

肉苁蓉治疗骨质疏松作用机制的网络药理学研究[△]

王延涛^{1*}, 杨智华², 陈怡³, 麦喆钡², 黄嘉华³, 孙治中³, 周驰⁴, 李伟宽¹(1.广州市番禺区中医院综合科, 广州 511400; 2.广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510405; 3.广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405; 4.广州中医药大学第一附属医院保髌病区, 广州 510115)

中图分类号 R932;R966 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)05-0645-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.05.14

摘要 目的:采用网络药理学方法研究肉苁蓉治疗骨质疏松的作用机制。方法:通过检索中药系统药理学分析平台(TCMSP)获取肉苁蓉的活性成分,采用反向分子对接服务器 DRAR-CPI 及相关数据库 GeneCards、OMIM 筛选肉苁蓉活性成分治疗骨质疏松的作用靶标;采用软件 Cytoscape 构建肉苁蓉的“成分-靶标”网络,结合数据库 String 和 Cytoscape 绘制靶标间相互作用关系;通过服务器 Systems Dock WebSite 将靶标与活性成分进行分子对接评估二者间的结合活性以进行验证;最后再利用数据库 DAVID 对靶标基因进行基因本体分类富集分析与京都基因与基因组百科全书通路富集分析。结果:从肉苁蓉中筛选出的活性成分有 13 个,主要为毛蕊花糖苷、益母草碱、京尼平酸等;活性成分作用的潜在靶标有 43 个,主要有成骨分化特异性转录因子 2(RUNX2)、血管内皮生长因子(VEGF)、白细胞介素 6(IL-6)、骨生长蛋白因子(BGP)、肿瘤坏死因子(TNF)等;靶标作用涉及的信号通路有多条,主要为 WNT(Wingless/Integrated)、VEGF、TNF 等。结论:本研究初步探讨并验证了肉苁蓉治疗骨质疏松的主要靶标和通路,为后续进一步研究其作用机制奠定了基础。

关键词 肉苁蓉;骨质疏松;网络药理学;活性成分;靶标;分子对接;信号通路

综上所述,本研究共鉴定了石菖蒲中 5 个生物碱成分,即菖蒲碱甲、*N*-反式阿魏酰酪胺、*N*-月桂基二乙醇胺、4-羟双氢鞘氨醇和 5-丁基尿苷,可为石菖蒲生物碱成分的进一步研究奠定基础。

参考文献

- [1] 黄月纯,魏刚.石菖蒲挥发油的气相色谱指纹图谱研究[J].中国药房,2005,16(21):1676-1677.
- [2] 吴启端,吴清和.石菖蒲的药理研究进展[J].中药新药与临床药理,2006,17(6):477-480.
- [3] 胡增晓,黄晏,刘港,等.中药复方治疗老年痴呆的用药规律分析[J].中药药理与临床,2012,28(5):252-256.
- [4] 杨洁,陶汝俊,王垠芸,等.石菖蒲化学成分及其对中枢神经系统作用研究进展[J].药物资讯,2017,6(5):133-141.
- [5] 卢成淑,冯宁,南国,等.石菖蒲及其活性成分防治阿尔茨海默病的研究进展[J].中草药,2016,47(7):1236-1242.
- [6] 倪刚.石菖蒲、华桑化学成分及生物活性研究[D].北京:北京协和医学院,2010.
- [7] 陈锋.菖蒲属植物的化学成分及药理作用[J].世界科学技术(中医药现代化),2011,13(6):1013-1017.
- [8] 劳安娜,唐希灿,王洪诚,等.石菖蒲中菖蒲碱及它们的用途:中国,ZL97106786.4[P].2013-02-19.
- [9] YUAN J, CHEN Y, LIANG J, et al. Component analysis and target cell-based neuroactivity screening of panax ginseng by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.10.014
- [10] 吴春华,陈玥,李晓霞,等.石菖蒲化学成分的分离与结构鉴定[J].中国药物化学杂志,2014,24(3):209-213.
- [11] KUMAR V, KUMAR S, SINGH B, et al. Quantitative and structural analysis of amides and lignans in zanthoxylum armatum by UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS[J]. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2014, 94(3):23-29.
- [12] 杨颖达.3种植物的化学成分和生物活性研究[D].武汉:华中科技大学,2014.
- [13] 赖显英,梁红,赵玉英.石菖蒲化学成分和药理作用研究[J].中国中药杂志,2002,27(3):161-166.
- [14] 唐怡,任刚,黄群,等.石菖蒲挥发油化学成分的 GC-MS [J].江西中医药,2014,45(12):60-62.
- [15] 唐怡,李健康,刘校妃,等.石菖蒲鲜、干药材及其不同部位中挥发油、 α -细辛醚和 β -细辛醚的含量比较[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(5):32-35.
- [16] 吴启端,方永奇,李翎,等.不同剂量石菖蒲对中枢神经系统影响的实验研究[J].中国药房,2005,16(9):656-658.

