映射,然后利用 Cytoscape 软件进行计算,得到中药-疾病调控网络(见图 2)。其中节点的类型有疾病、中药、中药靶点基因和中药-疾病共同靶点基因。

1.2.6 骨碎补治疗 OP 的靶点基因蛋白相互作用网络构建与核心靶点基因的筛选

利用 STRING 在线软件将中药-疾病共同靶点基因输入软件,筛选条件为种属选择人,最小互作分数值为 0.7,保存相应结果文件(见图 3)。将所得文件输入 R 语言计算,得到蛋白互作网络核心基因的条图(见图 4)。

1.2.7 GO 和 KEGG 功能富集分析

将中药-疾病共同靶点基因利用 R 语言软件计算,得到 GO 功能富集分析(图 5a、5b)和 KEGG 功能富集分析(图 6a、6b)。以 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 骨碎补有效成分及相关靶点筛选

通过对 TCMSP 数据库中骨碎补所有已报道的

有效成分及其相关靶点筛选,共搜索到有效成分 71 个,相关靶点 587 个。根据 OB 和 DL 参数对骨碎补的有效成分进行筛选,共获得有效成分 18 个,有效成分对应的靶点 304 个。

表 1 本研究使用的数据库及相关分析平台

Table 1 Databases and related analysis platforms used in this study

名称	网址	版本
中药系统药理学分析平台(TCMSP)	http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php	2.3
UniProt 知识库	https://www.uniprot.org/	
GeneCards 数据库	https://genealacart.genecards.org/	4.9
OMIM 数据库	https://www.omim.org/	
Bioconductor 数据库	https://www.bioconductor.org/	3.8
STRING 在线软件	https://string-db.org/	11.0
Perl 软件	https://www.perl.org/get.html	5.26.3
R 语言软件	https://www.r-project.org/	3.5.3
Cytoscape 软件	https://cytoscape.org/	3.7.1

表 2 通过 TCMSP 数据库骨碎补所有成分根据 OB 和 DL 参数进行筛选后的结果

Table 2 The results of screening all ingredients of Rhizoma Drynariae by OB and DL parameters in TCMSP database

MOL ID	化合物		OB(%)DL	
	英文名称	中文名称		
MOL001040	(2R)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) chroman-4-one	柚皮素	42.36	0.21
MOL001978	Aureusidin	金鱼草素	53.42	0.24
MOI.002914	Eriodyctiol (flavanone)	去甲异辛醇(黄烷酮)	41.35	0.24
MOL000449	Stigmasterol	豆甾醇	43.83	0.76
MOL000358	beta-sitosterol	β-谷甾醇	36.91	0.75
MOL000422	kaempferol	山奈酚	41.88	0.24
MOL004328	naringenin	柚皮苷	59.29	0.21
MOL000492	(+)-catechin	(+)儿茶素	54.83	0.24
MOL005190	eriodictyol	圣草素	71.79	0.24
MOL000569	digallate	二没食子酸	61.85	0.26
MOL000006	luteolin	木犀草素	36.16	0.25
MOL009061	22-Stigmasten-3-one	22-豆甾烯-3-酮	39.25	0.76
MOL009063	Cyclolaudenol acetate	环鸦片甾烯醇乙酸酯	41.66	0.79
MOI.009075	cycloartenone	环木菠萝烯酮	40.57	0.79
MOL009076	cyclolaudenol	环鸦片甾烯醇	39.05	0.79
MOL009078	davallioside A _{qt}	大蒜素	62.65	0.51
MOL009087	marioside _{qt}	marioside _{qt}	70.79	0.19
MOI.009091	xanthogalenol	黄姜烯醇	41.08	0.32

2.2 中药靶点基因和疾病靶点基因的交集

利用 R 语言软件将疾病靶点基因与中药靶点基因取交集,得到中药-疾病共同靶点基因的韦恩图,从中得到中药-疾病共同靶点基因 98 个。其中疾病靶点基因3 530个,中药靶点基因 148 个。

