

·数字中医药·

本文引用:王杰,邹德宝,李琰,王志洲,金鑫,候燕,王金凤,石威,姜红江. 基于网络药理学结合实验验证探究骨碎补防治绝经后骨质疏松症的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(9): 1476-1484.

基于网络药理学结合实验验证探究骨碎补防治绝经后骨质疏松症的作用机制

王杰¹, 邹德宝², 李琰², 王志洲¹, 金鑫², 候燕², 王金凤², 石威¹, 姜红江^{1,2*}

(1.安徽中医药大学第一临床医学院,安徽合肥 230000;2.山东省文登整骨医院,山东威海 264400)

[摘要] 目的 通过网络药理学的途径探究骨碎补防治绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)的有效物质成分与潜在的分子作用机制,并借助动物实验进行验证。方法 通过TCMSP数据库挖掘骨碎补的主要化学成分,根据ADME功能结合SwissTargetPrediction平台筛选出药物活性成分,并通过UniProt数据库进行靶点预测;通过GeneCards、OMIM、DrugBank、TTD数据库对PMOP主要作用靶点进行检索,借助STRING平台对药物、PMOP共同靶点创建PPI网络图;然后借助DAVID数据库进行GO和KEGG分析,并使用Cytoscape 3.8.0软件构建“靶点-通路”图。将40只雌鼠随机均分为空白组、假手术组、模型组及骨碎补组。由摘除大鼠双侧卵巢的方式构建PMOP模型,不间断灌胃12周,腹主动脉取血后处死,留取血清标本及双侧股骨进行雌二醇(estradiol, E₂)、骨源性碱性磷酸酶(bone alkaline phosphatase, BALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)及骨密度(bone mineral density, BMD)检测。结果 筛选得到骨碎补治疗PMOP的主要活性成分为柚皮苷、木犀草素及山柰酚等,核心作用靶点包含MAPK1、MAPK3、TNF、TGF-β1等,通过Pathways in cancer、PI3K-Akt、TNF、HIF-1等信号通路参与调控PMOP。动物实验结果显示,空白组大鼠E₂、BALP、TRAP血清含量与假手术组相比,差异无统计学意义($P>0.05$);模型组大鼠E₂、BALP血清含量明显低于假手术组($P<0.01$),TRAP血清含量明显高于假手术组($P<0.01$);骨碎补组大鼠E₂、BALP血清含量较模型组明显增高($P<0.05$, $P<0.01$),TRAP血清含量比模型组明显下降($P<0.05$)。空白组大鼠股骨BMD与假手术组相比无统计学差异($P>0.05$);模型组大鼠股骨BMD明显低于假手术组($P<0.01$);骨碎补组大鼠股骨BMD高于模型组($P<0.05$)。结论 本研究证实了骨碎补防治PMOP具有多成分、多靶点、多通路的特点,能为PMOP的临床用药提供一定的理论参考和新药研发提供实验依据。

[关键词] 网络药理学;骨碎补;绝经后骨质疏松症;信号通路;作用机制;实验验证;骨密度

[中图分类号] R274

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.09.010

Mechanism of Gusuibu (*Drynariae Rhizoma*) in preventing and treating postmenopausal osteoporosis based on network pharmacology combined with experimental verification

WANG Jie¹, ZOU Debao², LI Yan², WANG Zhizhou¹, JIN Xin², HOU Yan², WANG Jinfeng²,
SHI Wei¹, JIANG Hongjiang^{1,2*}

(1. The First Clinical School of Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230000, China;

2. Shandong Wendeng Osteopathic Hospital, Weihai, Shandong 264400, China)

[Abstract] **Objective** To explore the active components and potential molecular mechanisms of Gusuibu (*Drynariae Rhizoma*) in preventing and treating postmenopausal osteoporosis (PMOP) by network pharmacology, and to verify by animal experiments. **Methods** The main chemical components of Gusuibu (*Drynariae Rhizoma*) were mined through the TCMSP database, and the active

[收稿日期] 2022-03-11

[基金项目] 山东省中医药科技发展计划项目(2019-0798)。

[第一作者] 王杰,男,硕士研究生,研究方向:骨与关节损伤。

[通信作者] *姜红江,男,博士,教授,主任医师,硕士研究生导师, E-mail: boneman@163.com。

components of the drug were screened according to the ADME function combined with the SwissTargetPrediction platform, and the target was predicted through the UniProt database. The main targets of PMOP were searched through GeneCards, OMIM, DrugBank, and TTD databases. The STRING platform was used to create PPI network diagram for the common target of drug and PMOP. GO analysis and KEGG analysis were performed with the help of DAVID database, and the "target-pathway" network map was constructed with Cytoscape 3.8.0 software. A total of 40 female rats were randomly divided into blank group, sham operation group, model group and Gusuibu (*Drynariae Rhizoma*) group. The PMOP model was constructed by removing the bilateral ovaries of the rats. The rats were given continuous gavage for 12 weeks. The abdominal aorta was collected for blood, and the rats were sacrificed. Serum samples and bilateral femurs were collected for the detection of estradiol (E_2), bone alkaline phosphatase (BALP), tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) and bone mineral density (BMD). **Results** The main active components of Gusuibu (*Drynariae Rhizoma*) in the treatment of PMOP were naringin, luteolin and kaempferol. The main targets included MAPK1, MAPK3, TNF, TGF- β 1, etc., and participated in the regulation of PMOP through Pathways in cancer, PI3K-Akt, TNF, HIF-1 and other signaling pathways. The results of animal experiments showed that there was no statistical difference in serum levels of E_2 , BALP and TRAP between the blank group and the sham operation group ($P>0.05$). The serum levels of E_2 and BALP in the model group were significantly lower than those in the sham operation group ($P<0.01$), and the serum levels of TRAP in the model group were significantly higher than those in the sham operation group ($P<0.01$). The serum levels of E_2 and BALP in the Gusuibu (*Drynariae Rhizoma*) group were significantly higher than those in the model group ($P<0.05$, $P<0.01$), and the serum levels of TRAP in the Gusuibu (*Drynariae Rhizoma*) group were significantly lower than those in the model group ($P<0.05$). There was no statistical difference in the BMD of femur of the blank group compared with the sham operation group ($P>0.05$); the BMD of femur of the model group were significantly lower than those of the sham operation group ($P<0.01$); the BMD of femur of rats in the Gusuibu (*Drynariae Rhizoma*) group was higher than that in the model group ($P<0.05$). **Conclusion** This study confirms that Gusuibu (*Drynariae Rhizoma*) has the characteristics of being multi-component, multi-target and multi-pathway in the prevention and treatment of PMOP, which can provide a certain theoretical reference for the clinical drug use of PMOP and experimental basis for new drug research and development.