[△]基金项目:广东省自然科学基金资助项目(No.2015A030310203);广东省高水平大学建设项目(No.A1-AFD018171Z11057);广州中医药大学第一附属医院人才培优项目(No.2015QN01)

*副主任中医师,硕士。研究方向:骨关节及脊柱退行性疾病。电话:020-85926324。E-mail:515301800@qq.com

(收稿日期:2018-09-09 修回日期:2018-11-22)
(编辑:唐晓莲)

Network Pharmacology Exploration of the Mechanism of *Cistanche deserticola* in the Treatment of Osteoporosis

WANG Yantao¹, YANG Zhihua², CHEN Yi³, MAI Zhexing², HUANG Jiahua³, SUN Zhizhong³, ZHOU Chi⁴, LI Weikuan¹ (1.General Department, Guangzhou Panyu District Hospital of TCM, Guangzhou 511400, China; 2.Second Clinical Medical College, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China; 3.First Clinical Medical College, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China; 4.Hip Protection Ward, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510115, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the mechanism of *Cistanche deserticola* in the treatment of osteoporosis by network pharmacology. METHODS: The active components of *C. deserticola* were retrieved and obtained by TCM system platform (TCMSP). Reverse molecular docking server DRAR-CPI and related databases GeneCards and OMIM were used to screen the target of *C. deserticola* active ingredients in the treatment of osteoporosis. The “component-target” network of *C. deserticola* was constructed by Cytoscape software, and the interaction between targets was plotted by String database and Cytoscape software. The combination activity of target and active ingredient was evaluated via molecular docking with Systems Dock WebSite server. GO classification and enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis were conducted for target genes using DAVID database. RESULTS: Totally 13 active ingredients were screened out from *C. deserticola*, such as verbascoside, leonurine, geniposidic acid. There were 43 active ingredient-treated potential targets, such as RUNX2, VEGF, IL-6, BGP, TNF. Multiple signaling pathways were involved in target action, such as WNT (Wingless/Integrated), VEGF, TNF. CONCLUSIONS: This study preliminarily explores and validates the main targets and pathways of *C. deserticola* in the treatment of osteoporosis, which lay the foundation for further study of its mechanism.

KEYWORDS *Cistanche deserticola*; Osteoporosis; Network pharmacology; Active ingredients; Target; Molecular docking; Signaling pathways

骨质疏松(Osteoporosis, OP)是一种好发于中老年人的系统性、慢性疾病,以骨密度下降和骨的显微结构破坏为主要特征。因患者的骨质脆性增加,其发生骨折的风险大大增加,轻微的外伤即可导致骨折^[1-2]。骨质疏松及其严重的并发症,给患者及其家庭和社会带来了沉重的经济负担,同时也严重地影响着患者的生活质量^[3]。据统计,我国老年人口总数已占总人口数的13.26%^[4]。因此,探究疗效更好、更安全的治疗骨质疏松的方法显得非常必要。目前对于骨质疏松的治疗主要采取药物治疗,包括以化学药为主的骨吸收抑制药、骨形成制剂、钙剂和维生素D等^[5]。另外,中医药治疗骨质疏松的报道也较多,其中尤以肉苁蓉为主要组方药材^[6-9]。

肉苁蓉味甘、咸,性温,归肾、大肠经,具有补肾阳、益精血、润肠通便的功效,常常用于治疗由肾阳亏虚、精血不足所引起的病证^[10]。近来,也有动物实验表明其对阿尔茨海默病模型大鼠有保护作用^[11]。现代药理研究结果表明,肉苁蓉可以提高骨质疏松模型大鼠血清碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素及钙离子水平,促进大鼠成骨细胞骨形成蛋白2(BMP2)的表达,加快骨髓间充质干细胞的增殖,促使大鼠成骨细胞合成ALP等,从而达到治疗骨质疏松的作用^[12-14]。但目前对于肉苁蓉治疗骨质疏松的作用机制研究尚停留在单项的细胞试验与动物实验上,难以详细地探究其更全面的作用机制。

网络药理学以生物信息学、系统生物学、多向药理学、计算机科学等多个学科的技术和知识为基础,可多

层次、全面地阐明药物治疗疾病的作用机制,使研究更能体现整体性和系统性^[15]。由于网络药理学强调从多靶标、多途径进行分析,这与中药及其复方中多成分、多靶标治疗疾病的特点不谋而合^[16]。因此,本研究采用网络药理学的方法,研究分析肉苁蓉的化学成分、作用靶标以及信号通路,并进行基因本体(Gene ontology, GO)分类富集分析及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,通过构建肉苁蓉治疗骨质疏松的“成分-靶标-通路”网络,从整体性角度揭示肉苁蓉多靶标、多通路的作用网络,为进一步探究其治疗骨质疏松的作用机制提供参考依据。

1 资料

本研究使用的数据库及相关分析平台见表1。

2 方法

2.1 化学成分的获取与活性成分的筛选

于TCMSP中以“肉苁蓉”作为关键词,搜索获取肉苁蓉所含的所有化学成分信息。以口服利用度(OB)大于30%、类药性(DL)大于0.18作为限定条件^[17],筛选同时符合上述2个条件的成分作为活性成分。利用Pubchem检索上述活性成分,得到各成分的3D结构并以mol2格式保存。