2.3 中药-疾病调控网络的构建

图中红色代表(菱形)骨质疏松症,蓝色(椭圆形)代表中药骨碎补,绿色(箭头形)代表骨碎补的有效成分,黄色(三角形)代表中药-疾病共同靶点基因。中药骨碎补主要通过 10 种有效成分作用于 98 个靶点基因,这 98 个靶点基因可能影响骨质疏松症的发生。

2.4 骨碎补治疗 OP 的靶点基因蛋白相互作用网

络构建与核心靶点基因的筛选

根据文献研究,筛选出骨碎补治疗 OP 的核心靶点基因。其中,邻接节点较多的 4 个靶标分别是:白介素-6 基因(IL-6)、JUN 基因、丝裂原活化蛋白激酶-1 基因(MAPK-1)、表皮细胞生长因子基因(EGF)。

IL-6^[6]是骨吸收的重要环节,其以自分泌和旁分泌形式作用于成骨细胞,促进自身合成,调节 bax/bcl-2 比值,抑制破骨细胞凋亡,促进成骨细胞凋亡,导致骨质疏松症。原发性骨质疏松时骨组织中癌基因 c-JUN 表达增加,c-JUN 表达增加与骨细胞和成骨细胞凋亡有关,c-JUN 与原发性骨质疏松症存在联系^[7]。MAPK 是信号从细胞表面传导到细

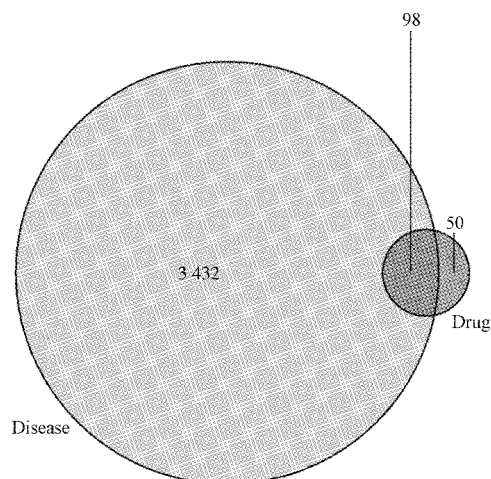


图 1 中药靶点基因和疾病靶点基因的交集

Fig.1 The intersection of TCM target genes and disease target genes

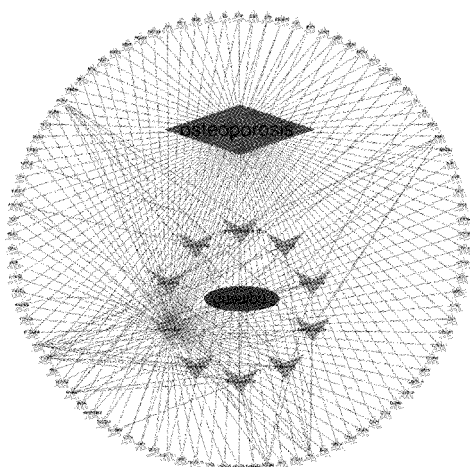


图 2 中药-疾病-靶标调控网络

Fig.2 The regulatory network of TCM-Disease-Target

胞核内部的重要传递者,MAPK-1 是 MAPK 的一个亚型,许多胞外信号通过 MAPK 信号通路,参与成骨细胞和破骨细胞的增殖、分化和凋亡,在骨质疏松的发生中具有重要作用^[8]。体外实验表明 EGF 促进破骨细胞骨吸收,抑制成骨细胞骨形成,参与骨质疏松^[9]。

2.5 GO 功能富集分析

骨碎补治疗 OP 的核心靶点基因的 GO 功能富集分析结果见图 5a、5b。骨碎补治疗 OP 的核心靶点基因的 GO 功能主要涉及血红素结合、辅因子结合、细胞因子受体结合、四吡咯结合、类固醇激素受体活性、核受体活性、转录因子活性、细胞因子活性、氧化还原酶活性、转录激活活性、受体配体活性等。