[**Keywords**] network pharmacology; Gusuibu (*Drynariae Rhizoma*); postmenopausal osteoporosis; signaling pathway; mechanism of action; experimental verification; bone mineral density

骨质疏松症(osteoporosis, OP)作为一种代谢性骨病,具有全身发病、骨量减少和骨小梁微结构破坏等表现,以骨皮质变薄、骨小梁之间失去连接为典型病理特征^[1],从而增加骨的脆性,使骨折发生率大幅提升。OP可分为I型(原发性)和II型(继发性)2种。绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是I型骨质疏松症中最高发的类型^[2]。有研究发现,全球范围内PMOP已成为绝经后妇女的多发病^[3-4],这一现象主要归因于绝经后女性雌激素含量大幅减少。雌激素对保持骨内成骨和破骨功能平衡发挥主要调控作用,所以绝经后妇女出现骨质疏松的主要原因之一就是体内雌激素减少^[5]。

目前,治疗PMOP的方法主要是通过药物升高雌激素水平、补充钙剂、促进钙吸收、刺激成骨和抑制破骨等,但治疗效果均不太理想。近年来,中医药防治PMOP逐渐受到越来越多的关注。

PMOP是现代医学病名,中医古籍中并无相关

描述。根据其症状可归为“骨痿”。中医理论分析“骨痿”发病多因肾精亏虚,进而生髓乏源,导致骨骼失养。根据“肾藏精,主骨生髓”的理论,中医以骨碎补、淫羊藿、杜仲等补肾中药为主对骨痿进行防治。骨碎补属于水龙骨科植物槲蕨的根茎,具有补肾壮骨、活血疗伤的功效^[6]。现代药理研究证实,骨碎补有效成分主要为黄酮类、三萜类及木脂素等^[7]。既往药理及临床研究已证实,骨碎补具备优良的抗骨质疏松和促进骨折愈合的功效^[8-10],但其治疗PMOP的具体作用机制尚不明确。因此,有必要基于网络药理学和动物实验验证的方法进一步展开研究。

网络药理学是一种多学科融合而形成的新学科,能够较为全面地反应在分子水平上药物对疾病网络的作用机制^[11]。此次研究借助网络药理学的手段,从骨碎补的化学成分基础出发,更加系统地深入探究骨碎补治疗PMOP的主要靶点和潜在的分子作用机制,并通过雌性大鼠去势构建PMOP模型,观察

不同组别大鼠血清 E_2 水平、骨代谢指标及骨密度的变化,来探究骨碎补防治 PMOP 的机制。以期为 PMOP 的防治提供理论依据,同时给新药开发提供新思路。

1 网络药理学

1.1 骨碎补相关靶点筛选

通过 TCMS^[12]平台检索骨碎补的化学成分并按口服药物生物利用度 $\geq 30\%$ 、类药性 ≥ 0.18 ^[13]两个 ADME 属性值对活性成分进行筛选,结合 SwissTargetPrediction 平台,勾选“Homo sapiens”选项查找药物作用的有效蛋白质靶点。

1.2 骨碎补活性成分-靶点网络

蛋白质靶点筛选完成后借助 Uniprot 数据库将与化合物相关联的蛋白质靶点进行标准化,使用 Cytoscape 3.8.0^[14]构建骨碎补活性成分-靶点网络。

1.3 PMOP 相关靶点筛选

通过检索 OMIM 数据库^[15]、GeneCards 数据库^[16]、TTD 数据库^[17]中 PMOP 的潜在靶点,设置“post-menopausal osteoporosis”为关键词,结合 DrugBank 数据库挖掘防治 PMOP 的临床药物作用靶点^[18]。将上述 4 个数据库靶点联合去重,获取 PMOP 的靶点。

1.4 PPI 网络构建

为确定骨碎补相关靶点与 PMOP 潜在靶点之间的关系,运用 Venny 2.1.0 平台将骨碎补相关成分靶点与 PMOP 潜在靶点取交集并制作韦恩图。运用 STRING 平台^[19]制作 PPI 网络图。

1.5 骨碎补成分-PMOP 靶点功能与通路的富集分析

将骨碎补防治 PMOP 的靶点录入 DAVID 平台,获取疾病生物学过程及其信号通路并加以富集分析,将获得的 4 个数据库资料设置 Count 值为 2、 $P < 0.05$;根据 Count 值选用 TOP10、TOP20 数据,采用微生信平台制作 GO 富集分析条形图、KEGG 通路富集分析气泡图。为更加直观地显示骨碎补治疗 PMOP 所涉及 KEGG 通路的相关靶点,借助 Cytoscape 3.8.0 构建“靶点-信号通路”网络图。

2 实验验证

2.1 动物与材料

40 只 8 周龄 SPF 级雌性 SD 大鼠,体质量 220~

250 g[许可证号 SCXK(鲁)20190003,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司],玉米芯垫料、SPF 级大小鼠繁殖饲料(广东省医学实验动物中心)。实验通过山东省文登整骨医院伦理委员会批准,批准号:LL2021052701。动物饲养于山东省文登整骨医院动物实验室大鼠 IVC 独立送风隔离笼具内,笼内温度 22~26 °C,相对湿度设定 40%~70%,昼夜节律 12 h 间隔照明。