2.2 活性成分作用靶标及骨质疏松作用靶标的获取

本研究利用基于蛋白-配体相互作用亲合性函数的DRAR-CPI,使用该服务器通过分子对接预测各成分可

表1 本研究使用的数据库及相关分析平台

Tab 1 Involved database and related analysis platform in the study

名称	网址	版本
中药系统药理学分析平台(TCMSP)	http://lsp.nwu.edu.cn/	2.3
有机小分子生物活性数据Pubchem	http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/	
反向分子对接服务器DRAR-CPI	http://cpi.bio-x.cn/drar/	更新于2017-07-26
UniProt知识库(UniProt Knowledgebase)	http://www.uniprot.org/uniprot/	更新于2017-06-22
Cytoscape	https://cytoscape.org/	3.4.0
蛋白质相互作用数据库String	https://string-db.org/cgi/input.pl	10.5
网络服务器Systems Dock WebSite	http://systemsdock.unit.oist.jp	2.0
生物学信息注释数据库(DAVID)	https://david.ncicrf.gov/	6.8
GraphPad Prism	http://www.graphpad.com/	7.0
GeneCards数据库	https://www.genecards.org/	4.8.1
人类基因与疾病数据库OMIM	http://www.omim.org/	更新于2018-10-14

能对应的靶标,并依据对接的紧密性进行打分^[18]。具体操作如下:将“2.1”项检索所得肉苁蓉所有活性成分的mol2格式文件上传至DRAR-CPI,选取Z-score<-0.5^[19]的靶点作为肉苁蓉活性成分的潜在靶点。利用UniProt知识库的UniProt Knowledgebase搜索功能,导入肉苁蓉作用的蛋白靶点的靶蛋白编号(PBD ID),限定物种为“人”,经过检索和转化操作,得到肉苁蓉活性成分的相应靶标。

利用GeneCards数据库和OMIM数据库,以“Osteoporosis”或“OP”作为关键词检索,在数据库中收集与骨质疏松相关的靶标。将所得靶标与肉苁蓉活性成分的靶标进行对比,以此筛选出共同的靶标。

2.3 “成分-靶标”网络构建与分析

将“2.1”项得到的肉苁蓉的活性成分和“2.2”项收集的治疗骨质疏松的靶标导入Cytoscape软件中,构建肉苁蓉的“成分-靶标”网络。

2.4 靶标相互作用网络的构建与分析

利用String数据库进行蛋白质之间及与预测蛋白质之间相互作用的搜索^[20]。将肉苁蓉的蛋白靶标导入String数据库,限定物种为“人”,获取肉苁蓉治疗骨质疏松的潜在靶标间的相互关系。利用Cytoscape软件,绘制蛋白相互作用网络,用Cytoscape的工具NetworkAnalyzer进行网络分析,将节点大小和颜色设置为用于反映Degree(连接度,即在网络中通过该点的边的个数)值的大小,边的粗细设置为用于反映结合分数的大小,最终获得靶标间的相互作用网络。

2.5 分子对接

利用Systems Dock WebSite进行网络药理学的预测和分析,研究配体对复杂的分子网络的作用。该服务器主要通过Dock-In评分(平台内置评分功能)的分子对接功能评估蛋白-配体结合活性^[21],故可利用其得到相互作用网络中的Degree值,对Degree值排名前5的分子与肉苁蓉的活性成分进行分子对接验证。之后保存分子对接结果,并对其进行Docking Score评分,用以评价肉苁蓉活性成分与靶标之间的结合活性。

2.6 生物过程与通路分析

利用DAVID为大规模的基因或蛋白提供系统而综合的生物功能注释信息的功能,获取最显著富集的生物学注释^[22]。即在DAVID中,对肉苁蓉的作用靶标进行GO通路和KEGG通路富集分析,保存结果。其中,GO通路富集分析可分为细胞组分(Cellular component, CC)、分子功能(Molecular function, MF)和生物过程(Biological process, BP)3部分。设定阈值P<0.05,并按照涉及的靶标数目多少进行排序,筛选前20名的生物过程或通路,利用GraphPad Prism绘制GO通路分析与KEGG通路分析图。

2.7 “成分-靶标-通路”网络构建

分析“2.6”项中排名前20的作用靶标的KEGG通路,结合文献检索,筛选出可能与治疗骨质疏松密切相关的通路,获取富集在这些通路上的肉苁蓉治疗骨质疏松的潜在靶标,并与相应的活性成分相对应,构建肉苁蓉治疗骨质疏松的“成分-靶标-通路”多维网络关系图。

3 结果

3.1 肉苁蓉活性成分分析

在TSCMP数据库中,以OB值大于30%、DL值大于0.18为筛选条件,收集肉苁蓉的活性成分,其中符合条件的活性成分共有13个,包括益母草碱、右旋喇叭茶醇、去咖啡酰基类叶升麻苷、京尼平酸等。另外,本研究还选择了部分OB值低于30%,但含量较高,具有较高药理研究价值的活性成分,如橙花醛、蝙蝠葛碱、毛蕊花糖苷等。肉苁蓉主要活性成分基本信息见表2。