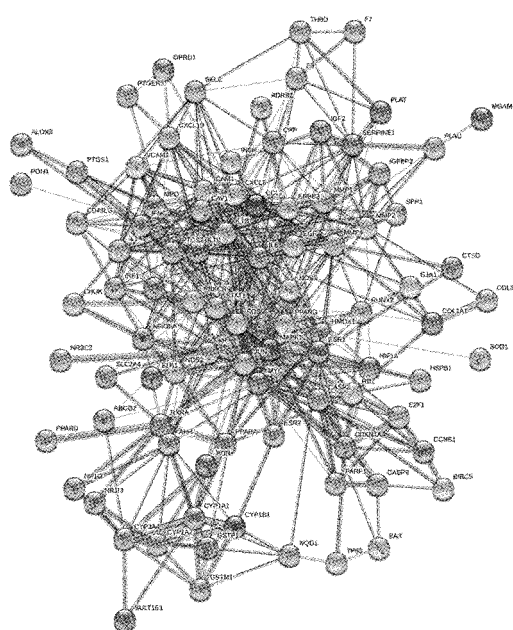


图 3 骨碎补治疗 OP 的靶点基因蛋白互作网络

Fig.3 Target gene protein protein interaction (PPI) network of Rhizoma Drynariae for OP

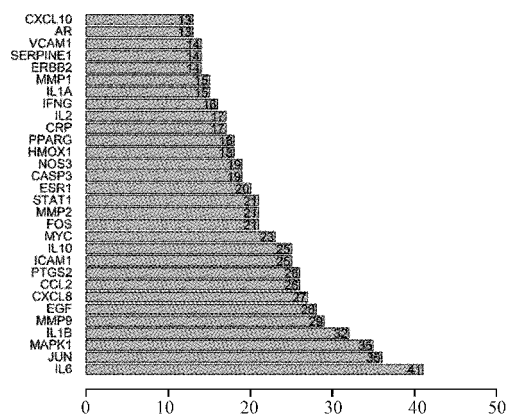


图 4 蛋白互作网络核心基因的条图

Fig.4 Barplot of PPI core genes

注:左列为基因名,如 IL-6(interleukin-6,白介素-6),数字为相应基因邻接节点数目,如 IL-6 邻接节点数目为 41。

气泡图图形左侧字母为 GO 名称,下面数字为基因的比例,圆圈大小表示富集的基因的数目,颜色代表 P 值,颜色越红,富集的程度越高,相应的 P 值越小。

2.6 KEGG 通路富集分析

骨碎补治疗 OP 的核心靶点基因的 KEGG 通路富集分析结果见图 6a、6b,骨碎补治疗 OP 的核心靶点基因的 KEGG 功能主要涉及:糖尿病并发症的 AGE-RAGE 信号通路、TNF 信号通路、IL-17 信号通