2.2 试剂与仪器

骨碎补中药饮片来自山东省文登整骨医院; E_2 检测试剂盒(批号:PE223)、BALP 检测试剂盒(批号:P0321S)、TRAP 检测试剂盒(批号:P0332)均购自上海碧云天生物技术有限公司;苯巴比妥钠注射液(批号:2103071,天津金耀药业有限公司);0.9% 氯化钠注射液(批号:2101010523,辰欣药业股份有限公司);75%乙醇(批号:210107,山东利尔康医疗科技股份有限公司);Micro CT(型号:NMC-100,平生医疗科技有限公司);离心机(型号:Sorvall ST 16R,赛默飞世尔科技公司)。

2.3 方法

2.3.1 分组与造模 40 只雌鼠经 7 d 适应性喂养后,按随机数字表法分成空白组、假手术组、模型组、骨碎补组,每组 10 只。空白组无手术干预,其余各组大鼠分别用苯巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉,麻醉完成后行术区备皮,75%乙醇消毒,经背侧腰椎旁入路各做一纵切口,长约 1.5 cm,逐层切开各层组织直至腹腔,模型组和骨碎补组大鼠摘除双侧卵巢,假手术组摘除卵巢周围等量脂肪,术区止血,缝合切口。术后各组大鼠切口按时消毒,定期更换垫料,预防感染。

2.3.2 骨碎补煎液制备 骨碎补饮片 100 g 置于锅中,加三蒸水浸泡 60 min,调整液面,大火煮沸,继续用小火煮 30 min,滤出煎液,锅中再次加入水,二煎,火候控制同前,时长 20 min,同前滤出煎液,与头煎汤液混合,继续文火蒸馏至 100 mL,得到骨碎补煎液(1 g/mL),4 °C 储存备用。

2.3.3 给药 继续饲养 2 周后给药,灌胃剂量根据动物与人体间的等效剂量换算方法,成人记为 a,大鼠记为 b。 $D、R、S$ 分别代表剂量、换算系数和校正系数,公式如下: $Db = Da \times R \times Sb$ ^[20]。成人取标准体质量 60 kg,给药前大鼠平均体质量约 300 g。得到骨碎补煎液灌胃剂量(6.1 g/kg),其余各组每天灌胃相应体积生理盐水。每 14 天再次称重调整灌胃剂量。每

天灌胃1次,持续12周。灌胃结束后全部大鼠依次麻醉,行腹主动脉取血,离心后留取血清并分离双侧股骨。

2.3.4 检测指标及方法 采集不同组别大鼠血清,依照各检测指标检测试剂盒使用说明进行雌二醇(estradiol, E2)、骨源性碱性磷酸酶(bone alkaline phosphatase, BALP)及抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)检测,运用 Micro CT 行大鼠股骨BDM检测,并通过自带软件对股骨近端和远端进行骨密度(bone mineral density, BDM)分析。

2.3.5 统计学分析 数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。采用两独立样本 *t* 检验,使用 SPSS 25.0 统计软件进行处理。取显著性 $\alpha=0.05, P<0.05$ 代表差异有统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学研究结果

3.1.1 骨碎补活性成分与靶点的获取 初步提取骨碎补的化学成分71种,有效成分作用靶点587个。经 ADME 筛选和 SwissTargetPrediction 平台补充后,删去不能获取信息的成分,共获得骨碎补16种有效活性成分,有效成分对应的靶点171个。包括柚皮苷、山柰酚和木犀草素等。利用 Cytoscape 3.8.0 对骨碎补成分连同作用靶点的关系网络进行绘制。详见图1。

3.1.2 PMOP 相关靶点的获取 从 GeneCards 数据库中获得 PMOP 潜在靶点,然后结合 OMIM、Drug-Bank、TTD 数据库对相关靶点进行补充,合并上述数据库有关靶点后除去重复值,最终获取611个PMOP有关靶点。

3.1.3 PPI 网络的构建 将筛选出来的药物有效活性成分靶点与 PMOP 靶点取交集,并借助 Venny 平

台制作韦恩图,得到骨碎补药物成分-PMOP 共同靶点74个,见图2。运用 STRING 平台构建骨碎补和 PMOP 共同靶点的PPI网络。详见图3。

3.1.4 靶点功能与通路的富集分析 应用 DAVID 数据平台对获取的74个潜在靶点进行信号通路GO富集分析,分别选取 Top10 运用微生信平台对结果进行可视化,见图4。由结果可见多个靶点的功能与 PMOP 的发病紧密联系。骨碎补参与的重要生物过程包含 RNA 聚合酶 II 启动子的转录正调节、氧化还原过程、凋亡过程的负调节和信号转导等。在细胞组分中,主要作用于细胞核、细胞质和质膜等。相关靶点调节 PMOP 的分子功能主要富集于蛋白结合、酶结合和蛋白质同源二聚化活性等。将 KEGG 通路 Top 20 结果绘制成气泡图,见图5。KEGG 富集通路提示骨碎补可能通过 Pathways in cancer、PI3K-Akt、TNF、HIF-1 等信号通路和 MAPK1、MAPK3、TNF、TGF- β 1 等主要靶点参与调控 PMOP。通过 Cytoscape 3.8.0 对骨碎补治疗 PMOP 所涉及 KEGG 通路的相关靶点进行可视化,见图6。

3.2 骨碎补对模型大鼠的作用

3.2.1 各组大鼠 E₂、BALP、TRAP 水平比较 与空白组相比,假手术组大鼠血清 E₂、BALP、TRAP 含量均无统计学差异($P>0.05$)。与假手术组相比,模型组大鼠血清 E₂、BALP 含量下降($P<0.01$),TRAP 含量增高($P<0.01$)。与模型组相比,骨碎补组大鼠血清 E₂、BALP 升高($P<0.05, P<0.01$),TRAP 降低($P<0.05$)。详见表1。