表2 肉苁蓉主要活性成分基本信息

Tab 2 General information of active ingredients of *C. deserticola*

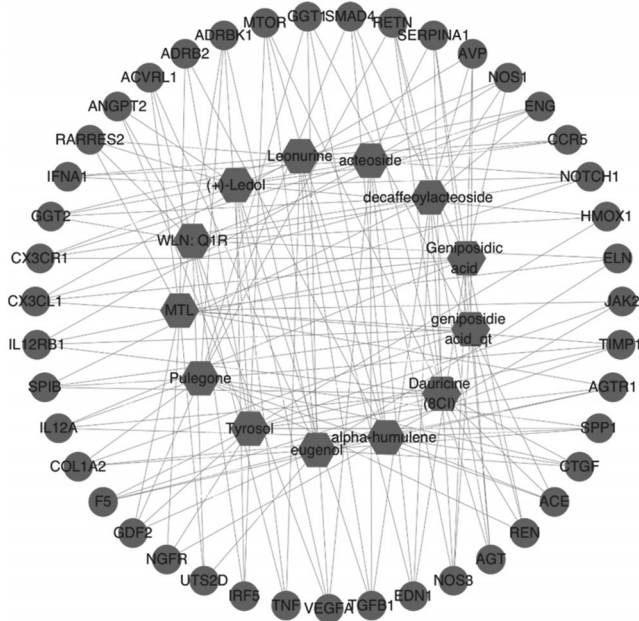
编号	化学成分	中文名	OB值	DL值
MOL000127	Nerolaldehyde(Neral)	橙花醛	19.48	0.34
MOL001335	Benzyl alcohol(WLN:QIR)	苯甲醇	58.68	0.38
MOL001388	(+)-Ledol	右旋喇叭茶醇	16.96	0.21
MOL001445	Leonurine	益母草碱	19.12	0.22
MOL003333	Acteoside	毛蕊花糖苷	2.94	0.33
MOL000156	Decaffeoyllacteoside	去咖啡酰基类叶升麻苷	6.33	0.26
MOL001668	Geniposidic acid	京尼平酸	19.59	0.28
MOL001669	Geniposidic acid_qt		30.96	0.31
MOL001965	Dauricine(8CI)	蝙蝠葛碱	23.65	0.22
MOL001972	Pulegone	薄荷酮	51.60	0.26
MOL000254	Eugenol	丁香油酚	56.24	0.32
MOL002930	Tyrosol	酪醇	33.81	0.36
MOL000003	Motilin(MTL)	胃蠕动素	17.73	0.18

3.2 潜在靶标预测

在服务器DRAR-CPI中检索肉苁蓉13个活性分子对应的潜在靶标,共得到258个,去除重复靶标后,共得137个潜在靶标。通过与GeneCards、OMIM数据库中骨质疏松相关靶标的对比,筛选出抗骨质疏松的可能潜在靶标43个,其主要是成骨分化特异性转录分子2(RUNX2)、血管内皮生长因子(VEGF)、白细胞介素6(IL-6)、骨生长蛋白因子(BGP)等。

3.3 “成分-靶标”网络构建

通过将肉苁蓉活性成分和潜在靶标的相关信息输入软件Cytoscape中,构建肉苁蓉的“成分-靶标”网络,见图1。



注:图中内圈六边形节点中的英文或缩写为活性成分名称,如Tyrosol为酪醇,其余略;图中外圈圆形节点中英文缩写为靶标名称,如NOS1为一氧化氮合成酶,其余略

Note: English or abbreviations in the hexagonal node of inner circle represent the name of active ingredients, such as Tyrosol; the rest is abbreviated. English or abbreviations in circle node of outer circle represent the name of target, such as NOS1 means nitric oxide synthase; the rest is abbreviated

图1 肉苁蓉“成分-靶标”网络

Fig 1 “Components-targets” network of *C. deserticola*

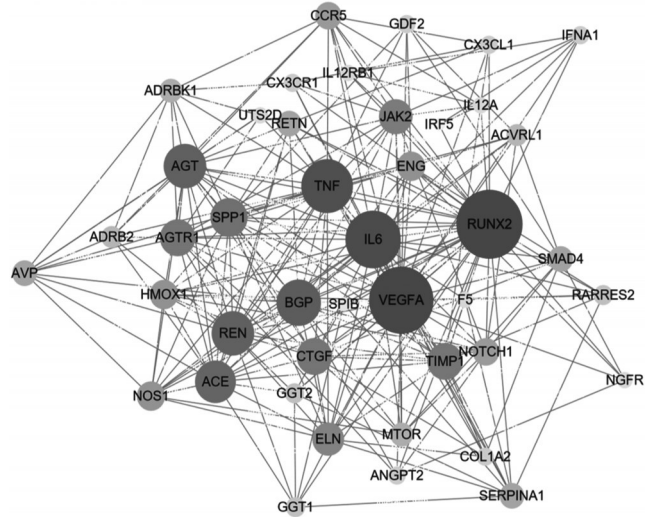
在图1中,共含有节点56个,边线185条。六边形节点即代表肉苁蓉活性成分,圆形节点代表潜在的靶标。边线代表活性成分与潜在靶标的相互关联。由此图可知,同一活性成分可以作用于不同靶标,同一靶标也可对应不同活性成分,体现出肉苁蓉治疗骨质疏松具有多成分、多靶标的特点。

3.4 靶标间相互作用网络的构建

通过数据库String获取肉苁蓉活性分子与骨质疏松相关靶标的相互关系,并将数据导入软件Cytoscape中构建靶标间相互作用网络,见图2。

由图2可知,靶标间相互作用网络中包含节点59个,边线453条。其中圆形节点代表靶标,边线代表靶标之间的相关性,节点的大小表示靶标的Degree值大小,节点面积越大,颜色越深,表示其Degree值越大。通过比较Degree值的大小,并结合现有的研究结果,推测肉苁蓉抗骨质疏松与RUNX2、VEGF、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)、BGP这5个靶标有关。