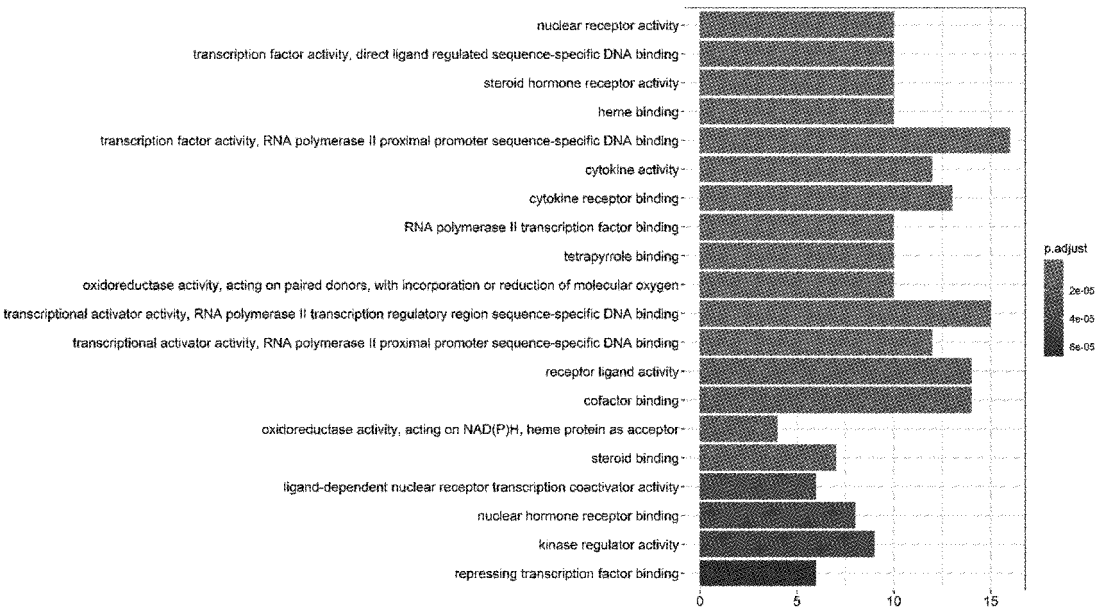


图 5a GO 功能富集分析柱状图
Fig.5a GO functional enrichment analysis barplot

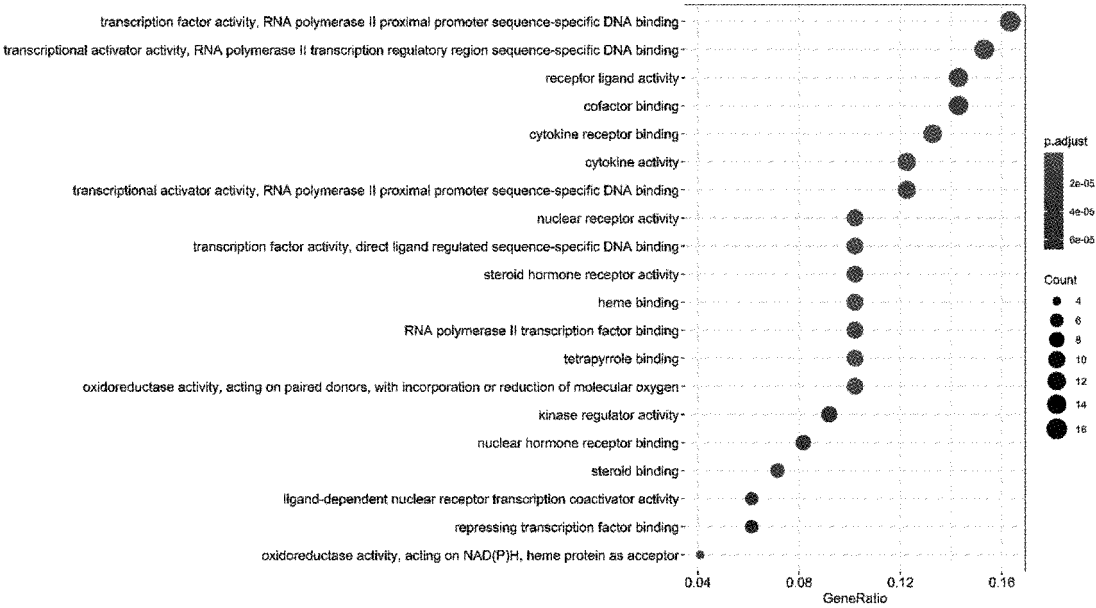


图 5b GO 功能富集分析气泡图
Fig.5b GO functional enrichment analysis dotplot

注:柱状图图形左侧字母为 GO 名称,下面数字为基因的数目,柱状图形表示富集在 GO 上的基因,P 代表富集的显著性,颜色越红,富集的程度越高,相应的 P 值越小。

路、HIF-1 信号通路、Th17 细胞分化信号通路等。富集程度相对低的信号通路有: NF- κ B 信号通路、Toll 样受体信号通路、C 型凝集素受体信号通路、凋亡信号通路、MAPK 信号通路、破骨细胞分化信号通路、T 细胞受体信号通路、PI3K-Akt 信号通路、p53 信号通

路、FoxO 信号通路等。

综合有关骨质疏松信号通路的文献,研究发现糖尿病并发症的 AGE-RAGE 信号通路、TNF 信号通路、IL-17 信号通路、HIF-1 信号通路、Th17 细胞分化信号通路、NF- κ B 信号通路、凋亡信号通路、MAPK