3.2.2 各组大鼠股骨 BDM 比较 与空白组相比,假手术组大鼠股骨近端和远端 BDM 水平均无统计学差异($P>0.05$)。与假手术组相比,模型组大鼠股骨近端和远端 BDM 水平显著降低($P<0.01$)。与模型组相比,骨碎补组大鼠股骨近端和远端 BDM 水平升高

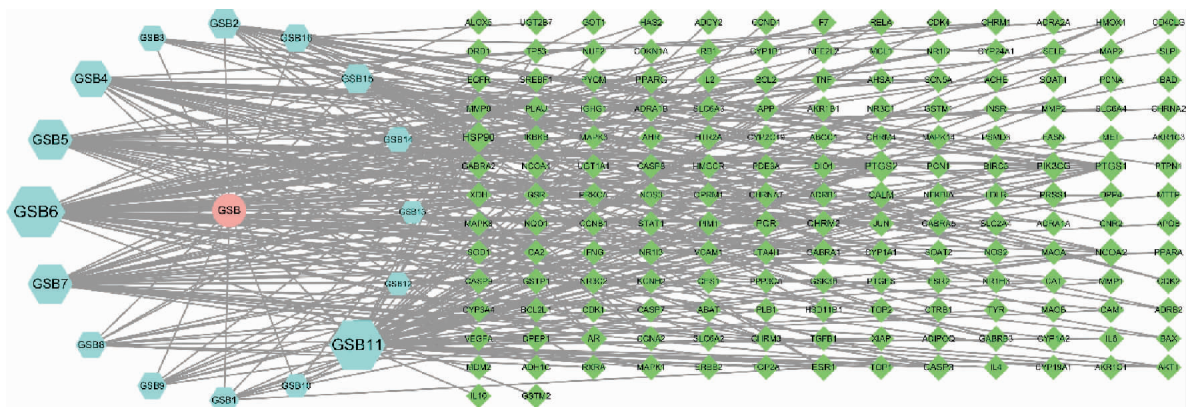


图1 骨碎补活性成分-靶点图

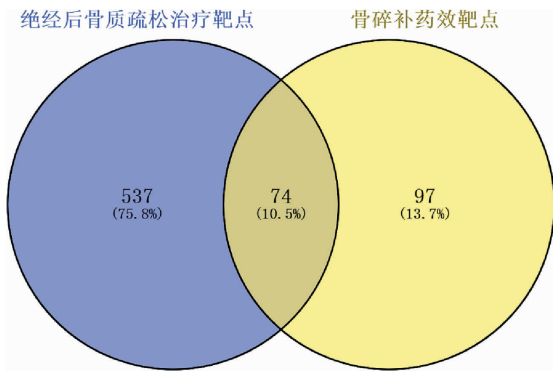


图 2 骨碎补药物成分-PMOP 靶点韦恩图

($P < 0.05$), 见表 2。空白组和假手术组大鼠骨小梁结构正常, 模型组大鼠骨小梁稀疏、断裂, 骨碎补组大鼠骨小梁稀疏、断裂程度较模型组轻, 但仍有破坏。详见图 7。