3.5 分子对接



注:图中圆形节点上的英文缩写为靶标名称,如IL-6为白细胞介素6,其余略;节点面积大小表示靶标Degree值的大小

Note: English abbreviations in circle nodes represent the name of target, such as IL-6 means interleukin-6; the rest is abbreviated. The size of node area represents the size of target Degree value

图2 肉苁蓉潜在靶标间相互作用网络

Fig 2 Potential target interaction network of *C. deserticola*

选取靶标相互作用网络中Degree值最大的5个靶标即RUNX2、VEGF、IL-6、TNF、BGP,将其名称输入软件System Dock WebSite,并与肉苁蓉的13个活性分子进行分子对接,5个靶标Docking Score值-活性成分数量结果见图3。

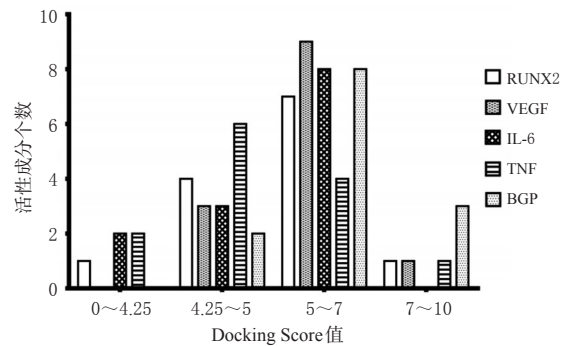


图3 5个靶标Docking Score值-活性成分数量柱状图

Fig 3 Histogram of five targets Docking Score-active ingredient quantity

由图3可知,在肉苁蓉13个活性分子与5个靶标的对接中,共有6个(占9%)的Docking Score值大于7,36个(占55%)的Docking Score值在5.0~7.0之间,18个(占28%)的Docking Score值在4.25~5.0之间,5个(占8%)的Docking Score值小于4.25。一般认为, Docking Score值大于4.25表示分子与靶标具有一定的结合能力,大于5.0表示结合能力较强,大于7.0表示结合能力很强^[23]。因此,肉苁蓉的活性成分与靶标之间具有良好的结合能力。

3.6 GO分类富集分析和KEGG通路富集分析

对肉苁蓉活性分子的对应靶标进行GO分类富集分析和KEGG通路富集分析,以 $P < 0.05$ 为筛选条件,筛选出富集基因数量较大的通路和生物过程。CC分析结果见图4, MF分析见图5, BP分析见图6, KEGG通路富集分析结果见图7。

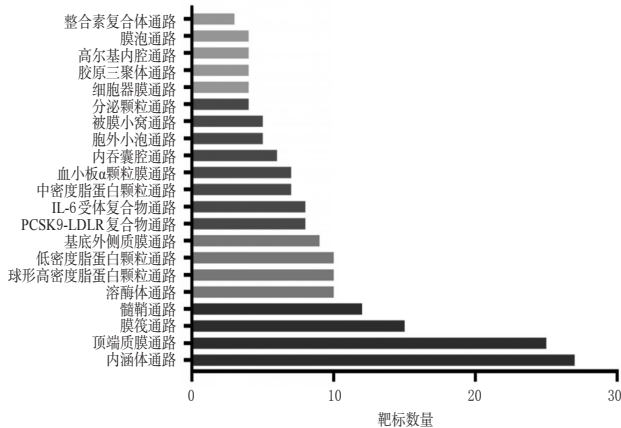


图4 肉苁蓉活性成分-靶标GO通路富集分析的CC分析

Fig 4 CC analysis of GO pathway enrichment analysis for active ingredient-target of *C. deserticola*

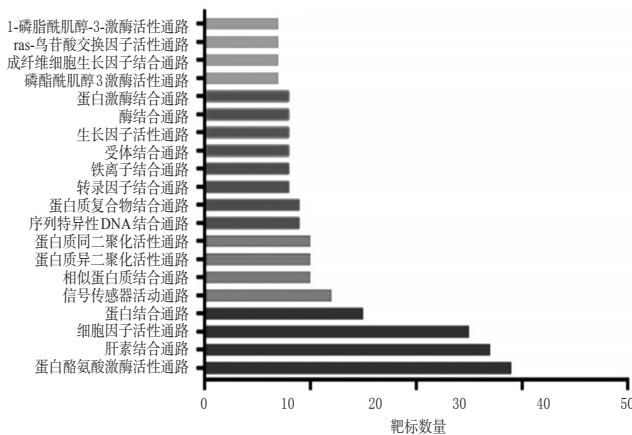


图5 肉苁蓉活性成分-靶标GO通路富集分析的MF分析

Fig 5 MF analysis of GO pathway enrichment analysis for active ingredient-target of *C. deserticola*

由图4~图6可见,在CC分析结果中,富集基因数量较大的有内涵体通路、顶端质膜通路、膜筏通路、髓鞘通路等;在MF分析结果中,富集基因数量较大的有蛋白酪氨酸激酶活性通路、肝素结合通路、细胞因子活性通路、蛋白结合通路等;在BP分析结果中,富集基因数量较大的有内皮细胞迁移负调控通路、一氧化氮介导信号转导通路、血管收缩调节通路、钠离子转运调节通路等。由图7可见,在KEGG通路富集分析结果中,WNT(Wingless/Integrated)信号通路、核转录因子 κ B(NF- κ B)受体活