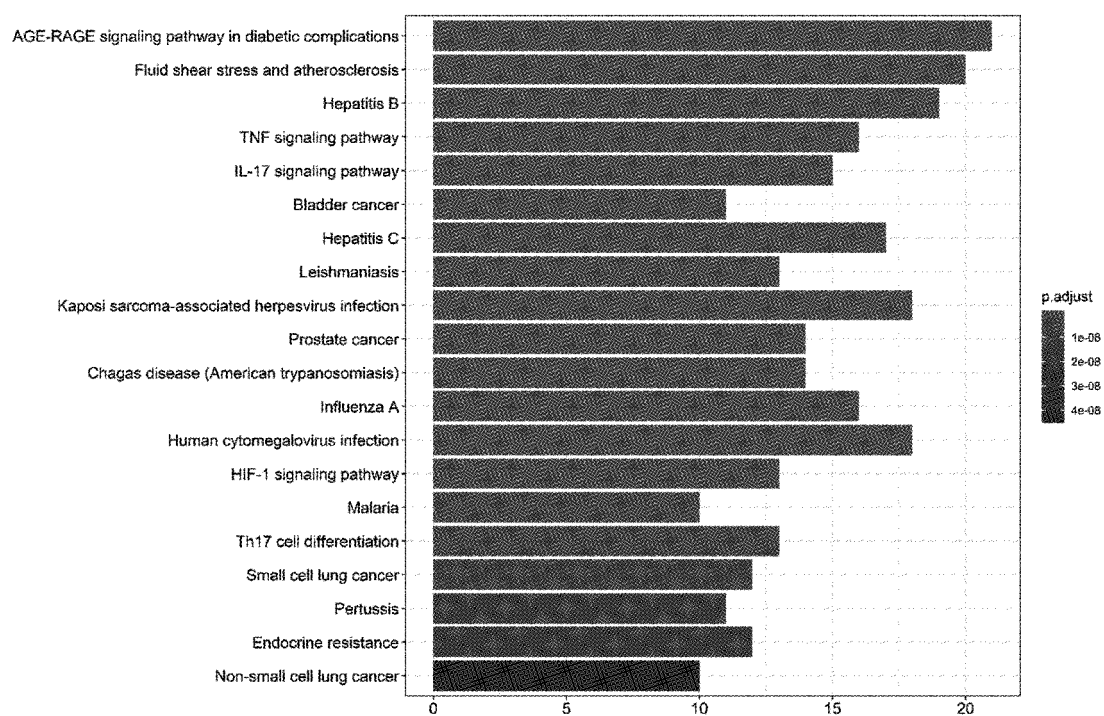


图 6a KEGG 功能富集分析柱状图

Fig.6a KEGG functional enrichment analysis barplot

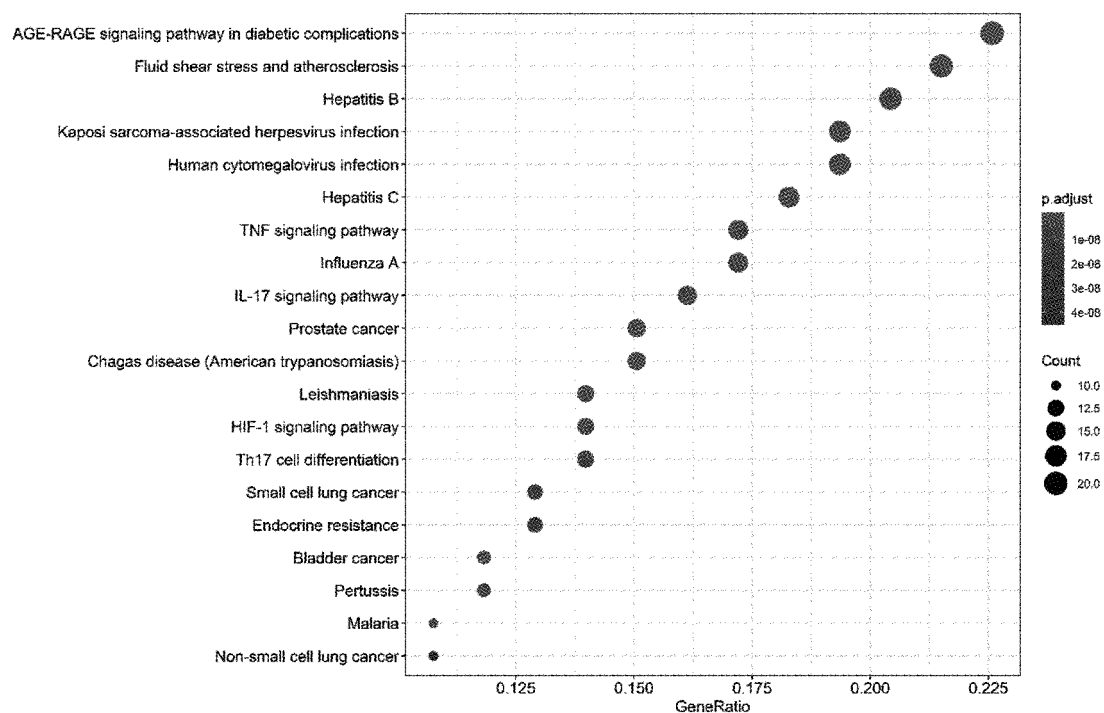


图 6b KEGG 功能富集分析气泡图

注:柱状图图形左侧字母为 KEGG 名称,下面数字为基因的数目,柱状图形表示富集在 KEGG 上的基因,P 代表富集的显著性,颜色越红,富集的程度越高,相应的 P 值越小。

Fig.6b KEGG functional enrichment analysis dotplot

信号通路、破骨细胞分化信号通路、PI3K-Akt 信号通路、p53 信号通路、FoxO 信号通路等均参与骨质疏松的发病。

气泡图图形左侧字母为 KEGG 名称,下面数字为基因的比例,圆圈大小表示富集的基因的数目,颜色代表 P 值,颜色越红,富集的程度越高,相应的 P 值越小。

3 讨论

基于中医药“整体观念”和网络药理学“系统生物学”的理论,中药网络药理学通过 TCMS 分析平台等软件,构建“中药-有效成分-靶标-疾病”网络,全面分析整合中药多种有效成分作用于疾病的靶标,深入研究中药-疾病核心靶标的作用机制,为研究中药的作用机制及中药新药开发提供技术和理论支持。