4 讨论

随着人口老龄化的加剧, 我国老年人比例不断上升, 因骨质疏松所造成的病理性骨折的发生率逐年增加, 尤其是绝经后女性更为严重, 使家庭和社会

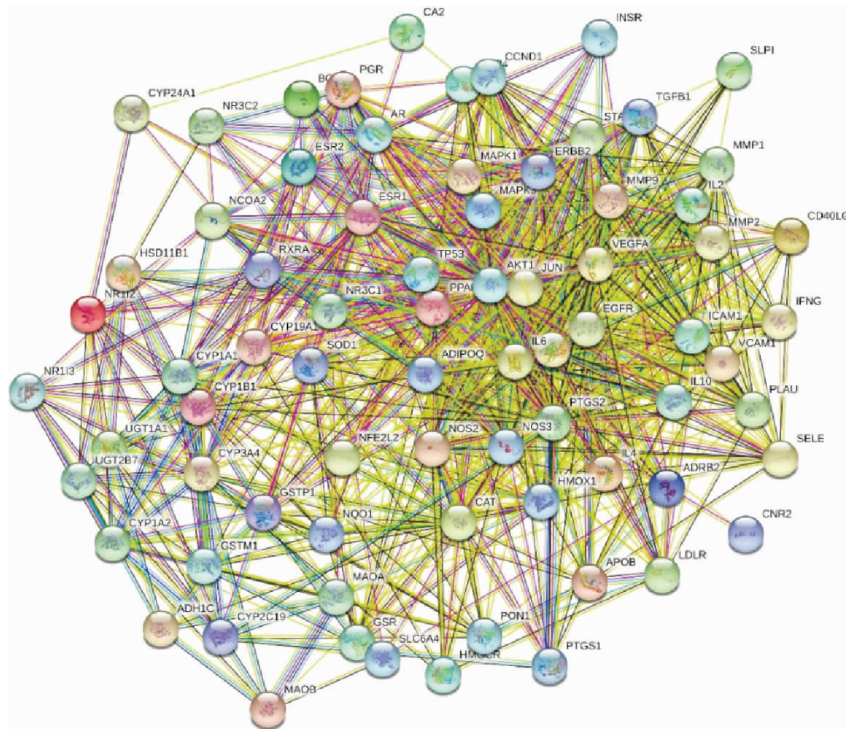


图 3 骨碎补-PMOP 靶点 PPI 网络图

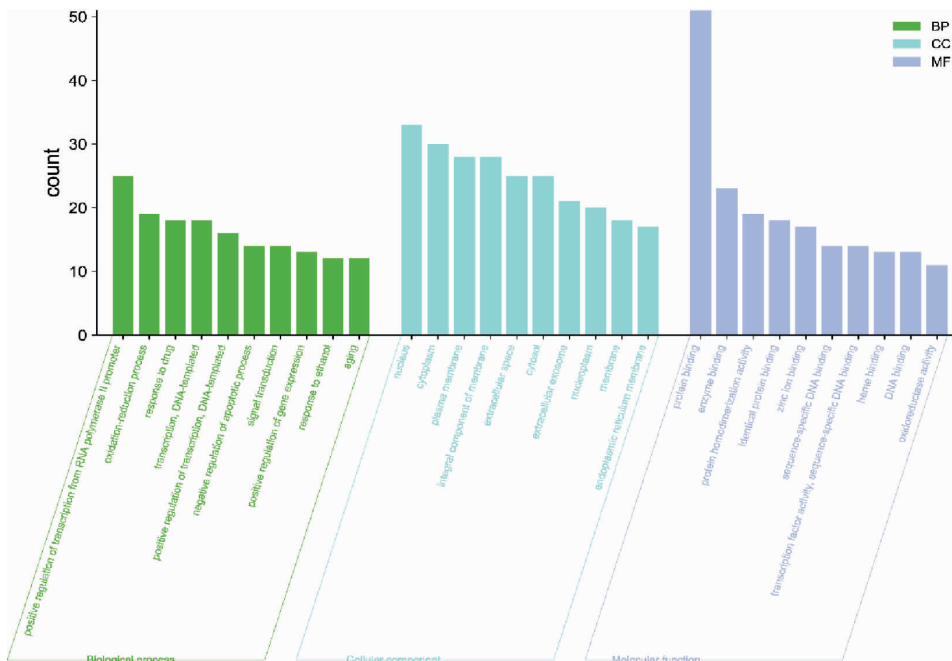


图 4 靶点 GO 富集分析条形图

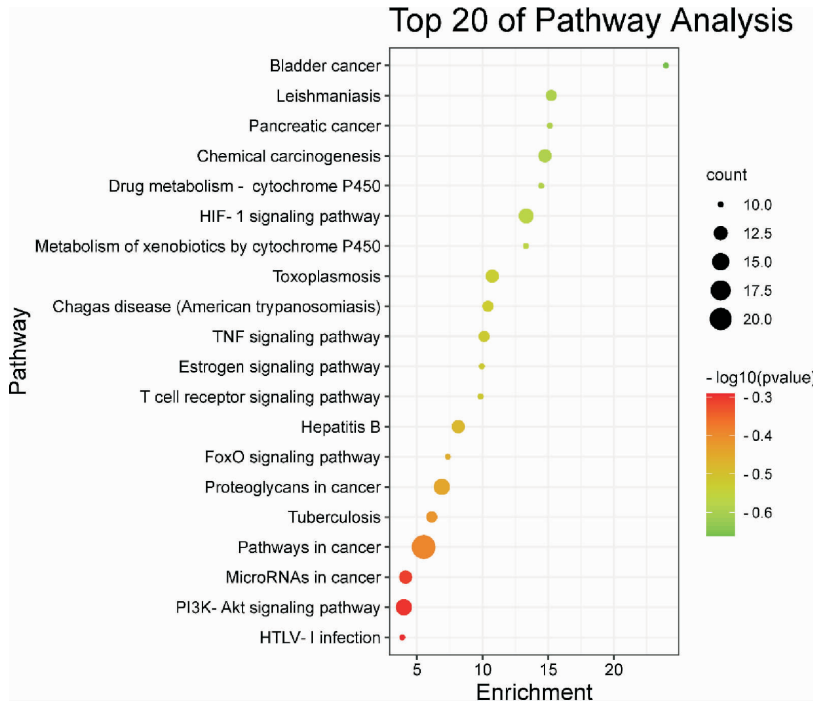


图 5 靶点 KEGG 通路富集分析气泡图

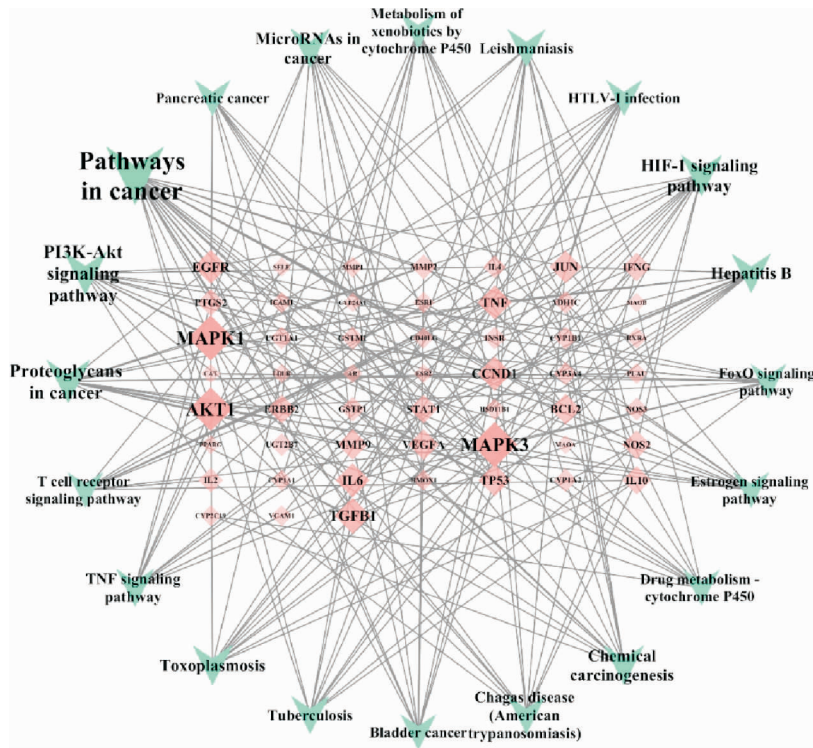


图 6 骨碎补防治 PMOP“靶点-信号通路”网络图

注:倒三角形代表通路,菱形代表靶点。

表 1 各组大鼠血清 BALP、E₂、TRAP 含量($\bar{x} \pm s, n=10$)