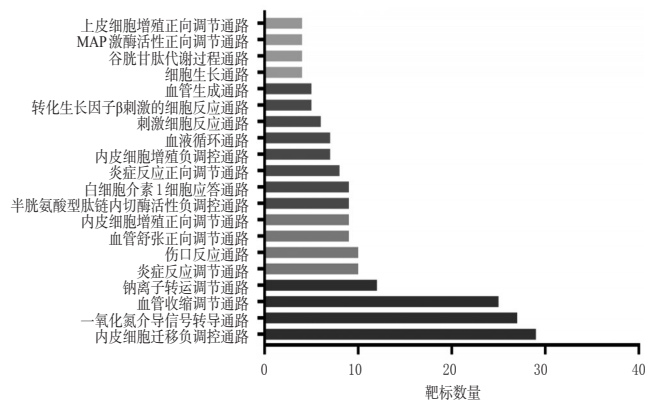


图6 肉苁蓉活性成分-潜在靶标GO通路富集分析的BP分析

Fig 6 BP analysis of GO pathway enrichment analysis for active ingredient-potential target of *C. deserticola*

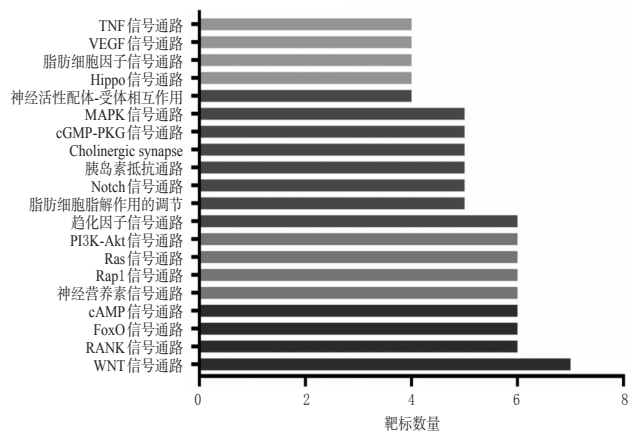


图7 肉苁蓉活性成分潜在靶标的KEGG通路富集分析

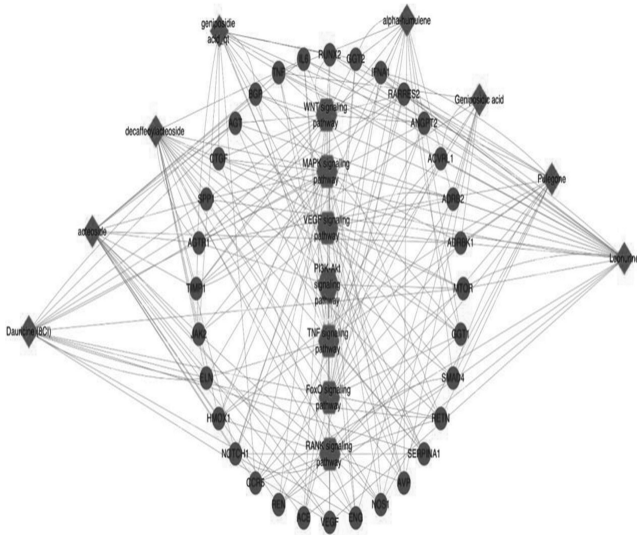
Fig 7 KEGG pathway enrichment analysis of active ingredient-potential target of *C. deserticola*

化因子(RANK)信号通路、叉头转录因子(FoxO)信号通路、环磷酸腺苷(cAMP)信号通路等与肉苁蓉治疗骨质疏松的潜在靶标的相关性明显。

3.7 “成分-靶标-通路”网络构建

综合GO通路和KEGG通路富集分析的结果,筛选出可能具有抗骨质疏松作用的通路,并将其与肉苁蓉的活性分子和相应的潜在靶标一一对应,即活性分子与靶标对应,靶标与可能通路对应,从而构建出肉苁蓉治疗骨质疏松的“成分-靶标-通路”网络,见图8。

如图8所示,肉苁蓉治疗骨质疏松的活性成分主要有益母草碱、毛蕊花糖苷、去咖啡酰基类叶升麻苷、京尼平酸等8个,这些活性成分作用的靶标有RUNX2、IL-6、BGP、TNF、VEGF、结缔组织生长因子(CTGF)、过氧化物酶增殖激活受体(PPAR)- γ 等32个,这些靶标主要被包含在丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、VEGF、WNT、TNF等7条信号通路中。



注:图中内圈六边形中的英文名称代表涉及的信号通路名称,如 VEGF signaling pathway 为血管内皮生长因子,其余略;中圈上圆形英文缩写为靶标名称,如 NOS1 为一氧化氮合成酶,其余略;外圈英文名称为活性成分名称,如 Geniposidic acid 为京尼平酸,其余略

Note: English notes in the inner circle hexagon represent the names of signaling pathways, such as VEGF signaling pathway means vascular endothelial growth factor; the rest is abbreviated. English abbreviations on the ring represent the target gene names, such as NOS1 means nitric oxide synthase; the rest is abbreviated. English notes outside the ring represent the name of active ingredients, such as geniposidic acid means jingni pingsuan; the rest is abbreviated