本研究表明,骨碎补的主要有效成分可通过多个靶点基因、多个信号通路影响 OP 的发生。骨碎补治疗 OP 的核心靶点基因主要有 IL-6 基因、JUN 基因、MAPK-1 基因、EGF 基因等,这些基因可通过介导骨吸收和骨形成来调控骨质疏松的发生。骨碎补治疗 OP 的核心靶点基因的 KEGG 通路众多,这些通路主要包括糖尿病并发症的 AGE-RAGE 信号通路、TNF 信号通路、IL-17 信号通路、HIF-1 信号通路、Th17 细胞分化信号通路等。柳辰玥^[10]研究发现桑叶水提液可能通过抑制糖尿病性骨质疏松症患者股骨和胫骨中 AGEs/RAGE/Nox4/NF- κ B 信号通路中相关蛋白的表达,减轻氧化应激损伤来防治糖尿病性骨质疏松。陈鹏等^[11]发现绝经后骨质疏松症中 TNF- α 通过激活 NF- κ B 来促进 RANKL 诱导的破骨细胞形成。张国权等^[12]通过体外培养大鼠成骨细胞,发现 IL-17 通过上调 cathepsin K、MMP9 的表达量,从而增强破骨细胞降解骨基质的能力。钟航等^[13]通过动物实验发现 HIF-1 信号通路参与了小鼠绝经后骨质疏松症 (PMOP) 的病理演变过程,抑制 HIF-1 信号通路可改善 PMOP 的严重程度。李春亮等^[14]通过临床研究发现骨质疏松合并压缩性骨折患者 Th17 细胞功能的增强能够影响骨代谢过程中的炎症反应及蛋白酶活性。这些富集度高的信号通路主要通过减轻氧化应激损伤、抑制破骨细胞形成、促进成骨细胞形成等作用发挥抗骨质疏松作用。骨碎补可能通过抑制糖尿病并发症患者骨骼的 AGE-RAGE 信号通路中相关蛋白的表达,减轻氧化应激损伤来防治糖尿病性骨质疏松;可能通过 TNF- α 激活 NF- κ B 来促进 RANKL 诱导的破骨细胞形