| 组别 | BALP/($\mu\text{g/L}$) | E ₂ /(ng/L) | TRAP/(ng/L) |
|------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 空白组 | 217.72±20.53 | 8.09±1.38 | 2.24±0.13 |
| 假手术组 | 218.30±17.23 [#] | 8.15±1.46 [#] | 2.25±0.10 [#] |
| 模型组 | 135.00±10.24 [△] | 5.31±0.72 [△] | 2.86±0.17 [△] |
| 骨碎补组 | 176.39±12.79 [*] | 6.30±0.91 ^{**} | 2.51±0.17 ^{**} |

注:与假手术组相比,[△]P<0.01;与模型组相比,^{*}P<0.01,^{**}P<0.05。

表 2 各组大鼠股骨近端、远端 BDM 水平($\bar{x} \pm s, n=10, \text{g/cm}^2$)

| 组别 | 股骨近端 BDM | 股骨远端 BDM |
|------|--------------------------------|--------------------------------|
| 空白组 | 0.212 39±0.012 62 | 0.262 20±0.013 08 |
| 假手术组 | 0.215 63±0.013 29 [#] | 0.262 61±0.013 49 [#] |
| 模型组 | 0.179 79±0.016 54 [△] | 0.216 13±0.014 72 [△] |
| 骨碎补组 | 0.206 31±0.007 90 [*] | 0.258 52±0.016 61 [*] |

注:与假手术组相比,[△]P<0.01;与模型组相比,^{*}P<0.05。

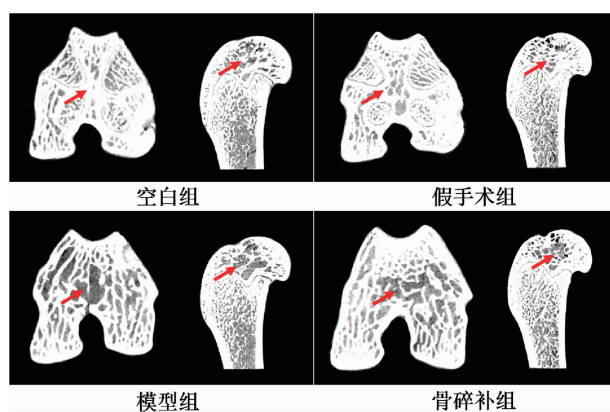


图7 各组大鼠股骨近端、远端CT断层扫描
注:与假手术组相比,[△] $P<0.01$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$ 。

承受了极大的经济压力,已经成为社会面临的严重挑战^[21]。根据国家卫生健康委员会2018年调查结果表明,我国超过50岁居民发病率为19.2%,超过65岁居民发病率达到32.0%,且女性患病率较男性显著提高^[22]。研究证实,在绝经后女性中,雌激素分泌减少能够刺激破骨细胞分化,增加骨细胞凋亡,并抑制成骨细胞分化功能^[23-24]。BALP和TRAP作为反映骨形成和骨吸收的敏感指标,常用于监测机体骨代谢情况^[25]。骨密度是诊断OP的重要指标,具有较广泛的临床应用。PMOP发病往往伴随着BALP和TRAP水平变化和骨密度下降。

根据中医学理论,PMOP可归为“骨痿”范畴。中医古籍关于“骨痿”的描述最早见于《素问·痿论篇》:“肾主身之骨髓……骨枯而髓减,发为骨痿。”骨碎补作为传统中药材,具有悠久的药用历史^[26]。《开宝本草》曰:“骨碎补主破血,止血,补伤折。”其补肾益精、续筋接骨的功效被历代医家广泛地用于治疗各种骨伤科疾病。

本实验结果发现,空白组与假手术组大鼠各项指标均无统计学差异。与假手术组比较,模型组大鼠血清 E_2 、BALP和BMD显著下降($P<0.01$),TRAP明显升高($P<0.01$),提示造模成功。骨碎补组大鼠血清 E_2 、BALP和BMD均高于模型组($P<0.01$),TRAP水平较模型组降低($P<0.01$),说明骨碎补能够改善PMOP大鼠 E_2 水平,促进成骨细胞功能,抑制破骨细胞活性,同时能够提高骨密度,从而对PMOP发挥治疗作用。

由于骨碎补的化学组成成分复杂,决定了其发挥药理作用可能是通过多个治疗疾病的信号通路、蛋白靶点进行调节,以发挥相应的作用。本研究共

筛选出骨碎补可能的活性成分16个,其中柚皮苷、木犀草素和山柰酚等成分拥有较多的预测靶点,说明这些化合物可能是骨碎补治疗PMOP的重要活性成分。柚皮苷作为一种天然黄酮类物质,已有研究证实其能促进微循环,改善成骨细胞增殖和分化^[27]。柚皮苷能提高BMP-2等成骨细胞标志蛋白的表达水平,同时还能减少NF- κ B和ERK信号转导和破骨细胞基因的蛋白表达水平,进而影响破骨细胞形成,起到缓解骨质疏松的作用^[28-29]。骨碎补中另一种主要化合物木犀草素也属于黄酮类,有研究证实,木犀草素能缓解甲基乙醛对成骨细胞MC3T3-E1的损伤,可能对糖尿病骨病的预防起作用^[30]。其他体内外实验^[31]指出木犀草素可能通过降低破骨细胞分化能力和功能来减少PMOP的骨流失。山柰酚作为骨碎补的重要有效成分,对防治OP有一定效果,能够缓解因雌激素减少所导致的大鼠骨微结构紊乱^[32]。WONG等^[33]提出山柰酚是通过调控雌激素受体、BMP-2、MAPK等信号通路来实现抗骨质疏松的作用。另有研究证实山柰酚可以参与雌激素信号转导,激活Wnt信号通路,从而起到骨保护的功功效^[34]。