图8 “成分-靶标-通路”网络关系图

Fig 8 “Component-target-pathway” network

4 讨论

4.1 肉苁蓉治疗骨质疏松的文献来源

肉苁蓉是寄生在沙漠树木梭梭根部的列当科寄生植物,具有补肾阳、益精血、润肠通便之功效^[24]。《神农本草经辑注》^[25]中提到肉苁蓉“主五劳七伤,补中,除茎中寒热痛,养五脏,强阴,益精气,妇人症瘕”;相关研究表明^[26],肉苁蓉可降低相关因子的阳性表达,具有一定的抗骨质疏松作用,但与其相关的机制仍待研究。因此,研究肉苁蓉抗骨质疏松的分子作用机制有较大的意义。

4.2 主要活性成分分析

本次研究收集到肉苁蓉中具有抗骨质疏松的化学成分主要有毛蕊花糖苷、益母草碱、京尼平酸等。研究表明,肉苁蓉中的毛蕊花糖苷可以作为抗再吸收剂,通过阻断破骨细胞活化来减少骨质流失^[27]。肉苁蓉中的益母草碱可通过抑制 NF- κ B 和磷脂酰肌醇三激酶 (PI3K)/丝氨酸/苏氨酸激酶 (Akt) 信号通路抑制破骨细胞生成并预防与雌激素缺乏相关的骨质疏松症^[28]。京尼平酸参与激活成骨细胞促进骨生成的相关步骤,并抑制破骨细胞活性以抑制骨质溶解^[29]。

4.3 主要靶标分析

本次研究发现,肉苁蓉可通过对 BGP、TNF、CTGF、

PPAR- γ 等靶标进行作用来达到抗骨质疏松的作用。多项研究显示,BGP 可影响骨代谢、促进骨吸收,从而对骨质疏松的发生产生影响^[30]; TNF- α 通过激活 PI3K/Akt 信号传导而协同促进 RANK 配体 (RANKL) 诱导的破骨细胞形成。此外,CTGF 表达的下降可促进人骨成形蛋白 2 (BMP-2) 诱导的成骨细胞分化,CTGF 的表达与调节成骨细胞分化有密切关系^[31]。PPAR- γ 作为 PPAR 基因家族的转录因子,与 PPAR- β/δ 不同,其可减少骨保护素 (OPG) 的表达和成骨细胞介导的增加破骨细胞生成等作用^[32]。结合本研究结果,推测肉苁蓉可能通过提高体内 TNF、BGP、ALP 的水平或上调 CTGF、PPAR- γ 的表达来发挥抗骨质疏松作用。

4.4 主要通路分析

本次研究结果显示,与肉苁蓉治疗骨质疏松相关的通路有 WNT、VEGF、IL-6 等。其中,WNT 通路的表达可增加成骨细胞的成骨活性和矿化能力^[33],且另有相关的基础研究证实^[34],WNT 可促进 β -连环蛋白结合 Lef1/Tcf 转录因子,并改变基因表达以促进成骨细胞的扩增和功能。间充质干细胞中 VEGF 的表达升高会导致成骨细胞增加和脂肪细胞分化的减少,并调节二者之间的均衡比例^[35]。RUNX2 是成骨细胞分化和骨形成的关键调节通路,对 MSCs 成骨细胞谱系有着重大的作用^[36]。而 IL-6 的表达可诱导破骨细胞活化、增强破骨细胞活性^[37],可显著促进人成骨细胞、内皮细胞和单核细胞的增殖,以及人内皮细胞的迁移^[38]。

综上,本研究通过网络药理学研究方法,分析肉苁蓉在抗骨质疏松治疗方面的有效活性成分和分子机制,结果显示肉苁蓉中具有治疗骨质疏松作用的化学成分可能是毛蕊花糖苷、益母草碱、京尼平酸等。此成分可能通过 BGP、TNF、CTGF、PPAR- γ 等靶标及 WNT、VEGF、IL-6 等信号通路发挥活性作用。另外,通过网络图的构建,可直观地显示出肉苁蓉治疗骨质疏松具有多成分、多途径共同作用的特点,符合中医药治疗疾病的特色,相比化学药的单基因-单靶点的作用机制,更有优势。且本研究通过分子对接验证了网络药理学数据的可靠性,但需要注意的是,本研究结果只是一种分子机制上的预测探讨,药物具体作用机制的确认仍需通过进一步的实验来验证。

参考文献

- [1] 刘振海,刘红,王少君,等.防治骨质疏松症常用单味中药实验研究概况[J].环球中医药,2013,6(6):473-479.
- [2] 汪呈,曹宇,顾永清,等.骨质疏松治疗药物的研究进展[J].科学通报,2014,59(13):1209-1214.
- [3] 何渝煦,魏庆中,熊启良,等.骨质疏松性骨折与骨密度关系的研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2014,20(2):219-224.
- [4] 王胜今,舒莉.积极应对我国人口老龄化的战略思考[J].吉林大学社会科学学报,2018,58(6):5-14,203.