成;可能通过 IL-17 上调 cathepsin K、MMP9 的表达量,从而增强破骨细胞降解骨基质的能力;可能通过抑制 HIF-1 信号通路改善 PMOP 的严重程度。

综上所述,骨碎补治疗 OP 的作用机制是通过骨碎补中多种活性成分调控 OP 相关的靶点基因,靶点基因进一步调控多种信号通路,最终在多种信号通路的综合作用下,机体表现出相应的表型。这为发现新通路,调控富集程度高的信号通路来治疗疾病以及全面认识中药与疾病的关系提供了思路。中药网络药理学开启了探索中药复方治疗疾病作用机制的大门,必将促进中药的现代化研究。

【参 考 文 献】

- [1] Paintin J, Cooper C, Dennison E. Osteosarcopenia [J]. Br J Hosp Med (Lond), 2018, 79(5): 253-258.
- [2] 夏维波,章振林,林华,等. 原发性骨质疏松症诊疗指南 (2017) [J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(3): 281-309.
- [3] 李杨,关雪峰. 中药对骨质疏松症骨代谢影响研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(5): 94-97.
- [4] 肖亚平,曾杰,焦琳娜,等. 补肾中药对骨质疏松症的治疗及其信号通路调节作用的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(1): 21-30.
- [5] 梁学振,许波,李刚,等. 基于网络药理学和生物信息学补肾活血胶囊抗骨质疏松的分子机制分析 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(6): 755-761.
- [6] 范宏斌,王全平,蒋尔鹏,等. 原发性骨质疏松症患者中轴骨 IL-6, bFGF 的免疫组化 [J]. 中国矫形外科杂志, 2001, 8(4): 363-365.
- [7] 林华,魏海燕,蒋青,等. 原发性骨质疏松骨组织 c-fos、c-jun 和 p53 基因的表达 [J]. 中国骨肿瘤骨病, 2003, 2(6): 368-371.
- [8] 彭文芳,张秀珍. 丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路与骨质疏松 [J]. 国外医学内分泌学分册, 2004, 24(4): 233-236.
- [9] Antosz ME, Bellows CG, Aubin JE. Biphasic effects of epidermal growth factor on bone nodule formation by isolated rat calvaria cells in vitro [J]. J Bone Miner Res, 1987, 2(5): 385-393.
- [10] 柳辰玥. 基于 ACEs/RAGE/Nox4/NF- κ B 和 TRPV6/CaBP-28k/VDR 通路探讨桑叶对 DOP 大鼠作用机制 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018, 1-20.
- [11] 陈鹏,李杨,胡伟文,等. 绝经后骨质疏松症 tnF- α 通过激活 nf- κ b 促进 rankl 诱导的破骨细胞形成 [J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(2): 960-965.
- [12] 张国权,范婉亭,陈倩仪,等. IL-17 抗体对大鼠破骨细胞功能影响的体外研究 [J]. 全科口腔医学电子杂志, 2018, 5(12): 7-10.
- [13] 钟航,曹参,杨静,等. Hif-1 信号通路对绝经后骨质疏松的关系研究 [J]. 四川大学学报 (医学版), 2017, 48(6): 862-868.
- [14] 李春亮,罗成林,朱海勇,等. 骨质疏松合并压缩性骨折患者 Th17 细胞功能测定及其与骨代谢的相关性分析 [J]. 疑难病杂志, 2018, 17(10): 1145-1148.

(收稿日期: 2019-04-18; 修回日期: 2019-05-29)