根据PPI网络图,得到骨碎补防治PMOP的靶点包括MAPK1、MAPK3、TNF、TGF- β 1等,表明骨碎补防治PMOP具有多成分、多靶点的特点。作为MAPK家族的主要成员,MAPK1、MAPK3基因通过编码相关蛋白介入细胞信号转导,调控细胞增殖、分化和凋亡等。研究证实,来源于大鼠骨髓间充质干细胞的外泌体,可通过MAPK途径产生促进成骨细胞增殖作用,进而延缓OP的进程^[35]。TNF- α 作为TNF的一种类型,通过炎症反应参与骨重塑,具有刺激OC形成和调控成骨细胞作用,在维持骨稳态中有重要功能^[36]。研究证实,TNF- α 通过提升巨噬细胞及干细胞中NF- κ B受体激活因子水平,并促进RANKL与其受体RANK结合进而刺激OC的增殖和分化^[37]。TGF- β 1是TGF- β 的亚型,在骨组织中含有丰富,在骨发育及重建过程中具有重要调节作用^[38]。刘元等^[39]借助动物实验证实蛇床子素能够降低去卵巢大鼠血清BGP含量,升高TGF- β 1水平,表明蛇床子素能够调节大鼠激素水平,明显改善去势雌鼠的骨代谢异常,增加骨密度,进而防治骨质疏松。

KEGG通路富集分析显示,骨碎补对PMOP的防治作用主要通过Pathways in cancer、PI3K-Akt、

TNF、HIF-1 等信号通路。Pathways in cancer 较为复杂,包括 Wnt 信号通路、Hedgehog 信号通路、Notch 信号通路等多个下游通路^[40]。其中,Wnt 蛋白是一组分泌的糖蛋白,是促进成骨细胞分化和活性的重要调节因子^[41]。ZHU 等^[42]证实,PI3K/Akt 信号通路具有促进成骨细胞增殖、分化和成骨作用而缓解骨质疏松。TNF 主要介导细胞凋亡及炎症和机体免疫,参与调节包括糖尿病、骨质疏松症、多发性硬化症和类风湿关节炎等多种疾病的发病机制^[43]。陈鹏等^[44]发现 TNF- α 通过介导 NF- κ B 来增加 RANKL 诱导的破骨细胞形成以防治 PMOP。已有研究证实,HIF-1 具有促进破骨细胞形成、增强破骨细胞活性的作用^[45-46]。该通路在组织缺氧时紧密参与了血管形成、骨吸收和骨生成的修复过程^[47]。由此预测,骨碎补可通过 Pathways in cancer、PI3K-Akt、TNF、HIF-1 等信号通路和 MAPK1、MAPK3、TNF、TGF- β 1 等靶点达到改善骨量的目的,对 PMOP 有治疗效果。

综上所述,本研究采用网络药理学结合动物实验验证的方法探讨了骨碎补治疗 PMOP 的潜在作用机制,证实了骨碎补治疗 PMOP 具有多成分、多靶点、多途径的作用机制特征。课题组拟在后续研究中基于不同骨碎补药物浓度进一步探讨骨碎补治疗 PMOP 作用机制及作用效果,为现代药物研发提供思路。

参考文献

- [1] 罗丽梅,李杰,杨帆,等.骨质疏松发病机制及治疗药物研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2020,26(4):610-614, 624.
- [2] 陈桐莹,万雷,刘少津,等.绝经后骨质疏松症相关的 lncRNA 研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2019,25(11):1631-1636.
- [3] RINGE J D. Plain vitamin D or active vitamin D in the treatment of osteoporosis: Where do we stand today? [J]. Archives of Osteoporosis, 2020, 15(1): 182.
- [4] YANG D S, LIU T, JIANG G Y, et al. Senkyunolide H attenuates osteoclastogenesis and postmenopausal osteoporosis by regulating the NF- κ B, JNK and ERK signaling pathways [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2020, 533(3): 510-518.
- [5] KLEIN-NULEND J, VAN OERS R F M, BAKKER A D, et al. Bone cell mechanosensitivity, estrogen deficiency, and osteoporosis[J]. Journal of Biomechanics, 2015, 48(5): 855-865.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [7] 谌顺清,梁伟,张雪妹,等.骨碎补化学成分和药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2021,46(11):2737-2745.
- [8] 杨同岗,王晓英,郝延科,等.骨碎补抗骨质疏松作用机理的研究进展[J].陕西中医,2017,38(5):677-678.
- [9] 眭承志.骨碎补总黄酮治疗骨质疏松症作用机理实验研究进展[J].中华中医药学刊,2010,28(6):1272-1274.
- [10] 李晋玉,赵学千,孙旗,等.骨碎补总黄酮的实验及临床研究概况[J].中国骨质疏松杂志,2018,24(10):1357-1364.
- [11] 陈海彬,周红光,李文婷,等.网络药理学:中药复方作用机制研究新视角[J].中华中医药杂志,2019,34(7):2873-2876.
- [12] RU J L, LI P, WANG J N, et al. TCMPSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. Journal of Cheminformatics, 2014, 6: 13.
- [13] LI J S, ZHAO P, LI Y, et al. Systems pharmacology-based dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Bufei Yishen as an effective treatment for chronic obstructive pulmonary disease[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 15290.
- [14] OTASEK D, MORRIS J H, BOUCAS J, et al. Cytoscape Automation: Empowering workflow-based network analysis[J]. Genome Biology, 2019, 20(1): 185.
- [15] AMBERGER J S, BOCCHINI C A, SCHIETTECATTE F, et al. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 43(D1): D789-D798.
- [16] SAFRAN M, DALAH I, ALEXANDER J, et al. GeneCards Version 3: The human gene integrator[J]. Database, 2010, 2010: baq020.
- [17] WANG Y X, ZHANG S, LI F C, et al. Therapeutic target database 2020: Enriched resource for facilitating research and early development of targeted therapeutics[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 48(D1): D1031-D1041.
- [18] WISHART D S, FEUNANG Y D, GUO A C, et al. DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018 [J]. Nucleic Acids Research, 2017, 46(D1): D1074-D1082.
- [19] SZKLARCZYK D, GABLE A L, LYON D, et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 47(D1): D607-D613.
- [20] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等.药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J].中国临床药理学与治疗学,2004,9(9):1069-1072.
- [21] 郑秀霞,林应华,黄雯晖,等.原发性骨质疏松症中医辨证分型研究[J].中医临床研究,2019,11(25):50-52.
- [22] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会.中国骨质疏松症流行病学调查及“健康骨骼”专项行动结果发布[J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2019,12(4):317-318.
- [23] OLÍMPIO R M C, MORETTO F C F, DE SIBIO M T, et al. The importance of estrogen for bone protection in experimental hyperthyroidism in human osteoblasts[J]. Life Sciences, 2019,