- [5] 崔莹,冯正平.抗骨质疏松药物的研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2015,21(3):367-371.
- [6] 常睿洁.骨质疏松症的中西药治疗进展[J].中国新药杂志,2015,24(13):1498-1503.
- [7] 严红梅,张振海,孙娥,等.中药治疗骨质疏松症的研究进展[J].中草药,2014,45(8):1174-1178.
- [8] 张沙,李红霞,胡秋生,等.中医疗法治疗骨质疏松症的研究概况[J].河北中医药学报,2018,33(5):61-64.
- [9] 罗彤,高毅,尹义辉,等.中药抗骨质疏松的研究现状[J].湖南中医杂志,2014,30(2):148-149.
- [10] 陈妙华,刘凤山,许建萍.补肾壮阳中药肉苁蓉的化学成分研究[J].中国中药杂志,1993,18(7):424-426,447.
- [11] 罗兰,吴小川,高惠静,等.肉苁蓉总苷对阿尔茨海默病模型大鼠的保护作用研究[J].中国药房,2013,24(23):2122-2125.
- [12] 陈飞,陈卓,邢雪飞,等.肉苁蓉的研究进展[J].药物评价研究,2013,36(6):469-475.
- [13] 赖青海,王琳琳,丁辉,等.肉苁蓉治疗骨质疏松症研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2016,18(3):102-104.
- [14] 朱刚,孙海斌,徐刚.肉苁蓉醇提物对去卵巢骨质疏松大鼠的治疗作用及其机制[J].吉林大学学报(医学版),2018,44(1):68-72,207.
- [15] 李玮婕,毛霞,郭秋岩,等.网络药理学研究策略在组合药物研究中的应用[J].转化医学电子杂志,2018,5(3):3-16.
- [16] 李学军,许海玉.网络药理学与中药研究[J].药学报,2018,53(9):1385-1386.
- [17] 汝锦龙.中药系统药理学数据库和分析平台的构建和应用[D].杨凌:西北农林科技大学,2015.
- [18] LUO H, CHEN J, SHI L, et al. DRAR-CPI: a server for identifying drug repositioning potential and adverse drug reactions via the chemical-protein interactome [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(Web Server issue): W492-W498.
- [19] WU Z, LI W, LIU G, et al. Network-based methods for prediction of drug-target interactions[J]. *Front Pharmacol*, 2018. DOI: 10.3389/fphar.2018.01134.eCollection2018.
- [20] SZKLARCZYK D, MORRIS JH, 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.
- [21] HSIN KY, MATSUOKA Y, ASAI Y, et al. SystemsDock: a web server for network pharmacology-based prediction and analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(W1): W507-W513.
- [22] LI S, ZHANG B. Traditional Chinese Medicine network pharmacology: theory, methodology and application[J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(2): 110-120.
- [23] 王文军,丁一,窦芳,等.分子对接在中药药效物质筛选及作用机制研究中的应用进展[J].中国药师,2018,21(6):1020-1023.
- [24] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:135-136.
- [25] 马继兴.神农本草经辑注[M].北京:人民卫生出版社,2013:95-96.
- [26] 方鉴.肉苁蓉的药理研究进展[J].光明中医,2017,32(14):2140-2142.
- [27] LEE SY, LEE KS, YI SH, et al. Acteoside suppresses RANKL-mediated osteoclastogenesis by inhibiting c-Fos induction and NF-kappaB pathway and attenuating ROS production[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e80873.
- [28] 张怡,田坤明.盐酸益母草碱对破骨细胞生成的作用及机制研究[J].现代医药卫生,2018,34(20):3215-3217.
- [29] HA H, HO J, SHIN S, et al. Effects of Eucommiae Cortex on osteoblast-like cell proliferation and osteoclast inhibition[J]. *Arch Pharm Res*, 2003, 26(11):929-936.
- [30] 林社裕,谭湘陵.骨质疏松症大鼠血液中碱性磷酸酶来源方式探讨[J].山东医药,2011,51(19):8-9.
- [31] 李姣,汤贤春,程小玲,等. BMP-2 与 Wnt/ β -catenin 信号通路对间充质干细胞分化为成骨细胞的作用[J].江苏医药,2017,43(23):1665-1670.
- [32] SCHOLTYSEK C, KATZENBEISSER J, FU H, et al. PPARbeta/delta governs Wnt signaling and bone turnover [J]. *Nature Medicine*, 2013, 19(5):608-613.
- [33] 许应星,吴承亮,吴岩,等. Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白在补肾活血颗粒含药血清影响成骨细胞过程中的表达及意义[J].中国中西医结合杂志,2011,31(4):537-541.
- [34] WESTENDORF JJ, KAHLER RA, SCHROEDER TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases[J]. *Gene*, 2004, 341(1/2): 19-39.
- [35] LIU Y, BERENDSEN AD, JIA S, et al. Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(9): 3101-3113.
- [36] LI P, KONG J, CHEN Z, et al. Aloiin promotes osteogenesis of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells via the ERK1/2-dependent Runx2 signaling pathway[J]. *J Nat Med*, 2018. DOI: 10.1007/s11418-018-1249-z.
- [37] BELLIDO T, JILKA RL, BOYCE BF, et al. Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. The role of the androgen receptor[J]. *J Clin Invest*, 1995, 95(6):2886-2895.
- [38] NIU X, CHEN Y, QI L, et al. Hypoxia regulates angiogenic-osteogenic coupling process via up-regulating IL-6 and IL-8 in human osteoblastic cells through hypoxia-inducible factor-1 α pathway[J]. *Cytokine*, 2018. DOI: 10.1016/j.cyto.2018.06.022.

(收稿日期:2018-10-09 修回日期:2018-12-19)

(编辑:刘萍)