- 231: 116556.
- [24] JIANG M, WANG T Q, YAN X M, et al. A novel Rhein derivative modulates bone formation and resorption and ameliorates estrogen-dependent bone loss [J]. *Journal of Bone and Mineral Research: the Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 2019, 34(2): 361-374.
- [25] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会.骨转换生化标志物临床应用指南[J].中华内分泌代谢杂志,2021,37(10):863-874.
- [26] 尹子丽,谭文红,冯德强,等.骨碎补的本草考证及炮制、药用历史沿革[J].中国药房,2019,30(12):1725-1728.
- [27] 李定,李悦,黄枫,等.骨碎补总黄酮在诱导膜技术中对骨缺损区域血管形成和成骨质量的影响[J].中华中医药杂志, 2019,34(11): 5086-5089.
- [28] XU Z W, LI N H, WOOLEY P H, et al. Naringin promotes osteoblast differentiation and effectively reverses ovariectomy-associated osteoporosis[J]. *Journal of Orthopaedic Science*, 2013, 18(3): 478-485.
- [29] WU J B, FONG Y C, TSAI H Y, et al. Naringin-induced bone morphogenetic protein-2 expression via PI3K, Akt, c-Fos/c-Jun and AP-1 pathway in osteoblasts[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2008, 588(2/3): 333-341.
- [30] SUH K S, CHON S, CHOI E M. Luteolin alleviates methylglyoxal-induced cytotoxicity in osteoblastic MC3T3-E1 cells[J]. *Cytotechnology*, 2016, 68(6): 2539-2552.
- [31] JING Z, WANG C Y, YANG Q N, et al. Luteolin attenuates glucocorticoid-induced osteoporosis by regulating ERK/Lrp-5/GSK-3 β signaling pathway in vivo and in vitro[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(4): 4472-4490.
- [32] NOWAK B, MATUSZEWSKA A, NIKODEM A, et al. Oral administration of kaempferol inhibits bone loss in rat model of ovariectomy-induced osteopenia[J]. *Pharmacological Reports*, 2017, 69(5): 1113-1119.
- [33] WONG S K, CHIN K Y, IMA-NIRWANA S. The osteoprotective effects of kaempferol: The evidence from In vivo and In vitro studies[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2019, 13: 3497-3514.
- [34] SHARMA A R, NAM J S. Kaempferol stimulates WNT/ β -catenin signaling pathway to induce differentiation of osteoblasts[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2019, 74: 108228.
- [35] ZHAO P, XIAO L, PENG J, et al. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells improve osteoporosis through promoting osteoblast proliferation via MAPK pathway[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2018, 22(12): 3962-3970.
- [36] ZHAO B H. TNF and bone remodeling[J]. *Current Osteoporosis Reports*, 2017, 15(3): 126-134.
- [37] FENG W, GUO J, LI M Q. RANKL-independent modulation of osteoclastogenesis[J]. *Journal of Oral Biosciences*, 2019, 61(1): 16-21.
- [38] NICKEL J, TEN DIJKE P, MUELLER T D. TGF- β family coreceptor function and signaling[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2017, 50(1): 12-36.
- [39] 刘元,王立恒,伊璠.基于BGP,TGF- β 1的表达探究蛇床子素对去卵巢致骨质疏松大鼠的作用[J].中国中医药现代远程教育,2020,18(5):99-101.
- [40] 林适,吴潇烁,陈柏行,等.基于网络药理学探讨骨碎补治疗骨质疏松症的作用机制[J].中国药房,2019,30(10):1333-1338.
- [41] KARNER C M, LONG F X. Wnt signaling and cellular metabolism in osteoblasts [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2017, 74(9): 1649-1657.
- [42] ZHU J, TANG Y, WU Q, et al. HIF-1 α facilitates osteocyte-mediated osteoclastogenesis by activating JAK2/STAT3 pathway in vitro[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(11): 21182-21192.
- [43] CHEN G Q, GOEDEL D V. TNF-R1 signaling: A beautiful pathway[J]. *Science*, 2002, 296(5573): 1634-1635.
- [44] 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.
- [45] INDO Y, TAKESHITA S, ISHII K A, et al. Metabolic regulation of osteoclast differentiation and function [J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2013, 28(11): 2392-2399.
- [46] MIYAUCHI Y, SATO Y, KOBAYASHI T, et al. HIF1 α is required for osteoclast activation by estrogen deficiency in postmenopausal osteoporosis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(41): 16568-16573.
- [47] ZHANG W L, YUAN Z, PEI X H, et al. In vivo and in vitro characteristic of HIF-1 α and relative genes in ischemic femoral head necrosis[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2015, 8(6): 7210-7216.

(本文编辑 苏维)